Dokument ten służy wyłącznie do celów informacyjnych i nie ma mocy prawnej. Unijne instytucje nie ponoszą żadnej odpowiedzialności za jego treść. Autentyczne wersje odpowiednich aktów prawnych, włącznie z ich preambułami, zostały opublikowane w Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej i są dostępne na stronie EUR-Lex. Bezpośredni dostęp do tekstów urzędowych można uzyskać za pośrednictwem linków zawartych w dokumencie

►B

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) nr 152/2009

z dnia 27 stycznia 2009 r.

ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

(Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1)

zmienione przez:

		Dziennik Urzędowy		
		nr	strona	data
►M1	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 278/2012 z dnia 28 marca 2012 r.	L 91	8	29.3.2012
►M2	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 51/2013 z dnia 16 stycznia 2013 r.	L 20	33	23.1.2013
►M3	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 691/2013 z dnia 19 lipca 2013 r.	L 197	1	20.7.2013
►M4	Rozporządzenie Komisji (UE) nr 709/2014 z dnia 20 czerwca 2014 r.	L 188	1	27.6.2014
►M5	Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/645 z dnia 5 kwietnia 2017 r.	L 92	35	6.4.2017
►M6	Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/771 z dnia 3 maja 2017 r.	L 115	22	4.5.2017
►M7	Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2020/1560 z dnia 26 października 2020 r.	L 357	17	27.10.2020

▼B

ROZPORZĄDZENIE KOMISJI (WE) nr 152/2009

z dnia 27 stycznia 2009 r.

ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

▼M3

Artykuł 1

Pobieranie próbek do celów urzędowej kontroli pasz, w szczególności w zakresie oznaczania składników, w tym materiału zawierającego organizmy zmodyfikowane genetycznie, składającego się z nich lub produkowanego z nich, dodatków paszowych zdefiniowanych w rozporządzeniu (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady ([1]) oraz niepożądanych substancji zdefiniowanych w dyrektywie 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady ([2]) przeprowadzane jest zgodnie z metodami opisanymi w załączniku I.

Metoda pobierania próbek opisana w załączniku I ma zastosowanie do kontroli pasz w zakresie oznaczania pozostałości pestycydów zgodnie z definicją w rozporządzeniu (WE) nr 396/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady ([3]) oraz do kontroli zgodności z rozporządzeniem (UE) nr 619/2011.

▼B

Artykuł 2

Przygotowanie próbek do analizy i wyrażanie wyników odbywa się zgodnie z metodami opisanymi w załączniku II.

Artykuł 3

Badania do celów urzędowej kontroli pasz przeprowadzane są z wykorzystaniem metod określonych w załącznikach III (Metody analizy składu materiałów i mieszanek paszowych), IV (Metody analizy do celów kontroli poziomu dopuszczonych dodatków w paszach), V (Metody analizy do celów kontroli zawartości niepożądanych substancji w paszach) oraz VI (Metody analizy dotyczące oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz).

Artykuł 4

Wartość energetyczna mieszanek paszowych dla drobiu obliczana jest zgodnie z załącznikiem VII.

Artykuł 5

Określone w załączniku VIII metody analizy mające na celu kontrolę nielegalnej obecności w paszach dodatków, które już nie są dopuszczone, stosowane są do celów potwierdzania.

([1]) Dz.U. L 268 z 18.10.2003, s. 29.
([2]) Dz.U. L 140 z 30.5.2002, s. 10.
([3]) Dz.U. L 70 z 16.3.2005, s. 1.;

▼B

Artykuł 6

Dyrektywy 71/250/EWG, 71/393/EWG, 72/199/EWG, 73/46/EWG, 76/371/EWG, 76/372/EWG, 78/633/EWG, 81/715/EWG, 84/425/EWG, 86/174/EWG, 93/70/EWG, 93/117/WE, 98/64/WE, 1999/27/WE, 1999/76/WE, 2000/45/WE, 2002/70/WE i 2003/126/WE tracą moc.

Odesłania do uchylonych dyrektyw rozumiane są jako odesłania do niniejszego rozporządzenia i interpretuje zgodnie z tabelami korelacji w załączniku IX.

Artykuł 7

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się od dnia 26 sierpnia 2009 r.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

▼M3

ZAŁĄCZNIK I

METODY POBIERANIA PRÓBEK

1. CEL I ZAKRES

Próbki przeznaczone do urzędowej kontroli pasz pobierane są zgodnie z metodami opisanymi poniżej. Próbki otrzymane w ten sposób uważa się za reprezentatywne dla kontrolowanych części.

Celem reprezentatywnego pobierania próbek jest uzyskanie niewielkiej frakcji partii w sposób gwarantujący, że oznaczenie jakiejkolwiek cechy szczególnej tej frakcji stanowi średnią cech całej partii. Próbki danej partii można pobierać poprzez wielokrotne pobieranie próbek pierwotnych w różnych miejscach partii. Próbki pierwotne są łączone poprzez ich zmieszanie w celu stworzenia próbki zbiorczej, z której przygotowuje się reprezentatywne próbki końcowe poprzez podział reprezentatywny.

Jeżeli kontrola wzrokowa wskazuje, że części paszy, z której mają być pobrane próbki, różnią się jakością od pozostałej części paszy z tej samej partii, części te oddziela się od pozostałej części paszy i traktuje jako oddzielną podpartię. Jeżeli podział paszy na oddzielne podpartie nie jest możliwy, należy pobrać próbki z paszy jako z jednej partii. W takim przypadku informację o tym należy umieścić w sprawozdaniu z pobierania próbek.

Jeżeli pasza, z której pobrano próbki zgodnie z przepisami niniejszego rozporządzenia, zostaje uznana za niespełniającą wymogów UE, i jest ona częścią partii paszy tej samej klasy lub o takim samym opisie, uznaje się, że cała pasza należąca do tej partii nie spełnia tych wymogów, chyba że z przeprowadzonej szczegółowej oceny wynika, że nie ma dowodów wykazujących, że pozostała część partii nie spełnia wymogów UE.

2. DEFINICJE

— Partia: określona ilość paszy mająca wspólne cechy, takie jak pochodzenie, odmiana, rodzaj opakowania, pakujący, wysyłający lub etykietowanie, a w przypadku procesu produkcyjnego – jednostka produkcyjna wytworzona w jednym zakładzie z wykorzystaniem jednolitych parametrów produkcyjnych lub pewna ilość takich jednostek, w przypadku gdy są one produkowane w sposób ciągły i przechowywane razem.

— Kontrolowana część: partia lub określona część partii lub podpartii.

— Próbka zapieczętowana: próbka zapieczętowana w sposób uniemożliwiający dostęp do niej bez złamania lub usunięcia pieczęci.

— Próbka pierwotna: ilość pobrana z jednego miejsca kontrolowanej części.

— Próbka zbiorcza: sumaryczna ilość pierwotnych próbek pobranych z tej samej kontrolowanej części.

— Próbka zredukowana: część próbki zbiorczej otrzymana z niej w procesie reprezentatywnej redukcji.

— Próbka końcowa: część zredukowanej próbki lub zhomogenizowanej próbki zbiorczej.

— Próbka laboratoryjna: próbka przeznaczona do celów laboratoryjnych (otrzymana przez laboratorium), która może być próbką końcową, zredukowaną lub zbiorczą.

▼M3

3. PRZEPISY OGÓLNE

— Personel pobierający próbki: próbki pobierane są przez osoby upoważnione do tego celu przez właściwy organ.

— Próbka musi być zapieczętowana w sposób uniemożliwiający dostęp do niej bez złamania lub usunięcia pieczęci. Znak pieczęci musi być łatwo identyfikowalny i widoczny. Ewentualnie próbka może zostać umieszczona w pojemniku, który może być zamknięty w sposób uniemożliwiający jego ponowne otwarcie bez nieodwracalnego uszkodzenia pojemnika, co zapobiega jego ponownemu użyciu.

— Identyfikacja próbki: próbka musi być oznaczona w sposób trwały i być zidentyfikowana w sposób pozwalający na jej jednoznaczne powiązanie ze sprawozdaniem z pobierania próbek.

— Z każdej próbki zbiorczej pobierane są co najmniej dwie próbki końcowe: co najmniej jedna w celu kontroli (przestrzeganie przepisów) oraz jedna dla podmiotu działającego na rynku pasz (obrona). Jedna próbka końcowa może zostać pobrana do celów referencyjnych. Jeżeli kompletna próbka zbiorcza zostaje zhomogenizowana, próbki końcowe pobierane są ze zhomogenizowanej próbki zbiorczej, chyba że procedura taka jest sprzeczna z przepisami państw członkowskich dotyczącymi praw podmiotu działającego na rynku pasz.

4. SPRZĘT

4.1. Sprzęt do pobierania próbek musi być wykonany z materiałów, które nie zanieczyszczą kontrolowanego produktu. Sprzęt przeznaczony do wielokrotnego użytku musi być łatwy do utrzymania w czystości w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego.

4.2. **Sprzęt zalecany do pobierania próbek pasz stałych**

4.2.1. *Ręczne pobieranie próbek*

4.2.1.1. Szufelka o płaskim dnie i prostopadłych ściankach bocznych.

4.2.1.2. Ostrze probiercze z długą szczeliną lub z przegródkami. Wymiary ostrza probierczego muszą być dostosowane do charakterystyki kontrolowanej części (głębokość pojemnika, wymiary worka itp.) i do wielkości cząstek paszy.

Jeżeli ostrze probiercze ma kilka otworów, w celu zagwarantowania pobierania próbek w różnych miejscach wzdłuż ostrza, należy oddzielić je przegródkami lub zastosować naprzemienne otwory rozmieszczone sekwencyjnie.

4.2.2. *Mechaniczne pobieranie próbek*

Stosowne urządzenie mechaniczne może być użyte do pobierania próbek paszy w ruchu. „Stosowne” oznacza, że próbki zostają pobrane co najmniej z całego odcinka przepływu.

Pobieranie próbek paszy w ruchu (przy dużym natężeniu przepływu) może być prowadzone przy użyciu automatycznych urządzeń.

4.2.3. *Rozdzielacz*

Jeżeli jest to możliwe i stosowne, w celu przygotowania próbek zredukowanych w sposób reprezentatywny powinien być stosowany sprzęt przeznaczony do rozdzielania próbki na w przybliżeniu równe części.

▼M3

5. WYMOGI ILOŚCIOWE DOTYCZĄCE LICZBY PRÓBEK PIERWOTNYCH

— Wymogi ilościowe określone w pkt 5.1 i 5.2, dotyczące liczby próbek pierwotnych, mają zastosowanie do kontrolowanych części do wielkości maksymalnie 500 ton, które mogą być kontrolowane w reprezentatywny sposób. Procedura pobierania próbek jest ważna również w odniesieniu do rozmiarów większych niż podana wielkość maksymalna, pod warunkiem że zignorowana zostanie maksymalna liczba próbek pierwotnych podana w tabelach poniżej, zaś ilość próbek pierwotnych zostanie określona poprzez zastosowanie wzoru pierwiastkowego podanego w stosownej części procedury (zob. pkt 5.3), a minimalna wielkość próbki zbiorczej zostanie proporcjonalnie zwiększona. Powyższe nie stoi na przeszkodzie podzieleniu dużej partii na mniejsze podpartie i pobraniu próbek z każdej podpartii zgodnie z procedurą opisaną w pkt 5.1 i 5.2.

— Wielkość kontrolowanej części musi umożliwiać pobranie próbek każdej części składowej.

— W odniesieniu do bardzo dużych partii lub podpartii (> 500 ton) oraz partii transportowanych lub przechowywanych w sposób uniemożliwiający pobranie próbek zgodnie z procedurą przewidzianą w pkt 5.1 i 5.2 niniejszego rozdziału, stosuje się procedurę pobierania próbek przewidzianą w pkt 5.3.

— Jeżeli podmiot działający na rynku pasz jest prawnie zobowiązany do spełnienia wymogów niniejszego rozporządzenia w ramach obowiązkowego systemu monitorowania, może on odejść od spełnienia wymogów ilościowych przewidzianych w niniejszym rozdziale w celu uwzględnienia charakterystyki operacyjnej pod warunkiem wykazania, w sposób wymagany przez właściwy organ, równoważności procedury pobierania próbek w odniesieniu do reprezentatywności oraz po zatwierdzeniu przez właściwy organ.

— W wyjątkowych przypadkach, jeżeli spełnienie wymogów ilościowych metody pobierania próbek nie jest możliwe ze względu na wystąpienie nieakceptowalnego komercyjnego uszkodzenia partii (ze względu na formy opakowań, środki transportu, sposób przechowywania itp.), możliwe jest zastosowanie alternatywnej metody pobierania próbek, pod warunkiem że jest ona możliwie jak najbardziej reprezentatywna, w pełni opisana i udokumentowana.

5.1. **Wymogi ilościowe dotyczące próbek pierwotnych w odniesieniu do kontroli substancji lub produktów jednolicie rozmieszczonych w paszy**

5.1.1. *Pasze stałe luzem*

Rozmiar kontrolowanej części	Minimalna liczba próbek pierwotnych
≤ 2,5 tony	7
> 2,5 tony	√ dwudziestokrotność liczby ton stanowiących wagę kontrolowanej części (*), do 40 próbek pierwotnych

(*) Jeżeli uzyskana liczba jest ułamkiem, należy ją zaokrąglić w górę do najbliższej liczby całkowitej.

▼M3

5.1.2. *Pasze płynne luzem*

Rozmiar kontrolowanej części	Minimalna liczba próbek pierwotnych
≤ 2,5 tony lub ≤ 2 500 litrów	4 (*)
> 2,5 tony lub > 2 500 litrów	7 (*)

(*) Jeżeli nie jest możliwe uzyskanie homogenicznej cieczy, należy zwiększyć liczbę próbek pierwotnych.

5.1.3. *Pasze opakowane*

Pasze (stałe i płynne) mogą być pakowane w torby, worki, puszki, beczki itd., określone w tabeli jako „jednostki". Duże jednostki (≥ 500 kg lub litrów) muszą być kontrolowane zgodnie z przepisami dotyczącymi paszy luzem (zob. pkt 5.1.1 i 5.1.2).

Rozmiar kontrolowanej części	Minimalna liczba jednostek, z których należy pobrać (co najmniej) jedną próbkę pierwotną (*)
1–20 jednostek	1 jednostka (**)
21–150 jednostek	3 jednostki (**)
151–400 jednostek	5 jednostek (**)
> 400 jednostek	¼ √ liczby jednostek stanowiących kontrolowaną część (***), do 40 jednostek

(*) W przypadku gdy otwarcie jednostki może wpłynąć na analizę (np. łatwo psujące się mokre pasze), próbką pierwotną jest nieotwarta jednostka.
(**) W przypadku jednostek, których zawartość nie przekracza 1 kg lub 1 litra, próbką pierwotną jest zawartość jednej oryginalnej jednostki.
(***) Jeżeli uzyskana liczba jest ułamkiem, należy ją zaokrąglić w górę do najbliższej liczby całkowitej.

5.1.4. *Bloki paszy i lizawki mineralne*

Kontroli należy poddać co najmniej jeden blok lub jedną lizawkę na kontrolowaną część 25 jednostek, maksymalnie do czterech bloków lub lizawek.

W przypadku bloków lub lizawek ważących maksymalnie 1 kg próbką pierwotną jest zawartość jednego bloku lub jednej lizawki.

5.1.5. *Pasze objętościowe i włókniste*

Rozmiar kontrolowanej części	Minimalna liczba próbek pierwotnych (*)
≤ 5 ton	5
> 5 ton	√ pięciokrotność liczby ton stanowiących wagę kontrolowanej części (**), do 40 próbek pierwotnych

(*) Uznaje się, że w niektórych sytuacjach (np. kiszonki) nie jest możliwe pobranie wymaganej liczby próbek pierwotnych bez nieakceptowalnego uszkodzenia partii. W takich przypadkach można zastosować alternatywną metodę pobierania próbek, zaś przed wejściem w życie niniejszego rozporządzenia opracowane zostaną wytyczne dla pobierania próbek w odniesieniu do takich partii.
(**) Jeżeli uzyskana liczba jest ułamkiem, należy ją zaokrąglić w górę do najbliższej liczby całkowitej.

▼M3

5.2. **Wymogi ilościowe dotyczące próbek pierwotnych w odniesieniu do kontroli składników lub substancji, które mogą nie być jednolicie rozmieszczone w paszy**

Wymogi ilościowe dotyczące próbek pierwotnych należy stosować w następujących przypadkach:

— kontrola aflatoksyn, sporyszu żyta, pozostałych mikotoksyn i szkodliwych zanieczyszczeń botanicznych w materiałach paszowych,

— kontrola zanieczyszczenia krzyżowego przez składnik, w tym materiał modyfikowany genetycznie, lub substancję, które mogą nie być jednolicie rozmieszczone w paszy.

Jeżeli organ kontrolny podejrzewa, że niejednolite rozmieszczenie ma miejsce również w przypadku zanieczyszczenia krzyżowego przez składnik lub substancję w mieszankach paszowych, można zastosować wymogi ilościowe określone w tabeli poniżej.

Rozmiar kontrolowanej części	Minimalna liczba próbek pierwotnych
< 80 ton	Zob. wymogi ilościowe w pkt 5.1. Liczbę próbek pierwotnych, które należy pobrać, mnoży się przez 2,5.
≥ 80 ton	100

5.3. **Wymogi ilościowe dotyczące próbek pierwotnych w przypadku bardzo dużych partii**

W przypadku dużych kontrolowanych części (> 500 ton) liczba próbek pierwotnych, które należy pobrać, wynosi 40 próbek pierwotnych + √ ton w odniesieniu do kontroli substancji lub produktów jednolicie rozmieszczonych w paszy lub 100 próbek pierwotnych + √ ton w odniesieniu do kontroli składników lub substancji, które mogą nie być jednolicie rozmieszczone w materiałach paszowych.

6. WYMOGI ILOŚCIOWE DOTYCZĄCE PRÓBKI ZBIORCZEJ

Wymagana jest jedna próbka zbiorcza na kontrolowaną część.

	Rodzaj paszy	Minimalna wielkość próbki zbiorczej (*) (**)
6.1.	Pasze luzem	4 kg
6.2.	Pasze pakowane	4 kg (***)

▼M3

Wymagana jest jedna próbka zbiorcza na kontrolowaną część.

	Rodzaj paszy	Minimalna wielkość próbki zbiorczej (*) (**)
6.3.	Pasze płynne lub półpłynne	4 litry
6.4.	Bloki paszy lub lizawki mineralne:	
6.4.1.	o wadze większej niż 1 kg	4 kg
6.4.2.	o wadze nie większej niż 1 kg	waga czterech oryginalnych bloków lub lizawek
6.5.	Pasze objętościowe i włókniste	4 kg (****)

(*) Jeżeli kontrolowana jest pasza o wysokiej wartości, może zostać pobrana mniejsza próbka zbiorcza, pod warunkiem że zostanie to opisane i udokumentowane w sprawozdaniu z pobierania próbek.

(**) Zgodnie z przepisami rozporządzenia Komisji (UE) nr 619/2011 z dnia 24 czerwca 2011 r. ustanawiającego metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli paszy pod kątem występowania materiału genetycznie zmodyfikowanego, dla którego procedura wydawania zezwolenia jest w toku lub dla którego zezwolenie wygasło (Dz.U. L 166 z 25.6.2011, s. 9), próbka zbiorcza do kontroli występowania materiału genetycznie zmodyfikowanego musi zawierać co najmniej 35 000 nasion/ziaren. Oznacza to, że w przypadku kukurydzy wielkość próbki zbiorczej musi wynosić co najmniej 10,5 kg, zaś soi – 7 kg. W przypadku innych nasion i ziaren, takich jak jęczmień, proso, owies, ryż, żyto, pszenica i rzepak, wielkość próbki zbiorczej wynosząca 4 kg odpowiada ponad 35 000 nasion.

(***) W przypadku paszy opakowanej, w zależności od rozmiaru indywidualnych jednostek, może nie być możliwe uzyskanie 4 kg próbki zbiorczej.

(****) W przypadku pasz objętościowych i włóknistych o niskim ciężarze właściwym (np. siano, słoma) próbka zbiorcza powinna mieć wielkość co najmniej 1 kg.

7. WYMOGI ILOŚCIOWE DOTYCZĄCE PRÓBEK KOŃCOWYCH

Próbki końcowe

Wymagana jest analiza co najmniej jednej próbki końcowej. Ilość próbki końcowej potrzebnej do analizy jest nie mniejsza niż:

Pasze stałe	500 g (*) (**) (***)
Pasze płynne lub półpłynne	500 ml (*)

(*) Zgodnie z przepisami rozporządzenia Komisji (UE) nr 619/2011 próbka końcowa do celów kontroli pod kątem występowania materiału genetycznie zmodyfikowanego musi zawierać co najmniej 10 000 nasion/ziaren. Oznacza to, że w przypadku kukurydzy wielkość próbki końcowej musi wynosić co najmniej 3 000 g, zaś soi – 2 000 g. W przypadku innych nasion i ziaren, takich jak jęczmień, proso, owies, ryż, żyto, pszenica i rzepak, wielkość próbki końcowej wynosząca 500 g odpowiada ponad 10 000 nasion.

(**) Jeżeli próbka zbiorcza jest znacznie mniejsza niż 4 kg lub litry (zob. przypisy do pkt 6), może zostać pobrana mniejsza próbka końcowa, pod warunkiem że zostanie to opisane i udokumentowane w sprawozdaniu z pobierania próbek.

(***) W przypadku pobierania próbek nasion roślin strączkowych, ziaren zbóż i orzechów z drzew orzechowych w celu oznaczania pozostałości pestycydów, minimalna wielkość próbki końcowej wynosi 1 kg zgodnie z przepisami dyrektywy Komisji 2002/63/WE (Dz.U. L 187 z 16.7.2002, s. 30).

▼M3

8. METODA POBIERANIA PRÓBEK W PRZYPADKU BARDZO DUŻYCH PARTII LUB PARTII PRZECHOWYWANYCH LUB TRANSPORTOWANYCH W SPOSÓB POWODUJĄCY, ŻE POBIERANIE PRÓBEK Z CAŁEJ PARTII NIE JEST MOŻLIWE

8.1. **Zasady ogólne**

Jeżeli sposób transportu lub przechowywania partii nie zezwala na pobieranie próbek pierwotnych z całej partii, próbki powinny w miarę możliwości być pobierane z partii w ruchu.

W przypadku dużych magazynów przeznaczonych do przechowywania paszy podmioty należy zachęcać do instalowania w nich sprzętu umożliwiającego (automatyczne) pobieranie próbek z całej przechowywanej partii.

W przypadku stosowania procedury pobierania próbek przewidzianej w niniejszym rozdziale 8 podmiot działający na rynku pasz lub jego przedstawiciel jest informowany o procedurze pobierania próbek. Jeżeli procedura ta zostanie zakwestionowana przez podmiot działający na rynku pasz lub jego przedstawiciela, umożliwiają oni właściwemu organowi pobieranie próbek w całej partii na koszt podmiotu lub jego przedstawiciela.

8.2. **Duże partie transportowane statkiem**

8.2.1. *Dynamiczne pobieranie próbek z dużych partii transportowanych statkiem*

Próbki z dużych partiach na statkach powinny być w miarę możliwości pobierane, gdy produkt jest w ruchu (dynamiczne pobieranie próbek).

Próbki pobiera się w podziale na ładownie (jednostkę, którą można fizycznie rozdzielić). Ładownie są jednak opróżniane częściowo jedna po drugiej, więc początkowy podział fizyczny nie występuje po przetransportowaniu do miejsca przechowywania. Próbki można zatem pobierać w ramach początkowego podziału fizycznego lub w ramach podziału po transporcie do miejsca przechowywania.

Rozładunek statku może trwać kilka dni. Próbki należy zazwyczaj pobierać w regularnych odstępach czasu podczas całego rozładunku. Jednakże nie zawsze jest możliwe lub stosowne, aby urzędowy inspektor był obecny przy pobieraniu próbek podczas całego rozładunku. Dlatego zezwala się na pobieranie próbek (kontrolowanej) części partii. Liczbę próbek pierwotnych ustala się przy uwzględnieniu rozmiaru kontrolowanej części.

W przypadku pobierania próbek części partii paszy tej samej klasy lub o takim samym opisie, jeżeli część ta zostaje uznana za niespełniającą wymogów UE, uznaje się, że cała pasza należąca do tej partii nie spełnia tych wymogów, chyba że z przeprowadzonej szczegółowej oceny wynika, że nie ma dowodów wykazujących, że pozostała część partii nie spełnia wymogów UE.

Nawet jeżeli oficjalna próbka jest pobierana automatycznie, obecność inspektora jest wymagana. Jednakże jeżeli próbki pobierane są automatycznie przy wcześniejszym ustawieniu parametrów, których nie można zmienić w procesie pobierania próbek, zaś próbki pierwotne zbierane są do zapieczętowanego pojemnika, uniemożliwiając ewentualne oszustwa, wówczas obecność inspektora jest wymagana tylko na początku pobierania próbek, przy każdej zmianie pojemnika i pod koniec pobierania próbek.

▼M3

8.2.2. *Statyczne pobieranie próbek z partii transportowanych statkiem*

Jeżeli pobieranie próbek odbywa się w sposób statyczny, należy zastosować procedurę przewidzianą dla miejsc przechowywania (silosów) dostępnych od góry (zob. pkt 8.4.1).

Próbki muszą być pobierane z dostępnej części partii/ładowni (od góry). Liczbę próbek pierwotnych określa się poprzez uwzględnienie rozmiaru kontrolowanej części. W przypadku pobierania próbek części partii paszy tej samej klasy lub o takim samym opisie, jeżeli część ta zostaje uznana za niespełniającą wymogów UE, uznaje się, że cała pasza należąca do tej partii nie spełnia tych wymogów, chyba że z przeprowadzonej szczegółowej oceny wynika, że nie ma dowodów wykazujących, że pozostała część partii nie spełnia wymogów UE.

8.3. **Pobieranie próbek z dużych partii przechowywanych w magazynach**

Próbki muszą być pobierane z dostępnej części partii. Liczbę próbek pierwotnych określa się poprzez uwzględnienie rozmiaru kontrolowanej części. W przypadku pobierania próbek części partii paszy tej samej klasy lub o takim samym opisie, jeżeli część ta zostaje uznana za niespełniającą wymogów UE, uznaje się, że cała pasza należąca do tej partii nie spełnia tych wymogów, chyba że z przeprowadzonej szczegółowej oceny wynika, że nie ma dowodów wykazujących, że pozostała część partii nie spełnia wymogów UE.

8.4. **Pobieranie próbek z miejsc przechowywania (silosów)**

8.4.1. *Pobieranie próbek z silosów (łatwo) dostępnych od góry*

Próbki muszą być pobierane z dostępnej części partii. Liczbę próbek pierwotnych określa się poprzez uwzględnienie rozmiaru kontrolowanej części. W przypadku pobierania próbek części partii paszy tej samej klasy lub o takim samym opisie, jeżeli część ta zostaje uznana za niespełniającą wymogów UE, uznaje się, że cała pasza należąca do tej partii nie spełnia tych wymogów, chyba że z przeprowadzonej szczegółowej oceny wynika, że nie ma dowodów wykazujących, że pozostała część partii nie spełnia wymogów UE.

8.4.2. *Pobieranie próbek z silosów niedostępnych od góry (silosów zamkniętych)*

8.4.2.1. Silosy niedostępne od góry (zamknięte) o rozmiarze > 100 ton

Pasze przechowywane w takich silosach nie mogą być kontrolowane w sposób statyczny. Jeżeli muszą być pobrane próbki z paszy przechowywanej w silosie i nie ma możliwości jej przeniesienia, należy uzgodnić z podmiotem, że poinformuje on inspektora o rozładunku silosu w celu umożliwienia pobrania próbek paszy w ruchu.

8.4.2.2. Silosy niedostępne od góry (zamknięte) o rozmiarze < 100 ton

Procedura pobierania próbek polega na umieszczeniu 50–100 kg w pojemniku i pobraniu z niego próbek. Wielkość próbki zbiorczej odpowiada wielkości całej partii, a liczba próbek pierwotnych odpowiada ilości pobranej z silosu do pojemnika w celu pobrania próbek. W przypadku pobierania próbek części partii paszy tej samej klasy lub o takim samym opisie, jeżeli część ta zostaje uznana za niespełniającą wymogów UE, uznaje się, że cała pasza należąca do tej partii nie spełnia tych wymogów, chyba że z przeprowadzonej szczegółowej oceny wynika, że nie ma dowodów wykazujących, że pozostała część partii nie spełnia wymogów UE.

▼M3

8.5. **Pobieranie próbek z paszy luzem w dużych zamkniętych pojemnikach**

Próbki z takich partii mogą być pobrane jedynie po rozładunku. W niektórych przypadkach nie jest możliwy rozładunek w miejscu przywozu lub kontroli, w związku z czym próbki powinny zostać pobrane w momencie rozładunku takich pojemników.

9. INSTRUKCJE POBIERANIA, PRZYGOTOWANIA I PAKOWANIA PRÓBEK

9.1. **Uwagi ogólne**

Próbki należy pobierać i przygotowywać bez zbędnej zwłoki, przy zachowaniu środków ostrożności gwarantujących, że produkt nie ulegnie zmianie lub zanieczyszczeniu. Stosowany sprzęt, a także powierzchnie i pojemniki przeznaczone na próbki muszą być czyste i suche.

9.2. **Próbki pierwotne**

Próbki pierwotne należy pobrać losowo z całej partii przy zachowaniu w przybliżeniu jednakowej ich wielkości.

Rozmiar próbki pierwotnej wynosi co najmniej 100 g lub 25 g w przypadku pasz objętościowych i włóknistych o niskim ciężarze właściwym.

Jeżeli, zgodnie z procedurą pobierania próbek ustanowioną w pkt 8, pobranych ma zostać mniej niż 40 próbek pierwotnych, rozmiar próbek pierwotnych ustala się na podstawie wymaganej wielkości próbki zbiorczej, jaką należy osiągnąć (zob. pkt 6).

W przypadku pobierania próbek z małych partii opakowanej paszy, jeżeli zgodnie z wymogami ilościowymi pobrana ma zostać ograniczona liczba próbek pierwotnych, próbką pierwotną jest zawartość jednej oryginalnej jednostki, nieprzekraczająca 1 kg lub litra.

W przypadku pobierania próbek paszy opakowanej, składającej się z małych jednostek (np. < 250 g), rozmiar próbki pierwotnej zależy od rozmiaru jednostki.

9.2.1. *Pasze luzem*

W stosownych przypadkach próbki mogą być pobierane, gdy kontrolowana partia paszy jest w ruchu (załadunek lub wyładunek).

9.2.2. *Pasze opakowane*

Po wybraniu wymaganej liczby jednostek w celu pobrania próbek zgodnie z rozdziałem 5, część zawartości każdej jednostki należy usunąć przy użyciu próbnika lub szufli. W miarę potrzeby próbki należy pobierać po opróżnieniu każdej jednostki oddzielnie.

9.2.3. *Homogeniczne lub nadające się do homogenizacji pasze płynne lub półpłynne*

Po wybraniu wymaganej liczby jednostek w celu pobrania próbek zgodnie z rozdziałem 5, należy w razie potrzeby zhomogenizować zawartość i pobrać próbkę z każdej jednostki.

Próbki pierwotne mogą być pobierane w trakcie opróżniania zawartości pojemnika.

▼M3

9.2.4. *Nienadające się do homogenizacji pasze płynne lub półpłynne*

Po wybraniu wymaganej liczby jednostek w celu pobrania próbek zgodnie z rozdziałem 5, należy pobrać próbki z różnych poziomów.

Próbki mogą być także pobierane w trakcie opróżniania pojemników, przy czym pierwszą frakcję należy odrzucić.

W każdym przypadku całkowita pobrana objętość nie może być mniejsza niż 10 litrów.

9.2.5. *Bloki paszy i lizawki mineralne*

Po wybraniu wymaganej liczby bloków i lizawek w celu pobrania próbek zgodnie z rozdziałem 5, należy pobrać część każdego bloku lub lizawki. Jeżeli podejrzewa się, że blok lub lizawka nie są homogeniczne, jako próbkę można pobrać cały blok lub lizawkę.

W przypadku bloków lub lizawek ważących maksymalnie 1 kg próbką pierwotną jest zawartość jednego bloku lub jednej lizawki.

9.3. **Przygotowanie próbek zbiorczych**

Próbki pierwotne miesza się w jedną próbkę zbiorczą.

9.4. **Przygotowanie próbek końcowych**

Materiał zawarty w próbce zbiorczej należy dokładnie wymieszać ([1]).

— Każdą próbkę należy umieścić w odpowiednim pojemniku. Należy podjąć wszelkie środki ostrożności, aby zapobiec zmianie składu próbki, zanieczyszczeniu lub sfałszowaniu, które mogą nastąpić w czasie transportu lub przechowywania.

— W przypadku kontroli składników lub substancji jednolicie rozmieszczonych w paszy próbka zbiorcza może zostać w sposób reprezentatywny zredukowana do co najmniej 2,0 kg lub 2,0 litrów (próbka zredukowana) ([2]), w miarę możliwości przy użyciu rozdzielacza mechanicznego lub automatycznego. W przypadku pobierania próbek nasion roślin strączkowych, ziaren zbóż i orzechów z drzew orzechowych w celu oznaczania pozostałości pestycydów minimalna wielkość próbki zredukowanej wynosi 3 kg. Jeżeli charakter paszy nie zezwala na zastosowanie rozdzielacza lub rozdzielacz nie jest dostępny, próbka może zostać zredukowana metodą ćwiartowania. Z próbek zredukowanych należy przygotować próbki końcowe (do celów kontroli, obrony i odniesienia) w przybliżeniu tej samej wielkości i dostosowane do ilościowych wymagań określonych w rozdziale 7. W przypadku kontroli składników, w tym materiału zmodyfikowanego genetycznie, lub substancji, które mogą nie być jednolicie rozmieszczone w materiałach paszowych, próbka zbiorcza musi zostać:

  — całkowicie zhomogenizowana i następnie podzielona na próbki końcowe, lub

  — zredukowana do co najmniej 2 kg lub 2 litrów ([3]) przy użyciu rozdzielacza mechanicznego lub automatycznego. Jedynie w przypadku gdy charakter paszy nie zezwala na zastosowanie rozdzielacza, próbka może zostać zredukowana metodą ćwiartowania. Do celów kontroli pod kątem występowania materiału genetycznie zmodyfikowanego zgodnie z rozporządzeniem (UE) nr 619/2011 próbka zredukowana musi zawierać co najmniej 35 000 nasion/ziaren, tak aby umożliwić uzyskanie próbek końcowych do celów kontroli przestrzegania przepisów, obrony i odniesienia zawierających co najmniej 10 000 nasion/ziaren (zob. przypis (**) w rozdziale 6 i przypis (*) w rozdziale 7).

([1]) Jakiekolwiek zbrylenia muszą być rozbite (jeśli to konieczne, poprzez odseparowanie i zwrócenie do próbki).
([2]) Z wyjątkiem pasz objętościowych i włóknistych o niskim ciężarze właściwym.
([3]) Z wyjątkiem pasz objętościowych i włóknistych o niskim ciężarze właściwym.

▼M3

9.5. **Opakowanie próbek**

Pojemniki lub opakowania są zapieczętowane i opatrzone etykietą w sposób uniemożliwiający otwarcie bez zniszczenia pieczęci. Całość etykiety musi być opieczętowana.

9.6. **Wysyłka próbek do laboratorium**

Próbkę wysyła się bezzwłocznie do wyznaczonego laboratorium analitycznego wraz z informacjami niezbędnymi dla analityka.

10. PROTOKÓŁ POBIERANIA PRÓBEK

Po każdym pobraniu próbek należy sporządzić protokół umożliwiający jednoznaczną identyfikację każdej kontrolowanej części i jej wielkości.

W protokole należy zapisać wszelkie przypadki odejścia od procedury pobierania próbek przewidzianej w niniejszym rozporządzeniu.

Oprócz udostępnienia protokołu urzędowemu laboratorium kontrolnemu zostaje on również udostępniony podmiotowi działającemu na rynku pasz i/lub laboratorium wyznaczonemu przez ten podmiot.

▼M3

ZAŁĄCZNIK II

PRZEPISY OGÓLNE DOTYCZĄCE METODYKI ANALIZY PASZ

A. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

1. **Cel**

Poniżej opisane procedury dotyczą przygotowania do badań próbek przesyłanych do laboratoriów kontrolnych po pobraniu zgodnie z przepisami określonymi w załączniku I.

Próbki te muszą być przygotowane w taki sposób, aby odważone ilości, jak przewidziano w metodyce analizy, były homogeniczne i reprezentatywne w odniesieniu do próbek końcowych.

2. **Niezbędne środki ostrożności**

Wybór procedury przy przygotowaniu próbek zależy od stosowanych metod analizy oraz składników lub substancji, które mają zostać poddane kontroli. Z tego względu bardzo ważne jest upewnienie się, czy wybrana procedura przygotowania próbki jest właściwa w odniesieniu do stosowanej metody analizy oraz składników lub substancji, które mają zostać poddane kontroli.

Wszystkie konieczne czynności należy wykonywać w taki sposób, aby zapobiec zanieczyszczeniu i zmianie składu próbki do badań.

Rozdrabnianie, mieszanie i przesiewanie należy wykonywać bezzwłocznie, przy ograniczonym dostępie powietrza i światła do próbki. Nie należy stosować młynków i rozdrabniaczy, które podczas pracy powodują znaczące nagrzewanie próbki do badań.

W przypadku pasz szczególnie wrażliwych na ciepło zaleca się ręczne rozdrabnianie. Ponadto zastosowany sprzęt nie może stanowić źródła zanieczyszczenia.

Jeżeli przygotowanie próbki do badań nie może być przeprowadzone bez znacznych zmian poziomu wilgotności próbki, poziom jej wilgotności oznacza się przed przygotowaniem i po przygotowaniu próbki do badań zgodnie z metodą, o której mowa w załączniku III część A.

3. **Procedura**

3.1. *Procedura ogólna*

Podwielokrotność do badań pobiera się z próbki końcowej. Stożkowanie i dzielenie na ćwiartki nie są zalecane, ponieważ może to skutkować podwielokrotnościami do badań o dużym błędzie podziału.

3.1.1. Pasze, które mogą być zmielone

— Przesianą próbkę końcową zmieszać oraz zgromadzić w odpowiednim czystym, suchym pojemniku, wyposażonym w hermetyczny korek. Zmieszać ponownie w celu zagwarantowania pełnej homogenizacji natychmiast przed odważeniem ilości przeznaczonej do analizy (podwielokrotności do badań).

3.1.2. Pasze, które mogą być zmielone po wysuszeniu

— Jeśli nie ustalono inaczej w metodzie analizy, wysuszyć próbkę końcową w celu obniżenia jej poziomu wilgotności do 8–12 %, zgodnie ze wstępną procedurą suszenia opisaną pkt 4.3 metodyki oznaczania wilgotności, o której mowa w załączniku III część A. Następnie postępować zgodnie z procedurą wskazaną w sekcji 3.1.1.

▼M3

3.1.3. Pasze płynne lub półpłynne

— Próbkę końcową umieścić w odpowiednim, czystym i suchym pojemniku, wyposażonym w hermetyczny korek. Zmieszać dokładnie w celu zagwarantowania pełnej homogenizacji natychmiast przed odważeniem ilości przeznaczonej do analizy (podwielokrotności do badań).

3.1.4. Inne pasze

— Próbki końcowe, które nie mogą być przygotowane zgodnie z jedną z powyższych procedur, należy przygotować w taki sposób, aby odważone ilości wymagane do analizy (podwielokrotność do badań) były homogeniczne i reprezentatywne dla próbki końcowej.

3.2. *Procedura szczególna w przypadku badania metodą inspekcji wzrokowej lub mikroskopowej lub w przypadku gdy cała próbka zbiorcza jest zhomogenizowana*

— W przypadku badania metodą inspekcji wzrokowej (bez mikroskopu) do badania stosuje się całą próbkę laboratoryjną.

— W przypadku badania mikroskopem laboratorium może zredukować próbkę zbiorczą lub zredukować próbkę zredukowaną. Próbki końcowe do celów obrony oraz ostatecznego odniesienia pobiera się zgodnie z procedurą równoważną procedurze pobierania próbek w celu kontroli przestrzegania przepisów.

— Jeżeli cała próbka zbiorcza jest zhomogenizowana, próbki końcowe pobiera się ze zhomogenizowanej próbki zbiorczej.

4. **Przechowywanie próbek**

Próbki należy przechowywać w temperaturze, która nie spowoduje zmiany ich składu. Próbki przeznaczone do badania witamin lub substancji, które są szczególnie wrażliwe na światło, należy przechowywać w warunkach gwarantujących, że światło nie wywrze na nie niekorzystnego wpływu.

B. PRZEPISY DOTYCZĄCE ODCZYNNIKÓW I APARATURY UŻYWANEJ W METODYCE ANALIZY

1. Jeżeli w metodyce analizy nie ustalono inaczej, wszystkie stosowane odczynniki muszą mieć stopień czystości do analizy. W przypadku oznaczania mikroelementów czystość odczynników należy sprawdzić przez wykonanie ślepej próby. Zależnie od uzyskanych wyników może być konieczne dalsze oczyszczanie odczynników.

2. Jeżeli w metodyce analizy nie podano konkretnego rozpuszczalnika lub rozcieńczalnika, w przypadku czynności wymagających przygotowania roztworów, rozcieńczania, spłukiwania lub przemywania należy stosować wodę. Co do zasady należy stosować wodę demineralizowaną lub destylowaną. W szczególnych przypadkach, wymienionych w metodyce analizy, wodę należy oczyścić w specjalny sposób.

3. Ze względu na aparaturę i sprzęt, które zwykle stosuje się w laboratoriach kontrolnych, w metodyce analizy wymienia się tylko tę aparaturę i sprzęt, które wymagają szczególnego zastosowania lub mają specjalny charakter. Wszystkie urządzenia muszą być czyste, zwłaszcza gdy są oznaczane bardzo małe ilości substancji.

▼M3

C. STOSOWANIE METODYKI ANALIZY I WYRAŻANIE WYNIKÓW

1. **Postępowanie ekstrakcyjne**

W kilku metodach określono konkretne postępowanie ekstrakcyjne. Z reguły można zastosować inne postępowanie ekstrakcyjne niż to, o którym mowa w danej metodyce, pod warunkiem że dowiedziono, iż w porównaniu z postępowaniem określonym w metodyce stosowane postępowanie ma równoważną wydajność ekstrakcji w odniesieniu do analizowanej matrycy.

2. **Postępowanie oczyszczające**

W kilku metodach określono konkretne postępowanie oczyszczające. Z reguły można zastosować inne postępowanie oczyszczające niż to, o którym mowa w danej metodyce, pod warunkiem że dowiedziono, iż w porównaniu z postępowaniem określonym w metodyce stosowane postępowanie daje równoważne wyniki analityczne w odniesieniu do analizowanej matrycy.

3. **Liczba oznaczeń**

W przypadku analizy substancji niepożądanych, jeżeli wynik pierwszego oznaczenia jest znacznie (o > 50 %) niższy niż wartość ustalona w specyfikacji, nie są konieczne dodatkowe oznaczenia, pod warunkiem że stosowane jest odpowiednie postępowanie w odniesieniu do jakości. W innych przypadkach konieczna jest druga analiza (drugie oznaczenie) w celu wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Do weryfikacji zgodności stosuje się średnią z dwóch oznaczeń przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

W przypadku kontroli deklarowanej zawartości substancji lub składnika, jeżeli wynik pierwszego oznaczenia potwierdza deklarowaną zawartość, tj. wyniki analizy mieszczą się w dopuszczalnym zakresie zmienności co do deklarowanej zawartości, nie są konieczne dodatkowe oznaczenia, pod warunkiem że stosowane jest odpowiednie postępowanie w odniesieniu do jakości. W innych przypadkach konieczna jest druga analiza (drugie oznaczenie) w celu wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Do weryfikacji zgodności stosuje się średnią z dwóch oznaczeń przy uwzględnieniu niepewności pomiaru.

W niektórych przypadkach dopuszczalny zakres zmienności określono w prawodawstwie, np. w rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 767/2009 z dnia 13 lipca 2009 r. w sprawie wprowadzania na rynek i stosowania pasz, zmieniającym rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady i uchylającym dyrektywę Rady 79/373/EWG, dyrektywę Komisji 80/511/EWG, dyrektywy Rady 82/471/EWG, 83/228/EWG, 93/74/EWG, 93/113/WE i 96/25/WE oraz decyzję Komisji 2004/217/WE ([1]).

4. **Podawanie zastosowanych metod analizy w sprawozdaniu**

W sprawozdaniu z analizy określa się zastosowaną metodykę.

5. **Podawanie wyników analizy**

Wynik analizy wyraża się w sposób podany w metodyce analizy, zawiera on odpowiednią liczbę cyfr znaczących i, jeżeli to konieczne, musi być korygowany do wilgotności próbki końcowej przed przygotowaniem.

([1]) Dz.U. L 229 z 1.9.2009, s. 1.

▼M3

6. **Niepewność pomiaru i stopień odzysku w przypadku analizy substancji niepożądanych**

W odniesieniu do substancji niepożądanych w rozumieniu dyrektywy 2002/32/WE uznaje się, że produkt przeznaczony na paszę jest niezgodny pod względem ustalonej zawartości maksymalnej, w przypadku gdy wynik analizy dotyczący paszy o zawartości wilgoci wynoszącej 12 % wskazuje na przekroczenie zawartości maksymalnej z uwzględnieniem rozszerzonej niepewności pomiaru i poprawki na stopień odzysku. Badane stężenie po uwzględnieniu poprawki na stopień odzysku i odjęciu rozszerzonej niepewności pomiaru od wyniku stanowi podstawę oceny zgodności. Procedura ta ma zastosowanie jedynie w przypadkach, gdy stosowana metoda analizy pozwala na ustalenie wartości niepewności pomiaru i stopnia odzysku (nie jest to możliwe np. w przypadku analizy mikroskopowej).

Wynik analizy przedstawia się w sposób następujący (o ile stosowana metoda analizy pozwala na ustalenie wartości niepewności pomiaru i stopnia odzysku):

a) jako skorygowany na stopień odzysku, przy czym stopień ten należy wskazać. Korekta na odzysk nie jest konieczna, jeśli stopień odzysku wynosi 90–110 %.

b) jako x +/– U, gdzie x oznacza wynik analizy, a U rozszerzoną niepewność pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia w wysokości 2, który daje wynik w przedziale ufności ok. 95 %.

Jeżeli wynik analizy jest jednak znacznie (o > 50 %) niższy niż wartość ustalona w specyfikacji oraz pod warunkiem że stosowane jest odpowiednie postępowanie w odniesieniu do jakości, a analiza wykonywana jest jedynie do celów sprawdzenia zgodności z przepisami prawnymi, wynik analizy można podać bez korekty na odzysk; w takim przypadku można pominąć podawanie stopnia odzysku i niepewności pomiaru.

▼B

ZAŁĄCZNIK III

METODY ANALIZY SKŁADU MATERIAŁÓW I MIESZANEK PASZOWYCH

A. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania wilgotności pasz. Należy zauważyć, że w przypadku pasz zawierających substancje lotne, np. kwasy organiczne, podczas oznaczania wilgotności oznaczana jest również znaczna ilość substancji lotnych.

Metody nie stosuje się do badania produktów mlecznych występujących jako materiały paszowe, związków mineralnych, mieszanin składających się głównie ze związków mineralnych, tłuszczów i olejów pochodzenia zwierzęcego i roślinnego oraz nasion i owoców roślin oleistych.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest suszona w warunkach dostosowanych do właściwości pasz. Obniżenie masy jest określane przez ważenie. Jeżeli pasze stałe zawierają duże ilości wilgotności, konieczne jest przeprowadzenie wstępnego suszenia.

3. **Aparatura i sprzęt**

3.1. Rozdrabniacz wykonany z materiałów niepochłaniających wilgotności, łatwy do czyszczenia, pozwalający na szybkie i równomierne rozdrobnienie materiału bez nadmiernego ogrzewania, w sposób ograniczający do minimum kontakt z powietrzem, spełniający wymagania określone w pkt 4.1.1 i pkt 4.1.2 (np. młotek, chłodzony wodą mikrorozdrabniacz, składany stożkowy młynek albo rozdrabniacz wolnoobrotowy lub wyposażony w koło zębate).

3.2. Waga analityczna ważąca z dokładnością do 1 mg.

3.3. Suche naczynka z nierdzewnego metalu lub ze szkła z przykrywkami umożliwiającymi hermetyczne zamknięcie, o powierzchni roboczej umożliwiającej równomierne rozprowadzenie badanej próbki w warstwie 0,3 g/cm^2.

3.4. Suszarka elektryczna z termostatem (± 2 °C), dobrze wentylowana i pozwalająca na szybką regulację temperatury ([1]).

3.5. Termostatowana suszarka próżniowa zaopatrzona w pompę olejową oraz mechanizm umożliwiający nawiew gorącego suchego powietrza lub wprowadzenie czynnika suszącego (np. tlenku wapnia).

3.6. Eksykator z płytką z grubego perforowanego metalu lub porcelany, zawierający efektywny czynnik suszący.

4. **Sposób postępowania**

Uwaga: Czynności opisane w tej części należy wykonywać natychmiast po otworzeniu opakowania próbki. Analizę należy wykonać co najmniej w 2 powtórzeniach.

([1]) Do suszenia roślin zbożowych, mąki, kaszy i mączki piec musi mieć pojemność cieplną taką, żeby po wstępnym nastawieniu na temperaturę 131 °C powrócił do tej temperatury w czasie krótszym niż 45 minut po umieszczeniu w nim maksymalnej liczby próbek do jednoczesnego wysuszenia. Wentylacja musi być taka, aby wyniki suszenia przez dwie godziny maksymalnej liczby próbek pszenicy zwyczajnej nie różniły się od wyników suszenia przez cztery godziny o więcej niż o 0,15 %.

▼B

4.1. *Przygotowanie*

4.1.1. Pasze inne niż określone w pkt 4.1.2 i pkt 4.1.3

Pobrać co najmniej 50 g próbki. Jeżeli to konieczne, rozdrobnić lub podzielić w taki sposób, aby zapobiec jakimkolwiek zmianom zawartości wilgotności (zob. pkt 6).

4.1.2. Zboża i kasze

Pobrać co najmniej 50 g próbki. Rozdrobnić na cząstki, które przechodzą przez oczka sita o średnicy 0,5 mm co najmniej w 50 % i pozostają w ilości nie wyższej niż 10 % na sicie o oczkach o średnicy 1 mm.

4.1.3. Pasze ciekłe lub w postaci pasty, pasze z przewagą olejów lub tłuszczów

Pobrać 25 g próbki, zważyć z dokładnością do 10 mg, dodać odpowiednią ilość bezwodnego piasku odważonego z dokładnością do 10 mg i zmieszać do uzyskania homogennego produktu.

4.2. *Suszenie*

4.2.1. Pasze inne niż określone w pkt 4.2.2 i 4.2.3

Zważyć, z dokładnością do 1 mg, naczynko z przykrywką (pkt 3.3). Do naczynka odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki i równo rozmieścić. Wstawić naczynko bez przykrywki do suszarki podgrzanej do temperatury 103 °C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić naczynko w suszarce tak szybko, jak to możliwe. Suszyć przez cztery godziny od czasu, gdy suszarka ponownie osiągnie temperaturę 103 °C. Nałożyć przykrywkę na naczynko, wyjąć je z suszarki, pozostawić do schłodzenia w eksykatorze (pkt 3.6) na 30 do 45 minut i zważyć z dokładnością do 1 mg.

Pasze z przeważającym udziałem oleju lub tłuszczu suszyć ponownie w suszarce przez 30 minut w temperaturze 130 °C. Różnica pomiędzy dwoma ważeniami nie może przekraczać 0,1 % wilgotności.

4.2.2. Zboża, mąki, kasze i mączki

Zważyć, z dokładnością do 0,5 mg, naczynko z przykrywką (pkt 3.3). Do naczynka odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g rozdrobnionej próbki i równo rozmieścić. Wstawić naczynko bez przykrywki do suszarki podgrzanej do temperatury 130 °C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić naczynko w suszarce tak szybko, jak to możliwe. Suszyć przez dwie godziny od czasu, gdy suszarka ponownie osiągnie temperaturę 130 °C. Nałożyć przykrywkę na naczynko, wyjąć je z suszarki, pozostawić do schłodzenia w eksykatorze (pkt 3.6) na 30 do 45 minut i zważyć z dokładnością do 1 mg.

4.2.3. Mieszanki paszowe zawierające ponad 4 % sacharozy lub laktozy: materiały paszowe, takie jak chleb świętojański, hydrolizowane produkty zbożowe, słód jęczmienny, susz buraczany, hydrolizaty rybne i cukrowe, mieszanki z ponad 25 % udziałem soli mineralnych zawierających wodę krystalizacyjną.

Zważyć, z dokładnością do 0,5 mg, naczynko z przykrywką (pkt 3.3). Do naczynka odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki i równo rozmieścić. Wstawić naczynko bez przykrywki do suszarki próżniowej (pkt 3.5), podgrzanej do temperatury od 80 do 85 °C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić naczynko w suszarce tak szybko, jak to możliwe.

Podwyższyć ciśnienie do 100 Torr i pozostawić w celu wysuszenia na cztery godziny pod działaniem tego ciśnienia, w strumieniu gorącego, suchego powietrza albo stosując czynnik suszący (ok. 300 g na 20 próbek). W drugim przypadku odłączyć pompę próżniową po uzyskaniu odpowiedniego ciśnienia. Czas suszenia liczyć od chwili, gdy suszarka ponownie osiągnie temperaturę od 80 do 85 °C. Ostrożnie zrównać ciśnienie w suszarce z ciśnieniem atmosferycznym. Otworzyć suszarkę,

▼B

szybko nałożyć przykrywkę na naczynko, wyjąć je z suszarki, pozostawić do schłodzenia w eksykatorze (pkt 3.6) na 30–45 minut i zważyć z dokładnością do 1 mg. Suszyć ponownie w suszarce próżniowej przez 30 minut o temperaturze od 80 do 85 °C i zważyć powtórnie. Różnica pomiędzy dwoma ważeniami nie może przekraczać 0,1 % wilgotności.

4.3. *Suszenie wstępne*

4.3.1. Pasze inne niż określone w pkt 4.3.2

Pasze stałe o wysokim poziomie wilgotności, trudne do rozdrabniania, należy poddać wstępnemu suszeniu w następujący sposób:

Odważyć 50 g, z dokładnością do 10 mg, *nierozdrobnionej* próbki (pasze sprasowane lub zbrylone można w razie potrzeby wstępnie rozdzielić) do odpowiedniego naczynia (np. płytka aluminiowa o wymiarach 20 cm × 12 cm z obwódką o wysokości 0,5 cm). Suszyć w suszarce o temperaturze od 60 do 70 °C, aż poziom wilgotności obniży się do 8–12 %. Wyjąć próbkę z suszarki, pozostawić bez przykrycia do schłodzenia w laboratorium przez godzinę i zważyć z dokładnością do 10 mg. Szybko rozdrobnić, postępując w sposób określony w pkt 4.1.1, i suszyć w sposób określony w pkt 4.2.1 lub 4.2.3, w zależności od rodzaju paszy.

4.3.2. Zboża

Ziarno zbóż o wilgotności wyższej niż 17 % należy poddać wstępnemu suszeniu w następujący sposób:

Odważyć, z dokładnością do 10 mg, 50 g nierozdrobnionego ziarna do odpowiedniego naczynia (np. płytka aluminiowa o wymiarach 20 × 12 cm z obwódką o wysokości 0,5 cm). Suszyć w suszarce od 5 do 7 minut w temperaturze 130 °C. Wyjąć próbkę z suszarki, pozostawić bez przykrycia do schłodzenia w laboratorium przez dwie godziny i zważyć z dokładnością do 10 mg. Szybko rozdrobnić, postępując w sposób określony w pkt 4.1.2, i suszyć w sposób określony w pkt 4.2.2.

5. **Obliczanie wyników**

Wilgotność (X) jako udział procentowy w próbce obliczana jest według następujących wzorów:

5.1. *Suszenie bez wstępnego podsuszania*

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

gdzie:

m = początkowa masa w g badanej próbki
m_0 = masa w g badanej próbki po wysuszeniu

5.2. *Suszenie z podsuszaniem*

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

gdzie:

m = początkowa masa w g badanej próbki

m_1 = masa w g badanej próbki po wstępnym podsuszaniu

m_2 = masa w g badanej próbki po rozdrobnieniu

m_0 = masa w g badanej próbki po wysuszeniu

▼B

5.3. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,2 % bezwzględnej wartości wilgotności.

6. **Objaśnienia**

Jeżeli rozdrabnianie próbki jest konieczne i wpływa na poziom wilgotności w produkcie, wyniki analizy składników paszowych należy skorygować o poziom wilgotności w początkowym stanie próbki.

B. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI OLEJÓW I TŁUSZCZÓW POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO I ROŚLINNEGO

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości wody i substancji lotnych w tłuszczach i olejach pochodzenia zwierzęcego oraz roślinnego.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest suszona w temperaturze 103 °C do uzyskania stałej masy (ubytek masy między dwoma kolejnymi ważeniami musi być równy lub mniejszy niż 1 mg). Ubytek masy jest określany metodą wagową.

3. **Aparatura i sprzęt**

3.1. Naczynie z płaskim dnem wykonane z materiału nierdzewnego, o średnicy od 8 do 9 cm i wysokości około 3 cm.

3.2. Termometr rtęciowy ze wzmocnionym zbiornikiem i ekspansyjną rurką w górnym końcu, z podziałką od 80 do co najmniej 110 °C i o długości około 10 cm.

3.3. Łaźnia piaskowa lub elektryczna płyta grzewcza.

3.4. Eksykator zawierający efektywny środek suszący.

3.5. Waga analityczna.

4. **Sposób postępowania**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 20 g homogennej próbki do suchego, zważonego naczynia (3.1), zawierającego termometr (3.2). Ogrzewać na łaźni piaskowej lub płycie grzewczej (3.3) ciągle mieszając termometrem, tak aby uzyskać wzrost temperatury do 90 °C w czasie około 7 minut.

Zmniejszyć ogrzewanie, obserwując częstotliwość odrywania się pęcherzyków powietrza od dna naczynia. Temperatura nie może przekroczyć 105 °C. Kontynuować mieszanie, pocierając dno naczynia do czasu, aż przestaną się tworzyć pęcherzyki.

W celu całkowitego odparowania wilgotności, ogrzewać próbkę kilka razy do temperatury 103 °C ± 2 °C, schładzając do 93 °C pomiędzy kolejnymi ogrzewaniami. Następnie schłodzić próbkę do temperatury pokojowej w eksykatorze (3.4) i zważyć. Powtarzać ogrzewanie, dopóki ubytek masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie będzie większy niż 2 mg.

Uwaga: Wzrost masy próbki po powtórnym ogrzewaniu wskazuje na utlenienie się tłuszczu. W takim przypadku do obliczenia wyniku wziąć ostatnią masę próbki, przed wzrostem jej masy.

5. **Obliczanie wyników**

Wilgotność (X) jako udział procentowy w próbce obliczana jest według następującego wzoru:

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

▼B

gdzie:

m = masa w g badanej próbki
m_1 = masa w g naczynia z zawartością przed ogrzewaniem
m_2 = masa w g naczynia z zawartością po ogrzewaniu

Wyniki oznaczania niższe niż 0,05 % należy zapisać, używając określenia „niższe niż 0,05 %”.

Powtarzalność

Różnica wilgotności pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,05 % wartości bezwzględnej.

C. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA SUROWEGO

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości białka surowego w paszach na podstawie zawartości azotu oznaczonego metodą Kjeldahla.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest mineralizowana kwasem siarkowym w obecności katalizatora. Kwaśny roztwór jest alkalizowany z użyciem roztworu wodorotlenku sodu. Amoniak destyluje się i zbiera w znanej ilości roztworu kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany mianowanym roztworem wodorotlenku sodu.

Ewentualnie uwolniony amoniak jest destylowany do nadmiaru roztworu kwasu borowego, a następnie miareczkowany roztworem kwasu chlorowodorowego lub siarkowego.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Siarczan potasu.

3.2. Katalizator: tlenek miedzi(II) CuO lub siarczan miedzi(II) $CuSO_4$ $5H_2O$ pentahydrat.

3.3. Granulowany cynk.

3.4. Kwas siarkowy, $\rho 20$ = 1,84 g/ml.

3.5. Kwas siarkowy, mianowany roztwór objętościowy o stężeniu $c(H_2SO_4)$ = 0,25 mol/l.

3.6. Kwas siarkowy, mianowany roztwór objętościowy o stężeniu $c(H_2SO_4)$ = 0,10 mol/l.

3.7. Kwas siarkowy, mianowany roztwór objętościowy o stężeniu $c(H_2SO_4)$ = 0,05 mol/l.

3.8. Czerwień metylowa, wskaźnik: rozpuścić 300 mg czerwieni metylowej w 100 ml etanolu, σ = 95–96 % (v/v).

3.9. Wodorotlenek sodu (może być techniczny), roztwór o stężeniu β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).

3.10. Wodorotlenek sodu, mianowany roztwór objętościowy o stężeniu c(NaOH) = 0,25 mol/l.

3.11. Wodorotlenek sodu, mianowany roztwór objętościowy o stężeniu c(NaOH) = 0,10 mol/l.

3.12. Granulowany pumeks, przemyty kwasem chlorowodorowym i wyprażony.

3.13. Acetanilid (temperatura topnienia = 114 °C, zawartość N = 10,36 %).

3.14. Sacharoza, niezawierająca azotu.

3.15. Kwas borowy (H_3BO_3).

3.16. Roztwór czerwieni metylowej, wskaźnik: rozpuścić 100 mg czerwieni metylowej w 100 ml etanolu lub metanolu.

▼B

3.17. Roztwór zieleni bromokrezolowej: rozpuścić 100 mg zieleni bromokrezolowej w 100 ml etanolu lub metanolu.

3.18. Roztwór kwasu borowego (od 10 g/l do 40 g/l, w zależności od stosowanej aparatury i sprzętu)

Przy stosowaniu kolorymetrycznego punktu końcowego do roztworów kwasu borowego należy dodać wskaźniki czerwieni metylowej i zieleni bromokrezolowej. Jeżeli przygotowuje się 1 l roztworu kwasu borowego, przed dostosowaniem objętości należy dodać 7 ml roztworu czerwieni metylowej (3.16) i 10 ml roztworu zieleni bromokrezolowej (3.17).

Odczyn pH roztworu kwasu borowego może różnić się między seriami w zależności od użytej wody. Często do uzyskania pozytywnej próby ślepej konieczne jest dostosowanie pH przy pomocy małej objętości zasady.

Uwaga: Dodanie ok. 3–4 ml NaOH (3.11) do 1 l kwasu borowego o stężeniu 10 g/l zwykle zapewnia dobre dostosowanie. Roztwór należy przechowywać w temperaturze pokojowej oraz chronić przed światłem i źródłami oparów amoniaku.

3.19 Kwas chlorowodorowy, mianowany roztwór objętościowy o stężeniu c(HCl) = 0,10 mol/l.

Uwaga: Można zastosować inne stężenia roztworów objętościowych (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 i 3.19), jeżeli zostanie to uwzględnione w obliczeniach. Stężenie należy podawać zawsze z dokładnością do czterech miejsc po przecinku.

4. Aparatura i sprzęt

Aparatura i sprzęt odpowiedni do przeprowadzenia mineralizacji, destylacji i miareczkowania według metody Kjeldahla.

5. Sposób postępowania

5.1. *Mineralizacja*

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, 1g próbki i przenieść do kolby aparatu do mineralizacji. Dodać 15 g siarczanu potasu (3.1), odpowiednią ilość katalizatora (3.2) (od 0,3 do 0,4 g tlenku miedzi(II) lub od 0,9 do 1,2 g pentahydratu siarczanu miedzi(II)), 25 ml kwasu siarkowego (3.4) oraz, w razie potrzeby, kilka granulek pumeksu (3.12) i zamieszać.

Początkowo ogrzewać kolbę ostrożnie, w razie konieczności mieszając od czasu do czasu, aż do zwęglenia substancji i zaniku piany; następnie zwiększyć intensywność ogrzewania aż do trwałego wrzenia roztworu. Ogrzewanie jest właściwe, jeżeli wrzący kwas kondensuje się na ściankach kolby. Zapobiegać przegrzewaniu się ścianek i przylepianiu do nich organicznych cząstek.

Od chwili gdy roztwór stanie się klarowny i przyjmie jasnozieloną barwę, kontynuować ogrzewanie przez dwie godziny, a następnie pozostawić do schłodzenia.

5.2. *Destylacja*

Ostrożnie dodać do kolby ilość wody wystarczającą do całkowitego rozpuszczenia siarczanów. Pozostawić do schłodzenia, a następnie w razie potrzeby dodać kilka granulek cynku (3.3). Postępować zgodnie z pkt 5.2.1 lub 5.2.2.

5.2.1. Destylacja do kwasu siarkowego

Umieścić w odbieralniku aparatu destylacyjnego odmierzone 25 ml kwasu siarkowego (3.5 lub 3.7), zależnie od przewidywanej zawartości azotu. Dodać kilka kropli wskaźnika czerwieni metylowej (3.8).

▼B

Podłączyć kolbę mineralizacyjną do chłodnicy aparatu destylacyjnego i zanurzyć koniec chłodnicy w cieczy znajdującej się w kolbie odbieralnika na głębokość co najmniej 1 cm (zob. objaśnienia pkt 8.3). Powoli wlać 100 ml roztworu wodorotlenku sodu (3.9) do kolby mineralizacyjnej, nie dopuszczając do strat amoniaku (zob. objaśnienia pkt 8.1). Ogrzewać kolbę aż do całkowitego oddestylowania amoniaku.

5.2.2. Destylacja do kwasu borowego

Jeżeli miareczkowanie zawartości amoniaku w destylacie wykonywane jest ręcznie, zastosowanie ma poniższe postępowanie. Jeżeli aparat destylacyjny jest w pełni zautomatyzowany i obejmuje miareczkowanie zawartości amoniaku w destylacie, należy stosować się do instrukcji producenta aparatu.

Umieścić kolbę odbieralnika zawierającą od 25 do 30 ml roztworu kwasu borowego (3.18) pod ujściem chłodnicy w taki sposób, aby rurka doprowadzająca znajdowała się pod powierzchnią nadmiaru roztworu kwasu borowego. Ustawić aparat destylacyjny, aby podał 50 ml roztworu wodorotlenku sodu (3.9). Obsługiwać aparat destylacyjny zgodnie z instrukcjami producenta i oddestylować amoniak uwolniony w wyniku dodania roztworu wodorotlenku sodu. Zebrać destylat w roztworze kwasu borowego. Ilość destylatu (czas destylacji z parą wodną) zależy od zawartości azotu w próbce. Postępować zgodnie z instrukcjami producenta.

Uwaga: W przypadku półautomatycznego aparatu destylacyjnego dodawanie nadmiaru wodorotlenku sodu i destylacja z parą wodną przeprowadzane są automatycznie.

5.3. *Miareczkowanie*

Postępować zgodnie z pkt 5.3.1 lub 5.3.2.

5.3.1. Kwas siarkowy

Miareczkować nadmiar kwasu siarkowego w kolbie odbieralnika roztworem wodorotlenku sodu (pkt 3.10 lub 3.11), w zależności od stężenia zastosowanego kwasu siarkowego, do uzyskania punktu końcowego.

5.3.2. Kwas borowy

Miareczkować zawartość kolby odbieralnika mianowanym roztworem objętościowym kwasu chlorowodorowego (3.19) lub kwasu siarkowego (3.6) przy pomocy biurety i odczytać ilość zużytego titrantu.

Przy stosowaniu kolorymetrycznego punktu końcowego punkt końcowy osiąga się w momencie pojawienia się pierwszego śladu różowego zabarwienia cieczy. Określić odczyt biurety z dokładnością do 0,05 ml. W wizualizacji punktu końcowego pomocna jest podświetlana płyta mieszadła magnetycznego lub detektor fotometryczny.

Można to przeprowadzić automatycznie za pomocą parowego aparatu destylacyjnego z funkcją automatycznego miareczkowania.

Przy obsłudze konkretnego aparatu destylacyjnego lub aparatu do miareczkowania stosować się do instrukcji producenta.

Uwaga: Jeżeli stosowany jest system automatycznego miareczkowania, rozpoczyna się ono bezpośrednio po destylacji i stosowany jest 1 % roztwór kwasu borowego (3.18).

▼B

Jeżeli stosowany jest w pełni automatyczny aparat destylacyjny, automatyczne miareczkowanie amoniaku można przeprowadzić również z wykryciem punktu końcowego przy pomocy potencjometrycznego systemu pH.

W tym przypadku stosowany jest automatyczny aparat do miareczkowania z pehametrem. Pehametr musi być odpowiednio skalibrowany w zakresie od pH 4 do pH 7 za pomocą zwykłych laboratoryjnych metod kalibracji pH.

Punkt końcowy pH w miareczkowaniu osiąga się przy wartości pH równej 4,6, co stanowi najwyższy punkt krzywej miareczkowania (punkt przegięcia).

5.4. *Ślepa próba*

W celu potwierdzenia, że zastosowane odczynniki nie zawierają azotu, przeprowadzić ślepą próbę (mineralizację, destylację i miareczkowanie), stosując 1 g sacharozy (3.14) zamiast próbki.

6. **Obliczanie wyników**

Obliczenia wykonywane są zgodnie z pkt 6.1 lub 6.2.

6.1. *Obliczenia do miareczkowania zgodnie z pkt 5.3.1*

Zawartość białka surowego jako udział procentowy w masie obliczana jest według następującego wzoru:

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

gdzie:

V_0 = objętość w ml NaOH (3.10 lub 3.11) zużytego do ślepej próby
V_1 = objętość w ml NaOH (3.10 lub 3.11) zużytego do miareczkowania próbki
c = stężenie w mol/l wodorotlenku sodu (3.10 lub 3.11)
m = masa w g próbki

6.2 *Obliczenia do miareczkowania zgodnie z pkt 5.3.2*

6.2.1. Miareczkowanie kwasem chlorowodorowym

Zawartość białka surowego jako udział procentowy w masie obliczana jest według następującego wzoru:

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

gdzie:

m = masa naważki w g
c = stężenie w mol/l mianowanego roztworu objętościowego kwasu chlorowodorowego (3.19)
V_0 = objętość w ml kwasu chlorowodorowego użytego do próby ślepej
V_1 = objętość w ml kwasu chlorowodorowego użytego do naważki

6.2.2. Miareczkowanie kwasem siarkowym

Zawartość białka surowego jako udział procentowy w masie obliczana jest według następującego wzoru:

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

▼B

gdzie:

m = masa naważki w g
c = stężenie w mol/l mianowanego roztworu objętościowego kwasu siarkowego (3.6)
V_0 = objętość w ml kwasu siarkowego (3.6) użytego do próby ślepej
V_1 = objętość w ml kwasu siarkowego (3.6) użytego do naważki

7. **Sprawdzenie metody**

7.1. *Powtarzalność*

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 0,2 % wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego niższej niż 20 %,

— 1,0 % najwyższego wyniku, dla zawartości białka surowego od 20 do 40 %,

— 0,4 % wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego wyższej niż 40 %.

7.2. *Dokładność*

Przeprowadzić analizę (mineralizację, destylację i miareczkowanie), stosując od 1,5 do 2,0 g acetanilidu (3.13) w obecności 1 g sacharozy (3.14); 1 g acetanilidu zużywa 14,80 ml kwasu siarkowego (3.5). Stopień odzysku musi wynosić co najmniej 99 %.

8. **Objaśnienia**

8.1. Sprzęt i aparatura mogą być obsługiwane ręcznie, półautomatycznie lub być całkowicie zautomatyzowane. W przypadku konieczności przeniesienia urządzenia pomiędzy etapami mineralizacji i destylacji, czynność tę należy wykonać bez jakichkolwiek strat. Jeżeli kolba aparatu destylacyjnego nie jest wyposażona we wkraplacz, dodać wodorotlenek sodu natychmiast przed podłączeniem kolby do chłodnicy, wlewając ciecz powoli po ściankach.

8.2. Jeżeli roztwór przechodzi w postać stałą, ponownie przeprowadzić oznaczanie, stosując większe ilości kwasu siarkowego (3.4) niż podano wyżej.

8.3. W przypadku produktów o niskiej zawartości azotu objętość kwasu siarkowego (3.7), która ma zostać dodana do kolby odbieralnika, może być w miarę potrzeby zmniejszona do 10 lub 15 ml i uzupełniona wodą do objętości 25 ml.

8.4. Do celów rutynowego badania można stosować inne metody analizy w odniesieniu do oznaczania białka surowego, ale metoda Kjeldahla opisana w niniejszej części C stanowi metodę referencyjną. Równoważność wyników uzyskanych inną metodą (np. DUMAS) w porównaniu z metodą referencyjną musi zostać wykazana odrębnie dla każdej matrycy. Ze względu na fakt, iż nawet po potwierdzeniu równoważności wyniki uzyskane inną metodą mogą się nieznacznie różnić od wyników uzyskanych metodą referencyjną, konieczne jest podanie w sprawozdaniu z badań metody analitycznej zastosowanej do oznaczenia białka surowego.

D. OZNACZANIE MOCZNIKA

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości mocznika w paszach.

▼B

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka ze środkiem klarującym tworzy w wodzie zawiesinę. Zawiesina jest filtrowana. Zawartość mocznika w filtracie jest oznaczana po dodaniu 4-dwumetyloaminobenzaldehydu (4-DMAB) poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali 420 nm.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Roztwór 4-dwumetyloaminobezaldehydu: rozpuścić 1,6 g 4-DMAB w 100 ml 96 % etanolu i dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego (ρ_{20} 1,19 g/ml). Trwałość tego odczynnika wynosi nie więcej niż dwa tygodnie.

3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynkowego $Zn(CH_3COO)_2$ $2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.4. Aktywny węgiel nieabsorbujący mocznika (sprawdzony).

3.5. Roztwór 0,1 % (w/v) mocznika.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Mikser (tumbler): ok. 35 do 40 obr./min.

4.2. Probówki: 160 × 16 mm ze szklanymi, szlifowanymi korkami.

4.3. Spektrofotometr.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Analiza próbki*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2 g próbki i umieścić razem z 1 g aktywnego węgla (3.4) w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 400 ml wody i 5 ml roztworu Carreza I (3.2), mieszać przez ok. 30 sekund, a następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.3). Mieszać przez 30 minut w mikserze. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, wstrząsnąć i przefiltrować.

Do probówek ze szklanymi szlifowanymi korkami przenieść po 5 ml przezroczystego, bezbarwnego filtratu, dodać 5 ml roztworu 4-DMAB (3.1) i zamieszać. Wstawić probówki do łaźni wodnej ustawionej na temperaturę 20 °C (+/- 4 °C). Po 15 minutach zmierzyć gęstość optyczną roztworu próbki spektrofotometrem przy długości fali 420 nm. Pomiar porównać ze ślepą próbą odczynnikową.

5.2. *Krzywa kalibracyjna*

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml nalać 1, 2, 4, 5 i 10 ml roztworu mocznika (3.5) i uzupełnić do pełnej objętości kolb wodą. Odlać 5 ml każdego z roztworów, dodać do każdej kolby po 5 ml roztworu 4-DMAB (3.1), wymieszać i zmierzyć gęstość optyczną w podany wyżej sposób, porównując z roztworem kontrolnym zawierającym 5 ml 4-DMAB i 5 ml wody pozbawionej mocznika. Wykreślić krzywą kalibracyjną.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie krzywej kalibracyjnej oznaczyć zawartość mocznika w próbce.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. **Objaśnienia**

7.1. W przypadku gdy zawartość mocznika jest wyższa niż 3 %, zmniejszyć masę próbki do 1 g lub rozcieńczyć pierwotny roztwór tak, aby w 500 ml nie znajdowało się więcej niż 50 mg mocznika.

▼B

7.2. W przypadku niskiej zawartości mocznika zwiększać masę próbki tak, aby filtrat pozostał przezroczysty i bezbarwny.

7.3. Jeśli próbka zawiera proste związki azotowe takie jak aminokwasy, gęstość optyczną należy mierzyć przy długości fali 435 nm.

E. OZNACZANIE LOTNYCH ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH

I. **METODA MIKRODYFUZYJNA**

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania w paszach zawartości lotnych związków azotowych, w przeliczeniu na amoniak.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest ekstrahowana wodą, a roztwór – klarowany i filtrowany. Lotne związki azotowe są oddzielane metodą mikrodyfuzji z użyciem roztworu węglanu potasu, zbierane w roztworze kwasu borowego i miareczkowane kwasem siarkowym.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Kwas trójchlorooctowy, roztwór 20 % (w/v).

3.2. Wskaźnik: rozpuścić 33 mg zieleni bromokrezolowej i 65 mg czerwieni metylowej w 100 ml etanolu o stężeniu od 95 do 96 % (v/v).

3.3. Kwas borowy, roztwór: w kolbie miarowej o pojemności 1 l rozpuścić 10 g kwasu borowego w 200 ml etanolu o stężeniu od 95 do 96 % (v/v) i 700 ml wody. Dodać 10 ml wskaźnika (3.2). Zamieszać i, jeżeli to konieczne, doprowadzić barwę roztworu do jasnoczerwonej przez dodanie roztworu wodorotlenku sodu. 1 ml tego roztworu będzie pochłaniał maksymalnie 300 µg NH_3.

3.4. Węglan potasu, roztwór nasycony: rozpuścić 100 g węglanu potasu w 100 ml wrzącej wody. Schłodzić i przefiltrować.

3.5. Kwas siarkowy o stężeniu 0,01 mol/l.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Mikser (tumbler): ok. 35 do 40 obr./min.

4.2. Szklane lub plastykowe naczynka Conwaya (zob. rysunek).

4.3. Mikrobiurety ze skalą 1/100 ml.

5. **Sposób postępowania**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 10 g próbki do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać 100 ml wody. Miksować w mikserze przez 30 minut. Dodać 50 ml roztworu kwasu trójchlorooctowego (3.1), uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, energicznie wstrząsnąć i przefiltrować przez karbowany filtr.

Pipetą wprowadzić 1 ml roztworu kwasu borowego (3.3) do środkowej części naczynka Conwaya i 1 ml filtratu próbki na obrzeże naczynka. Częściowo przykryć nasmarowaną przykrywką. Szybko dodać kroplami 1 ml nasyconego roztworu węglanu potasu (3.4) na obrzeże naczynka i zamknąć pokrywką, tak aby naczynko było hermetyczne. Obracać ostrożnie naczynkiem w płaszczyźnie poziomej, aby doprowadzić do zmieszania dwóch odczynników. Inkubować przez co najmniej cztery godziny w temperaturze pokojowej lub godzinę w temperaturze 40 °C.

Mikrobiuretą (4.3) miareczkować lotne związki zaabsorbowane w kwasie borowym, stosując roztwór kwasu siarkowego (3.5).

Ślepą próbę przeprowadzić w ten sam sposób, lecz bez próbki przeznaczonej do analizy.

▼B

6. **Obliczanie wyników**

1 ml H_2SO_4 o stężeniu 0,01 mol/l odpowiada 0,34 mg amoniaku.

Przedstawić wynik jako udział procentowy w próbce.

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

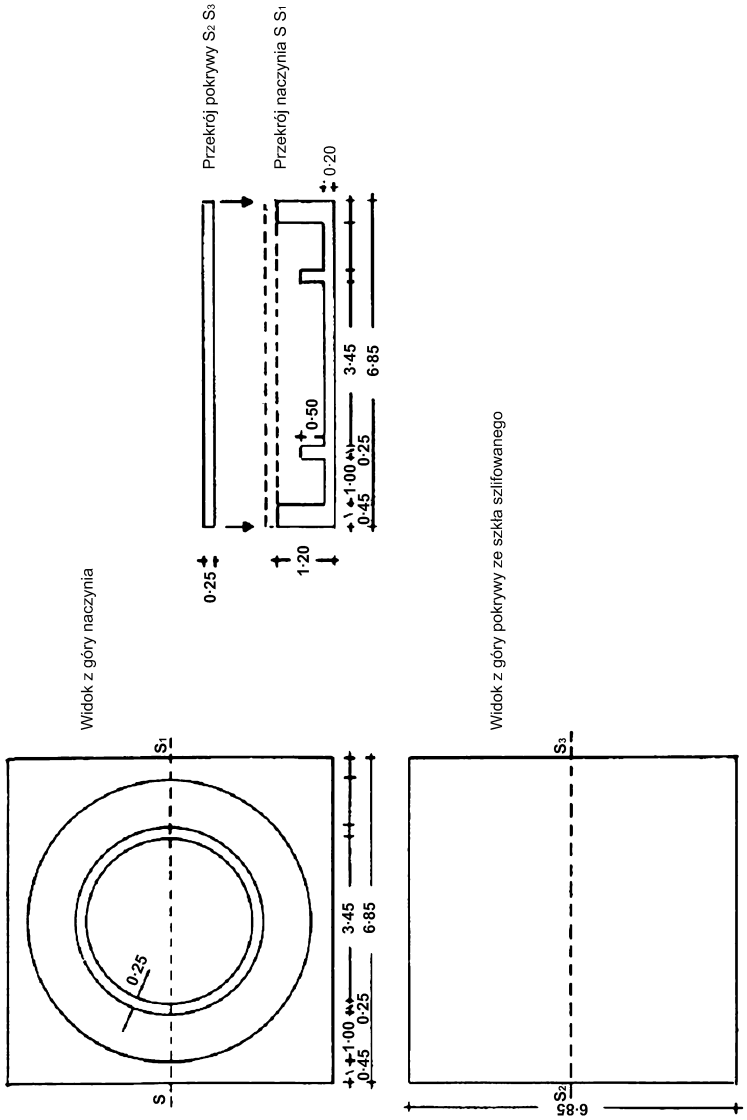
— 10 % wartości względnej, dla zawartości amoniaku poniżej 1,0 %,

— 0,1 % wartości bezwzględnej, dla zawartości amoniaku równej lub wyższej niż 1,0 %.

7. **Objaśnienia**

Jeżeli zawartość amoniaku w próbce przekracza 0,6 %, rozcieńczyć filtrat.

Naczynie Conwaya
(w skali 1/1)



▼B

II. METODA DESTYLACYJNA

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości lotnych związków azotowych, w przeliczeniu na amoniak, w mączkach rybnych niezawierających mocznika. Metoda ma zastosowanie dla zawartości amoniaku niższej niż 0,25 %.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest ekstrahowana wodą, a uzyskany roztwór klarowany i filtrowany. Lotne związki azotowe są oddzielane w punkcie wrzenia poprzez dodanie tlenku magnezu i zbierane w określonej ilości kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany z użyciem roztworu wodorotlenku sodu.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Kwas trójchlorooctowy, roztwór 20 % (w/v).

3.2. Tlenek magnezu.

3.3. Emulsja zapobiegająca spienieniu (np. silikon).

3.4. Kwas siarkowy o stężeniu 0,05 mol/l.

3.5. Wodorotlenek sodu, roztwór o stężeniu 0,1 mol/l.

3.6. Czerwień metylowa, roztwór 0,3 % w alkoholu etylowym 95 %–96 % (v/v).

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Mikser (tumbler): ok. 35–40 obr./min.

4.2. Aparat do destylacji typu Kjeldahla.

5. **Sposób postępowania**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 10 g próbki do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać 100 ml wody. Miksować w mikserze przez 30 minut. Dodać 50 ml roztworu kwasu trójchlorooctowego (3.1), uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, energicznie wstrząsnąć i filtrować przez karbowany filtr.

Pobrać taką ilość klarownego filtratu, która odpowiada spodziewanej zawartości lotnych związków azotowych, co zwykle odpowiada objętości 100 ml. Rozcieńczyć do 200 ml, dodać 2 g tlenku magnezu (3.2) i kilka kropli emulsji zapobiegającej spienieniu (3.3). Roztwór musi wykazywać alkaliczność wobec papierka lakmusowego, w przeciwnym razie dodać nieco tlenku magnezu (3.2). Postępować zgodnie z pkt 5.2 i 5.3 metody analitycznej dotyczącej oznaczania zawartości białka surowego (część C niniejszego załącznika).

Ślepą próbę przeprowadzić w ten sam sposób, lecz bez próbki przeznaczonej do analizy.

6. **Obliczanie wyników**

1 ml H_2SO_4 o stężeniu 0,05 mol/l odpowiada 1,7 mg amoniaku.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń, wykonanych dla tej samej próbki, nie może przekraczać 10 % wartości względnej amoniaku.

F. OZNACZANIE AMINOKWASÓW (Z WYJĄTKIEM TRYPTOFANU)

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości wolnych (syntetycznych i naturalnych) oraz całkowitych (związanych i wolnych peptydów) aminokwasów w paszach z użyciem analizatora aminokwasów. Metoda ma

▼B

zastosowanie do następujących aminokwasów: cystyny (cysteiny), metioniny, lizyny, treoniny, alaniny, argininy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, histydyny, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, proliny, seryny, tyrozyny i waliny.

Metoda nie pozwala odróżnić soli aminokwasów, a także form D i L aminokwasów. Nie można jej stosować do oznaczania tryptofanu lub hydroksyanalogów aminokwasów.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

2.1. *Wolne aminokwasy*

Wolne aminokwasy są ekstrahowane rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym. Wyekstrahowane jednocześnie makrocząsteczki związków azotowych są wytrącane kwasem sulfosalicylowym i usuwane przez filtrowanie. Filtrowany roztwór jest dostosowany do pH 2,20. Aminokwasy są oddzielane w drodze chromatografii jonowymiennej i oznaczane z zastosowaniem reakcji z ninhydryną, poprzez fotometryczną detekcję przy 570 nm.

2.2. *Aminokwasy całkowite*

Wybór sposobu postępowania zależy od oznaczanych aminokwasów. Cystynę (cysteinę) i metioninę przed hydrolizą poddać utlenianiu, odpowiednio do kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny. Tyrozyna musi być oznaczana w hydrolizatach próbek niepoddanych utlenieniu. Pozostałe aminokwasy wymienione w pkt 1 mogą być oznaczane w próbce utlenionej albo niepoddanej utlenianiu.

Utlenianie jest przeprowadzane w temperaturze 0 °C z użyciem mieszaniny kwasu nadmrówkowego i fenolu. Nadmiar odczynnika utleniającego jest rozkładany z użyciem dwusiarczku sodu. Utleniona albo niepoddana utlenianiu próbka jest hydrolizowana kwasem chlorowodorowym (3.20) przez 23 godziny. Hydrolizat jest dostosowany do pH 2,20. Aminokwasy są oddzielane w drodze chromatografii jonowymiennej i oznaczane na drodze reakcji z ninhydryną, przez fotometryczną detekcję przy 570 nm (440 nm w przypadku proliny).

3. **Odczynniki i roztwory**

Należy stosować wodę podwójnie destylowaną lub podobnej jakości (przewodność < 10 μS).

3.1. Nadtlenek wodoru, w (w/w) = 30 %.

3.2. Kwas mrówkowy, w (w/w) = 98–100 %.

3.3. Fenol.

3.4. Dwusiarczyn sodu.

3.5. Wodorotlenek sodu.

3.6. Kwas 5-sulfosalicylowy dwuhydrat.

3.7. Kwas chlorowodorowy, gęstość około 1,18 g/ml.

3.8. Cytrynian trisodu, dwuhydrat.

3.9. 2,2' tiodwuetanol (tiodwuglikol).

3.10. Chlorek sodu.

3.11. Ninhydryna.

3.12. Eter naftowy o temperaturze wrzenia 40–60 °C.

3.13. Norleucyna lub inny związek odpowiedni do stosowania jako wzorzec wewnętrzny.

▼B

3.14. Azot gazowy (< 10 ppm tlenu).

3.15. 1-oktanol.

3.16. Aminokwasy.

3.16.1. Substancje wzorcowe określone w pkt 1. Czyste związki, niezawierające wody krystalizacyjnej. Suszyć w warunkach próżni w obecności P_2O_5 lub H_2SO_4 przez tydzień przed użyciem.

3.16.2. Kwas cysteinowy.

3.16.3. Sulfon metioniny.

3.17. Roztwór wodorotlenku sodu, c = 7,5 mol/l:

Rozpuścić 300 g NaOH (3.5) w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą.

3.18. Roztwór wodorotlenku sodu, c = 1 mol/l:

Rozpuścić 40 g NaOH (3.5) w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą.

3.19. Roztwór kwasu mrówkowego i fenolu:

Zmieszać 889 g kwasu mrówkowego (3.2) z 111 g wody i dodać 4,73 g fenolu (3.3).

3.20. Mieszanina hydrolizująca, c = 6 mol HCl/l, zawierająca 1 g fenolu/l:

Dodać 1 g fenolu (3.3) do 492 ml HCl (3.7) i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą.

3.21. Mieszanina ekstrakcyjna, c = 0,1 mol HCl/l, zawierająca 2 % tiodwuglikolu: Pobrać 8,2 ml HCl (3.7), rozpuścić w około 900 ml wody, dodać 20 ml tiodwuglikolu (3.9) i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą (nie mieszać bezpośrednio odczynników określonych w pkt 3.7 i 3.9.).

3.22. Kwas 5-sulfosalicylowy, ß = 6 %:

Rozpuścić 60 g kwasu 5-sulfosalicylowego (3.6) w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą.

3.23. Mieszanina utleniająca (kwas nadmrówkowy – fenol):

Zmieszać w małej zlewce 0,5 ml nadtlenku wodoru (3.1) z 4,5 ml roztworu kwasu mrówkowego i fenolu (3.19). Inkubować w temperaturze od 20 do 30 ^{o}C przez godzinę w celu utworzenia kwasu nadmrówkowego, następnie schłodzić w lodowej łaźni wodnej (15 minut) przed dodaniem tej mieszaniny do próbki.

Uwaga: Unikać kontaktu ze skórą i nosić odzież ochronną.

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

Rozpuścić 19,61 g cytrynianu trisodu (3.8), 5 ml tiodwuglikolu (3.9), 1 g fenolu (3.3) i 16,50 ml HCl (3.7) w około 800 ml wody. Dostosować pH do 2,20. Uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.25. Bufor wymywający, przygotowany zgodnie z warunkami stosowanego analizatora (4.9).

3.26. Odczynnik ninhydrynowy, przygotowany zgodnie z warunkami stosowanego analizatora (4.9).

3.27. Wzorcowe roztwory aminokwasów. Roztwory te należy przechowywać w temperaturze niższej niż 5 ^{o}C.

▼B

3.27.1. Podstawowy wzorcowy roztwór aminokwasów (3.16.1).

Każdy o stężeniu c = 2,5 µmol/ml, w kwasie chlorowodorowym.

Mogą być otrzymane w handlu.

3.27.2. Podstawowe wzorcowe roztwory kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny, c = 1,25 µmol/ml.

Rozpuścić 0,2115 g kwasu cysteinowego (3.16.2) i 0,2265 g sulfonu metioniny (3.16.3) w buforze cytrynianowym (3.24) w kolbie miarowej o pojemności 1 l i uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze niższej niż 5 °C nie dłużej niż przez 12 miesięcy. Roztworu nie stosuje się, jeżeli podstawowy wzorcowy roztwór (3.27.1) zawiera kwas cysteinowy i sulfon metioniny.

3.27.3. Podstawowy wzorcowy roztwór wzorca wewnętrznego, proponuje się zastosować norleucynę, c = 20 µmol/ml.

Rozpuścić 0,6560 g norleucyny (3.13) w buforze cytrynianowym (3.24) w kolbie miarowej i uzupełnić kolbę do objętości 250 ml buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze niższej niż 5 °C nie dłużej niż przez 6 miesięcy.

3.27.4. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do użycia z hydrolizatami, c = 5 nmol/50 µl kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny i c = 10 nmol/50 µl innych aminokwasów. Rozpuścić 2,2 g chlorku sodu (3.10) w zlewce o pojemności 100 ml z 30 ml buforu cytrynianowego (3.24). Dodać 4,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego aminokwasów (3.27.1), 4,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny (3.27.2) i, jeżeli jest stosowany, 0,5 ml podstawowego wzorcowego roztworu wzorca wewnętrznego (3.27.3). Dostosować pH do 2,20 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu (3.18).

Przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym (3.24) i zmieszać.

Przechowywać w temperaturze niższej niż 5 °C nie dłużej niż przez 3 miesiące.

Zob. również objaśnienia pkt 9.1.

3.27.5. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do stosowania z hydrolizatami przygotowanymi w sposób określony w pkt 5.3.3.1 i do użycia z ekstraktami (5.2). Roztwór kalibracyjny przygotowuje się w sposób określony w pkt 3.27.4, z pominięciem chlorku sodu.

Przechowywać w temperaturze niższej niż 5 °C nie dłużej niż przez 3 miesiące.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Kolba okrągłodenna o pojemności 100 lub 250 ml z chłodnicą zwrotną.

4.2. Butelka ze szkła borokrzemowego o pojemności 100 ml z nakrętką pokrytą gumą/teflonem (np. Duran, Schott) do stosowania w suszarce.

4.3. Suszarka z silnym nawiewem i możliwością regulacji temperatury z dokładnością większą niż ± 2 °C.

4.4. Pehametr (dokładność do trzech miejsc po przecinku).

4.5. Filtr membranowy (0,22 µm).

4.6. Wirówka.

4.7. Obrotowa wyparka próżniowa.

4.8. Mechaniczna wytrząsarka lub mieszadło magnetyczne.

▼B

4.9. Analizator aminokwasów lub wyposażenie do HPLC z kolumną jonowymienną, przystawką do ninhydryny, postkolumnową derywatyzacją i detektorem fotometrycznym.

Kolumna jest wypełniona sulfonowaną żywicą polistyrenową mającą zdolność rozdziału aminokwasów od siebie i od innych składników reagujących z ninhydryną. Przepływ buforu i ninhydryny jest przeprowadzany przez pompy o stabilności przepływu 0,5 % w czasie testowania kalibracyjnych roztworów, jak i analizy próbek.

W niektórych analizatorach aminokwasów mogą być stosowane metody hydrolizy, w których hydrolizat zawiera stężenie sodu c = 0,8 mol/l i całą pozostałość kwasu mrówkowego z etapu utleniania. Inne analizatory nie dają zadowalającego rozdziału niektórych aminokwasów, jeżeli hydrolizat zawiera nadmiar kwasu mrówkowego lub wysokie stężenie jonów sodowych. W tym przypadku objętość kwasu jest zmniejszana przez odparowanie do objętości około 5 ml, które wykonuje się po hydrolizie i przed dostosowaniem pH. Odparowywanie należy prowadzić w warunkach próżni w temperaturze nie wyższej niż 40 °C.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Przygotowanie próbki*

Rozdrobnić próbkę, tak aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 0,5 mm. Próbki o dużej zawartości wilgotności przed rozdrobnieniem należy wysuszyć albo suchym powietrzem o temperaturze nieprzekraczającej 50 °C, albo przez zamrożenie. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed rozdrobnieniem należy poddać ekstrakcji eterem naftowym (3.12).

5.2. *Oznaczanie wolnych aminokwasów w paszach i premiksach*

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, odpowiednią ilość (1–5 g) próbki przygotowanej w sposób określony w pkt 5.1 do kolby stożkowej i dodać 100 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (3.21). Wstrząsać mieszaninę przez 60 minut, używając mechanicznej wytrząsarki lub mieszadła magnetycznego (4.8). Odstawić do sedymentacji osadu i pobrać pipetą 10 ml supernatantu roztworu do zlewki o objętości 100 ml.

Dodać, mieszając, 5,0 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego (3.22) i kontynuować mieszanie z użyciem mieszadła magnetycznego przez 5 minut. Przefiltrować lub odwirować supernatant w celu usunięcia osadu. Umieścić 10,0 ml otrzymanego roztworu w zlewce o objętości 100 ml, dostosować pH do 2,20 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu (3.18), przenieść do wolumetrycznej kolby o odpowiedniej pojemności, z użyciem buforu cytrynianowego (3.24) i uzupełnić roztworem buforu cytrynianowego do pełnej objętości tej kolby (3.24).

Jeżeli jest stosowany wzorzec wewnętrzny, dodać 1,00 ml podstawowego wzorcowego roztworu wzorca wewnętrznego (3.27.3) na każde 100 ml końcowego roztworu i uzupełnić roztworem buforu cytrynianowego (3.24) do pełnej objętości kolby.

Przeprowadzić rozdział chromatograficzny w sposób określony w pkt 5.4.

Jeżeli ekstrakty nie będą oznaczane tego samego dnia, należy przechowywać je w temperaturze niższej niż 5 °C.

5.3. *Oznaczanie całkowitej zawartości aminokwasów*

5.3.1. Utlenianie

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 do 1 g próbki przygotowanej w sposób określony w pkt 5.1 do:

— kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml (4.1) do hydrolizy otwartej (5.3.2.3), lub

▼B

— kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml (4.1), jeżeli wymagane jest niskie stężenie sodu (5.3.3.1), lub

— butelki o pojemności 100 ml z nakrętką (4.2), w przypadku hydrolizy zamkniętej (5.3.2.4).

Odważona próbka musi zawierać około 10 mg azotu, a poziom wilgotności nie może przekraczać 100 mg.

Umieścić kolbę lub butelkę w lodowej łaźni wodnej i oziębić do temperatury 0 °C, dodać 5 ml mieszaniny utleniającej (3.23) i zamieszać, używając szklanej bagietki z wygiętym końcem. Uszczelnić kolbę/butelkę wraz z bagietką, stosując hermetyczny film, umieścić wraz z lodową łaźnią wodną w lodówce o temperaturze 0 °C i pozostawić na 16 godzin. Po 16 godzinach wyjąć z lodówki i rozłożyć nadmiar odczynnika utleniającego przez dodanie 0,84 g dwusiarczynu sodu (3.4).

Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3.2.1.

5.3.2. Hydroliza

5.3.2.1. *Hydroliza próbek utlenionych*

Do utlenionej próbki, przygotowanej w sposób określony w pkt 5.3.1, dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej (3.20), zwracając uwagę, aby zmyć pozostałości próbki przywierające do bocznych ścianek naczynia i bagietki.

W zależności od sposobu przeprowadzonej hydrolizy postępować w sposób określony w pkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4.

5.3.2.2. *Hydroliza próbek nieutlenionych*

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 do 1 g próbki przygotowanej w sposób określony w pkt 5.1 do kolby okrągłodennej o pojemności 100 lub 250 ml (4.1) lub do butelki o pojemności 100 ml z nakrętką (4.2). Odważona próbka musi zawierać około 10 mg azotu. Ostrożnie dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej (3.20) i zmieszać z próbką. Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4.

5.3.2.3. *Hydroliza otwarta*

Do kolby z mieszaniną, przygotowaną w sposób określony w pkt 5.3.2.1 lub 5.3.2.2, dodać 3 szklane perełki i gotować, utrzymując stan wrzenia ze zwrotem skroplin przez 23 godziny. Po zakończonej hydrolizie przemyć chłodnicę od dołu 5 ml buforu cytrynianowego (3.24). Odłączyć kolbę i schłodzić w łaźni lodowej.

Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3.3.

5.3.2.4. *Hydroliza zamknięta*

Umieścić butelkę zawierającą mieszaninę, przygotowaną w sposób określony w pkt 5.3.2.1 lub 5.3.2.2, w suszarce (4.3) w temperaturze 110 °C. W czasie 1 godziny hydrolizy, aby uniknąć gwałtownego wzrostu ciśnienia w wyniku powstawania substancji gazowych i wybuchu, umieścić nakrętkę na naczyniu. Nie zamykać naczynia korkiem. Po godzinie dokręcić nakrętkę i pozostawić w suszarce (4.3) przez 23 godziny. Po zakończeniu hydrolizy wyjąć butelkę z suszarki, ostrożnie odkręcić nakrętkę i umieścić butelkę w lodowej łaźni wodnej. Pozostawić do schłodzenia.

W zależności od sposobu dostosowania pH (5.3.3) przenieść ilościowo zawartość butelki do zlewki lub kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml, stosując bufor cytrynianowy (3.24).

Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3.3.

▼B

5.3.3. Dostosowanie pH

W zależności od tolerancji analizatora aminokwasów (4.9) na sód pH dostosowuje się w sposób określony w pkt 5.3.3.1 lub 5.3.3.2.

5.3.3.1. *Dla systemów chromatograficznych (4.9) wymagających niskiego stężenia sodu*

Wskazane jest zastosowanie podstawowego wzorcowego roztworu wzorca wewnętrznego (3.27.3), gdy analizatory aminokwasów wymagają niskiego stężenia sodu, w przypadku gdy należy zredukować objętość kwasu.

W tym przypadku dodać 2,00 ml podstawowego roztworu wzorca wewnętrznego (3.27.3) do hydrolizatu przed odparowaniem.

Dodać 2 krople 1-oktanolu (3.15) do hydrolizatu otrzymanego w sposób określony w pkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4.

Stosując obrotową wyparkę próżniową (4.7) zmniejszyć w warunkach próżni i w temperaturze 40 °C objętość do 5–10 ml. Jeżeli objętość roztworu zostanie przypadkowo zredukowana poniżej 5 ml, hydrolizat należy wyrzucić i powtórzyć analizę.

Dostosować pH do 2,20 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu (3.18) i postępować w sposób określony w pkt 5.3.4.

5.3.3.2. *Dla pozostałych analizatorów aminokwasów (4.9)*

Pobrać hydrolizaty otrzymane w sposób określony w pkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4 i częściowo je zneutralizować poprzez mieszanie, ostrożnie dodając 17 ml roztworu wodorotlenku sodu (3.17), zwracając uwagę, aby temperatura roztworu nie była wyższa niż 40 °C.

Dostosować pH do 2,20 w temperaturze pokojowej, dodając roztwór wodorotlenku sodu (3.17), a pod koniec roztwór wodorotlenku sodu (3.18). Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3.4.

5.3.4. Roztwór próbki do analizy chromatograficznej

Przenieść ilościowo hydrolizaty o dostosowanym pH (5.3.3.1 lub 5.3.3.2) z użyciem buforu cytrynianowego (3.24) do kolby miarowej o pojemności 200 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym (3.24).

Jeżeli wcześniej nie dodawano wzorca wewnętrznego, dodać 2,00 ml podstawowego wzorcowego roztworu wzorca wewnętrznego (3.27.3) i uzupełnić buforem cytrynianowym (3.24) do pełnej objętości kolby. Dokładnie zmieszać.

Przejść do analizy chromatograficznej (5.4).

Jeżeli roztwory próbek nie będą analizowane tego samego dnia, należy przechowywać je w temperaturze niższej niż 5 °C.

5.4. *Chromatografia*

Przed analizą chromatograficzną doprowadzić ekstrakt (5.2) lub hydrolizat (5.3.4) do temperatury pokojowej. Wstrząsnąć mieszaniną i przefiltrować jej odpowiednią ilość przez filtr membranowy 0,22 µm (4.5). Otrzymany klarowny roztwór jest poddawany chromatografii jonowymiennej przy wykorzystaniu analizatora aminokwasów (4.9).

Dozowanie wykonuje się ręcznie lub automatycznie. Ważne jest, aby na kolumnę nanieść takie same ilości roztworów z dokładnością ± 0,5 % zarówno w przypadku analizy wzorców, jak i badanych próbek, z wyjątkiem gdy jest stosowany wzorzec wewnętrzny, oraz aby stosunek sodu do aminokwasu w roztworze badanej próbki był jak najbardziej zbliżony do tego w roztworze wzorcowym.

▼B

Zasadniczo częstość przeprowadzania kalibracji zależy od stabilności odczynnika ninhydrynowego i od systemu analitycznego. Wzorzec lub próbka są wymywane buforem cytrynianowym (3.24), tak aby powierzchnia piku wzorca odpowiadała od 30 do 200 % powierzchni piku badanej próbki aminokwasu.

Analiza chromatograficzna aminokwasów będzie różnić się nieznacznie w zależności od typu stosowanego analizatora i żywicy. Wybrany system musi mieć zdolność oddzielenia od siebie aminokwasów oraz od innych substancji dających z ninhydryną reakcje. W badanym zakresie stosowany system chromatograficzny musi dawać liniową odpowiedź na zmiany ilości aminokwasów dodawanych na kolumnę.

W czasie analizy chromatograficznej opisany poniżej stosunek doliny do wysokości piku odnosi się do przypadku, gdy jest analizowany równomolowy roztwór oznaczanego aminokwasu. Równomolowy roztwór aminokwasu musi zawierać co najmniej 30 % maksymalnej zawartości każdego aminokwasu, który można aktualnie oznaczyć z użyciem danego analizatora aminokwasów (4.9).

Dla oddzielenia treoniny od seryny stosunek doliny do wysokości piku niższego z pokrywających się aminokwasów na chromatografie nie może przekraczać 2:10, w przypadku gdy oznaczane są tylko cystyna (cysteina), metionina, treonina i lizyna, niewystarczające oddzielenie od sprzężonych pików będzie ujemnie wpływało na oznaczenie. Dla wszystkich innych aminokwasów rozdział musi być lepszy niż 1:10.

System musi zapewniać oddzielenie lizyny od „artefaktów lizyny” i od ornityny.

6. **Obliczanie wyników**

Powierzchnię pików próbki i wzorca mierzy się dla każdego pojedynczego aminokwasu i obliczana jest zawartość aminokwasu (X) w g/kg próbki.

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

Jeżeli jest stosowany wzorzec wewnętrzny, wyrażenie należy pomnożyć przez: $\frac{D}{C}$

gdzie:

A = powierzchnia piku hydrolizatu lub ekstraktu

B = powierzchnia piku wzorcowego roztworu kalibracyjnego

C = powierzchnia piku wzorca wewnętrznego w hydrolizacie lub ekstrakcie

D = powierzchnia piku wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym kalibracyjnym

M = masa cząsteczkowa oznaczanego aminokwasu

c = stężenie wzorca w μmol/ml

m = masa próbki w g przeliczona na masę oryginalnej próbki w przypadku odtłuszczania lub podsuszania

V = hydrolizat ogółem w ml (5.3.4) lub obliczona ogólna objętość w ml rozcieńczonego ekstraktu (6.1)

Cystyna i cysteina są oznaczane jako kwas cysteinowy w hydrolizatach utlenionej próbki, ale są obliczane jak cystyna ($C_6H_{12}N_2O_4S_2$, M 240,30 g/mol), stosując M 120,15 g/mol (= 0,5 × 240,30 g/mol).

Metionina jest oznaczana jako sulfon metioniny w hydrolizatach utlenionej próbki, ale jest obliczana jak metionina, stosując M metioniny: 149,21 g/mol.

▼B

Dodana wolna metionina jest oznaczana po ekstrakcji jako metionina, przy czym dla obliczeń stosowana jest taka sama wartość M.

6.1. Ogólną objętość rozcieńczonych ekstraktów (F) w przypadku oznaczania zawartości wolnych aminokwasów (5.2) obliczyć według następującego wzoru:

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

V = objętość końcowego

7. **Ocena metody**

Międzynarodowe badania porównawcze metody były przeprowadzone w 1990 r. z użyciem czterech pasz (mieszanki paszowej dla świń, mieszanki paszowej dla brojlerów, koncentratu białkowego i premiksu). Po odrzuceniu wyników odbiegających, średnie wyniki i odchylenia standardowe są przedstawione w tabelach zawartych w niniejszym punkcie:

Średnie wielkości w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/ cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Mieszanka paszowa dla brojlerów	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów.

7.1. *Powtarzalność*

Powtarzalność wyrażona jako „odchylenie standardowe wewnątrz laboratorium” omawianego powyżej porównawczego badania jest przedstawiona w poniższych tabelach:

Odchylenie standardowe wewnątrz laboratorium (S_r) w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/ cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Mieszanka paszowa dla brojlerów	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów.

▼B

Współczynnik zmienności (%) dla odchylenia standardowego wewnątrz laboratorium (S_r)

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/ cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Mieszanka paszowa dla brojlerów	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów.

7.2. *Odtwarzalność*

Wyniki odchylenia standardowego między laboratoriami otrzymane w wyniku przeprowadzenia omawianego powyżej porównawczego badania są przedstawione w poniższej tabeli:

Odchylenie standardowe między laboratoriami (S_R) w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/ cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Mieszanka paszowa dla brojlerów	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów.

Współczynnik zmienności (%) dla odchylenia standardowego między laboratoriami (S_R)

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna/ cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Mieszanka paszowa dla brojlerów	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Koncentrat białkowy	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 = liczba uczestniczących laboratoriów.

▼B

8. **Stosowanie materiałów odwoławczych**

Prawidłowe stosowanie metody należy weryfikować przez wykonywanie powtarzalnych oznaczeń certyfikowanych materiałów odwoławczych, jeżeli takie są dostępne. Zalecana jest także kalibracja z zastosowaniem certyfikowanych kalibracyjnych roztworów aminokwasów.

9. **Objaśnienia**

9.1. Z powodu różnic pomiędzy analizatorami aminokwasów końcowe stężenia kalibracyjnych roztworów aminokwasów wzorcowych (zob. 3.27.4 i 3.27.5) oraz hydrolizatu (zob. 5.3.4) należy traktować jako przykładowe.

Zakres liniowej odpowiedzi aparatu należy sprawdzić dla wszystkich aminokwasów.

Roztwór wzorcowy jest rozcieńczany buforem cytrynianowym, tak aby otrzymać powierzchnię piku o średnim zasięgu.

9.2. Jeżeli do analizy produktów hydrolizy jest wykorzystywany wysoko sprawny chromatograf cieczowy, należy zoptymalizować warunki doświadczalne analizy zgodnie z zaleceniami producenta.

9.3. Przy stosowaniu tej metody do pasz zawierających więcej niż 1 % chlorków (koncentraty, mieszanki mineralne, mieszanki paszowe uzupełniające) wyniki oznaczania metioniny mogą być zaniżone i należy stosować specjalne postępowanie.

G. OZNACZANIE TRYPTOFANU

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości całkowitego i wolnego tryptofanu w paszach. Metoda nie wyróżnia form D i L.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

W celu oznaczenia całkowitego tryptofanu próbka jest hydrolizowana w środowisku zasadowym z użyciem nasyconego roztworu wodorotlenku baru i ogrzewana do 110 ^{o}C przez 20 godzin. Po hydrolizie dodawany jest wzorzec wewnętrzny.

W celu oznaczenia wolnego tryptofanu próbka jest ekstrahowana w warunkach lekko kwaśnych w obecności wzorca wewnętrznego.

Tryptofan i wzorzec wewnętrzny w hydrolizacie lub w ekstrakcie jest oznaczony metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Należy stosować wodę podwójnie destylowaną lub o porównywalnej jakości (przewodnictwo < 10 μS/cm).

3.2. Substancja wzorcowa: tryptofan (czystość/zawartość ≥ 99 %) suszony w próżni nad pięciotlenkiem fosforu.

3.3. Substancja wzorcowa wewnętrzna: α-metylo-tryptofan (czystość/zawartość ≥ 99 %) suszony w próżni nad pięciotlenkiem fosforu.

3.4. Wodorotlenek baru, oktahydrat (należy uważać, aby nie wystawiać $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ na nadmierne działanie powietrza, aby uniknąć tworzenia się $BaCO_3$, który mógłby utrudniać oznaczenie) (zob. objaśnienia pkt 9.3).

3.5. Wodorotlenek sodu.

3.6. Kwas ortofosforowy, w (w/w) = 85 %.

3.7. Kwas chlorowodorowy, ρ_{20} = 1,19 g/ml.

3.8. Metanol do HPLC.

3.9. Eter naftowy o temperaturze wrzenia od 40 do 60 ^{o}C.

▼B

3.10. Roztwór wodorotlenku sodu, c = 1 mol/l:

Rozpuścić 40,0 g NaOH (3.5) w wodzie i uzupełnić do objętości 1 l wodą (3.1).

3.11. Kwas chlorowodorowy, c = 6 mol/l:

Odmierzyć 492 ml HCl (3.7) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.12. Kwas chlorowodorowy, c = 1 mol/l:

Odmierzyć 82 ml HCl (3.7) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.13. Kwas chlorowodorowy, c = 0,1 mol/l:

Odmierzyć 8,2 ml HCl (3.7) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.14. Kwas ortofosforowy, c = 0,5 mol/l:

Odmierzyć 34 ml kwasu ortofosforowego (3.6) i uzupełnić do objętości 1 l wodą (3.1).

3.15. Stężony roztwór tryptofanu (3.2), c = 2,50 μmol/ml:

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2553 g tryptofanu (3.2) w kwasie chlorowodorowym (3.13) i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym (3.13). Przechowywać w temperaturze - 18 ^{o}C nie dłużej niż przez 4 tygodnie.

3.16. Stężony roztwór wzorca wewnętrznego, c = 2,50 μmol/ml:

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2728 g α-metylo-tryptofanu (3.3) w kwasie chlorowodorowym (3.13) i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym (3.13). Przechowywać w temperaturze - 18 ^{o}C nie dłużej niż przez 4 tygodnie.

3.17. Kalibracyjny roztwór wzorcowy tryptofanu i wzorca wewnętrznego:

Odmierzyć 2,00 ml stężonego roztworu tryptofanu (3.15) i 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α-metylo-tryptofanu) (3.16). Rozcieńczyć wodą (3.1) i metanolem (3.8) w przybliżeniu do tej samej objętości i tego samego stężenia metanolu (10–30 %) jak w końcowym hydrolizacie.

Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Chronić przed bezpośrednim działaniem światła podczas przygotowywania.

3.18. Kwas octowy.

3.19. 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanol.

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

3.21. Roztwór 1 g 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (3.19) w 100 ml metanolu (3.8).

3.22. Faza ruchoma do HPLC: 3,00 g kwasu octowego (3.18) + 900 ml wody (3.1) +50,0 ml roztworu (3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (3.19) w metanolu (3.8) (1 g/100 ml). Dostosować pH do 5,00, stosując etanoloaminę (3.20). Uzupełnić do objętości 1 000 ml wodą (3.1).

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Wyposażenie HPLC z detektorem spektrofluorometrycznym.

4.2. Kolumna do chromatografii cieczowej, 125 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 3 μm lub równoważne.

4.3. Pehametr.

4.4. Kolba propylenowa o pojemności 125 ml, z szeroką szyjką i nakrętką.

▼B

4.5. Filtr membranowy, 0,45 µm.

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

4.7. Wstrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne.

4.8. Mieszadło Vortex.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Przygotowanie próbek*

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 0,5 mm. Próbki o dużej zawartości wilgotności przed rozdrobnieniem wysuszyć albo na powietrzu w temperaturze nieprzekraczającej 50 °C, albo przez wymrażanie. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed rozdrobnieniem należy poddać ekstrakcji eterem naftowym (3.9).

5.2. *Oznaczanie wolnego tryptofanu (ekstrakt)*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, odpowiednią ilość (1–5 g) próbki przygotowanej w sposób określony w 5.1 do kolby stożkowej. Dodać 100,0 ml kwasu chlorowodorowego (3.13) i 5,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (3.16). Wstrząsać lub mieszać przez 60 minut z użyciem wstrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego (4.7). Pozostawić do oddzielenia się osadu i przenieść pipetą 10,0 ml supernatantu roztworu do zlewki. Dodać 5 ml kwasu ortofosforowego (3.14). Dostosować pH do 3 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu (3.10). Dodać odpowiednią ilość metanolu (3.8), aby uzyskać stężenie od 10 do 30 % metanolu w końcowej objętości. Przenieść do kolby miarowej o odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do objętości właściwej dla chromatografii (objętość zbliżona do objętości kalibracyjnego roztworu wzorcowego (3.17)).

Przefiltrować kilka ml roztworu przez filtr membranowy 0,45 µm (4.5) przed dozowaniem na kolumnę HPLC. Przeprowadzić chromatografię w sposób określony w pkt 5.4.

Roztwór wzorcowy i ekstrakty chronić przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Jeżeli jest niemożliwe dokonanie analizy ekstraktów tego samego dnia, ekstrakty można przechowywać w temperaturze 5 °C nie dłużej niż przez 3 dni.

5.3. *Oznaczanie całkowitego tryptofanu (hydrolizat)*

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 do 1 g próbki przygotowanej w sposób określony w pkt 5.1 do kolby propylenowej (4.4). Odważona próbka musi zawierać około 10 mg azotu. Dodać 8,4 g oktahydratu wodorotlenku baru (3.4) i 10 ml wody. Mieszać z użyciem mieszadła Vortex (4.8) lub mieszadła magnetycznego (4.7). Pozostawić osłonięty teflonem magnes w mieszaninie. Spłukać ściany naczynia z użyciem 4 ml wody. Nałożyć nakrętkę i zamknąć luźno naczynie. Przenieść kolbę do autoklawu (4.6) z wrzącą wodą i parą i utrzymywać ją w czasie od 30 do 60 minut. Zamknąć autoklaw i autoklawować w temperaturze 110 °C (± 2) °C przez 20 godzin.

Przed otwarciem autoklawu obniżyć temperaturę nieco poniżej 100 °C. W celu uniknięcia krystalizacji $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ dodać do ciepłej mieszaniny 30 ml wody o temperaturze pokojowej. Łagodnie wstrząsać lub mieszać. Dodać 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α-metylo-tryptofanu) (3.16). Studzić naczynia w łaźni wodnej lub lodowej przez 15 minut.

Następnie dodać 5 ml kwasu ortofosforowego (3.14). Utrzymując naczynie w zimnej łaźni, zobojętnić z użyciem HCl (3.11), mieszając, i dostosować pH do 3,0 z HCl (3.12). Dodać ilość metanolu konieczną do uzyskania stężenia od 10 do 30 % metanolu w końcowej objętości. Przenieść do kolby miarowej o odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do objętości, koniecznej dla chromatografii (np. 100 ml). Dodanie metanolu nie może powodować wytrącania.

▼B

Przefiltrować kilka ml roztworu przez filtr membranowy 0,45 µm (4.5) przed dozowaniem na kolumnę HPLC. Przeprowadzić chromatografię w sposób określony w 5.4.

Roztwór wzorcowy i produkty hydrolizy chronić przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Jeżeli jest niemożliwe dokonanie analizy produktów hydrolizy tego samego dnia, można je przechowywać w temperaturze 5 °C nie dłużej niż przez 3 dni.

5.4. *Oznaczanie HPLC*

Poniższe parametry izokratycznej elucji są przykładowe. Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników (zob. objaśnienia 9.1 i 9.2):

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.2):	125 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 3 µm lub równoważne
Temperatura kolumny:	Temperatura pokojowa
Faza ruchoma (3.22):	3,00 g kwasu octowego (3.18) + 900 ml wody (3.1) + 50,0 ml roztworu (3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (3.19) w metanolu (3.8) (1g/100ml). Dostosować pH do 5,00 z użyciem etanoloaminy (3.20). Uzupełnić do objętości 1 l wodą (3.1)
Prędkość przepływu:	1 ml/min
Całkowity czas analizy chromatograficznej:	około 34 minuty
Długość fali przy detekcji:	wzbudzenie: 280 nm, emisja: 356 nm.
Dozowana objętość:	20 µl

6. **Obliczanie wyników**

Zawartość tryptofanu (X) w g na 100 g próbki obliczana jest według poniższego wzoru:

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

A = powierzchnia piku wzorca wewnętrznego, kalibracyjny roztwór wzorcowy (3.17)

B = powierzchnia piku tryptofanu, ekstraktu (5.2) lub hydrolizatu (5.3)

V_1 = objętość w ml (2 ml) stężonego roztworu tryptofanu (3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (3.17)

c = stężenie w µmol/ml (= 2,50) stężonego roztworu tryptofanu (3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (3.17)

V_2 = objętość w ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (3.16) dodanego przy ekstrakcji (5.2) (= 5,00 ml) lub do hydrolizatu (5.3) (= 2,00 ml)

C = powierzchnia piku wzorca wewnętrznego, ekstraktu (5.2) lub hydrolizatu (5.3)

D = powierzchnia piku tryptofanu, kalibracyjnego roztworu wzorcowego (3.17)

V_3 = objętość w ml (= 2,00 ml) stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (3.16) dodanego do kalibracyjnego roztworu wzorcowego (3.17)

m = naważka próbki w g (skorygowana względem masy wyjściowej, jeżeli była podsuszana lub odtłuszczana)

M = ciężar cząsteczkowy tryptofanu (= 204,23 g/mol)

7. **Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % względem najwyższego wyniku.

▼B

8. **Wyniki badań porównawczych**

We Wspólnocie Europejskiej przeprowadzono badania porównawcze (czwarte porównanie wyników różnych laboratoriów), w których trzy próbki były analizowane przez maksymalnie 12 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy. Na każdej próbce powtórzono analizy pięciokrotnie. Ich wyniki są przedstawione w poniższej tabeli:

	Próbka 1Pasza dla świń	Próbka 2 Pasza dla świń uzupełniona L-tryptofanem	Próbka 3 Koncentrat paszowy dla świń
L	12	12	12
n	50	55	50
Średnia [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	1,9	1,6	1,9
S_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochrana, próba wartości oddalonych Dixona)
s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
r = powtarzalność wyników
R = odtwarzalność wyników
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności, w %
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności, w %

W innym badaniu porównawczym przeprowadzonym we Wspólnocie Europejskiej (trzecie porównanie wyników różnych laboratoriów) dwie próbki były analizowane przez maksymalnie 13 laboratoriów w celu sprawdzenia metody ekstrakcji wolnego tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizy pięciokrotnie. Ich wyniki są przedstawione w poniższej tabeli:

	Próbka 4 Mieszanka pszenicy i soi	Próbka 5 Mieszanka pszenicy i soi (= próbka 4) z dodatkiem tryptofanu (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Średnia [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
S_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochrana, próba wartości oddalonych Dixona)
s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
r = powtarzalność wyników
R = odtwarzalność wyników
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności, w %
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności, w %

▼B

W kolejnym badaniu porównawczym przeprowadzonym we Wspólnocie Europejskiej cztery próbki były analizowane przez maksymalnie 7 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizy pięciokrotnie. Ich wyniki są przedstawione w poniższej tabeli.

	Próbka 1 Mieszanka paszowa dla świń (CRM 117)	Próbka 2 Niskotłuszczowa mączka rybna (CRM 118)	Próbka 3 Mączka sojowa (CRM 119)	Próbka 4 Odtłuszczone mleko w proszku (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Średnia [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
S_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochrana, próba wartości oddalonych Dixona)
s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
r = powtarzalność wyników
R = odtwarzalność wyników
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności, w %
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności, w %

9. **Objaśnienia**

9.1. Lepszy rozdział tryptofanu i α-metylo-tryptofanu może nastąpić przy uwzględnieniu następujących parametrów.

Izokratyczna elucja po gradientowym czyszczeniu kolumny:

Kolumna do chromatografii cieczowej:	125 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 5 µm lub równoważne		
Temperatura kolumny:	32 °C		
Faza ruchoma:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4/metanol, 95+5 (V+V) B: Metanol		
Program gradientowy:	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
Prędkość przepływu:	1,2 ml/min		
Całkowity czas analizy chromatograficznej:	około 33 minuty		

9.2. Analiza chromatograficzna będzie się zmieniać w zależności od typu HPLC i materiału użytego do wypełnienia kolumny. Wybrany system musi umożliwić uzyskanie oddzielającej linii bazowej pomiędzy tryptofanem i wzorcem wewnętrznym. Ponadto ważne jest, aby produkty degradacji

▼B

zostały dobrze oddzielone od tryptofanu i wzorca wewnętrznego. Hydrolizaty bez wzorca wewnętrznego należy poddać analizie w celu sprawdzenia linii bazowej stosownie do wzorca wewnętrznego względem zanieczyszczeń. Ważne jest, aby czas analizy był wystarczająco długi dla elucji wszystkich produktów degradacji, w przeciwnym razie ostatnie eluujące piki na chromatogramie mogą zakłócać kolejną analizę.

W zakresie badanych stężeń układ chromatograficzny musi zapewniać liniową odpowiedź. Liniową odpowiedź należy mierzyć przy stałym (normalnym) stężeniu wzorca wewnętrznego i zmieniających się stężeniach tryptofanu. Ważne jest, aby wielkość pików tryptofanu i wzorca wewnętrznego zawierała się w liniowym zakresie układu HPLC z detekcją fluorescencyjną. Jeżeli piki tryptofanu lub wzorca wewnętrznego są zbyt małe lub zbyt duże, analizę należy powtórzyć przy zmienionej wielkości próbki lub jej objętości końcowej.

9.3. *Wodorotlenek baru*

Fakt, że wodorotlenek baru z czasem jest coraz trudniejszy do rozpuszczenia, wpływa na nieklarowność roztworu do oznaczania HPLC, która może być przyczyną zaniżania wyników oznaczania tryptofanu.

H. OZNACZANIE SUROWEGO OLEJU I TŁUSZCZU

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości surowych olejów i tłuszczów w paszach. Nie stosuje się jej do analizy nasion i owoców roślin oleistych.

Zastosowanie dwóch sposobów postępowania opisanych poniżej zależy od rodzaju i składu paszy oraz celu prowadzenia analizy.

1.1. *Postępowanie A – Bezpośrednio ekstrahowane oleje i tłuszcze*

Postępowanie ma zastosowanie do materiałów paszowych pochodzenia roślinnego, z wyjątkiem tych, które zostały objęte zakresem postępowania B.

1.2. *Postępowanie B – Całkowite surowe oleje i tłuszcze*

Postępowanie ma zastosowanie do materiałów paszowych pochodzenia zwierzęcego i wszystkich mieszanek paszowych. Jest stosowane do wszystkich materiałów, z których oleje i tłuszcze nie mogą być w całości wyekstrahowane bez uprzedniej hydrolizy (np. gluten, drożdże, białka ziemniaczane i produkty przetworzone np. poprzez ekstruzję, płatkowanie i ogrzewanie).

1.3. *Interpretacja wyników*

We wszystkich przypadkach, w których wynik otrzymany przy zastosowaniu postępowania B jest wyższy od wyniku otrzymanego przy zastosowaniu postępowania A, wynik otrzymany przy zastosowaniu postępowania B należy traktować jako rzeczywisty.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

2.1. *Postępowanie A*

Próbka jest poddawana ekstrakcji eterem naftowym. Roztwór jest oddestylowany, a pozostałość jest suszona i ważona.

2.2. *Postępowanie B*

Próbka jest ogrzewana kwasem chlorowodorowym. Mieszanina jest oziębiana i filtrowana. Pozostałość jest przemywana i suszona, a następnie poddawana oznaczaniu przy zastosowaniu postępowania A.

▼B

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Eter naftowy o zakresie temperatur wrzenia od 40 do 60 °C. Wartość bromowa musi być niższa niż 1, a pozostałość po odparowaniu niższa niż 2 mg/100 ml.

3.2. Siarczan sodu bezwodny.

3.3. Kwas chlorowodorowy, c = 3 mol/l.

3.4. Materiał wspomagający filtrację, np. Kieselgur, Hyflo-supercel.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Aparat do ekstrakcji. Jeżeli aparat jest wyposażony w syfon (jak np. aparat Soxhleta), prędkość skraplania musi wynosić około 10 cykli na godzinę. Jeżeli aparat nie ma syfonu, wówczas prędkość skraplania musi wynosić około 10 ml na minutę.

4.2. Gilzy do ekstrakcji, niezawierające substancji rozpuszczalnych w eterze naftowym, o porowatości odpowiadającej wymaganiom określonym w pkt 4.1.

4.3. Suszarka albo suszarka próżniowa, z możliwością ustawienia temperatury suszenia na 75 ± 3 °C, lub suszarka nawiewna z możliwością ustawienia temperatury na 100 ± 3 °C.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Postępowanie A (zob. pkt 8.1)*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki, przenieść do gilzy ekstrakcyjnej (4.2) i przykryć beztłuszczowym zwitkiem waty bawełnianej.

Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji (4.1) i ekstrahować przez sześć godzin eterem naftowym (3.1). Zebrać ekstrakt eterowy do suchej, zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu ([1]).

Oddestylować rozpuszczalnik. Suszyć pozostałość, umieszczając kolbę w suszarce (4.3) na półtorej godziny. Schłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczów (ubytek masy między dwoma kolejnymi ważeniami nie może przekraczać 1 mg).

5.2. *Postępowanie B*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2,5 g próbki (zob. pkt 8.2), umieścić w zlewce o pojemności 400 ml lub w kolbie stożkowej o pojemności 300 ml i dodać 100 ml kwasu chlorowodorowego (3.3) oraz kawałki pumeksu. Przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym lub dopasować kolbę stożkową z chłodnicą zwrotną. Doprowadzić mieszaninę do spokojnego wrzenia w małym płomieniu palnika lub na płytce grzewczej i utrzymywać wrzenie przez godzinę. Nie dopuszczać do osadzania się produktu na ścianach naczynia.

Schłodzić i dodać materiał wspomagający filtrację (3.4) w ilości zapobiegającej jakimkolwiek stratom oleju i tłuszczu podczas filtracji. Przefiltrować przez zwilżony, beztłuszczowy podwójny filtr papierowy. Przemywać pozostałość zimną wodą do uzyskania obojętnego filtratu. Sprawdzić, czy filtrat nie zawiera śladów olejów lub tłuszczów. Ich obecność wskazuje na konieczność przeprowadzenia przed hydrolizą ekstrakcji eterem naftowym, przy zastosowaniu postępowania A.

Umieścić na szkiełku zegarkowym podwójny filtr papierowy z pozostałością i suszyć przez 1,5 godziny w suszarce nawiewnej (4.3) w temperaturze 100 ± 3 °C.

([1]) Jeśli olej lub tłuszcz musi zostać poddany późniejszym próbom badania jakości, kawałki pumeksu należy zastąpić paciorkami szklanymi.

▼B

Umieścić podwójny filtr papierowy zawierający suchą pozostałość w gilzie ekstrakcyjnej (4.2) i przykryć zwitkiem beztłuszczowej waty bawełnianej. Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji (4.1) i postępować w sposób określony w pkt 5.1, akapity drugi i trzeci.

6. **Wyrażenie wyników**

Masę pozostałości wyrazić jako procent wagowy próbki.

7. **Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 0,2 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości surowego oleju i tłuszczu niższej niż 5 %,

— 4,0 % względem najwyższego wyniku, dla zawartości oleju i tłuszczu od 5 do 10 %,

— 0,4 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości oleju i tłuszczu wyższej niż 10 %.

8. **Objaśnienia**

8.1. Dla produktów o wysokiej zawartości olejów i tłuszczów, które są trudne do rozdrobnienia lub osiągnięcia homogenności badanej próbki, postępować w sposób podany poniżej.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 20 g próbki i zmieszać z co najmniej 10 g bezwodnego siarczanu sodu (3.2). Ekstrahować eterem naftowym (3.1) w sposób określony w pkt 5.1. Otrzymany ekstrakt uzupełnić do objętości 500 ml eterem naftowym (3.1) i zmieszać. Pobrać 50 ml roztworu i przenieść do małej, suchej i zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu. Oddestylować rozpuszczalnik, suszyć i postępować, jak wskazano w pkt 5.1 akapit ostatni.

Usunąć rozpuszczalnik z pozostałości po ekstrakcji w gilzie, rozdrobnić pozostałość na 1 mm cząstki, ponownie umieścić w gilzie (nie dodawać siarczanu sodu) i postępować, jak wskazano w pkt 5.1 akapity drugi i trzeci.

Zawartość oleju i tłuszczu obliczyć w procentach wagowych próbki, według następującego wzoru:

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

gdzie:

m_1 = masa w g pozostałości po pierwszej ekstrakcji, podzielnej części ekstraktu

m_2 = masa w g pozostałości po drugiej ekstrakcji

8.2. Dla produktów o niskiej zawartości olejów i tłuszczów próbkę można zwiększyć do 5 g.

8.3. W przypadku karmy dla zwierząt domowych o wysokiej zawartości wody dla zwierząt domowych może wystąpić potrzeba zmieszania tej karmy przed hydrolizą i ekstrakcją z bezwodnym siarczanem sodu, z zastosowaniem postępowania B.

8.4. W przypadku postępowania określonego w pkt 5.2 do przemywania pozostałości po filtracji skuteczniejsze może być użycie wody gorącej zamiast zimnej.

8.5. W przypadku niektórych pasz czas suszenia wynoszący 1,5 godziny może być przedłużony. Należy jednak unikać nadmiernego suszenia, gdyż może to prowadzić do zaniżania wyników. Można również stosować kuchenki mikrofalowe.

▼B

8.6. Jeżeli zawartość surowego oleju lub tłuszczu jest wyższa niż 15 %, zaleca się wstępną ekstrakcję przed hydrolizą, z zastosowaniem postępowania A, i powtórną ekstrakcję, z zastosowaniem postępowania B. Postępowanie to zależy od rodzaju paszy i oleju lub tłuszczu w paszy.

I. OZNACZANIE WŁÓKNA SUROWEGO

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania w paszach zawartości nietłuszczowych substancji organicznych, które nie rozpuszczają się ani w środowisku kwaśnym, ani zasadowym i które zwyczajowo określa się mianem włókna surowego.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbkę, w razie konieczności odtłuszczoną, gotuje się w roztworach kwasu siarkowego i wodorotlenku potasu o odpowiednim stężeniu. Pozostałość jest rozdzielana przez filtrację na filtrze ze szklanego spieku, przemywana, suszona, ważona i spopielana w temperaturze od 475 do 500 °C. Ubytek masy po spopielaniu odpowiada zawartości włókna surowego w badanej próbce.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Kwas siarkowy, c = 0,13 mol/l.

3.2. Odczynnik przeciwpieniący (np. n-oktanol).

3.3. Materiał wspomagający filtrowanie (Celit 545 lub podobny), wyprażony w temperaturze 500 °C przez cztery godziny (8.6).

3.4. Aceton.

3.5. Eter naftowy o temperaturze wrzenia od 40 do 60 °C.

3.6. Kwas chlorowodorowy, c = 0,5 mol/l.

3.7. Roztwór wodorotlenku potasu, c = 0,23 mol/l.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Urządzenie grzewcze do roztwarzania kwasem siarkowym lub roztworem wodorotlenku potasu, wyposażone w podstawkę mocującą tygiel filtracyjny (4.2) i rurkę odprowadzającą z kranem służącą do odprowadzenia cieczy i próżni, ewentualnie ze sprzężonym powietrzem. Codziennie przed użyciem podgrzewa się urządzenie, przemywając je wrzącą wodą przez pięć minut.

4.2. Szklany tygiel filtracyjny ze spiekiem o porach od 40 do 90 µm. Przed pierwszym użyciem ogrzewać przez kilka minut w temperaturze 500 °C i schłodzić (8.6).

4.3. Cylinder o pojemności co najmniej 270 ml z chłodnicą zwrotną, przystosowany do gotowania.

4.4. Suszarka z termostatem.

4.5. Piec muflowy z termostatem.

4.6. Urządzenie do ekstrakcji składające się z podstawki mocującej tygiel filtracyjny (4.2) i rurki odprowadzającej z kranem, służącej do ujścia cieczy i próżni.

4.7. Pierścienie łączące, służące do połączenia urządzenia grzewczego (4.1) z tyglem filtracyjnym (4.2) i cylindrem (4.3) oraz do dołączenia urządzenia ekstrakcyjnego do ekstrakcji na zimno (4.6) i tygla.

5. **Sposób postępowania**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 1 g przygotowanej próbki do tygla (4.2) (zob. objaśnienia 8.1, 8.2 i 8.3) i dodać 1 g materiału wspomagającego filtrowanie (3.3).

▼B

Połączyć urządzenie grzewcze (4.1) z tyglem filtracyjnym (4.2), a następnie dołączyć cylinder (4.3) do tygla. Wlać 150 ml wrzącego kwasu siarkowego (3.1) do cylindra połączonego z tyglem i, w razie potrzeby, dodać kilka kropli odczynnika przeciwpieniącego (3.2).

Doprowadzić ciecz do wrzenia w czasie 5 ± 2 minut i gotować przez dokładnie 30 minut.

Otworzyć kran rurki odprowadzającej (4.1) i w warunkach próżni filtrować kwas siarkowy przez tygiel filtracyjny i przemywać pozostałość trzykrotnie 30 ml porcjami wrzącej wody, upewniając się, że pozostałość przefiltrowano do sucha po każdym przemyciu.

Zamknąć ujście kranu i wlać 150 ml wrzącego roztworu wodorotlenku potasu (3.7) do cylindra połączonego z tyglem i dodać kilka kropli odczynnika przeciwpieniącego (3.2). Doprowadzić ciecz do punktu wrzenia w czasie 5 ± 2 minut i gotować przez 30 minut. Przefiltrować i powtórzyć procedurę przemywania wykorzystaną w odniesieniu do kwasu siarkowego.

Po ostatnim przemyciu i wysuszeniu odłączyć tygiel i jego zawartość i podłączyć go do urządzenia do zimnej ekstrakcji (4.6). W warunkach próżni przemywać pozostałość w tyglu trzema kolejnymi porcjami 25 ml acetonu (3.4), upewniając się, że pozostałość przefiltrowano do sucha po każdym przemyciu.

Wysuszyć tygiel do stałej masy w suszarce o temperaturze 130 °C. Po każdym suszeniu schłodzić w eksykatorze i niezwłocznie zważyć. Umieścić tygiel w piecu muflowym i spopielać do stałej masy (ubytek masy między dwoma kolejnymi ważeniami musi być równy lub mniejszy niż 2 mg) w temperaturze od 475 do 500 °C przez co najmniej 30 minut.

Przed ważeniem, po każdym ogrzewaniu, najpierw schłodzić w piecu, a następnie w eksykatorze.

Przeprowadzić test ślepej próby bez próbki. Ubytek masy po spopielaniu nie może przekraczać 4 mg.

6. **Obliczanie wyników**

Procentową zawartość włókna surowego w próbce oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

m = masa próbki w g
m_0 = ubytek masy po spopieleniu w trakcie oznaczania, w g
m_1 = ubytek masy po spopieleniu w trakcie ślepej próby, w g

7. **Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 0,6 % wartości bezwzględnej, dla zawartości włókna surowego niższej niż 10 %,

— 6 % względem wyższego wyniku, dla zawartości włókna surowego równej lub wyższej niż 10 %.

8. **Objaśnienia**

8.1. Pasze zawierające więcej niż 10 % tłuszczu surowego przed oznaczaniem należy odtłuścić eterem naftowym (3.5). Podłączyć tygiel filtracyjny (4.2) wraz z jego zawartością do urządzenia do zimnej ekstrakcji

▼B

(4.6), zastosować próżnię i przemyć pozostałość trzykrotnie 30 ml porcjami eteru naftowego, upewniając się, że pozostałość jest sucha. Podłączyć tygiel wraz z jego zawartością do urządzenia grzewczego (4.1) i postępować w sposób określony w pkt 5.

8.2. Pasze zawierające tłuszcze, które nie mogą być bezpośrednio ekstrahowane eterem naftowym (3.5), odtłuścić w sposób określony w pkt 8.1 i ponownie odtłuścić po gotowaniu z kwasem. Po gotowaniu z kwasem, a następnie przemyciu podłączyć tygiel wraz z jego zawartością do urządzenia do zimnej ekstrakcji (4.6) i przemyć trzykrotnie 30 ml porcjami acetonu, a następnie trzykrotnie 30 ml porcjami eteru naftowego. Przefiltrować do sucha w warunkach próżni i postępować w sposób określony w pkt 5, rozpoczynając postępowanie z wodorotlenkiem potasu.

8.3. Jeżeli pasze zawierają więcej niż 5 % węglanów, wyrażonych jako węglan wapnia, podłączyć tygiel (4.2) z odważoną próbką do urządzenia grzewczego (4.1). Przemyć próbkę trzykrotnie 30 ml porcjami kwasu chlorowodorowego (3.6). Po dodaniu każdej porcji kwasu pozostawić próbkę na około minutę przed filtrowaniem. Przemyć 30 ml wody i postępować w sposób określony w pkt 5.

8.4. Jeżeli używana jest aparatura stojąca (kilka tygli podłączonych do jednego urządzenia grzewczego), nie należy wykonywać dwóch pojedynczych oznaczeń tej samej próbki w tej samej partii.

8.5. Jeżeli po gotowaniu filtrowanie roztworu kwasowego i zasadowego jest trudne, przepuścić sprężone powietrze przez rurkę podłączaną do urządzenia grzewczego i następnie kontynuować filtrowanie.

8.6. Temperatura spopielania nie może być wyższa niż 500 ^{o}C, ze względu na wytrzymałość szklanego tygla. Postępować w taki sposób, aby uniknąć szoku termicznego podczas ogrzewania i schładzania.

J. OZNACZANIE CUKRÓW

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości cukrów redukujących i całkowitej zawartości cukrów po inwersji, wyrażonych jako glukoza lub w razie potrzeby jako sacharoza, z zastosowaniem współczynnika 0,95. Metodę stosuje się do mieszanek paszowych. Dla innych pasz stosuje się specjalne metody. W razie potrzeby laktozę należy mierzyć oddzielnie, uwzględniając ją w obliczeniach.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Cukry ekstrahuje się w rozcieńczonym etanolu. Otrzymany roztwór klaruje się roztworami Carreza I i Carreza II. Po wyeliminowaniu etanolu zawartość cukrów przed i po inwersji oznacza się metodą Luff-Schoorla.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Etanol, roztwór 40 % (v/v), gęstość d = 0,948 g/ml przy temperaturze 20 ^{o}C, obojętny wobec fenoloftaleiny.

3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, Zn $(CH_3COO)_2$ $2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu K_4Fe $(CN)_6$ $3H_2O$. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.4. Roztwór 0,1 % (w/v) oranżu metylowego.

3.5. Kwas chlorowodorowy, 4 mol/l.

3.6. Kwas chlorowodorowy, 0,1 mol/l.

▼B

3.7. Roztwór wodorotlenku sodu, 0,1 mol/l.

3.8. Odczynnik Luff-Schoorla:

Ostrożnie mieszając, dodać roztwór kwasu cytrynowego (3.8.2) do roztworu węglanu sodu (3.8.3). Następnie dodać roztwór siarczanu miedzi (3.8.1) i uzupełnić do objętości 1 l wodą. Zostawić na noc do osadzenia i przefiltrować.

Sprawdzić normalność otrzymanego odczynnika (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l). Zob. pkt 5.4, ostatni akapit. pH roztworu musi wynosić około 9,4.

3.8.1. Roztwór siarczanu miedzi: rozpuścić 25 g siarczanu miedzi $Cu\ SO_4\ 5H_2O$, wolnego od żelaza, w 100 ml wody.

3.8.2. Roztwór kwasu cytrynowego: rozpuścić 50 g kwasu cytrynowego $C_6H_8O_7{\cdot}H_2O$ w 50 ml wody.

3.8.3. Roztwór węglanu sodu: rozpuścić 143,8 g bezwodnego węglanu sodu w około 300 ml ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia.

3.9. Roztwór tiosiarczanu(VI) sodu, 0,1 mol/l.

3.10. Roztwór skrobi: do 1 l wrzącej wody dodać 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody. Gotować trzy minuty, pozostawić do schłodzenia, a jeżeli to konieczne, dodać 10 mg jodku rtęci jako środka konserwującego.

3.11. Kwas siarkowy, 3 mol/l.

3.12. 30 % (w/v) roztwór jodku potasu.

3.13. Granulki pumeksu gotowane w kwasie chlorowodorowym, przemyte wodą i wysuszone.

3.14. 3-metylobutan-l-ol.

4. **Aparatura i sprzęt**

Mikser (tumbler): ok. 35–40 obr./min.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Ekstrakcja próbki*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2,5 g próbki i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 200 ml etanolu (3.1) i mieszać w mikserze przez godzinę. Dodać 5 ml roztworu Carreza I (3.2) i mieszać przez ok. 30 sekund. Dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.3), i ponownie mieszać przez minutę. Uzupełnić do pełnej objętości kolby etanolem (3.1), homogenizować i przefiltrować. Pobrać 200 ml filtratu i odparować do około połowy objętości w celu usunięcia większości etanolu. Przenieść ilościowo pozostałość po odparowaniu do kolby miarowej o pojemności 200 ml z użyciem ciepłej wody, schłodzić, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, homogenizować i, jeżeli to konieczne, przefiltrować. Roztwór ten będzie użyty do oznaczenia zawartości cukrów redukujących i, po inwersji, całkowitej zawartości cukrów.

5.2. *Oznaczanie cukrów redukujących*

Używając pipety, pobrać nie więcej niż 25 ml roztworu zawierającego mniej niż 60 mg cukrów redukujących wyrażonych jako glukoza. Jeżeli to konieczne, uzupełnić do objętości 25 ml wodą destylowaną i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luff-Schoorla. Wynik wyrazić jako procentową zawartość glukozy w próbce.

5.3. *Oznaczanie całkowitej zawartości cukru po inwersji*

Używając pipety, pobrać 50 ml roztworu i przenieść go do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Dodać kilka kropli roztworu oranżu metylowego (3.4), i następnie, ostrożnie mieszając, dodać kwas chlorowodorowy (3.5), aż do zmiany barwy cieczy na czerwoną. Dodać 15 ml kwasu chlorowodorowego (3.6) i zanurzyć kolbę we wrzącej łaźni

▼B

wodnej na 30 minut. Szybko schłodzić do temperatury około 20 °C i dodać 15 ml roztworu wodorotlenku sodu (3.7). Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml wodą i homogenizować. Pobrać nie więcej niż 25 ml roztworu zawierającego mniej niż 60 mg cukrów redukujących wyrażonych jako glukoza. Jeżeli to konieczne, uzupełnić do objętości 25 ml wodą destylowaną i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luff-Schoorla. Wynik wyrazić jako procentową zawartość glukozy lub, w stosownych przypadkach, sacharozy, mnożąc przez współczynnik 0,95.

5.4. *Miareczkowanie metodą Luff-Schoorla*

Używając pipety, pobrać 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (3.8), przenieść go do kolby Erlenmeyera o pojemności 300 ml i dodać dokładnie 25 ml klarownego roztworu cukru. Dodać dwie granulki pumeksu (3.13), ogrzewać nad średnim płomieniem, ręcznie mieszając, i doprowadzić ciecz do wrzenia w czasie około dwóch minut. Natychmiast postawić kolbę Erlenmeyera na siatce azbestowej z otworem o średnicy około 6 cm, pod którym pali się płomień. Płomień należy ustawić tak, aby ogrzewane było tylko dno kolby. Dopasować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera. Gotować dokładnie dziesięć minut. Schłodzić natychmiast zimną wodą i po około pięciu minutach miareczkować w następujący sposób:

Dodać 10 ml roztworu jodku potasu (3.12) i od razu po tej czynności (zachowując ostrożność ze względu na ryzyko powstania piany) dodać 25 ml kwasu siarkowego (3.11). Miareczkować roztworem tiosiarczanu(VI) sodu (3.9) do pojawienia się mętnej żółtej barwy, dodać wskaźnik skrobiowy (3.10) i dokończyć miareczkowanie.

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie na mieszaninie 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (3.8) i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasu (3.12) i 25 ml kwasu siarkowego (3.11), bez gotowania.

6. **Obliczanie wyników**

Wykorzystując tabelę, określić ilość glukozy w mg, która odpowiada różnicy między wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonych w mg tiosiarczanu(VI) sodu 0,1 mol/l. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. **Postępowanie specjalne**

7.1. W przypadku pasz bogatych w melasę i innych pasz, które nie są szczególnie homogenizowane, odważyć 20 g próbki i umieścić z 500 ml wody w kolbie miarowej o pojemności 1 l. Mieszać przez godzinę w mikserze. Sklarować odczynnikami Carreza I (3.2) i II (3.3) w sposób określony w pkt 5.1, z użyciem czterokrotnie większych ilości każdego odczynnika. Uzupełnić kolbę do objętości 80 % etanolem (v/v).

Homogenizować i przefiltrować. Usunąć etanol w sposób określony w pkt 5.1. Jeżeli nie ma dekstrynowanej skrobi, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą destylowaną.

7.2. W przypadku melasy i materiałów paszowych, bogatych w cukier i prawie wolnych od skrobi (np. chleb świętojański, suszone krajane buraki ćwikłowe itp.), odważyć 5 g próbki, umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml, dodać 200 ml wody destylowanej, mieszać w mikserze przez godzinę lub, jeśli to konieczne, dłużej. Roztwór klarować odczynnikami Carreza I (3.2) i II (3.3) w sposób określony w pkt 5.1. Uzupełnić do pełnej objętości kolby zimną wodą, homogenizować i przefiltrować. Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3, w celu określenia zawartości cukrów.

8. **Objaśnienia**

8.1. Aby zapobiec powstawaniu piany, wskazane jest dodanie (niezależnie od objętości) około 1 ml 3-metylobutan-1-olu (3.14) przed gotowaniem z odczynnikiem Luff-Schoorla.

▼B

8.2. Różnica pomiędzy zawartością całkowitą cukrów po inwersji, wyrażonych jako glukoza, a zawartością cukrów redukujących, wyrażonych jako glukoza, pomnożona przez 0,95 daje procentową zawartość sacharozy.

8.3. Aby oznaczyć zawartość cukrów redukujących, z wyłączeniem laktozy, można zastosować dwie następujące metody:

8.3.1. Dla szacunkowych obliczeń pomnożyć zawartość laktozy oznaczoną inną metodą przez 0,675 i uzyskany wynik odjąć od zawartości cukrów redukujących.

8.3.2. Aby dokładnie obliczyć zawartość cukrów redukujących, z wyłączeniem laktozy, ta sama próbka musi być użyta do dwóch końcowych oznaczeń. Jedną analizę przeprowadza się na części roztworu otrzymanego w sposób określony w pkt 5.1, drugą na części roztworu otrzymanego podczas oznaczania laktozy metodą służącą do jej oznaczania (po fermentacji innych rodzajów cukrów i sklarowaniu).

W obu przypadkach ilość cukru jest oznaczana metodą Luff-Schoorla i przeliczana na mg glukozy Jedna wartość jest odejmowana od drugiej, a różnica jest wyrażana jako udział procentowy w próbce.

Przykład

Dwie pobrane objętości odpowiadają próbce o masie próbki 250 mg dla każdego oznaczenia.

W pierwszym przypadku 17 ml roztworu tiosiarczanu(VI) sodu o stężeniu 0,1 mol/l odpowiada 44,2 mg zużytej glukozy, w drugim przypadku 11 ml odpowiada 27,6 mg glukozy.

Różnica wynosi 16,6 mg glukozy.

Zawartość cukrów redukujących (z wyłączeniem laktozy), w przeliczeniu na glukozę, wynosi zatem:

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

Tabela wartości dla 25 ml odczynnika Luff-Schoorla

ml $Na_2\ S_2\ O_3$, 0,1 mol/l, podgrzewanie przez 2 minuty, gotowanie przez 10 minut

$Na_2\ S_2\ O_3$ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, cukry inwertowane $C_6\ H_{12}\ O_6$		Laktoza $C_{12}\ H_{22}\ O_{11}$		Maltoza $C_{12}\ H_{22}\ O_{11}$		$Na_2\ S_2\ O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	różnica	mg	różnica	mg	różnica	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

▼B

K. OZNACZANIE LAKTOZY

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości laktozy w paszach zawierających ponad 0,5 % laktozy.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Cukry są rozpuszczane w wodzie. Roztwór jest poddawany fermentacji w obecności drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które nie rozkładają laktozy. Po sklarowaniu i przefiltrowaniu zawartość laktozy w filtracie jest oznaczana metodą Luff-Schoorla.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Suspensja drożdży *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g świeżych drożdży umieścić w 100 ml wody. Zawiesinę przechowywać w lodówce nie dłużej niż przez 7 dni od jej sporządzenia.

3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, Zn $(CH_3COO)_2$ $2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml wodą.

3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $K_4Fe(CN)_6$ $3H_2O$. Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml wodą.

3.4. Odczynnik Luff-Schoorla:

Ostrożnie mieszając, dodać roztwór kwasu cytrynowego (3.4.2) do roztworu węglanu sodu (3.4.3). Następnie dodać roztwór siarczanu miedzi (3.4.1) i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą. Zostawić na noc do osadzenia i przefiltrować. Sprawdzić normalność otrzymanego odczynnika (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l). Wartość pH roztworu musi wynosić około 9,4.

3.4.1. Roztwór siarczanu miedzi: rozpuścić 25 g siarczanu miedzi Cu SO_4 $5H_2O$ wolnego od żelaza w 100 ml wody.

3.4.2. Roztwór kwasu cytrynowego: rozpuścić 50 g kwasu cytrynowego $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ w 50 ml wody.

3.4.3. Roztwór węglanu sodu: rozpuścić 143,8 g bezwodnego węglanu sodu w około 300 ml ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia.

3.5. Granulki pumeksu gotowane w kwasie chlorowodorowym, przemyte wodą i wysuszone.

3.6. 30 % roztwór jodku potasu (w/v).

3.7. Kwas siarkowy, 3 mol/l.

3.8. Roztwór tiosiarczanu sodu, 0,1 mol/l.

3.9. Roztwór skrobi: do 1 l wrzącej wody dodać 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody. Gotować trzy minuty, pozostawić do schłodzenia, a jeżeli to konieczne, dodać 10 mg jodku rtęci jako środka konserwującego.

4. **Aparatura i sprzęt**

Łaźnia wodna z termostatem umożliwiającym utrzymanie temperatury od 38 do 40 °C.

5. **Sposób postępowania**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 1 g próbki i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml. Dodać od 25 do 30 ml wody. Umieścić kolbę we wrzącej łaźni wodnej na 30 minut, a następnie schłodzić do temperatury około 35 °C. Dodać 5 ml zawiesiny drożdży (3.1) i homogenizować. Pozostawić kolbę na dwie godziny w łaźni wodnej o temperaturze od 38 do 40 °C. Schłodzić do temperatury około 20 °C.

Dodać 2,5 ml roztworu Carreza I (3.2) i mieszać przez 30 sekund, następnie dodać 2,5 ml roztworu Carreza II (3.3) i ponownie

▼B

mieszać przez 30 sekund. Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml wodą, zmieszać i przefiltrować. Używając pipety, pobrać nie więcej niż 25 ml filtratu, który zawiera od 40 do 80 mg laktozy, i umieścić go w kolbie Erlenmeyera o pojemności 300 ml. W miarę potrzeby uzupełnić do objętości 25 ml wodą.

W ten sam sposób przeprowadzić test ślepej próby z 5 ml suspensji drożdżowej (3.1). Oznaczyć zawartość laktozy według Luff-Schoorla, w następujący sposób: dodać 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (3.4) i dwie granulki pumeksu (3.5). Ogrzewać nad średnim płomieniem, ręcznie mieszając, i doprowadzić ciecz do wrzenia w czasie około 2 minut. Natychmiast postawić kolbę Erlenmeyera na siatce azbestowej z otworem o średnicy około 6 cm, pod którym pali się płomień. Płomień należy ustawić tak, aby ogrzewane było tylko dno kolby Erlenmeyera. Dopasować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera. Gotować dokładnie 10 minut. Schłodzić natychmiast zimną wodą i po około 5 minutach miareczkować w następujący sposób:

Dodać 10 ml roztworu jodku potasu (3.6) i niezwłocznie (zachowując ostrożność ze względu na ryzyko powstania piany) dodać 25 ml kwasu siarkowego (3.7). Miareczkować roztworem tiosiarczanu sodowego (3.8) do pojawienia się mętnej żółtej barwy, dodać wskaźnik skrobiowy (3.9) i dokończyć miareczkowanie.

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie na mieszaninie 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (3.4) i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasu (3.6) i 25 ml kwasu siarkowego (3.7), bez gotowania.

6. **Obliczanie wyników**

Wykorzystując załączoną tabelę, określić ilość laktozy w mg, która odpowiada różnicy między wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonych w ml roztworu tiosiarczanu sodu 0,1 mol/l.

Wynik wyrazić jako udział procentowy bezwodnej laktozy w próbce.

7. **Objaśnienia**

W przypadku produktów zawierających ponad 40 % fermentujących cukrów dodać więcej niż 5 ml zawiesiny drożdży (3.1).

Tabela wartości dla 25 ml odczynnika Luff-Schoorla

ml $Na_2 S_2 O_3$, 0,1 mol/l, podgrzewanie przez 2 minuty, gotowanie przez 10 minut

$Na_2 S_2 O_3$ 0,1 mol/l	Glukoza, fruktoza, cukry inwertowane $C_6 H_{12} O_6$		Laktoza $C_{12} H_{22} O_{11}$		Maltoza $C_{12} H_{22} O_{11}$		$Na_2 S_2 O_3$ 0,1 mol/l
ml	mg	różnica	mg	różnica	mg	różnica	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

▼B

L. OZNACZANIE SKROBI

METODA POLARYMETRYCZNA

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do polarymetrycznego oznaczania zawartości skrobi i wysokocząsteczkowych produktów jej rozkładu w paszach, w celu sprawdzenia zgodności z zadeklarowaną wartością energetyczną (przepisy zawarte w załączniku VII) oraz dyrektywą Rady 96/25/WE ([1]).

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Metoda składa się z dwóch oznaczeń. W pierwszym oznaczeniu próbka jest traktowana rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym. Po sklarowaniu i przefiltrowaniu mierzy się polarymetrycznie skręcalność optyczną roztworu.

W drugim oznaczeniu próbka jest ekstrahowana 40 % etanolem. Po zakwaszeniu filtratu kwasem chlorowodorowym, sklarowaniu i przefiltrowaniu mierzy się skręcalność optyczną, tak jak w pierwszym oznaczeniu.

Różnica pomiędzy dwoma pomiarami, pomnożona przez znany współczynnik, daje zawartość skrobi w próbce.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Kwas chlorowodorowy, roztwór 25 % (w/w), gęstość: 1,126 g/ml.

3.2. Kwas chlorowodorowy, roztwór 1,13 % (w/v)

Stężenie należy sprawdzić poprzez miareczkowanie przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu 0,1 mol/l w obecności czerwieni metylowej 0,1 % (w/V) w 94 % (v/v) etanolu. Do neutralizacji 10 ml potrzeba 30,94 ml NaOH 0,1 mol/l.

3.3. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $Zn(CH_3COO)_2\ 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.4. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $K_4\ (Fe(CN)_6\ 3H_2O$. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.5. Etanol, roztwór 40 % (v/v), gęstość: 0,948 g/ml w temperaturze 20 °C.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Kolba Erlenmeyera o pojemności 250 ml ze szlifem szklanym i chłodnicą zwrotną.

4.2. Polarymetr lub sacharymetr.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Przygotowanie próbki*

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 0,5 mm.

5.2. *Oznaczanie całkowitej skręcalności optycznej (P lub S) (zob. objaśnienia 7.1)*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2,5 g rozdrobnionej próbki i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml. Dodać 25 ml kwasu chlorowodorowego (3.2), wstrząsnąć do równomiernego rozprowadzenia próbki i dodać następną porcję 25 ml kwasu chlorowodorowego (3.2). Kolbę zanurzyć we wrzącej łaźni wodnej. Aby zapobiec aglomeracji, przez pierwsze 3 minuty nieprzerwanie i energicznie wstrząsać kolbą. Ilość wody w łaźni wodnej musi być wystarczająca, aby pozostała ona

([1]) Dz.U. L 125 z 23.5.1996, s. 35.

▼B

w stanie wrzenia, kiedy kolba zostanie do niej włożona. Nie należy wyjmować kolby z wody w trakcie wstrząsania. Dokładnie po 15 minutach wyjąć kolbę z łaźni wodnej, dodać 30 ml zimnej wody i natychmiast schłodzić do temperatury 20 °C.

Dodać 5 ml roztworu Carreza I (3.3) i wstrząsać przez ok. 30 sekund. Następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.4) i ponownie wstrząsać przez ok. 30 sekund. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, zmieszać i przefiltrować. W przypadku gdy filtrat nie jest idealnie klarowny (co zdarza się rzadko), powtórzyć oznaczanie z użyciem większej ilości roztworów Carreza I i II, np. 10 ml.

Zmierzyć skręcalność optyczną roztworu w 200 mm rurce przy zastosowaniu polarymetru lub sacharymetru.

5.3. *Oznaczanie skręcalności optycznej (P' lub S') produktów rozpuszczonych w 40 % etanolu*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki, umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml i dodać około 80 ml etanolu (3.5) (zob. objaśnienia 7.2). Pozostawić kolbę na godzinę w temperaturze pokojowej, sześciokrotnie energicznie wstrząsając w tym czasie kolbą tak, aby próbka została dobrze zmieszana z etanolem. Uzupełnić do pełnej objętości kolby etanolem (3.5), zmieszać i przefiltrować.

Pobrać pipetą 50 ml filtratu, co jest równe 2,5 g próbki, do kolby Erlenmeyera o pojemności 250 ml, dodać 2,1 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i energicznie wstrząsnąć. Przymocować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera i kolbę tę zanurzyć we wrzącej łaźni wodnej. Po dokładnie 15 minutach wyjąć kolbę Erlenmeyera z łaźni, przenieść zawartość do kolby miarowej o pojemności 100 ml, spłukując kolbę Erlenmeyera niewielką ilością zimnej wody, i schłodzić do temperatury 20 °C.

Sklarować z użyciem roztworów Carreza I (3.3) i Carreza II (3.4), uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, zmieszać, przefiltrować i zmierzyć skręcalność optyczną, w sposób określony w drugim i trzecim akapicie pkt 5.2.

6. **Obliczanie wyników**

Zawartość skrobi (w %) oblicza się według następujących wzorów:

6.1. *Pomiary z użyciem polarymetru*

$$\text{Zawartość skrobi (\%)} = \frac{2\,000(P - P')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

P = całkowita skręcalność optyczna w stopniach kątowych

P' = skręcalność optyczna w stopniach kątowych substancji rozpuszczonych w 40 % (V/V) etanolu

$[\alpha]_D^{20°}$ = określona skręcalność optyczna czystej skrobi. Umowne wartości liczbowe przyjęte dla tego współczynnika są następujące:

+185,9°: skrobia ryżowa
+185,7°: skrobia ziemniaczana
+184,6°: skrobia kukurydziana
+182,7°: skrobia pszenna
+181,5°: skrobia jęczmienna
+181,3°: skrobia owsiana
+184,0°: inne typy skrobi i jej mieszaniny w mieszankach paszowych

6.2. *Pomiary z użyciem sacharymetru*

$$\text{Zawartość skrobi (\%)} = \frac{2\,000}{[\alpha]_D^{20°}} \times \frac{(2\,N \times 0{,}665) \times (S - S')}{100} - \frac{26{,}6\,N \times (S - S')}{[\alpha]_D^{20°}}$$

▼B

S = całkowita skręcalność optyczna w stopniach sacharymetru

S' = skręcalność optyczna w stopniach sacharymetru substancji rozpuszczonych w 40 % (v/v) etanolu

N = masa w g sacharozy w 100 ml wody ulegająca skręcalności optycznej 100 stopni sacharymetrycznych, podczas pomiaru z użyciem rurki o długości 200 mm
16,29 g dla sacharymetrów francuskich
26,00 g dla sacharymetrów niemieckich
20,00 g dla sacharymetrów połączonych

P = całkowita skręcalność optyczna w stopniach kątowych

P' = skręcalność optyczna w stopniach kątowych substancji rozpuszczonych w 40 % (V/V) etanolu

$[\alpha]_D^{20°}$ = określona skręcalność optyczna czystej skrobi (zob. pkt 6.1)

6.3. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,4 w wartości bezwzględnej dla zawartości skrobi niższej niż 40 % i 1 % względem zawartości skrobi równej lub wyższej niż 40 %.

7. **Objaśnienia**

7.1. Jeżeli próbka zawiera więcej niż 6 % węglanów, w przeliczeniu na węglan wapnia, należy rozłożyć je przy użyciu odpowiedniej ilości rozcieńczonego kwasu siarkowego przed określeniem całkowitej skręcalności optycznej.

7.2. W przypadku produktów o wysokiej zawartości laktozy, takich jak serwatka w proszku lub mleko odtłuszczone w proszku, postępować w następujący sposób: po dodaniu 80 ml etanolu (3.5) przymocować chłodnicę zwrotną do kolby i kolbę tę zanurzyć w łaźni wodnej o temperaturze 50 °C na 30 minut. Pozostawić do schłodzenia i kontynuować analizę w sposób określony w pkt 5.3.

7.3. Następujące materiały paszowe – w przypadku obecności w znacznych ilościach w paszy – powodują interferencje podczas określania zawartości skrobi metodą polarymetryczną i mogą wpływać na otrzymywanie nieprawidłowych wyników:

— produkty z buraków cukrowych, takie jak wysłodki buraczane, melasa buraczana, wysłodki buraczane melasowane, wywar buraczany melasowany,

— miazga (pulpa, wysłodki) cytrusowa,

— siemię lniane, ekspelery z siemienia lnianego, siemię lniane ekstrahowane,

— nasiona rzepaku, ekspelery z nasion rzepaku, ekstrahowane nasiona rzepaku, łuski nasion rzepaku,

— nasiona słonecznika, ekstrahowane nasiona słonecznika, nasiona słonecznika częściowo łuskane, ekstrahowane,

— ekspelery kopry, kopra ekstrahowana,

— miazga (pulpa) ziemniaczana,

— drożdże odwodnione,

— produkty bogate w inulinę, a w szczególności chipsy i mączka z karczochów jerozolimskich,

— skwarki.

M. OZNACZANIE POPIOŁU SUROWEGO

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości popiołu surowego w paszach.

▼B

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest spopielana w temperaturze 550 °C, a pozostałość jest ważona.

3. **Odczynniki i roztwory**

20 % roztwór azotanu amonu (w/v).

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Płyta grzewcza.

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem.

4.3. Kwarcowe, porcelanowe lub platynowe tygle do spalań, prostokątne (ok. 60 × 40 × 25 mm) lub okrągłe (średnica: 60–75 mm, wysokość: 20–40 mm).

5. **Sposób postępowania**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki (2,5 w przypadku substancji pęczniejących), i umieścić w tyglu do spalań, który został podgrzany do temperatury 550 °C, schłodzony i wytarowany. Tygiel postawić na płycie grzewczej i ogrzewać stopniowo aż do zwęglenia substancji. Spopielić zgodnie z pkt 5.1 lub 5.2.

5.1. Wstawić tygiel do skalibrowanego pieca muflowego o temperaturze ustawionej na 550 °C. Utrzymywać w tej temperaturze aż do uzyskania popiołu o barwie białej, jasnoszarej lub jasnoczerwonej, świadczącej o niewystępowaniu cząsteczek węglowych. Umieścić tygiel w eksykatorze, pozostawić do schłodzenia i niezwłocznie zważyć.

5.2. Wstawić tygiel do skalibrowanego pieca muflowego o temperaturze ustawionej na 550 °C. Spopielać przez 3 godziny. Umieścić tygiel w eksykatorze, pozostawić do schłodzenia i niezwłocznie zważyć. Ponownie spopielać przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy popiołu (ubytek masy między dwoma kolejnymi ważeniami musi być równy lub mniejszy niż 1 mg).

6. **Obliczanie wyników**

Obliczyć masę pozostałości, odejmując tarę.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. **Objaśnienia**

7.1. Substancje, *które trudno się spopielają*, należy wstępnie spopielać co najmniej przez 3 godziny, schłodzić, a następnie dodać do nich – ostrożnie, w taki sposób, aby nie spowodować strat popiołu i tworzenia się zbryleń – kilka kropli 20 % roztworu azotanu amonu. Po wysuszeniu kontynuować zwęglanie w piecu. Powtarzać czynność w razie potrzeby aż do całkowitego spopielenia.

7.2. W przypadku gdy badane *produkty trudno poddają się postępowaniu* określonemu w pkt 7.1, postępuje się w następujący sposób: po spopielaniu przez 3 godziny popiół umieścić w ciepłej wodzie i przefiltrować przez mały, bezpopiołowy filtr. Spopielić filtr z zawartością w tyglu. Filtrat umieścić w schłodzonym tyglu, odparować do sucha, spopielić i zważyć.

7.3. W przypadku *olejów i tłuszczów* należy dokładnie odważyć próbkę o masie 25 g i umieścić ją w tyglu o odpowiedniej wielkości. Zwęglić, przenosząc płomień na substancję skrawkiem bezpopiołowej bibuły filtracyjnej. Po spaleniu pozostałość zwilżyć jak najmniejszą ilością wody. Wysuszyć i spopielać w sposób określony w pkt 5.

▼B

N. OZNACZANIE POPIOŁU NIEROZPUSZCZALNEGO W KWASIE CHLOROWODOROWYM

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości substancji mineralnych nierozpuszczalnych w kwasie chlorowodorowym w paszach. W zależności od rodzaju próbki stosuje się dwie metody.

1.1. *Metoda A:* mająca zastosowanie do materiałów paszowych i do większości mieszanek paszowych;

1.2. *Metoda B:* mająca zastosowanie do mieszanek paszowych mineralnych, mieszanin oraz do mieszanek paszowych zawierających substancje nierozpuszczalne w kwasie chlorowodorowym w ilości wyższej niż 1 %, co sprawdza się, stosując wcześniej metodę A.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

2.1. *Metoda A:* próbka jest spopielana, popiół gotowany w kwasie chlorowodorowym, a nierozpuszczalna pozostałość jest filtrowana i ważona.

2.2. *Metoda B:* próbka jest traktowana kwasem chlorowodorowym. Roztwór się filtruje, pozostałość spopiela i z otrzymanym popiołem postępuje się w sposób opisany w metodzie A.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Kwas chlorowodorowy, 3 mol/l.

3.2. 20 % roztwór kwasu trichlorooctowego (w/v).

3.3. 1 % roztwór kwasu trichlorooctowego (w/v).

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Płyta grzewcza.

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem.

4.3. Kwarcowe, porcelanowe lub platynowe tygle do spalań, prostokątne (ok. 60 × 40 × 25 mm) lub okrągłe (średnica: 60–75 mm, wysokość: 20–40 mm).

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Metoda A*

Spopielić próbkę metodą opisaną w odniesieniu do oznaczania popiołu surowego. Popiół uzyskany w wyniku zastosowanej analizy może być także wykorzystany do badania.

Popiół przenieść do zlewki o pojemności od 250 do 400 ml z użyciem 75 ml kwasu chlorowodorowego (3.1). Powoli doprowadzić do wrzenia i gotować ostrożnie przez 15 minut. Przefiltrować gorący roztwór przez bibułę bez popiołu i przemywać pozostałość gorącą wodą, aż reakcja z kwasem przestanie być widoczna. Filtr z osadem wysuszyć i spopielić w uprzednio wytarowanym tyglu w temperaturze nie niższej niż 550 °C i nie wyższej niż 700 °C. Ostudzić w eksykatorze i zważyć.

5.2. *Metoda B*

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki i umieścić w zlewce o pojemności od 250 do 400 ml. Dodać kolejno 25 ml wody i 25 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), wymieszać i odczekać, aż roztwór przestanie się burzyć. Dodać kolejne 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.1). Odczekać do ulotnienia się gazu, następnie umieścić zlewkę we wrzącej łaźni wodnej i trzymać ją tam przez co najmniej 30 minut, w celu całkowitej hydrolizy skrobi. Gorący roztwór przefiltrować przez bibułę bez popiołu i przemyć 50 ml gorącej wody (zob. objaśnienia pkt 7). Filtr z osadem umieścić w tyglu do spalań, wysuszyć i spopielać w temperaturze nie niższej niż 550 °C i nie wyższej niż 700 °C. Popiół umieścić

▼B

w zlewce o pojemności od 250 do 400 ml z użyciem 75 ml kwasu chlorowodorowego (3.1). Postępować w sposób określony w drugim akapicie pkt 5.1.

6. **Obliczanie wyników**

Masę pozostałości obliczyć, odejmując tarę. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. **Objaśnienia**

Jeżeli filtracja ma trudny przebieg, zaleca się powtórne przeprowadzenie analizy, zastępując 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) 50 ml 20 % kwasu trichlorooctowego (3.2) i przemywając filtr ciepłym 1 % roztworem kwasu trichlorooctowego (3.3).

O. OZNACZANIE WĘGLANÓW

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości węglanów, umownie wyrażanych jako węglan wapnia, w większości pasz.

Jednakże w niektórych przypadkach (np. węglan żelaza) należy stosować szczególną metodę.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Węglany rozkłada się kwasem chlorowodorowym. Powstały dwutlenek węgla zbiera się do probówki miarowej, a jego objętość jest porównywana z objętością uwolnioną ze znanej ilości węglanu wapnia w tych samych warunkach.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Kwas chlorowodorowy, gęstość 1,10 g/ml.

3.2. Węglan wapnia.

3.3. Kwas siarkowy o stężeniu ok. 0,05 mol/l, zabarwiony czerwienią metylową.

4. **Aparatura i sprzęt**

Zestaw Scheiblera-Dietriecha (zob. rysunek) lub podobny.

5. **Sposób postępowania**

W zależności od zawartości węglanów w próbce, zważyć próbkę o masie:

— 0,5 g w przypadku produktów zawierających od 50 do 100 % węglanów, wyrażanych jako węglan wapnia,

— 1 g w przypadku produktów zawierających od 40 do 50 % węglanów, wyrażanych jako węglan wapnia,

— 2 do 3 g w przypadku innych produktów.

Próbkę umieścić w specjalnej kolbie aparatu (4) wyposażonej w małą probówkę wykonaną z nietłukącego się szkła zawierającą 10 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.1) i podłączyć kolbę do aparatury. Kran trójdrożny (5) ustawić tak, aby rurka (1) była podłączona z wyjściem. Używając ruchomej rurki (2) wypełnionej barwnym kwasem siarkowym (pkt 3.3) i połączonej z wykalibrowaną rurką (1), doprowadzić poziom cieczy do znaku zero, który wyznaczony jest na podziałce. Przekręcić kran (5) tak, aby połączyć rurki (1) i (3), i sprawdzić, czy poziom cieczy doprowadzony został do znaku 0.

Przechylając kolbę (4), powoli wlewać kwas chlorowodorowy (3.1) do próbki. Wyrównać ciśnienie, obniżając rurkę (2). Potrząsać kolbą (4), dopóki nie ustanie wydzielanie dwutlenku węgla.

Przywrócić ciśnienie, doprowadzając ciecz w rurkach (1) i (2) do tego samego poziomu. Po *kilku minutach*, kiedy ustali się objętość gazu, wykonać odczyt.

Przeprowadzić test kontrolny w tych samych warunkach z 0,5 g węglanu wapnia (3.2).

▼B

6. **Obliczanie wyników**

Wyrażoną jako węglan wapnia zawartość węglanów oblicza się według następującego wzoru:

$$X = \frac{V \times 100}{V_1 \times 2m}$$

gdzie:

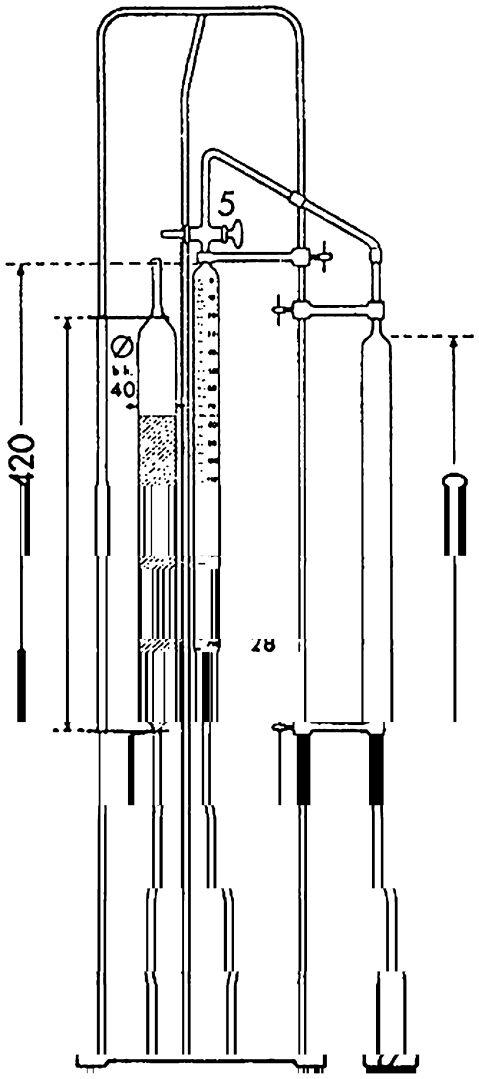
X = zawartość w % (w/w) węglanów w próbce wyrażona jako węglan wapnia
V = ilość CO_2 w ml uwolniona z próbki
V_1 = ilość CO_2 w ml uwolniona z 0,5 g $CaCO_3$
m = masa w g próbki.

7. **Objaśnienia**

7.1. Jeżeli masa próbki jest większa niż 2 g, do kolby (4) wlać najpierw 15 ml wody destylowanej i zmieszać przed rozpoczęciem badania. Do testu kontrolnego zastosować taką samą objętość wody.

7.2. Jeżeli objętość zastosowanej aparatury różni się od objętości aparatu Scheiblera-Dietricha, należy dopasować porcje badanej próbki i substancji kontrolnej i odpowiednio obliczyć wyniki.

APARATURA SCHEIBLERA-DIETRICHA DO OZNACZANIA CO_2



(wymiary w mm)

▼B

P. OZNACZANIE CAŁKOWITEJ ZAWARTOŚCI FOSFORU

METODA FOTOMETRYCZNA

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania całkowitej zawartości fosforu w paszach. Metodę należy stosować do analizy pasz o niskiej zawartości fosforu. W niektórych przypadkach (produkty bogate w fosfor) dopuszcza się stosowanie metody wagowej.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest mineralizowana poprzez suche spalanie (w przypadku pasz organicznych) lub przez rozpuszczenie kwasem (w przypadku związków mineralnych i pasz ciekłych), a następnie wprowadzona do kwaśnego roztworu. Roztwór jest traktowany odczynnikiem molibdenowanadowym. Gęstość optyczna utworzonego żółtego roztworu jest mierzona w spektrofotometrze przy 430 nm.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Węglan wapnia.

3.2. Kwas chlorowodorowy, ρ_{20} = 1,10 g/ml (ok. 6 mol/l).

3.3. Kwas azotowy, ρ_{20} = 1,045 g/ml.

3.4. Kwas azotowy, ρ_{20} od 1,38 do 1,42 g/ml.

3.5. Kwas siarkowy, ρ_{20} 1,84 g/ml.

3.6. Odczynnik molibdenowanadowy: zmieszać 200 ml roztworu heptamolibdenianu amonu (3.6.1), 200 ml roztworu wanadanu amonu (3.6.2) i 134 ml kwasu azotowego (3.4) w kolbie miarowej o pojemności 1 l. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą.

3.6.1. Roztwór heptamolibdenianu (VI) amonu: rozpuścić w gorącej wodzie 100 g heptamolibdenianu (VI) amonu $(NH_4)\ 6Mo_7O_{24}{\cdot}4H_2O$. Dodać 10 ml amoniaku (o gęstości 0,91 g/ml) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.6.2. Roztwór wanadanu (V) amonu: 2,35 g wanadanu (V) amonu NH_4VO_3 rozpuścić w 400 ml gorącej wody. Stale mieszając, dodawać powoli 20 ml rozcieńczonego kwasu azotowego (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.7. Roztwór wzorcowy fosforu o stężeniu 1 mg/ml: rozpuścić 4,387 g dwuwodorofosforanu potasu KH_2PO_4 w wodzie. Uzupełnić do objętości 1 l wodą.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Kwarcowe, porcelanowe lub platynowe tygle do spopielania.

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem nastawionym na temperaturę 550 °C.

4.3. Kolba Kjeldahla o pojemności 250 ml.

4.4. Kolby i pipety miarowe.

4.5. Spektrofotometr.

4.6. Probówki o średnicy 16 mm i pojemności od 25 do 30 ml z korkami stopniowanymi do średnicy 14,5 mm.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Przygotowanie roztworu*

W zależności od rodzaju próbki przygotować roztwór w sposób określony w pkt 5.1.1 lub 5.1.2.

5.1.1. Zwykły sposób postępowania

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, co najmniej 1 g próbki. Umieścić próbkę w kolbie Kjeldahla, dodać 20 ml kwasu siarkowego (3.5), wstrząsnąć do całkowitego nasycenia kwasem i nie dopuścić do

▼B

przyklejania cząstek do ścianek kolby, podgrzać i utrzymywać w stanie wrzenia przez 10 minut. Nieznacznie schłodzić, dodać 2 ml kwasu azotowego (3.4), ostrożnie podgrzać, ponownie nieznacznie schłodzić i dodać nieco więcej kwasu azotowego (3.4), a następnie ponownie doprowadzić do wrzenia. Powtarzać tę czynność aż do uzyskania bezbarwnego roztworu. Schłodzić, dodać trochę wody, zdekantować ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml, spłukać kolbę Kjeldahla gorącą wodą. Schłodzić, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, homogenizować i przefiltrować.

5.1.2. Próbki zawierające substancje organiczne, wolne od dwuwodorofosforanu magnezu i wapnia

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 2,5 g próbki i umieścić w tyglu do spopielania. Zmieszać dokładnie próbkę z 1 g węglanu wapnia (3.1). Spopielać w piecu w temperaturze 550 °C do uzyskania popiołu o białej lub szarej barwie (niewielka ilość węgla drzewnego nie ma znaczenia). Przenieść popiół do zlewki o pojemności 250 ml. Dodać 20 ml wody i kwasu chlorowodorowego (3.2) aż do zaprzestania pienienia się. Następnie dodać kolejne 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.2). Umieścić zlewkę na łaźni piaskowej i odparować do sucha do powstania nierozpuszczalnej krzemionki. Pozostałość rozpuścić w 10 ml kwasu azotowego (3.3) i gotować na łaźni piaskowej lub płycie przez 5 minut, nie doprowadzając do zupełnego odparowania cieczy. Przenieść ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml, spłukując kilkakrotnie zlewkę gorącą wodą. Pozostawić do schłodzenia, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, homogenizować i przefiltrować.

5.2. *Wywołanie zabarwienia i gęstości optycznej*

Rozcieńczyć podzielną część filtratu otrzymanego w sposób określony w pkt 5.1.1 lub 5.1.2 do uzyskania stężenia fosforu nie większego niż 40 µg/ml. Umieścić 10 ml tego roztworu w probówce (4.6) i dodać 10 ml odczynnika molibdenowanadowego (3.6). Homogenizować i pozostawić co najmniej na 10 minut w temperaturze 20 °C. Zmierzyć gęstość optyczną w spektrofotometrze przy 430 nm w stosunku do roztworu otrzymanego przez dodanie 10 ml odczynnika molibdenowanadowego (3.6) do 10 ml wody.

5.3. *Krzywa kalibracyjna*

Z roztworu wzorcowego fosforu (3.7) przygotować roztwory zawierające odpowiednio 5, 10, 20, 30 i 40 µg fosforu w 1 ml. Pobrać 10 ml każdego z tych roztworów i dodać do nich po 10 ml odczynnika molibdenowanadowego (3.6). Homogenizować i pozostawić co najmniej na 10 minut w temperaturze 20 °C. Zmierzyć gęstość optyczną w sposób określony w pkt 5.2. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając wartości gęstości optycznej w stosunku do odpowiadających jej ilości fosforu. W zakresie stężeń od 0 do 40 µg/ml krzywa jest liniowa.

6. **Obliczanie wyników**

Określić zawartość fosforu w badanej próbce z zastosowaniem krzywej kalibracyjnej.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 3 % względem wyższego wyniku dla zawartości fosforu niższej niż 5 %,

— 0,15 % wartości bezwzględnej, dla zawartości fosforu równej lub wyższej niż 5 %.

▼B

Q. OZNACZANIE CHLORU Z CHLORKÓW

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości chloru w chlorkach rozpuszczalnych w wodzie, umownie wyrażanego jako chlorku sodu w paszach. Metodę tę stosuje się do wszystkich pasz.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Chlorki są rozpuszczane w wodzie. Jeżeli badany produkt zawiera substancje organiczne, roztwór jest klarowany. Po nieznacznym zakwaszeniu kwasem azotowym chlorki strąca się w postaci chlorku srebra przy użyciu roztworu azotanu srebra. Nadmiar azotanu srebra jest miareczkowany roztworem tiocyjanianu amonu według metody Volharda.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Roztwór tiocyjanianu amonu 0,1 mol/l.

3.2. Roztwór azotanu srebra 0,1 mol/l.

3.3. Nasycony roztwór siarczanu (VI) amonu i żelaza $(NH_4)Fe(SO_4)_2$.

3.4. Kwas azotowy, gęstość: 1,38 g/ml.

3.5. Eter dwuetylowy.

3.6. Aceton.

3.7. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.8. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu (II) potasu $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.9. Węgiel aktywny, wolny od chlorków i nieabsorbujący chlorków.

4. **Aparatura i sprzęt**

Mikser (tumbler): ok. 35–40 obr./min.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Przygotowanie roztworu*

Zależnie od rodzaju próbki, przygotować roztwór w sposób określony w pkt 5.1.1, 5.1.2 lub 5.1.3.

W tym samym czasie przeprowadzić *ślepą próbę*, pomijając analizowaną próbkę.

5.1.1. Próbki niezawierające substancji organicznej

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, nie więcej niż 10 g próbki zawierającej nie więcej niż 3 g chloru w postaci chlorków. Odważkę umieścić z 400 ml wody o temperaturze około 20 °C w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Mieszać przez 30 minut w mikserze, uzupełnić do pełnej objętości kolby, homogenizować i przefiltrować.

5.1.2. Próbki zawierające substancje organiczne, z wyłączeniem produktów opisanych w pkt 5.1.3

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki i wraz z 1 g węgla aktywnego umieścić w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 400 ml wody o temperaturze około 20 °C i 5 ml roztworu Carreza I (3.7), mieszać przez 30 sekund i dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.8). Mieszać przez 30 minut w mikserze, uzupełnić do pełnej objętości kolby, homogenizować i przefiltrować.

▼B

5.1.3. Pasze po obróbce cieplnej, makuchy lniane, mączka lniana, produkty bogate w mączkę lnianą i inne produkty bogate w śluz lub substancje koloidalne (np. dekstryna skrobi)

Przygotować roztwór w sposób określony w pkt 5.1.2, ale nie filtrować. Zdekantować (w razie potrzeby odwirować), pobrać 100 ml płynnego supernatantu i przenieść go do kolby miarowej o pojemności 200 ml. Zmieszać z acetonem (3.6) i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem, homogenizować i przefiltrować.

5.2. *Miareczkowanie*

W zależności od przewidywanej zawartości chlorku przenieść pipetą do kolby Erlenmeyera od 25 do 100 ml filtratu, otrzymanego w sposób określony w pkt 5.1.1, 5.1.2 lub 5.1.3. Podzielna część nie może zawierać więcej niż 150 mg chloru (Cl). Rozcieńczyć w razie potrzeby wodą do objętości nie mniejszej niż 50 ml, dodać 5 ml kwasu azotowego (3.4), 20 ml nasyconego roztworu siarczanu amonu i żelaza (3.3) i 2 krople roztworu tiocyjanianu amonu (3.1) przeniesionego z zastosowaniem biurety wypełnionej do znaku 0. Stosując biuretę, przenieść roztwór azotanu srebra (3.2), tak aby nadmiar wyniósł 5 ml. Dodać 5 ml eteru dwuetylowego (3.5) i mocno wstrząsać do skoagulowania się osadu. Nadmiar azotanu srebra miareczkować roztworem tiocyjanianu amonu (3.1), aż do uzyskania czerwonobrązowego odcienia utrzymującego się przez minutę.

6. **Obliczanie wyników**

Ilość chlorku (X), wyrażonego jako udział procentowy chlorku sodu, oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

V_1 = fobjętość w ml dodanego roztworu azotanu srebra o stężeniu 0,1 mol/l

V_2 = objętość w ml użytego do miareczkowania roztworu tiocyjanku amonu o stężeniu 0,1 mol/l

m = masa próbki

Jeżeli ślepa próba wykaże, że roztwór azotanu srebra o stężeniu 0,1 mol/l został zużyty, odjąć jego objętość od objętości ($V_1 - V_2$).

7. **Objaśnienia**

7.1. Można także zastosować miareczkowanie potencjometryczne.

7.2. W przypadku produktów bogatych w oleje i tłuszcze najpierw odtłuścić je eterem dwuetylowym lub eterem naftowym.

7.3. W przypadku mączki rybnej miareczkowanie można prowadzić metodą Mohra.

▼B

ZAŁĄCZNIK IV

METODY ANALIZY DO CELÓW KONTROLI POZIOMU DOPUSZCZONYCH DODATKÓW W PASZACH

A. OZNACZANIE WITAMINY A

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości witaminy A (retinolu) w paszach i premiksach. Metoda pozwala na oznaczenie witaminy A obejmującej wszystkie formy alkoholowe *trans*-retinolu i wszystkie jej izomery *cis*. Zawartość witaminy A jest wyrażana w jednostkach międzynarodowych (IU) na kg. Jedna IU odpowiada aktywności 0,300 µg wszystkich form alkoholowych *trans*-witaminy A lub 0,344 µg wszystkich form octanowych *trans*-witaminy A lub 0,550 µg wszystkich form palmitynianowych *trans*-witaminy A.

Granica oznaczalności metody wynosi 2 000 IU witaminy A/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest hydrolizowana w etanolowym roztworze wodorotlenku potasu, a witamina A ekstrahowana eterem naftowym. Rozpuszczalnik jest usuwany przez odparowanie, a pozostałość rozpuszczana w metanolu i, w razie konieczności, rozcieńczana do wymaganego stężenia. Zawartość witaminy A jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (RP-HPLC) z wykorzystaniem detektora UV lub detektora fluorescencyjnego. Parametry chromatograficzne zostały tak dobrane, że nie zachodzi rozdział pomiędzy wszystkimi formami alkoholowymi *trans*-witaminy A i jej *cis* izomerami.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Etanol, σ = 96 %

3.2. Eter naftowy, zakres wrzenia od 40 do 60 °C

3.3. Metanol

3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, c = 50 g/100 ml

3.5. Roztwór askorbinianu sodu, c = 10 g/100 ml (zob. objaśnienia pkt 7.7)

3.6. Siarczek sodu, $Na_2S \cdot x\ H_2O$ (x = 7 – 9)

3.6.1. Roztwór siarczku sodu, c = 0,5 mol/l w glicerolu, ß = 120 g/l (dla x = 9) (zob. objaśnienia pkt 7.8)

3.7. Roztwór fenoloftaleiny, c = 2 g/100 ml w etanolu (pkt 3.1)

3.8. 2-propanol

3.9. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v). Dokładny współczynnik zostanie określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.

3.10. Azot wolny od tlenu

3.11. Wszystkie formy octanowe *trans*-witaminy A, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności, np. $2{,}80 \times 10^6$ IU/g

3.11.1. Roztwór podstawowy wszystkich form octanowych *trans*-witaminy A: odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg octanu witaminy A (3.11) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (3.8) i uzupełnić tym samym rozpuszczalnikiem do pełnej objętości kolby. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1 400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość oznaczyć w sposób określony w pkt 5.6.3.1.

3.12. Wszystkie formy palmitynianowe-*trans*-witaminy A, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności, np. $1{,}80 \times 10^6$ IU/g

▼B

3.12.1. Roztwór podstawowy wszystkich form palmitynianowych *trans*-witaminy A: odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 80 mg palmitynianu witaminy A (3.12) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (3.8) i uzupełnić do pełnej objętości tej kolby tym samym rozpuszczalnikiem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1 400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość oznaczyć w sposób określony w pkt 5.6.3.2.

3.13. 2,6-dwu-*tetr*-butylo-4-metylofenol (BHT) (zob. objaśnienia pkt 7.5)

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Rotacyjna wyparka próżniowa

4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe

4.2.1. Kolby płaskodenne lub stożkowe o pojemności 500 ml, ze szlifem

4.2.2. Kolby miarowe o wąskich szyjkach o pojemnościach 10, 25, 100 i 500 ml, ze szklanymi korkami

4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1 000 ml, ze szklanymi korkami

4.2.4. Kolby gruszkowe o pojemności 250 ml, ze szlifem

4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa o długości płaszcza 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu

4.4. Karbowany filtr bibułowy do rozdzielania faz o średnicy 185 mm (np. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Wyposażenie HPLC z systemem dozowania

4.5.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 250 × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 5 lub 10 µm lub równoważne (kryterium poprawności: pojedynczy pik dla wszystkich izomerów retinolu w warunkach HPLC)

4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z możliwością zmiany długości fali

4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami o długości drogi optycznej 10 mm

4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym

4.8. Aparat do ekstrakcji (zob. rys. 1) zawierający:

4.8.1. Szklany cylinder o pojemności 1 l, ze szlifem i korkiem

4.8.2. Nasadkę szklaną ze szlifem z bocznikiem i ruchomą nastawną rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Nastawna rurka musi mieć zakończenie w kształcie litery U i przeciwległy otwór skierowany ku górze, tak aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza stożkowego.

5. **Sposób postępowania**

Uwaga: Witamina A jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie. Wszystkie czynności należy przeprowadzać bez dostępu światła (z zastosowaniem szkła oranżowego lub szkła zabezpieczonego folią aluminiową) i bez dostępu tlenu (płukanie strumieniem azotu). Podczas ekstrakcji powietrze znad cieczy należy zastąpić azotem (zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając od czasu do czasu korek).

5.1. *Przygotowanie próbki*

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 1 mm, uważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielało się ciepło. Rozdrabnianie musi być przeprowadzone **tuż** przed ważeniem i zmydlaniem, gdyż w przeciwnym razie mogą wystąpić straty witaminy A.

▼B

5.2. *Zmydlanie*

W zależności od zawartości witaminy A zważyć, z dokładnością do 1 mg, od 2 do 25 g próbki do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (4.2.1). Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu (3.1), około 100 mg BHT (3.13), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (3.6). Założyć chłodnicę (4.3) na kolbę i umieścić kolbę w łaźni wodnej z mieszadłem magnetycznym (4.7). Ogrzać do wrzenia i skraplać przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (3.4) przez chłodnicę (4.3) i skraplać przez 25 minut, mieszając w trakcie powolnego przepływu azotu. Następnie spłukać chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

5.3. *Ekstrakcja*

Przenieść, dekantując, zmydlony roztwór, ilościowo spłukując 250 ml wody, do rozdzielacza o pojemności 1 000 ml (4.2.3) lub do aparatu do ekstrakcji (4.8). Spłukać kolbę po zmydlaniu kolejno 25 ml etanolu (3.1) i 100 ml eteru naftowego (3.2) i przenieść popłuczyny do rozdzielacza lub do zestawu do ekstrakcji. Proporcja wody i etanolu w łączonych roztworach musi wynosić około 2:1. Wstrząsać energicznie przez 2 minuty i pozostawić w celu wytrącenia osadu na 2 minuty.

5.3.1. Ekstrakcja z użyciem rozdzielacza stożkowego (4.2.3)

Po rozdzieleniu warstw (zob. objaśnienia pkt 7.3) przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza (4.2.3). Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego (3.2) i dwukrotnie używając 50 ml eteru naftowego (3.2).

Przemyć dwukrotnie połączone ekstrakty w rozdzielaczu stożkowym 100 ml porcjami wody, ostrożnie mieszając, aby zapobiec powstawaniu zawiesiny, a następnie, wielokrotnie wstrząsając, powtórzyć przemywanie kolejnymi 100 ml porcjami wody, aż woda pozostanie bezbarwna po dodaniu roztworu fenoloftaleiny (3.7) (wystarczy zwykle czterokrotne przemycie). W celu usunięcia suspensji wodnej filtrować przemyty ekstrakt przez suchy karbowany filtr do rozdzielania faz (4.4) do kolby miarowej o pojemności 500 ml (4.2.2). Spłukać rozdzielacz i filtr przy użyciu 50 ml eteru naftowego (3.2), uzupełnić eterem naftowym (3.2) do pełnej objętości kolby i dobrze zmieszać.

5.3.2. Ekstrakcja z użyciem aparatu do ekstrakcji (4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielone (zob. objaśnienia pkt 7.3) zastąpić korek szklanego cylindra (4.8.1) nasadką szklaną ze szlifem (4.8.2) i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U tak, aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez aplikację ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza o pojemności 1 000 ml (4.2.3). Do szklanego cylindra dodać 100 ml eteru naftowego (3.2), zamknąć i dobrze wstrząsnąć. Pozostawić do rozdzielenia się faz i przenieść górną warstwę do rozdzielacza w sposób opisany powyżej. Powtórzyć postępowanie ekstrakcyjne, stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego (3.2), a następnie stosując dwukrotnie porcje 50 ml eteru naftowego (3.2) i dodać warstwy eteru naftowego do rozdzielacza.

Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego w sposób określony w pkt 5.3.1 i dalej postępować w sposób tam określony.

5.4. *Przygotowanie roztworu próbki do HPLC*

Pobrać pipetą podzielną część roztworu eteru naftowego (z pkt 5.3.1 lub 5.3.2) do kolby gruszkowej o pojemności 250 ml (4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na rotacyjnej wyparce próżniowej (4.1) przy obniżonym ciśnieniu na łaźni wodnej w temperaturze nie wyższej

▼B

niż 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (3.10) i zdjąć kolbę z rotacyjnej wyparki próżniowej. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (3.10) i szybko rozpuścić pozostałość w znanej objętości metanolu (10–100 ml) (3.3) (stężenie witaminy A musi wynosić od 5 IU/ml do 30 IU/ml).

5.5. *Oznaczanie HPLC*

Witamina A jest rozdzielana na kolumnie z fazą odwróconą C_{18} (4.5.1), a stężenie jest mierzone z użyciem detektora UV (325 nm) lub detektora fluorescencyjnego (wzbudzanie: 325 nm; emisja 475 nm) (4.5.2).

Zadozować podzielną część roztworu metanolowego (np. 20 µl), otrzymanego w sposób określony w pkt 5.4 i wymywać fazą ruchomą (3.9). Obliczyć średnią wysokość (powierzchnię) piku kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku dozowań kalibracyjnych roztworów (5.6.2).

Warunki HPLC

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.5.1):	250 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 5 lub 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.9):	Mieszanina metanolu (3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v)
Prędkość przepływu:	1–2 ml/min
Detektor (4.5.2):	Detektor UV (325 nm) lub detektor fluorescencyjny (wzbudzenie: 325 nm/emisja: 475 nm)

5.6. *Kalibracja*

5.6.1. Przygotowanie roboczych roztworów wzorcowych

Pobrać pipetą 20 ml podstawowego roztworu octanowej witaminy A (3.11.1) lub 20 ml podstawowego roztworu palmitynianowej witaminy A (3.12.1) do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (4.2.1) i hydrolizować w sposób określony w pkt 5.2, lecz bez dodawania BHT. Następnie ekstrahować eterem naftowym (3.2) w sposób określony w pkt 5.3 i uzupełnić do objętości 500 ml eterem naftowym (3.2). Odparować prawie do sucha 100 ml tego ekstraktu na rotacyjnej wyparce próżniowej (zob. pkt 5.4), usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (3.10) i ponownie rozpuścić pozostałość w 10,0 ml metanolu (3.3). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 560 IU witaminy A na 1 ml. Oznaczyć dokładną zawartość ekstraktu w sposób określony w pkt 5.6.3.3. Roboczy roztwór wzorcowy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Przenieść pipetą 2,0 ml tego roboczego roztworu wzorcowego do kolby miarowej o pojemności 20 ml, uzupełnić metanolem (3.3) do pełnej objętości kolby i zmieszać. Nominalne stężenie tego **rozcieńczonego** roboczego roztworu wzorcowego wynosi 56 IU witaminy A na 1 ml.

5.6.2. Przygotowanie kalibracyjnych roztworów i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml **rozcieńczonego** roboczego roztworu wzorcowego do partii kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolb metanolem (3.3) i zmieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,8, 5,6, 14,0 i 28,0 IU witaminy A na 1 ml.

Zadozować kilka razy 20 µl każdego z roztworów kalibracyjnych i określić średnie wysokości (powierzchnie) piku. Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) piku, wykreślić krzywą kalibracyjną, uwzględniając wyniki kontroli UV (5.6.3.3).

▼B

5.6.3. Standaryzacja UV wzorcowych roztworów

5.6.3.1. *Roztwór podstawowy octanowej witaminy A*

Pobrać pipetą 2,0 ml roztworu podstawowego octanowej witaminy A (3.11.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml (4.2.2) i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 56 IU witaminy A na 1 ml. Pobrać pipetą 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu octanowej witaminy A do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (3.8) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia musi znajdować się pomiędzy 325 nm a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

($E^{1\,\%}_{1\,\text{cm}}$ dla octanowej witaminy A = 1 530 przy 326 nm w 2-propanolu)

5.6.3.2. *Roztwór podstawowy palmitynianowej witaminy A*

Pobrać pipetą 2,0 ml roztworu podstawowego palmitynianowej witaminy A (3.12.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml (4.2.2) i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 56 IU witaminy A na 1 ml. Pobrać pipetą 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu palmitynianowej witaminy A do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na 1 ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (3.8) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia musi znajdować się pomiędzy 325 nm a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

($E^{1\,\%}_{1\,\text{cm}}$ palmitynianowej witaminy A = 957 przy 326 nm w 2- propanolu)

5.6.3.3. *Roboczy roztwór wzorcowy witaminy A*

Pobrać pipetą 3,0 ml **nierozcieńczonego** roboczego roztworu wzorcowego witaminy A, przygotowanego w sposób określony w pkt 5.6.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml (4.2.2) i uzupełnić 2-propanolem (3.8) do pełnej objętości kolby. Pobrać pipetą 5,0 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na 1 ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (3.8) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia musi znajdować się pomiędzy 325 nm a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

($E^{1\,\%}_{1\,\text{cm}}$ dla alkoholowej formy witaminy A = 1 821 przy 325 nm w 2-propanolu)

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików witaminy A roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w IU/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (5.6.2).

▼B

Zawartość witaminy A w IU/kg próbki oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie w IU/ml witaminy A w roztworze próbki (5.4)
V_1 = objętość w ml roztworu próbki (5.4)
V_2 = objętość w ml pobranej podzielnej części z roztworu próbki, o którym mowa w pkt 5.4
m = masa naważki w g

7. **Objaśnienia**

7.1. W przypadku próbek o niskim stężeniu witaminy A jest wskazane połączenie ekstraktów eteru naftowego dwóch zmydlanych naważek (o wadze 25 g każda) w jeden roztwór próbki przeznaczony do oznaczania HPLC.

7.2. Próbka pobrana do analizy nie może zawierać więcej niż 2 g tłuszczu.

7.3. Jeżeli nie dochodzi do rozdzielenia faz, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby rozbić emulsję.

7.4. W przypadku oleju z wątroby dorsza i innych czystych tłuszczów czas zmydlania należy przedłużyć do od 45 do 60 minut.

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu zwykłej kolumny możliwe jest oddzielenie izomerów retinolu. W tym wypadku do obliczeń należy jednak zsumować wysokości (powierzchnie) pików wszystkich izomerów trans i cis.

7.7. Zamiast roztworu askorbinianu sodu można zastosować około 150 mg kwasu askorbinowego.

7.8. Zamiast roztworu siarczku sodu można zastosować około 50 mg EDTA.

7.9. W przypadku analizy witaminy A w preparatach mlekozastępczych należy zwrócić szczególną uwagę na:

— zmydlanie (5.2): ze względu na zawartość tłuszczu w próbce konieczne może być zwiększenie ilości roztworu wodorotlenku potasu (3.4),

— ekstrakcję (5.3): ze względu na obecność emulsji konieczne może być dostosowanie proporcji wody i etanolu do 2:1.

Aby sprawdzić, czy zastosowana metoda analizy daje wiarygodne wyniki w odniesieniu do tej konkretnej matrycy (preparat mlekozastępczy), na dodatkowej naważce należy przeprowadzić test odzysku. Jeżeli stopień odzysku jest niższy niż 80 %, wyniki analizy należy skorygować o odzysk.

8. **Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 15 % względem wyższego wyniku.

▼B

9. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych** ([1])

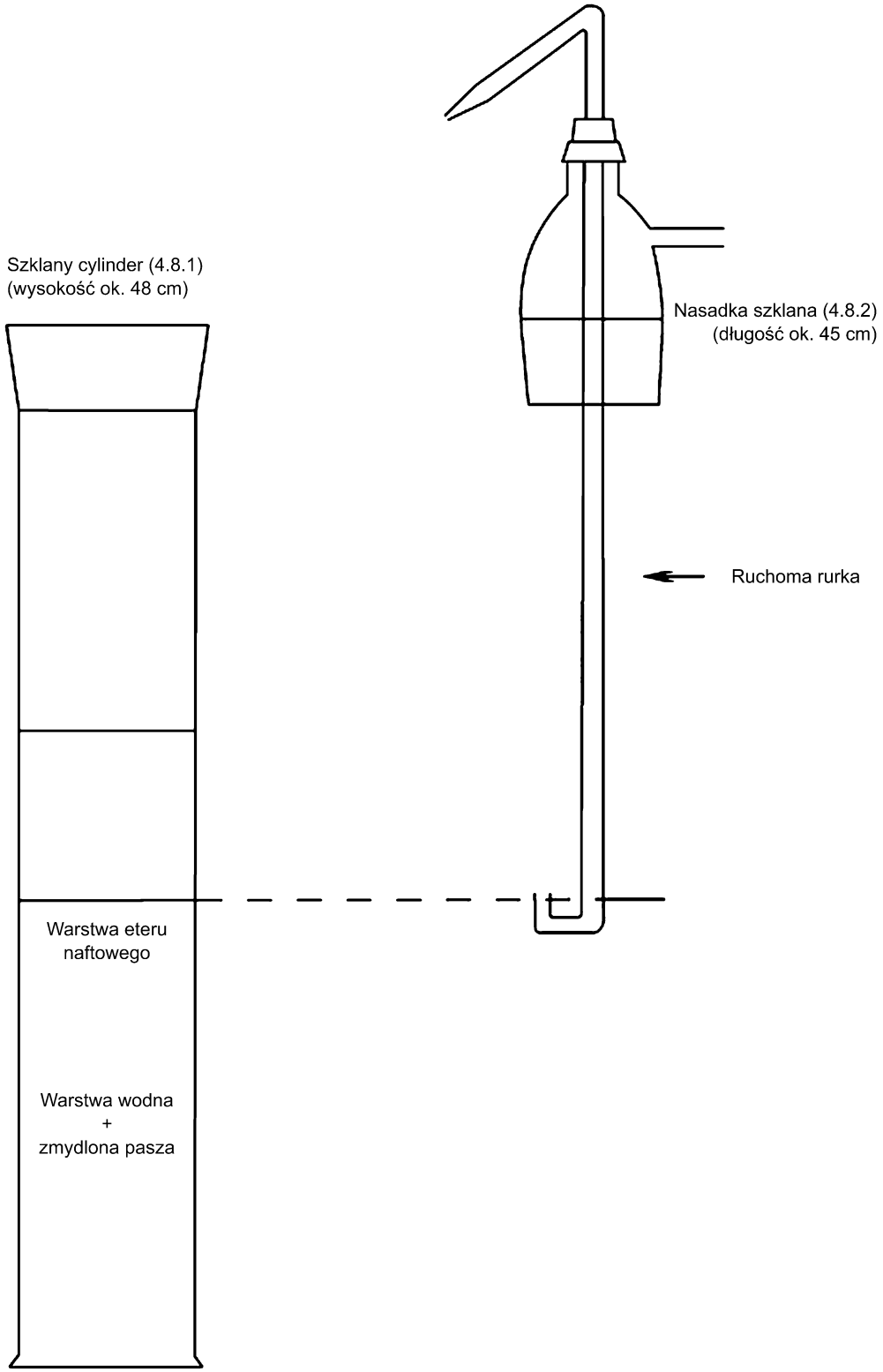
	Premiks	Pasza z premiksem	Mieszanka paszowa mineralna	Pasza białkowa	Pasza dla prosiąt
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
średnia [IU/kg]	$17{,}02 \times 10^6$	$1{,}21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r [IU/kg]	$0{,}51 \times 10^6$	$0{,}039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1{,}43 \times 10^6$	$0{,}109 \times 10^6$	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 = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych wartości
s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
s_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
r = powtarzalność wyników
R = odtwarzalność wyników
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności

([1]) Przeprowadzone przez grupę roboczą ds. pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Rysunek 1: Aparat do ekstrakcji (4.8)



▼B

B. OZNACZANIE WITAMINY E

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości witaminy E w paszach i premiksach. Zawartość witaminy E jest wyrażana w mg octanu DL-α-tokoferolu na kg. 1 mg octanu DL-α-tokoferolu odpowiada 0,91 mg DL-α-tokoferolu (witamina E).

Granica oznaczalności metody wynosi 2 mg witaminy E/kg. Granica oznaczalności jest osiągalna jedynie przy pomocy detektora fluorescencyjnego. W przypadku detektora UV granica oznaczalności wynosi 10 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest hydrolizowana etanolowym roztworem wodorotlenku potasu, a witamina E jest ekstrahowana eterem naftowym. Rozpuszczalnik jest usuwany przez odparowanie, a pozostałość rozpuszczana w metanolu i, w razie konieczności, rozcieńczana do wymaganego stężenia. Zawartość witaminy E jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (RP-HPLC) przy wykorzystaniu detektora UV lub detektora fluorescencyjnego.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Etanol, σ = 96 %

3.2. Eter naftowy, zakres wrzenia od 40 do 60 °C

3.3. Metanol

3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, c = 50 g/100 ml

3.5. Roztwór askorbinianu sodu, c = 10 g/100 ml (zob. objaśnienia pkt 7.7)

3.6. Siarczek sodu, $Na_2S \cdot x\ H_2O$ (x = 7 – 9)

3.6.1. Roztwór siarczku sodu, c = 0,5 mol/l w glicerolu, β = 120 g/l (dla x = 9) (zob. objaśnienia pkt 7.8)

3.7. Roztwór fenoloftaleiny, c = 2 g/100 ml w etanolu (3.1)

3.8. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v). Dokładny współczynnik jest określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.

3.9. Azot wolny od tlenu

3.10. Octan DL-α-tokoferolu o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności

3.10.1. Roztwór podstawowy octanu DL-α-tokoferolu: odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg octanu DL-α-tokoferolu (3.10) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (3.1) i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg octanu DL-α-tokoferolu. (kontrola UV – zob. pkt 5.6.1.3; stabilizacja – zob. objaśnienia pkt 7.4).

3.11. DL-α-tokoferol o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności

3.11.1. Roztwór podstawowy DL-α-tokoferolu: odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg DL-α-tokoferolu (3.11) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (3.1) i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg DL-α-tokoferolu. (kontrola UV – zob. pkt 5.6.2.3; stabilizacja – zob. objaśnienia pkt 7.4).

3.12. 2,6-dwu-*tetr*-butylo-4-metylofenol (BHT) (zob. objaśnienia pkt 7.5)

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Rotacyjna wyparka warstwowa

▼B

4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe

4.2.1. Kolby płaskodenne lub stożkowe o pojemności 500 ml, ze szlifem

4.2.2. Kolby miarowe o wąskich szyjkach o pojemnościach 10, 25, 100 i 500 ml, ze szklanymi korkami

4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1 000 ml, ze szklanymi korkami

4.2.4. Kolby gruszkowe o pojemności 250 ml, ze szlifem

4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa o długości płaszcza 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu

4.4. Karbowany filtr bibułowy do rozdzielania faz o średnicy 185 mm (np. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Wyposażenie HPLC z systemem dozowania

4.5.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 250 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 5 lub 10 µm lub równoważne

4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z możliwością zmiany długości fali

4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami o długości drogi optycznej 10 mm

4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym

4.8. Aparat do ekstrakcji (zob. rys. 1) zawierający:

4.8.1. Cylinder szklany o pojemności 1 l, ze szlifem i korkiem

4.8.2. Nasadkę szklaną ze szlifem z bocznikiem i ruchomą nastawną rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Nastawna rurka musi mieć zakończenie w kształcie litery U i przeciwległy otwór skierowany ku górze, tak aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza stożkowego.

5. **Sposób postępowania**

Uwaga: Witamina E jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie. Wszystkie czynności należy przeprowadzać bez dostępu światła (z zastosowaniem szkła oranżowego lub szkła zabezpieczonego folią aluminiową) i bez dostępu tlenu (płukanie strumieniem azotu). Podczas ekstrakcji powietrze znad cieczy należy zastąpić azotem (zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając od czasu do czasu korek).

5.1. *Przygotowanie próbki*

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 1 mm, uważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielało się ciepło. Rozdrabnianie musi być przeprowadzone **tuż** przed ważeniem i zmydlaniem, gdyż w przeciwnym razie mogą wystąpić straty witaminy E.

5.2. *Zmydlanie*

W zależności od zawartości witaminy E odważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 2 do 25 g próbki do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (4.2.1). Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu (3.1), około 100 mg BHT (3.12), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (3.6). Założyć chłodnicę (4.3) na kolbę i umieścić kolbę na łaźni wodnej z mieszadłem magnetycznym (4.7). Ogrzać do wrzenia i skraplać przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (3.4) przez chłodnicę (4.3) i skraplać przez 25 minut, mieszając pod powolnym przepływem azotu. Następnie spłukać chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

▼B

5.3. *Ekstrakcja*

Przenieść, dekantując, zmydlony roztwór, ilościowo spłukując 250 ml wody, do rozdzielacza o pojemności 1 000 ml (4.2.3) lub do aparatu do ekstrakcji (4.8). Spłukać kolbę po zmydlaniu kolejno 25 ml etanolu (3.1) i 100 ml eteru naftowego (3.2) i przenieść popłuczyny do rozdzielacza lub do aparatu do ekstrakcji. Proporcja wody i etanolu w łączonych roztworach musi wynosić około 2:1. Wstrząsać energicznie przez 2 minuty i pozostawić na 2 minuty.

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza stożkowego (4.2.3)

Po rozdzieleniu warstw (zob. objaśnienia pkt 7.3) przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza (4.2.3). Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego (3.2) i używając dwukrotnie 50 ml eteru naftowego (3.2).

Przemyć dwukrotnie połączone ekstrakty w rozdzielaczu stożkowym 100 ml porcjami wody, ostrożnie mieszając, aby zapobiec powstawaniu zawiesiny, a następnie, wielokrotnie wstrząsając, powtórzyć przemywanie kolejnymi 100 ml porcjami wody, aż woda pozostanie bezbarwna po dodaniu roztworu fenoloftaleiny (3.7) (wystarczy zwykle czterokrotne przemycie). Aby usunąć suspensję wodną, filtrować przemyty ekstrakt przez suchy karbowany filtr do rozdzielania faz (4.4) do kolby miarowej o pojemności 500 ml (4.2.2). Spłukać rozdzielacz i filtr przy użyciu 50 ml eteru naftowego (3.2), uzupełnić do pełnej objętości kolby eterem naftowym (3.2) i dobrze zmieszać.

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu do ekstrakcji (4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielone (zob. objaśnienia pkt 7.3), zastąpić korek szklanego cylindra (4.8.1) nasadką szklaną ze szlifem (4.8.2) i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U tak, aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez aplikację ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza o pojemności 1 000 ml (4.2.3). Do szklanego cylindra dodać 100 ml eteru naftowego (3.2), zamknąć i dobrze wstrząsnąć. Pozostawić do rozdzielenia się faz i przenieść górną warstwę do rozdzielacza w sposób opisany powyżej. Powtórzyć postępowanie ekstrakcyjne, stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego (3.2), a następnie stosując dwukrotnie porcję 50 ml eteru naftowego (3.2), i dodać warstwy eteru naftowego do rozdzielacza.

Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego, w sposób określony w pkt 5.3.1 i postępować w sposób tam określony.

5.4. *Przygotowanie roztworu próbki do HPLC*

Pobrać pipetą podzielną część roztworu eteru naftowego (z pkt 5.3.1 lub 5.3.2) do kolby gruszkowej o pojemności 250 ml (4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na rotacyjnej wyparce próżniowej (4.1) przy obniżonym ciśnieniu na łaźni wodnej w temperaturze nie wyższej niż 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (3.9) i zdjąć kolbę z rotacyjnej wyparki próżniowej. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (3.9) i szybko rozpuścić pozostałość w znanej objętości metanolu (10–100 ml) (3.3) (stężenie DL-α-tokoferolu musi wynosić od 5 µg/ml do 30 µg/ml).

5.5. *Oznaczanie HPLC*

Witamina E jest rozdzielana na kolumnie z fazą odwróconą C_{18} (4.5.1), a stężenie jest mierzone przy użyciu detektora fluorescencyjnego (wzbudzanie: 295 nm; emisja: 330 nm) lub detektora UV (292 nm) (4.5.2).

▼B

Zadozować podzielną część roztworu metanolowego (np. 20 µl), otrzymanego w sposób określony w pkt 5.4, i wymywać fazą ruchomą (3.8). Obliczyć średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku dozowań kalibracyjnych roztworów (5.6.2).

Warunki HPLC

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.5.1):	wypełnienie 5 lub 10 µm lub 250 mm × 4 mm, C_{18}, lub równoważne
Faza ruchoma (3.8):	Mieszanina metanolu (3.3) i wody np. 980 + 20 (v + v).
Prędkość przepływu:	1–2 ml/min
Detektor (4.5.2):	detektor fluorescencyjny (wzbudzenie: 295 nm/emisja: 330 nm) lub detektor UV (292 nm)

5.6. *Kalibracja (octan DL-α-tokoferolu lub DL-α-tokoferol)*

5.6.1. Wzorzec octanu DL-α-tokoferolu

5.6.1.1. *Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego*

Pobrać pipetą 25 ml podstawowego roztworu octanu DL-α-tokoferolu (3.10.1) do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (4.2.1) i hydrolizować w sposób określony w pkt 5.2. Następnie ekstrahować eterem naftowym (3.2) w sposób określony w pkt 5.3 i uzupełnić do pełnej objętości kolby 500 ml eterem naftowym. Odparować prawie do sucha 25 ml tego ekstraktu na rotacyjnej wyparce próżniowej (zob. pkt 5.4), usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (3.9) i ponownie rozpuścić pozostałość w 25,0 ml metanolu (3.3). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 45,5 µg DL-α-tokoferolu na 1 ml, co odpowiada 50 µg octanu DL-α-tokoferolu na 1 ml. Roztwór wzorcowy roboczy należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

5.6.1.2. *Przygotowanie kalibracyjnych roztworów i krzywej kalibracyjnej*

Przenieść 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem (3.3) i zmieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,5, 5,0, 10,0 i 25,0 µg/ml octanu DL-α-tokoferolu, co odpowiada 2,28, 4,55, 9,10 i 22,8 µg/ml DL-α-tokoferolu.

Zadozować kilka razy 20 µl każdego roztworu kalibracyjnego i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików. Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) pików, wykreślić krzywą kalibracyjną.

5.6.1.3. *Standaryzacja UV roztworu podstawowego octanu DL-α-tokoferolu (3.10.1)*

Rozcieńczyć 5,0 ml roztworu podstawowego octanu DL-α-tokoferolu (3.10.1) w 25,0 ml etanolu i zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem etanolu (3.1) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 250 nm i 320 nm.

Maksimum absorpcji musi wystąpić przy 284 nm:

$E^{1\,\%}_{1\,cm}$ = 43,6 przy 284 nm w etanolu

Przy tym rozcieńczeniu wartość wygaśnięcia musi wynosić od 0,84 do 0,88.

▼B

5.6.2. Wzorzec DL-α-tokoferolu

5.6.2.1. *Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego*

Pobrać pipetą 2 ml podstawowego roztworu wzorcowego DL-α-tokoferolu (3.11.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, rozpuścić w metanolu (3.3) i uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 40 µg DL-α-tokoferolu na 1 ml, co odpowiada 44,0 µg octanu DL-α-tokoferolu na 1 ml. Wzorcowy roztwór roboczy przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

5.6.2.2. *Przygotowanie kalibracyjnych roztworów i krzywej kalibracyjnej*

Przenieść 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolb metanolem (3.3) i zmieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 µg/ml DL-α-tokoferolu, czyli 2,20, 4,40, 8,79 i 22,0 µg/ml octanu DL-α-tokoferolu.

Zadozować kilka razy 20 µl każdego roztworu kalibracyjnego i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików. Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) pików, wykreślić krzywą kalibracyjną.

5.6.2.3. *Standaryzacja UV roztworu podstawowego DL-α-tokoferolu (3.11.1)*

Rozcieńczyć 2,0 ml roztworu podstawowego DL-α-tokoferolu (3.11.1) w 25,0 ml etanolu i zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem etanolu (3.1) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 250 nm i 320 nm. Maksimum absorpcji musi wystąpić przy 292 nm:

$E_{1\,cm}^{1\,\%}$ = 75,8 przy 292 nm w etanolu

Przy tym rozcieńczeniu wartość wygaśnięcia musi wynosić 0,6.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików witaminy E roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml (obliczonego jako octan DL-α-tokoferolu) z krzywej wzorcowej (5.6.1.2 lub 5.6.2.2).

Zawartość witaminy E w mg/kg próbki oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie w µg/ml witaminy E (jako octan DL-α-tokoferolu) w roztworze próbki (5.4)

V_1 = objętość w ml roztworu próbki (5.4)

V_2 = objętość w ml podzielnej części pobranej z roztworu próbki, o którym mowa w pkt 5.4

m = masa naważki w g

7. **Objaśnienia**

7.1. W przypadku próbek o niskim stężeniu witaminy E wskazane jest połączenie ekstraktów eteru naftowego z 2 zmydlonych naważek (o wadze 25 g każda) w jeden roztwór próbki przeznaczony do oznaczania HPLC.

7.2. Próbka pobrana do analizy nie może zawierać więcej niż 2 g tłuszczu.

7.3. Jeżeli nie dochodzi do rozdzielenia faz, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby usunąć emulsję.

▼B

7.4. Po pomiarze spektrofotometrycznym roztworu octanu DL-α-tokoferolu lub DL-α-tokoferolu, wykonanym odpowiednio w sposób określony w pkt 5.6.1.3 lub 5.6.2.3, dodać 10 mg BHT (3.12) do roztworu (3.10.1 lub 3.10.2) i roztwór przechowywać w lodówce (nie dłużej niż przez 4 tygodnie).

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu zwykłej kolumny możliwe jest oddzielenie α-, β-, γ- i δ-tokoferolu.

7.7. Zamiast roztworu askorbinianu sodu można zastosować około 150 mg kwasu askorbinowego.

7.8. Zamiast roztworu siarczku sodu można zastosować około 50 mg EDTA.

7.9. Octanowa witamina E ulega bardzo szybkiej hydrolizie w warunkach zasadowych i dlatego jest ona wrażliwa na utlenianie, szczególnie w obecności takich pierwiastków śladowych jak żelazo lub miedź. W przypadku oznaczania witaminy E w premiksach na poziomach wyższych niż 5 000 mg/kg, konsekwencją może być degradacja witaminy E. Dlatego też do celów potwierdzenia zaleca się metodę HPLC obejmującą enzymatyczny rozkład witaminy E bez zmydlania zasadą.

8. **Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 15 % względem wyższego wyniku.

9. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych** ([1])

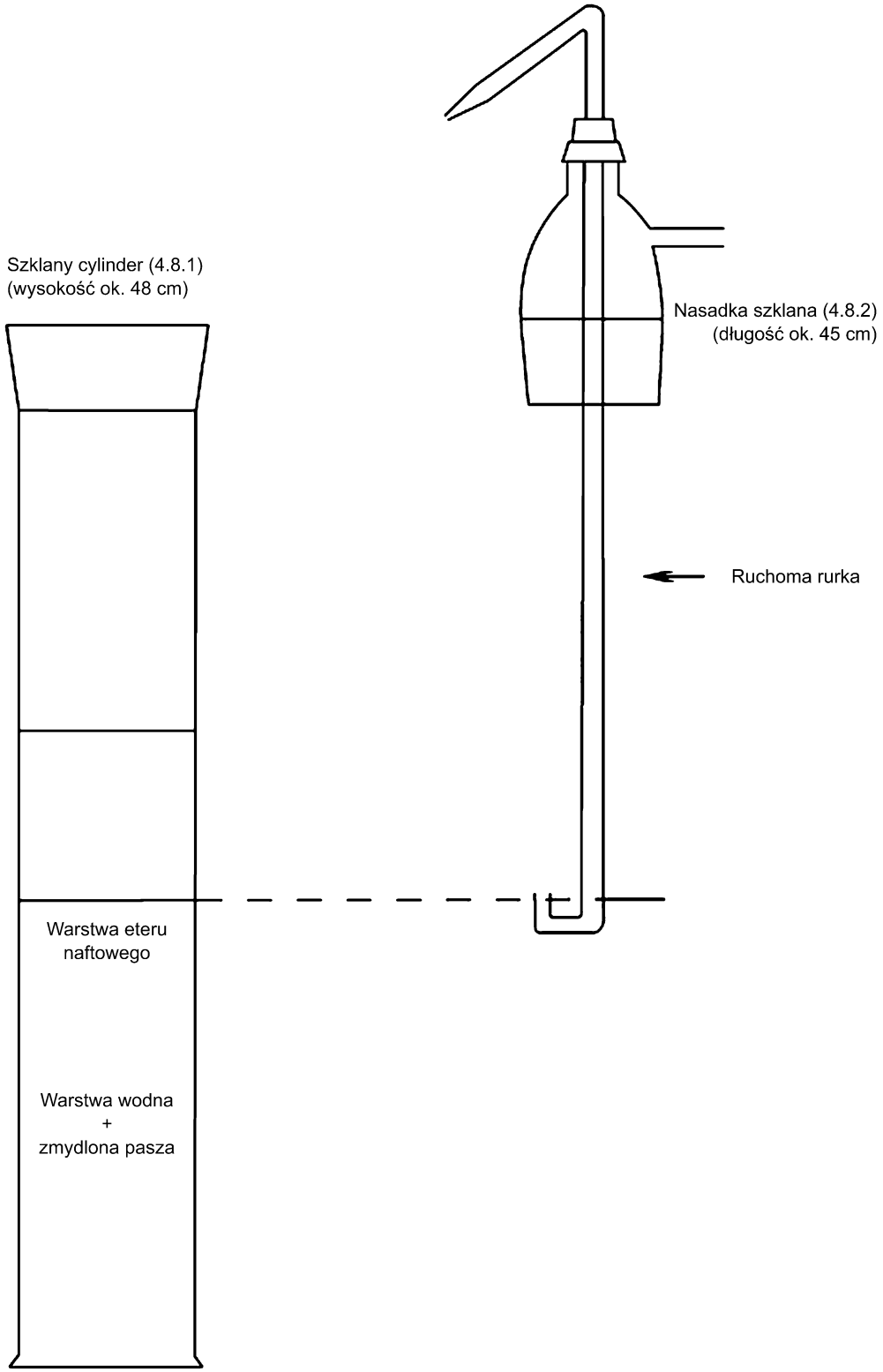
	Premiks	Pasza z premiksem	Mieszanka paszowa mineralna	Pasza białkowa	Pasza dla prosiąt
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Średnia [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych wartości
s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
s_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
r = powtarzalność wyników
R = odtwarzalność wyników
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności

([1]) Przeprowadzone przez grupę roboczą ds. pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

▼B

Rysunek 1: Aparat do ekstrakcji (4.8)



▼B

C. OZNACZANIE PIERWIASTKÓW ŚLADOWYCH: ŻELAZA, MIEDZI, MANGANU I CYNKU

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości pierwiastków śladowych żelaza, miedzi, manganu i cynku w paszach. Dolne granice oznaczalności metody wynoszą dla:

— żelaza (Fe): 20 mg/kg,

— miedzi (Cu): 10 mg/kg,

— manganu (Mn): 20 mg/kg,

— cynku (Zn): 20 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbkę wprowadza się do roztworu kwasu chlorowodorowego po zniszczeniu ewentualnej substancji organicznej. Pierwiastki śladowe: żelazo, miedź, mangan i cynk są oznaczane, po odpowiednim rozcieńczeniu, z użyciem spektrometrii absorpcji atomowej.

3. **Odczynniki i roztwory**

Uwagi wstępne

Do przygotowania odczynników i roztworów używanych w postępowaniu analitycznym stosuje się wodę wolną od oznaczanych kationów, otrzymaną w drodze podwójnej destylacji w destylarce ze szkła borokrzemowego lub kwarcowego lub w wyniku podwójnego traktowania na żywicy jonowymiennej.

Stosować odczynniki o czystości co najmniej analitycznej. Nieobecność oznaczanych pierwiastków w stosowanych odczynnikach i roztworach należy sprawdzać poprzez ślepą próbę. Odczynnik, jeżeli to konieczne, poddaje się oczyszczeniu przed zastosowaniem.

Zamiast przygotowania wzorcowych roztworów opisanych poniżej dopuszcza się stosowanie innych dostępnych wzorcowych roztworów, pod warunkiem że mają one gwarancję i zostały sprawdzone przed użyciem.

3.1. Kwas chlorowodorowy (d: 1,19 g/ml).

3.2. Kwas chlorowodorowy (6 mol/l).

3.3. Kwas chlorowodorowy (0,5 mol/l).

3.4. Kwas fluorowodorowy od 38 do 40 % (v/v), o zawartości żelaza (Fe) niższej niż 1 mg/l i pozostałości po odparowaniu niższej niż 10 mg (jako siarczanu)/l.

3.5. Kwas siarkowy (d: 1,84 g/ml).

3.6. Nadtlenek wodoru (około 100 objętości tlenu (30 % wagowych)).

3.7. Roztwór wzorcowy żelaza (1 000 µg Fe/ml) przygotowany w następujący sposób lub równoważny roztwór dostępny w handlu: rozpuścić 1 g drutu żelaznego w 200 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2), dodać 16 ml nadtlenku wodoru (3.6) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.7.1. Roboczy roztwór wzorcowy żelaza (100 µg Fe/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego żelaza (3.7) wodą w stosunku 1:9.

3.8. Roztwór wzorcowy miedzi (1 000 µg Cu/ml) przygotowany w następujący sposób lub równoważny roztwór dostępny w handlu:

— rozpuścić 1 g sproszkowanej miedzi w 25 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2), dodać 5 ml nadtlenku wodoru (3.6) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.8.1. Roboczy roztwór wzorcowy miedzi (10 µg Cu/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego miedzi (3.8) wodą w stosunku 1:9, a następnie przez rozcieńczenie jednej części uzyskanego roztworu wodą stosunku 1:9.

▼B

3.9. Roztwór wzorcowy manganu (1 000 µg Mn/ml) przygotowany w następujący sposób lub równoważny roztwór dostępny w handlu:

— rozpuścić 1 g sproszkowanego manganu w 25 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.9.1. Roboczy roztwór wzorcowy manganu (10 µg Mn/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego manganu (3.9) wodą w stosunku 1:9, a następnie przez rozcieńczenie jednej części uzyskanego roztworu wodą w stosunku 1:9.

3.10. Roztwór wzorcowy cynku (1 000 µg Zn/ml) przygotowany w następujący sposób lub równoważny roztwór dostępny w handlu:

— rozpuścić 1 g cynku w postaci paska lub listka w 25 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.10.1. Roboczy roztwór wzorcowy cynku (10 µg Zn/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego cynku (3.10) wodą w stosunku 1:9, a następnie przez rozcieńczenie jednej części uzyskanego roztworu wodą w stosunku 1:9.

3.11. Roztwór chlorku lantanu: rozpuścić 12 g tlenku lantanu w 150 ml wody, dodać 100 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Piec muflowy z regulacją temperatury i rejestratorem.

4.2. Naczynie szklane z odpornego borokrzemowego szkła; zalecane jest stosowanie sprzętu wyłącznie do oznaczania mikroelementów.

4.3. Spektrofotometr absorpcji atomowej o czułości i precyzji w zakresie prezentowanej metody.

5. **Sposób postępowania** ([1])

5.1. *Próbki zawierające substancję organiczną*

5.1.1. Spopielanie i przygotowanie roztworu do analizy ([2])

5.1.1.1. Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 5 do 10 g próbki i umieścić w kwarcowym lub platynowym tyglu (zob. uwaga b)), wysuszyć w suszarce o temperaturze 105 °C i wstawić tygiel do zimnego pieca muflowego (4.1). Zamknąć piec, (zob. uwaga c)) i stopniowo podwyższać temperaturę do 450 do 475 °C w czasie około 90 minut. Utrzymywać tę temperaturę od 4 do 16 godzin, np. przez noc, aby usunąć związki węglowe, następnie otworzyć piec i pozostawić do schłodzenia (zob. uwaga d)).

([1]) Inne metody rozkładu mogą być stosowane, pod warunkiem, iż wykazano, że zapewniają podobne wyniki (np. rozkład mikrofalami).

([2]) Zielonki świeże lub suszone mogą zawierać duże ilości krzemionki roślinnej, która może zawierać pierwiastki śladowe i którą trzeba usunąć. Dlatego też w przypadku analizy próbek takich pasz należy zastosować następujące, zmodyfikowane postępowanie. Postępować w sposób określony w pkt 5.1.1.1 do etapu filtrowania. Następnie należy dwukrotnie wrzącą wodą przemyć filtr papierowy zawierający nierozpuszczalną pozostałość i umieścić w platynowym lub kwarcowym tyglu. Należy włączyć piec muflowy (4.1), nastawić temperaturę poniżej 550 °C i poczekać, aż całkowicie zniknie wszelki materiał zawierający węgiel. Pozostawić do ostygnięcia, dodać kilka kropli wody, a następnie 10–15 ml kwasu fluorowodorowego (3.4) i odparować do osiągnięcia suchości w temperaturze około 150 °C. Jeśli w pozostałościach pozostanie krzemionka, to należy ponownie rozpuścić tę pozostałość w kilku mililitrach kwasu fluorowodorowego (3.4) i odparować aż do osiągnięcia suchości. Dodać pięć kropli kwasu siarkowego (3.5) i podgrzewać do momentu pokazania się białego dymu. Po dodaniu 5 ml kwasu solnego o stężeniu 6 mol/l (3.2) i około 30 ml wody podgrzać, przefiltrować roztwór do kolby miarowej o pojemności 250 ml i dopełnić wodą do pełnej objętości (stężenie HCl około 0,5 mol/l). Następnie należy wykonać oznaczenie zgodnie z pkt 5.1.2.

▼B

Zwilżyć spopielałe pozostałości wodą i przenieść do zlewki o pojemności 250 ml. Przemyć tygiel z użyciem około 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i dodawać kwas powoli i ostrożnie do zlewki (może zajść gwałtowna reakcja w wyniku powstania CO_2). Dodawać kroplami kwas chlorowodorowy (3.1) mieszając do zaniku burzenia się mieszaniny. Odparować do sucha, od czasu do czasu mieszając szklaną bagietką.

Następnie dodać do pozostałości 15 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2), a następnie około 120 ml wody. Zamieszać szklaną bagietką, którą należy pozostać w zlewce, i przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym. Doprowadzić ostrożnie do wrzenia i pozostawić w tym stanie aż do całkowitego rozpuszczenia rozpuszczalnych cząstek popiołu. Przefiltrować przez bezpopiołowy filtr i zebrać filtrat w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Spłukać zlewkę i filtr z użyciem 5 ml gorącego kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2) i dwukrotnie wrzącą wodą. Uzupełnić kolbę miarową do pełnej objętości wodą tak, aby uzyskać stężenie HCl około 0,5 mol/l.

5.1.1.2. Jeżeli pozostałość na filtrze jest czarna (węgiel), wstawić z powrotem do pieca i ponownie spopielać w temperaturze od 450 do 475 °C. Spopielanie, które wymaga kilku godzin (od trzech do pięciu), uważa się za zakończone, gdy popiół ma barwę białą lub białawą. Rozpuścić pozostałość w około 2 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), odparować do sucha i dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (3.2). Podgrzać, przefiltrować roztwór do kolby miarowej i uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą tak, aby uzyskać stężenie HCl około 0,5 mol/l.

Uwagi:

a) Przy oznaczaniu pierwiastków śladowych należy postępować tak, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia, zwłaszcza cynkiem, miedzią i żelazem. Dlatego sprzęt stosowany podczas przygotowania próbki musi być wolny od zanieczyszczeń tymi metalami.

   W celu zmniejszenia ogólnego ryzyka zanieczyszczenia wykonywać oznaczenie w środowisku wolnym od kurzu, dokładnie czyszcząc wyposażenie i myjąc naczynia szklane. Zwłaszcza przy oznaczaniu cynku występuje ryzyko zanieczyszczeń, np. z naczynia szklanego, odczynników, kurzu.

b) Masę próbki, która ma być spopielona, szacuje się na podstawie przybliżonej zawartości pierwiastka śladowego w paszy, w stosunku do czułości stosowanego spektrofotometru. W przypadku pasz ubogich w pierwiastki śladowe może zaistnieć konieczność rozpoczęcia oznaczania od odważenia od 10 do 20 g próbki i sporządzenia roztworu o końcowej objętości 100 ml.

c) Spopielanie należy przeprowadzać w zamkniętym piecu bez dostępu powietrza lub tlenu.

d) Temperatura według wskazań pirometru nie może być wyższa niż 475 °C.

5.1.2. Spektrofotometryczne oznaczanie

5.1.2.1. *Przygotowanie roztworów do kalibracji*

Dla każdego z oznaczanych pierwiastków śladowych przygotować, z roboczych roztworów wzorcowych określonych w pkt 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 i 3.10.1, roztwory do kalibracji o stężeniu kwasu chlorowodorowego około 0,5 mol/l i – w przypadku żelaza, manganu i cynku – chlorek lantanu o stężeniu 0,1 % La (w/v).

Wybrane stężenia pierwiastków śladowych muszą mieścić się w zakresie czułości stosowanego spektrofotometru. W poniższych tabelach podano przykładowy skład typowych zakresów stężeń kalibracyjnych roztworów; w zależności od typu i czułości stosowanego spektrofotometru może zachodzić konieczność wyboru innych stężeń.

▼B

Żelazo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml roboczego roztworu wzorcowego (3.7.1) (1 ml= 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do objętości 100 ml wodą.							

Miedź

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml roboczego roztworu wzorcowego (3.8.1) (1 ml= 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (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 roboczego roztworu wzorcowego (3.9.1) (1 ml= 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do objętości 100 ml wodą.							

Cynk

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml roboczego roztworu wzorcowego (3.10.1) (1 ml= 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do objętości 100 ml wodą.							

5.1.2.2. *Przygotowanie roztworu do analizy*

W przypadku oznaczania miedzi może być wykorzystany roztwór przygotowany w sposób określony w pkt 5.1.1. W przypadku konieczności dostosowania jego stężenia do zakresu stężeń kalibracyjnych roztworów, pobrać pipetą podzielną część roztworu do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym o stężeniu 0,5 mol/l (3.3).

Przy oznaczaniu żelaza, manganu i cynku pobrać pipetą podzielną część roztworu przygotowanego w sposób określony w pkt 5.1.1 do kolby miarowej o pojemności 100 ml, dodać 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym o stężeniu 0,5 mol/l (3.3) (zob. objaśnienia pkt 8).

5.1.2.3. *Ślepa próba*

Ślepą próbę przeprowadzić zgodnie z kolejnością wykonywania czynności metody, pomijając te czynności, w których materiał próbki został pominięty. Nie stosować roztworu kalibracyjnego „0” jako ślepej próby.

5.1.2.4. *Pomiar absorpcji atomowej*

Zmierzyć absorpcję atomową kalibracyjnych roztworów i badanego roztworu z użyciem utleniającego płomienia powietrzno-acetylenowego przy następujących długościach fal:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

▼B

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Każdy pomiar przeprowadzić czterokrotnie.

5.2. *Pasze mineralne*

Jeżeli próbka paszy nie zawiera substancji organicznych, wcześniejsze spopielanie nie jest konieczne. Postępować w sposób określony w pkt 5.1.1.1, poczynając od akapitu drugiego. Można pominąć etap odparowania z kwasem fluorowodorowym.

6. **Obliczanie wyników**

Przy zastosowaniu krzywej kalibracyjnej obliczyć zawartość oznaczanego pierwiastka śladowego w roztworze do analizy i wyrazić wynik w mg pierwiastka śladowego na kg próbki (ppm).

7. **Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości pierwiastka śladowego nie wyższej niż 50 mg/kg,

— 10 % wyższego wyniku, dla zawartości pierwiastka śladowego od 50 do 100 mg/kg,

— 10 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości pierwiastka śladowego od 100 do 200 mg/kg,

— 5 % wyższego wyniku, dla zawartości pierwiastka śladowego wyższej niż 200 mg/kg.

8. **Objaśnienia**

Obecność znacznych ilości fosforanów może interferować przy oznaczaniu żelaza, manganu i cynku. Takie interferencje należy skorygować przez dodanie chlorku lantanu (3.11). Jeżeli jednak w próbce stosunek wagowy Ca + Mg/P jest > 2, to dodanie roztworu chlorku lantanu (3.11) do analizowanego roztworu i kalibracyjnych roztworów może być pominięte.

D. OZNACZANIE HALOFUGINONU

DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetonylo]-chinazoliny-4-(3H)-1 bromowodorek

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości halofuginonu w paszach. Dolna granica oznaczalności wynosi 1 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Po potraktowaniu gorącą wodą halofuginon ekstrahuje się w postaci wolnej zasady w octanie etylowym, a następnie rozdziela jako chlorowodorek w wodnym roztworze kwasu. Ekstrakt jest oczyszczany z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej. Zawartość halofuginonu określa się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Acetonitryl do HPLC.

3.2. Żywica Amberlit XAD-2.

3.3. Octan amonu.

3.4. Octan etylu.

3.5. Lodowaty kwas octowy.

▼B

3.6. Substancja wzorcowa halofuginonu (DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetonylo]-chinazoliny-4-(3H)-1 bromowodorek, E 764).

3.6.1. Roztwór wzorcowy podstawowy halofuginonu, 100 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg halofuginonu (3.6) do kolby miarowej o pojemności 500 ml, rozpuścić w roztworze buforu octanu amonu (3.18), uzupełnić do pełnej objętości kolby roztworem buforu i zmieszać. Roztwór zachowuje stabilność do 3 tygodni, jeżeli jest przechowywany bez dostępu światła w temperaturze 5 °C.

3.6.2. Roztwory kalibracyjne

Do partii kolb miarowych o pojemności 100 ml przenieść kolejno 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego halofuginonu (3.6.1). Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą (3.21) i zmieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 µg/ml halofuginonu. Roztwory te przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.7. Kwas chlorowodorowy (ρ_{20} = około 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Azotan srebra.

3.10. Askorbinian sodu.

3.11. Węglan sodu.

3.12. Chlorek sodu.

3.13. EDTA (etylenodwuaminoczterooctowy kwas, sól dwusodowa).

3.14. Woda do HPLC.

3.15. Roztwór węglanu sodu, c = 10 g/100 ml.

3.16. Roztwór chlorku sodu nasyconego węglanem sodu, c = 5g/100 ml.

Rozpuścić 50 g węglanu sodu (3.11) w wodzie, rozcieńczyć do objętości 1 l i dodać chlorek sodu (3.12), aż do otrzymania roztworu nasyconego.

3.17. Kwas chlorowodorowy, stężenie około 0,1 mol/l.

Rozcieńczyć 10 ml HCI (3.7) wodą do objętości 1 l.

3.18. Roztwór buforu octanu amonu, około 0,25 mol/l.

Rozpuścić 19,3 g octanu amonu (3.3) i 30 ml kwasu octowego (3.5) w wodzie (3.14), i rozcieńczyć do objętości 1 l.

3.19. Przygotowanie żywicy Amberlit XAD-2.

Żywicę (3.2) przemywać odpowiednią ilością wody aż do zaniku wszystkich jonów chlorku, co sprawdza się roztworem azotanu srebra (3.20) w odrzucanej fazie wodnej. Następnie przemyć żywicę 50 ml metanolu (3.8), odrzucić metanol i przechowywać żywicę w świeżym metanolu.

3.20. Roztwór azotanu srebra około 0,1 mol/l.

Rozpuścić 0,17 g azotanu srebra (3.9) w 10 ml wody.

3.21. Faza ruchoma HPLC.

Zmieszać 500 ml acetonitrylu (3.1) z 300 ml roztworu buforu octanu amonu (3.18) i 1 200 ml wody (3.14). Przy użyciu kwasu octowego (3.5) dostosować pH do 4,3. Przefiltrować przez filtr membranowy 0,22 µm (4.8), a następnie odgazować roztwór (np. przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut). Roztwór zachowuje stabilność do miesiąca, jeżeli jest przechowywany w zamkniętym naczyniu, bez dostępu światła.

▼B

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa

4.2. Rotacyjna wyparka warstwowa

4.3. Wirówka

4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem UV o zmiennej długości fali miarowej lub z detektorem diodowym

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 300 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 10 µm lub równoważne

4.5. Kolumna szklana o wymiarach 300 mm × 10 mm z kranem i filtrem ze spiekanego szkła

4.6. Filtry z włóknem szklanym o średnicy 150 mm

4.7. Filtry membranowe, 0,45 µm

4.8. Filtry membranowe, 0,22 µm

5. **Sposób postępowania**

Uwaga: Halofuginon w formie wolnej zasady jest niestabilny w roztworach zasadowych i octanu etylowego. Nie może on pozostawać w octanie etylu dłużej niż przez 30 minut.

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepą próbę paszy należy przeanalizować w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona halofuginonu i innych substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowanej przez dodanie znanej ilości halofuginonu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby fortyfikować na poziomie 3 mg/kg, dodać 300 µl podstawowego roztworu wzorcowego (3.6.1) do 10 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Uwaga: dla celów niniejszej metody ślepa próba paszy musi być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie może potwierdzać obecności halofuginonu.

5.2. *Ekstrakcja*

Odważyć, z dokładnością do 0,1 g, 10 g przygotowanej próbki i umieścić w probówce wirówkowej o pojemności 200 ml. Dodać 0,5 g askorbinianu sodu (3.10), 0,5 g EDTA (3.13), 20 ml wody i zmieszać. Probówkę umieścić na 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 80 °C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodać 20 ml roztworu węglanu sodu (3.15) i zmieszać. Niezwłocznie dodać 100 ml octanu etylowego (3.4) i ręcznie, energicznie wstrząsać przez 15 sekund. Następnie umieścić probówkę w łaźni ultradźwiękowej (4.1) na 3 minuty i odkorkować. Wirować przez 2 minuty i zdekantować fazę octanu etylowego przez filtr z włóknem szklanym (4.6) do rozdzielacza o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję tej próbki drugą porcją 100 ml octanu etylowego. Przemywać połączone ekstrakty przez minutę 50 ml roztworu chlorku sodu nasyconego węglanem sodu (3.16) i odrzucić warstwę wodną.

Warstwę organiczną ekstrahować przez minutę 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.17). Dolną kwasową warstwę spuścić do rozdzielacza o pojemności 250 ml. Przez 1,5 minuty powtarzać ekstrakcję warstwy organicznej przy użyciu kolejnej ilości 50 ml kwasu chlorowodorowego i połączyć z ekstraktem uzyskanym z pierwszego procesu. Przemyć połączone ekstrakty kwasu, wirując z 10 ml octanu etylowego (3.4) przez około 10 sekund.

▼B

Warstwę wodną przenieść ilościowo do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml i odrzucić warstwę organiczną. Znajdujący się jeszcze w roztworze kwasu octan etylowy odparować na rotacyjnej wyparce warstwowej (4.2). Temperatura wody w łaźni nie może przekraczać 40 °C. Pozostały octan etylu zostanie usunięty w próżni o ciśnieniu około 25 mbar i temperaturze 38 °C, w czasie 5 minut.

5.3. *Oczyszczanie*

5.3.1. Przygotowanie kolumny z Amberlitem

Dla każdej próbki ekstraktu przygotować kolumnę XAD-2. Przygotowany Amberlit o masie 10 g (3.19) umieścić w szklanej kolumnie (4.5) z metanolem (3.8). Wprowadzić mały zwitek szklanej waty w górną część podłoża żywicy. Wydrenować metanol z kolumny, a następnie przemyć żywicę 100 ml wody, zatrzymując proces, gdy ciecz dosięgnie górnej części powierzchni żywicy. Pozostawić kolumnę do ustabilizowania na 10 minut przed użyciem. Nie dopuścić do osuszenia kolumny.

5.3.2. Oczyszczanie próbki

Uzyskany ekstrakt (5.2) przenieść ilościowo na górną powierzchnię kolumny z Amberlitem (5.3.1) i eluować, odrzucając eluent. Prędkość elucji nie może przekraczać 20 ml/min. Przemyć kolbę okrągłodenną 20 ml kwasu chlorowodorowego (3.17). Użyć tego kwasu do przemycia kolumny z żywicą. Usunąć pozostałości roztworu kwasu strumieniem powietrza. Wylać popłuczyny. Dodać 100 ml metanolu (3.8) na kolumnę i pozostawić od 5 do 10 ml w celu wymycia, zebrać eluent w kolbę okrągłodenną o pojemności 250 ml. Pozostawić pozostały metanol na 10 minut w celu ustabilizowania z żywicą, a następnie kontynuować elucję, której prędkość nie może przekraczać 20 ml/min, zbierając eluent do tej samej kolby okrągłodennej. Odparować metanol na rotacyjnej wyparce (4.2), przy czym temperatura wody w łaźni nie może być wyższa niż 40 °C. Za pomocą fazy ruchomej (3.21) przenieść ilościowo pozostałość do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą i zmieszać. Podzielna część jest filtrowana przez filtr membranowy (4.7). Roztwór zastosować do oznaczania HPLC (5.4).

5.4. *Oznaczanie HPLC*

5.4.1. Parametry

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1)

Faza ruchoma do HPLC (3.21)

Prędkość przepływu: od 1,5 do 2 ml/min

Długość fali przy detekcji: 243 nm

Dozowana objętość: od 40 do 100 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny (3.6.2) o stężeniu 3 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (3.6.2) i określić wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

▼B

5.4.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki (5.3.2) stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku dla pików halofuginonu.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików halofuginonu roztworu próbki, określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (5.4.2).

Zawartość halofuginonu w mg/kg w próbce oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie w µg/ml halofuginonu w roztworze próbki
m = masa naważki w g

7. **Sprawdzenie wyników**

7.1. *Sprawdzanie tożsamości*

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego (3.6.2) zawierającego 6,0 µg/ml.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.6.2). Ilość dodanego halofuginonu musi być podobna do tej w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku halofuginonu. Szerokość piku w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka piku zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ±2 nm;

b) w zakresie pomiędzy 225 a 300 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji wzorcowego analitu;

c) w zakresie od 225 do 300 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest wyższa niż 15 % widma wartości szczytowej.

▼B

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,5 mg/kg dla zawartości halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3. *Odzysk*

W przypadku fortyfikowanej ślepej próby odzysk nie może być mniejszy niż 80 %.

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

W ramach współpracy ośmiu laboratoriów przeprowadzono analizę [1] trzech próbek.

Wyniki

	Próbka A (ślepa) Przy odbiorze	Próbka B (mączka)		Próbka C (granulki)	
		Przy odbiorze	Po 2 miesiącach	Przy odbiorze	Po 2 miesiącach
Średnia [mg/kg]	N.W.	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
Odzysk [%]		86	74	88	75

N.W. = nie wykryto
S_R = odchylenie standardowe powtarzalności
CV_R = współczynnik zmienności powtarzalności (%)
Odzysk (%) = odzysk (%)

E. OZNACZANIE ROBENIDYNY

Chlorowodorek 1,3-bis[(4-chlorobenzylideno)amino]guanidyny

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości robenidyny w paszach. Granica oznaczalności wynosi 5 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbkę poddaje się ekstrakcji zakwaszonym metanolem. Ekstrakt osusza się, a podzielną część oczyszcza na kolumnie z tlenkiem glinu. Robenidynę z kolumny wymywa się metanolem, zatęża i uzupełnia do odpowiedniej objętości fazą ruchomą. Robenidynę oznacza się metodą chromatografii cieczowej (HPLC) z odwróconymi fazami przy użyciu detektora UV.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Metanol

3.2. Zakwaszony metanol

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml umieścić 4 ml kwasu chlorowodorowego (ρ_{20} = 1,18 g/ml), uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem (3.1) i zmieszać. Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

[1] „The Analyst” 108 z 1983 r., s. 1 252–1 256

▼B

3.3. Acetonitryl do HPLC

3.4. Sito molekularne

Typ 3A, granulki 8–12 mesh (granulki z glinokrzemianu krystalicznego 1,6–2,5 mm, średnica porów 0,3 mm).

3.5. Tlenek glinu 1 stopnia aktywności kwasowej do chromatografii

100 g tlenku glinu umieścić w naczyniu i dodać 2 ml wody. Naczynie zakorkować i wstrząsać przez około 20 minut. Przechowywać w dobrze zamkniętym naczyniu.

3.6. Roztwór dwuwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4), c = 0,025 mol/l

Rozpuścić 3,40 g dwuwodorofosforanu potasu w wodzie do HPLC w kolbie miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby i zmieszać.

3.7. Roztwór wodorofosforanu dwusodu, c = 0,025 mol/l

Rozpuścić 3,55 g bezwodnego lub 4,45 g dwuhydratu, lub 8,95 g dekahydratu wodorofosforanu dwusodu w wodzie do HPLC w kolbie miarowej o pojemności 1 l, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą do HPLC i zmieszać.

3.8. Faza ruchoma do HPLC

Zmieszać razem:

650 ml acetonitrylu (3.3),

250 ml wody do HPLC,

50 ml roztworu dwuwodorofosforanu potasu (3.6),

50 ml roztworu wodorofosforanu dwusodu (3.7).

Filtrować przez filtr 0,22 µm (4.6) i odgazować roztwór, np. poprzez zastosowanie ultradźwięków przez 10 minut.

3.9. Substancja wzorcowa

Czysta robenidyna: chlorowodorek 1,3-bis[(4-chlorobenzylideno)amino] guanidyny.

3.9.1. Roztwór wzorcowy podstawowy robenidyny: 300 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 30 mg substancji wzorcowej robenidyny (3.9). Rozpuścić w zakwaszonym metanolu (3.2) w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby tym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.2. Roztwór wzorcowy pośredni robenidyny: 12 µg/ml

Przenieść 10,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.9.1) do kolby miarowej o pojemności 250 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby fazą ruchomą (3.8) i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.3. Roztwory kalibracyjne

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego robenidyny (3.9.2). Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą (3.8) i zmieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 i 6,0 µg/ml robenidyny. Roztwory te przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10. Woda do HPLC

▼B

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Kolumna szklana

Przygotować kolumnę ze szkła oranżowego o średnicy wewnętrznej od 10 do 15 mm i długości 250 mm, wyposażoną w kran i zbiorniczek o pojemności około 150 ml.

4.2. Wstrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne

4.3. Rotacyjna wyparka warstwowa

4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem UV lub diodowym pracującym w zakresie od 250 do 400 mm

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 300 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 10 µm lub równoważne

4.5. *Filtr szklany* (Whatman GF/A lub podobny)

4.6. Filtry membranowe, 0,22 µm

4.7. Filtry membranowe, 0,45 µm

5. **Sposób postępowania**

Uwaga: Robenidyna jest wrażliwa na światło. Wszystkie czynności należy przeprowadzać z zastosowaniem szkła oranżowego.

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepą próbę paszy należy przebadać w celu sprawdzenia, czy nie zawiera robenidyny ani innych substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy (5.1.1) fortyfikowanej przez dodanie znanej ilości robenidyny, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 60 mg/kg, przenieść 3 ml roztworu wzorcowego podstawowego robenidyny (3.9.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Odparować roztwór w strumieniu azotu do około 0,5 ml. Dodać 15 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Uwaga: Ślepa próba paszy musi być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie może potwierdzać obecności robenidyny.

5.2. *Ekstrakcja*

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 15 g wcześniej przygotowanej próbki. Odważkę umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml i dodać 100,0 ml zakwaszonego metanolu (3.2), zakorkować i wstrząsać przez godzinę na wytrząsarce (4.2). Roztwór filtrować przez filtr szklany (4.5), a filtrat zebrać do kolby stożkowej o pojemności 150 ml. Dodać 7,5 g sita molekularnego (3.4), zamknąć i wstrząsać przez 5 minut. Natychmiast filtrować przez filtr szklany. Roztwór poddać oczyszczaniu, w sposób określony w pkt 5.3.

5.3. *Oczyszczanie*

5.3.1. Przygotowanie kolumny z tlenkiem glinu

Umieścić w dolnym końcu szklanej kolumny chromatograficznej (4.1) zwitek szklanej waty i wbić ją, używając szklanego pręcika. Odważyć 11,0 g tlenku glinu (3.5) i przenieść do kolumny. Czynność tę należy wykonywać tak, aby ograniczyć do minimum działanie powietrza atmosferycznego. Delikatnie postukać w napełnioną kolumnę od strony dna w celu osadzenia tlenku glinu.

▼B

5.3.2. Oczyszczanie próbki

Używając pipety, przenieść do kolumny 5,0 ml ekstraktu próbki otrzymanego w sposób określony w pkt 5.2. Zakończenie pipety przyłożyć blisko do ścianki kolumny i pozwolić, aby roztwór został wchłonięty przez tlenek glinu. Wymyć robenidynę z kolumny przy użyciu 100 ml metanolu (3.1) przy prędkości przepływu od 2 do 3 ml na minutę, a eluent zebrać do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml. Na rotacyjnej wyparce warstwowej (4.3) odparować roztwór metanolu do sucha, przy pomniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C. Pozostałość ponownie rozpuścić w od 3 do 4 ml fazy ruchomej (3.8) i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Kolbę przemyć kilkakrotnie od 1 do 2 ml porcjami fazy ruchomej, a popłuczyny wlać do kolby miarowej. Uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Podzielna część jest filtrowana przez filtr membranowy 0,45 µm (4.7). Roztwór zastosować do oznaczania HPLC (5.4).

5.4. *Oznaczanie HPLC*

5.4.1. Parametry

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników:

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1),

Faza ruchoma do HPLC (3.8),

Prędkość przepływu: 1,5 do 2 ml/min.,

Długość fali przy detekcji: 317 nm,

Dozowana objętość: 20 do 50 µl.

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny (3.9.3) zawierający 3,6 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (3.9.3) i określić wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki (5.3.2), stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku dla pików robenidyny.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików robenidyny roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (5.4.2).

Zawartość robenidyny (w mg/kg) w próbce oblicza się według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

gdzie:

c = stężenie w µg/ml robenidyny w roztworze próbki
m = masa naważki w g

▼B

7. **Sprawdzenie wyników**

7.1. *Sprawdzanie tożsamości*

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego (3.9.3) zawierającego 6 μg/ml.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.9.3). Ilość dodanej robenidyny musi być porównywalna do ilości robenidyny w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku robenidyny. Szerokość piku w połowie jego maksymalnej wysokości musi mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka piku zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm;

b) w zakresie pomiędzy 250 a 400 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji wzorcowego analitu;

c) w zakresie od 250 do 400 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 widmami nie jest wyższa niż 15 % widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 10 % najwyższego wyniku dla zawartości robenidyny powyżej 15 mg/kg.

7.3. *Odzysk*

W przypadku fortyfikowanej ślepej próby paszy odzysk nie może być mniejszy niż 85 %.

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

W ramach prowadzonej z inicjatywy Wspólnoty współpracy 12 laboratoriów przeprowadzono analizę 4 próbek paszy dla drobiu i królików, w postaci mączki lub granulatu. Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. W poniższej tabeli podano wyniki przeprowadzonych badań:

▼B

	Pasza dla drobiu		Pasza dla królików	
	Mączka	Granulat	Mączka	Granulat
Średnia [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
Odzysk [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności, %
S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności, %

F. OZNACZANIE DIKLAZURILU

(+)-4-chlorofenylo[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triazyno-2-yl)fenylo]acetonitryl

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości diklazurilu w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 0,1 mg/kg, granica oznaczalności 0,5 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Po dodaniu wzorca wewnętrznego próbka jest ekstrahowana zakwaszonym metanolem. W przypadku pasz podzielna część ekstraktu zostaje oczyszczona na wypełnieniu ekstrakcyjnym fazy stałej C_{18}. Diklazuril jest eluowany z wypełnienia mieszaniną zakwaszonego metanolu i wody. Po odparowaniu pozostałość jest rozpuszczana w DMF/woda. W przypadku premiksów ekstrakt jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana w DMF/woda. Zawartość diklazurilu jest oznaczana w układzie podwójnego gradientu faz odwróconych wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem detektora UV.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Woda do HPLC

3.2. Octan amonu

3.3. Kwaśny siarczan tetrabutyloamoniowy (TBHS)

3.4. Acetonitryl do HPLC

3.5. Metanol do HPLC

3.6. N, N-dwumetyloformamid (DMF)

3.7. Kwas chlorowodorowy, ρ_{20} = 1,19 g/ml

3.8. Substancja wzorcowa: diklazuril II-24: (+)-4-chlorofenylo[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-diokso-1,2,4-triazyno-2-yl) fenylo]acetonitryl o gwarantowanej czystości, E 771.

3.8.1. Roztwór wzorcowy podstawowy diklazurilu, 500 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej (3.8), do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (3.6), uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym DMF (3.6) i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze ≤ 4 °C roztwór zachowuje stabilność do miesiąca.

▼B

3.8.2. Roztwór wzorcowy diklazurilu, 50 µg/ml

Przenieść 5,00 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.8.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF (3.6) i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze ≤ 4 °C roztwór zachowuje stabilność do miesiąca.

3.9. Substancja wzorcowa wewnętrzna: 2,6-dwuchloro-α-(4-chlorofenylo)-4-(4,5dihydro-3,5-diokso-1,2,4-triazyno-2(3H) -yl) α-metylobenzeno-acetonitryl

3.9.1. Roztwór wewnętrznego wzorca podstawowego, 500 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej wewnętrznej (3.9), do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (3.6), uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym DMF (3.6) i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze ≤ 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.

3.9.2. Roztwór wzorca wewnętrznego, 50 µg/ml

Przenieść 5,00 ml roztworu wewnętrznego wzorca podstawowego (3.9.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF (3.6) i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze ≤ 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.

3.9.3. Roztwór wzorca wewnętrznego dla premiksów, p/1000 mg/ml

(p = nominalna zawartość diklazurilu w premiksie w mg/kg)

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, p/10 mg substancji wzorca wewnętrznego do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w DMF (3.6) w łaźni ultradźwiękowej (4.6), uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym DMF i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze ≤ 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.

3.10. Roztwór kalibracyjny, 2 µg/ml.

Odmierzyć pipetą 2,00 ml roztworu wzorcowego diklazurilu (3.8.2) i 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (3.9.2) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 16 ml DMF (3.6), uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Roztwór sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.11. C_{18}, wypełnienie ekstrakcyjne fazy stałej; proponuje się zastosować Bond Elut, rozmiar: 1 cc, masa sorbentu: 100 mg.

3.12. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny: zakwaszony metanol.

Odmierzyć pipetą 5,0 ml kwasu chlorowodorowego (3.7) do 1 000 ml metanolu (3.5) i zmieszać.

3.13. Faza ruchoma do HPLC.

3.13.1. Eluent A: octan amonu – roztwór kwaśnego siarczanu tetrabutyloamonu.

Rozpuścić 5 g octanu amonu (3.2) i 3,4 g TBHS (3.3) w 1 000 ml wody (3.1) i zmieszać.

3.13.2. Eluent B: acetonitryl (3.4).

3.13.3. Eluent C: metanol (3.5).

▼B

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Wstrząsarka mechaniczna

4.2. Sprzęt do HPLC przy potrójnym gradiencie

4.2.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, Hypersil ODS, wypełnienie 3 µm, 100 mm × 4,6 mm lub równoważne

4.2.2. Detektor UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy

4.3. Rotacyjna wyparka warstwowa

4.4. Filtr membranowy, 0,45 µm

4.5. Rozdzielnik próżni do jednoczesnej próżniowej izolacji

4.6. Łaźnia ultradźwiękowa

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepa próba paszy

Należy przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona diklazurilu ani substancji interferujących. Ślepa próba paszy musi być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie może potwierdzać obecności diklazurilu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy, fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości diklazurilu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 1 mg/kg, dodać 0,1 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.8.1) do 50 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut, kilkakrotnie mieszając, przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy podobnej do badanej próbki (zob. pkt 5.1.1), badanie odzysku można przeprowadzić stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest fortyfikowana przez dodanie znanej ilości diklazurilu o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. *Ekstrakcja*

5.2.1. Pasze

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 50 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1 ml roztworu wzorca wewnętrznego (3.9.2), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce (4.1) przez noc. Pozostawić na 10 minut do odstania. Przelać 20 ml podzielnej części supernatantu do odpowiedniego szklanego naczynia i rozcieńczyć 20 ml wody. Przenieść ten roztwór na wypełnienie ekstrakcyjne (3.11) i przepuścić przez to wypełnienie, stosując rozdzielnik próżni (4.5). Przepłukać wypełnienie 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.12) i wody, 65 + 35 (V + V). Odrzucić zebrane frakcje i eluować związki, stosując 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.12) i wody, 80 + 20 (V + V). Odparować tę frakcję do osuszenia przy zastosowaniu rotacyjnej wyparki (4.3) w temperaturze 60 °C. Rozpuścić suchą pozostałość w 1,0 ml DMF (3.6), dodać 1,5 ml wody (3.1) i zmieszać. Przefiltrować przez filtr membranowy (4.4). Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.2.2. Premiksy

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, 1 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (3.9.3), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce (4.1) przez noc. Pozostawić na 10 minut do odstania. Przenieść podzielną

▼B

część 10 000/p ml (p = nominalna zawartość diklazurilu w premiksie w mg/kg) supernatantu do kolby okrągłodennej o odpowiedniej pojemności. Odparować do osuszenia, pod obniżonym ciśnieniem, w temperaturze 60 °C przy użyciu rotacyjnej wyparki (4.3). Ponownie rozpuścić suchą pozostałość w 10,0 ml DMF (3.6), dodać 15,0 ml wody (3.1) i zmieszać. Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.3. *Oznaczanie HPLC*

5.3.1. Parametry

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.2.1):	100 × 4,6 mm, Hypersil ODS, wypełnienie 3 µm lub równoważne	
Faza ruchoma:	Eluent A (3.13.1):	wodny roztwór octanu amonu i kwaśnego siarczanu tetrabutyloamoniowego
	Eluent B (3.13.2):	acetonitryl
	Eluent C (3.13.3):	metanol
Elucja:	— gradient liniowy — warunki początkowe: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) — po 10 minutach frakcjonowanie przez 30 minut do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V). Płukać eluentem B przez 10 minut.	
Prędkość przepływu:	1,5–2 ml/min	
Dozowana objętość:	20 µl	
Długość fali przy detekcji:	280 nm	

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny (3.10) zawierający 2 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

5.3.2. Roztwór kalibracyjny

Zadozować kilka razy 20 µl roztworu kalibracyjnego (3.10) i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku diklazurilu i wewnętrzne wzorcowe pików.

5.3.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy 20 µl roztworu próbki (5.2.1 lub 5.2.2) i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku diklazurilu i wewnętrzne wzorcowe pików.

6. **Obliczanie wyników**

6.1. *Pasze*

Zawartość diklazurilu w próbce (w mg/kg) oblicza się według następującego wzoru:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 10\ V}{m}\ [\mathrm{mg/kg}]$$

▼B

gdzie:

$h_{d,s}$ = wysokość (powierzchnia) piku diklazurilu w roztworze próbki (5.2.1)
$h_{i,s}$ = wysokość (powierzchnia) piku wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (5.2.1)
$h_{d,c}$ = wysokość (powierzchnia) piku diklazurilu w roztworze kalibracyjnym (3.10)
$h_{i,c}$ = wysokość (powierzchnia) piku wzorca wewnętrznego w roztworze kalibracyjnym (3.10)
$c_{d,c}$ = stężenie w µg/ml diklazurilu w roztworze kalibracyjnym (3.10)
m = masa naważki w g
V = objętość ekstraktu próbki zgodna z pkt 5.2.1 (tj. 2,5 ml)

6.2. *Premiksy*

Zawartość diklazurilu w próbce (w mg/kg) obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{c_{d,c} \times 0,02\ V \times p}{m}\ [\mathrm{mg/kg}]$$

gdzie:

$h_{d,c}$ = wysokość (powierzchnia) piku diklazurilu w roztworze kalibracyjnym (3.10)
$h_{i,c}$ = wysokość (powierzchnia) piku wzorca wewnętrznego w roztworze kalibracyjnym (3.10)
$h_{d,s}$ = wysokość (powierzchnia) piku diklazurilu w roztworze próbki (5.2.2)
$h_{i,s}$ = wysokość (powierzchnia) piku wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (5.2.2)
$c_{d,c}$ = stężenie w µg/ml diklazurilu w roztworze kalibracyjnym (3.10)
m = masa naważki w g
V = objętość ekstraktu próbki zgodna z pkt 5.2.2 (tj. 25 ml)
p = nominalna zawartość w mg/kg diklazurilu w premiksie

7. **Sprawdzenie wyników**

7.1. *Sprawdzenie tożsamości*

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki (5.2.1 lub 5.2.2) i roztworu kalibracyjnego (3.10).

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki (5.2.1 lub 5.2.2) fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.10) Ilość dodanego diklazurilu musi odpowiadać ilości diklazurilu znajdującej się w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku diklazurilu i piku wzorca wewnętrznego. Szerokość piku w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości piku diklazurilu lub piku wzorca wewnętrznego niefortyfikowanego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka piku zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ±2 nm;

▼B

b) w zakresie od 230 do 320 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji wzorcowego agalitu;

c) w zakresie od 230 do 320 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 30 % względem wyższej wartości, dla zawartości diklazurilu od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg,

— 0,75 mg/kg, dla zawartości diklazurilu od 2,5 do 5 mg/kg,

— 15 % względem wyższej wartości, dla zawartości diklazurilu powyżej 5 mg/kg.

7.3. *Odzysk*

W przypadku fortyfikacji ślepej próby lub próby paszy odzysk musi wynosić co najmniej 80 %.

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

W ramach współpracy 11 laboratoriów przeprowadzono analizę 5 próbek. Były to próbki z dwóch premiksów; jeden był wymieszany z głównym składnikiem organicznym (O 100), a drugi z głównym składnikiem nieorganicznym (A 100). Zawartość teoretyczna diklazurilu wynosiła 100 mg/kg, trzy mieszanki pasz dla drobiu zostały sporządzone przez 3 różnych producentów (NL) (L1/Z1/K1). Teoretyczna zawartość diklazurilu wynosiła 1 mg/kg. Analizę każdej próbki przeprowadzono raz lub dwukrotnie. (Bardziej szczegółowe informacje dotyczące tej analizy można znaleźć w *Journal of AOAC International, tom 77, nr 6, 1994, s. 1359–1361*). W poniższej tabeli podano wyniki przeprowadzonych badań.

	Próbka 1 A 100	Próbka 2 O 100	Próbka 3 L1	Próbka 4 Z1	Próbka 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Średnia	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
Zawartość nominalna (mg/kg)	100	100	1	1	1

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych wartości
S_r = odchylenie standardowe powtarzalności
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności

▼B

S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności

CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności

9. **Objaśnienia**

Należy uprzednio wykazać, że reakcja diklazurilu jest liniowa w zakresie mierzonych stężeń.

G. OZNACZANIE SOLI SODOWEJ LASALOCIDU

Sól sodowa polieterowego monokarboksylowego kwasu wytwarzanego przez Streptomyces lasaliensis

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości soli sodowej lasalocidu w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 5 mg/kg, granica oznaczalności 10 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Sól sodowa lasalocidu jest ekstrahowana z próbki zakwaszonym metanolem i oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (HPLC) przy wykorzystaniu detektora spektrofluorometrycznego.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Dwuwodorofosforan potasu (KH_2PO_4).

3.2. Kwas ortofosforowy, w (w/w) = 85 %.

3.3. Roztwór kwasu ortofosforowego, c = 20 %.

Rozcieńczyć 23,5 ml kwasu ortofosforowego (3.2) wodą do objętości 100 ml.

3.4. 6-metylo-2-heptyloamina(1,5-dwumetyloheksyloamina), w (w/w) = 99 %.

3.5. Metanol do HPLC.

3.6. Kwas chlorowodorowy, gęstość = 1,19 g/ml.

3.7. Roztwór buforu fosforanowego, c = 0,01 mol/l.

Rozpuścić 1,36 g KH_2PO_4 (3.1), w 500 ml wody (3.11), dodać 3,5 ml kwasu ortofosforowego (3.2) i 10,0 ml 6-metylo-2-heptyloaminy (3.4). Dostosować pH do 4,0 przy użyciu roztworu kwasu ortofosforowego (3.3) i rozcieńczyć wodą (3.11) do objętości 1 000 ml.

3.8. Zakwaszony metanol.

Przenieść 5,0 ml kwasu chlorowodorowego (3.6) do kolby miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem (3.5) i zmieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.9. Faza ruchoma HPLC: mieszanina roztworu buforu fosforanowego i metanolu w stosunku 5 + 95 (V +V).

Zmieszać 5 ml roztworu buforu fosforanowego (3.7) i 95 ml metanolu (3.5).

3.10. Substancja wzorcowa soli sodowej lasalocidu o gwarantowanej czystości, $C_{34}H_{53}O_8Na$ (sól sodowa polieterowego monokarboksylowego kwasu wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1. Podstawowy roztwór wzorcowy soli sodowej lasalocidu, 500 µg/ml

Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg soli sodowej lasalocidu (3.10) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w zakwaszonym metanolu (3.8), uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

▼B

3.10.2. Roztwór wzorcowy pośredni soli sodowej lasalocidu, 50 µg/ml

Przenieść pipetą 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego soli sodowej lasalocidu (3.10.1) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby zakwaszonym metanolem (3.8) i zmieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.3. Roztwory kalibracyjne

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego (3.10.2). Uzupełnić do pełnej objętości kolb zakwaszonym metanolem (3.8) i zmieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 µg soli sodowej lasalocidu w 1 ml. Roztwory przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Woda do HPLC.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa lub wibracyjna łaźnia wodna, z możliwością kontroli temperatury.

4.2. Filtry membranowe, 0,45 µm.

4.3. Zestaw HPLC z systemem dozowania, umożliwiający dozowanie 20 µl.

4.3.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 125 mm × 4 mm, faza odwrócona C_{18}, wypełnienie 5 µm lub równoważne

4.3.2. Spektrofluorymetr o zmiennej fali, z możliwością zmiany długości fal wzbudzenia i emisji

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Objaśnienia*

5.1.1. Ślepa próba

W celu przeprowadzenia badania odzysku (5.1.2) należy przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu sprawdzenia, czy badana pasza nie zawiera lasalocidu ani substancji interferujących. Pasza użyta do ślepej próby musi być podobna do próbki paszy badanej i nie może zawierać lasalocidu sodu ani interferujących substancji.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości soli sodowej lasalocidu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 100 mg/kg, dodać 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.10.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do objętości około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut, a następnie kilkakrotnie zamieszać i przejść do etapu ekstrakcji (5.2).

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy podobnej do badanej próbki (zob. pkt 5.1.1), badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest fortyfikowana przez dodanie znanej ilości soli sodowej lasalocidu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. *Ekstrakcja*

5.2.1. Pasze

Zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 5 g do 10 g próbki do wyposażonej w korek kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać przy użyciu pipety 100,0 ml zakwaszonego metanolu (3.8). Zamknąć luźno

▼B

korkiem i zamieszać w celu rozproszenia. Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (4.1) w temperaturze około 40 °C na 20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Pozostawić kolbę na około godzinę, dopóki suspensja nie opadnie, następnie przefiltrować podzielną część przez filtr membranowy 0,45 µm (4.2) do odpowiedniego naczynia. Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.2.2. Premiksy

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 2 g nierozdrobnionego premiksu do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 100,0 ml zakwaszonego metanolu (3.8) i zamieszać w celu rozproszenia. Umieścić kolbę z zawartością w łaźni ultradźwiękowej (4.1) w temperaturze około 40 °C na 20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Uzupełnić do pełnej objętości kolb zakwaszonym metanolem (3.8) i dokładnie zmieszać. Pozostawić kolbę na około godzinę, dopóki suspensja nie opadnie, następnie przefiltrować podzielną część przez filtr membranowy 0,45 µm (4.2). Rozcieńczyć odpowiednią objętość klarownego filtratu przy użyciu zakwaszonego metanolu (3.8) w celu otrzymania finalnego testowego roztworu zawierającego około 4 µg/ml soli sodowej lasalocidu. Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.3. *Oznaczanie HPLC*

5.3.1. Parametry

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników:

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.3.1):	125 mm × 4 mm, faza odwrócona C_{18}, wypełnienie 5 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.9):	Mieszanina roztworu buforu fosforanowego (3.7) i metanolu (3.5), 5+95 (V+V)
Prędkość przepływu:	1,2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	
Wzbudzenie:	310 nm
Emisja:	419 nm
Dozowana objętość:	20 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.10.3) zawierający 4 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów (3.10.3) i określić średnie wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) piku na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki (5.2.1 lub 5.2.2) stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku dla pików soli sodowej lasalocidu.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) piku otrzymanej po zadozowaniu roztworu próbki (5.3.3) określić stężenie soli sodowej lasalocidu w µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej.

▼B

6.1. *Pasze*

Zawartość soli sodowej lasalocidu w mg/kg w próbce oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie w µg/ml soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki (5.2.1)
V_1 = objętość w ml ekstraktu próbki (5.2.1) (tj. 100 ml)
m = masa naważki w g

6.2. *Premiksy*

Zawartość soli sodowej lasalocidu, w mg/kg, w próbce obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie w µg/ml soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki (5.2.2)
V_2 = objętość w ml ekstraktu próbki zgodny z pkt 5.2.2 (tj. 250 ml)
f = współczynnik rozcieńczania zgodny z pkt 5.2.2
m = masa naważki w g

7. **Sprawdzenie wyników**

7.1. *Sprawdzenie tożsamości*

Metody bazujące na detekcji spektrofluorometrycznej są mniej podatne na interferencje niż metody z zastosowaniem detekcji UV. Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki (5.2.1 lub 5.2.2) jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.10.3). Ilość dodanej soli sodowej lasalocidu musi odpowiadać ilości soli sodowej lasalocidu w ekstrakcie próbki. Po uwzględnieniu ilości dodanej soli sodowej lasalocidu i rozcieńczenia ekstraktu zwiększyć się może tylko wysokość piku soli sodowej lasalocidu. Szerokość piku w połowie wysokości musi mieścić się w zakresie ± 10 % oryginalnej szerokości piku niefortyfikowanego ekstraktu.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 15 % względem wyższej wartości, dla zawartości soli sodowej lasalocidu od 30 mg/kg do 100 mg/kg,

— 15 mg/kg dla zawartości soli sodowej lasalocidu od 100 mg/kg do 200 mg/kg,

— 7,5 % względem wyższej wartości, dla zawartości soli sodowej lasalocidu powyżej 200 mg/kg.

7.3. *Odzysk*

W przypadku fortyfikowanej (ślepej) próby paszy lub próby paszy odzysk nie może być niższy niż 80 %. W przypadku fortyfikowanych próbek premiksów odzysk nie może być niższy niż 90 %.

▼B

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

W ramach współpracy 12 laboratoriów (*) przeprowadzono analizę 2 premiksów (próbki 1 i 2) oraz 5 pasz (próbki 3–7). Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. W poniższej tabeli podane są wyniki przeprowadzonych badań:

	Próbka 1 Premiks dla kurcząt	Próbka 2 Premiks dla indyków	Próbka 3 Śruty dla indyków	Próbka 4 Granulki dla kurcząt	Próbka 5 Pasza dla indyków	Próbka 6 Pasza dla drobiu A	Próbka 7 Pasza dla drobiu B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Średnia [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
Zawartość nominalna [mg/kg]	5 000 (*)	16 000 (*)	80 (*)	105 (*)	120 (*)	50 (**)	35 (**)

(*) Zawartość zadeklarowana przez producenta.
(**) Pasza przygotowana w laboratorium.

L = liczba laboratoriów
n = liczba poszczególnych wyników
s_r = standardowe odchylenie powtarzalności
s_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
CV_r = odchylenie standardowe zmienne powtarzalności, %
CV_R = odchylenie standardowe zmienne odtwarzalności, %

(*) „The Analyst” nr 120 z 1995 r., s. 2175–2180.

▼B

ZAŁĄCZNIK V

METODY ANALIZY DO CELÓW KONTROLI NIEPOŻĄDANYCH SUBSTANCJI W PASZACH

A. OZNACZANIE WOLNEGO I CAŁKOWITEGO GOSSYPOLU

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości wolnego gossypolu, całkowitego gossypolu i chemicznie związanych substancji w nasionach bawełny, w makuchach, w mączce z nasion bawełny i w mieszankach paszowych zawierających te materiały paszowe, w których zawartość wolnego gossypolu, całkowitego gossypolu i chemicznie związanych substancji przekracza 20 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Gossypol ekstrahuje się w obecności 3-aminopropan-1-olu lub mieszaniny propan-2-olu i heksanu w przypadku oznaczania wolnego gossypolu lub dwumetyloformamidem w przypadku oznaczenia całkowitego gossypolu. Gossypol, reagując z aniliną, tworzy gossypol-dianilinę, której gęstość optyczna mierzona jest przy 440 nm.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Mieszanina propan-2-ol-heksanu: Zmieszać 60 części objętościowych propan-2-olu z 40 częściami objętościowymi *n*-heksanu.

3.2. Rozpuszczalnik A: Umieścić w kolbie o pojemności 1 l około 500 ml mieszaniny propan-2-ol-heksanu (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-olu, 8 ml lodowatego kwasu octowego i 50 ml wody. Uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1). Odczynnik zachowuje stabilność przez tydzień.

3.3. Rozpuszczalnik B: odpipetować 2 ml 3-aminopropan-1-olu i 10 ml lodowatego kwasu octowego do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Schłodzić do temperatury pokojowej i uzupełnić do pełnej objętości kolby N,N-dwumetyloformamidem. Odczynnik zachowuje stabilność przez tydzień.

3.4. Anilina: *Jeżeli gęstość optyczna ślepej próby przekracza 0,022*, przedestylować anilinę nad proszkiem cynku, odrzucając pierwsze i ostatnie 10 % frakcji destylatu. Odczynnik można przechowywać przez kilka miesięcy, jeżeli jest trzymany w lodówce w brązowej butelce zamkniętej korkiem.

3.5. Roztwór A wzorcowego gossypolu: 27,9 mg octanu gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Rozpuścić i uzupełnić do pełnej objętości kolby rozpuszczalnikiem A (3.2). Przenieść pipetą 50 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 250 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby rozpuszczalnikiem A. Stężenie gossypolu w tym roztworze wynosi 0,02 mg/ml. Przed użyciem pozostawić na godzinę w temperaturze pokojowej.

3.6. Roztwór B wzorcowego gossypolu: 27,9 mg octanu gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić i uzupełnić do pełnej objętości kolby rozpuszczalnikiem B (3.3). Stężenie gossypolu w tym roztworze wynosi 0,5 mg/ml.

Wzorcowe roztwory gossypolu A i B nadają się do użycia przez 24 godziny, jeżeli są chronione przed światłem.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Mikser lub tumbler: około 35 obr./min.

▼B

4.2. Spektrofotometr

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Analiza próbki*

Masa próbki pobrana do analizy zależy od przewidywanej zawartości gossypolu w próbce. Zalecana jest praca na małych ilościach próby i stosunkowo dużej ilości filtratu po to, aby otrzymać wystarczającą ilość gossypolu do precyzyjnego oznaczenia fotometrycznego. *W przypadku oznaczania wolnego gossypolu* w nasionach bawełny, w makuchach i mączce z nasion bawełny masa próbki do analizy nie może przekraczać 1 g. W przypadku mieszanek paszowych może wynosić do 5 g. W większości przypadków wystarczające jest 10 ml podzielnej części filtratu. Musi on zawierać od 50 do 100 µg gossypolu. *Jeżeli oznaczamy całkowity gossypol*, ilość badanej próbki musi wynosić od 0,5 do 5 g, wówczas 2 ml podzielnej części filtratu będzie zawierać od 40 do 200 µg gossypolu.

Analizę należy przeprowadzać w temperaturze pokojowej, za którą uważa się temperaturę około 20 °C.

5.2. *Oznaczanie wolnego gossypolu*

Umieścić próbkę w kolbie ze szlifowaną szyjką o pojemności 250 ml. Dno kolby pokryć pokruszonym szkłem. Przy użyciu pipety dodać 50 ml rozpuszczalnika A (3.2), zamknąć kolbę korkiem i mieszać przez godzinę w mikserze. Filtrować przez suchy filtr, a filtrat zebrać do małej kolby ze szlifowaną szyjką. Podczas filtracji przykryć lejek szkiełkiem zegarkowym.

Odmierzyć pipetą identyczne podzielne części filtratu zawierające od 50 do 100 µg gossypolu i umieścić w 2 kolbach miarowych o pojemności 25 ml (A i B). Jeżeli to konieczne, uzupełnić zawartość kolby do 10 ml rozpuszczalnikiem A (3.2). Następnie uzupełnić zawartość kolby (A) do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1). Roztwór ten będzie użyty jako roztwór odniesienia względem pomiaru roztworu próbki.

Przenieść pipetą po 10 ml rozpuszczalnika A (3.2) do 2 następnych kolb miarowych o pojemności 25 ml (C i D). Zawartość kolby (C) uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1). Roztwór ten będzie używany jako roztwór odniesienia względem pomiaru roztworu ślepej próby.

Dodać po 2 ml aniliny (3.4) do każdej z kolb (D) i (B). Ogrzewać na wrzącej łaźni przez 30 minut, do wywołania reakcji barwnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1), homogenizować i odstawić na godzinę.

Oznaczyć gęstość optyczną roztworu ślepej próby (D), używając odpowiedniego roztworu (C) jako roztworu odniesienia, oraz gęstość optyczną roztworu próbki (B) przez porównanie z odpowiednim roztworem (A), jako roztworem odniesienia w spektrofotometrze przy 440 nm, stosując 1-centymetrowe szklane kuwety.

Od odpowiadającej gęstości optycznej wartości roztworu próbki odjąć wartość gęstości optycznej roztworu ślepej próby (= skorygowana gęstość optyczna). Z użyciem tej różnicy obliczyć zawartość wolnego gossypolu, w sposób określony w pkt 6.

5.3. *Oznaczanie całkowitego gossypolu*

Próbkę zawierającą od 1 do 5 mg gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 50 ml i dodać 10 ml rozpuszczalnika B (3.3). W tym samym czasie przygotować ślepą próbę, umieszczając 10 ml rozpuszczalnika B (3.3) w następnej kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Ogrzewać obie kolby przez 30 minut na wrzącej łaźni

▼B

wodnej. Następnie schłodzić do temperatury pokojowej i uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1). Homogenizować i odstawić na 10 do 15 minut. Następnie filtrować, a filtrat zebrać do kolb ze szlifowaną szyjką.

Przenieść pipetą po 2 ml filtratu próbki do każdej z dwóch kolb miarowych o pojemności 25 ml i oraz po 2 ml filtratu do próby ślepej do pozostałych dwóch kolb. Uzupełnić zawartość jednej kolby z każdej partii do objętości 25 ml mieszaniną 1-propan-2-ol-heksanu (3.1). Roztwory te będą używane jako roztwory odniesienia.

Dodać po 2 ml aniliny (3.4) do 2 następnych kolb miarowych. Ogrzewać obie kolby przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej do wywołania reakcji barwnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do objętości 25 ml mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1), homogenizować i odstawić na godzinę.

Oznaczyć gęstość optyczną, tak jak dla wolnego gossypolu (5.2). Używając tej wartości, obliczyć zawartość całkowitego gossypolu, w sposób określony w pkt 6.

6. **Obliczanie wyników**

Wyniki mogą być obliczone na podstawie określonej gęstości optycznej (6.1) lub na podstawie odniesienia do krzywej kalibracyjnej (6.2).

6.1. *Wyniki obliczane na podstawie określonej gęstości optycznej*

W podanych warunkach określone gęstości optyczne są następujące:

Wolny gossypol: $E\frac{1\ \%}{1\ \text{cm}} = 625$

Całkowity gossypol: $E\frac{1\ \%}{1\ \text{cm}} = 600$

Zawartość wolnego lub całkowitego gossypolu w próbce oblicza się według następującego wzoru:

$$\%\ \text{gossypol} : \frac{E \times 1\,250}{E_{1\text{cm}}^{1\ \%} \times p \times a}$$

gdzie:

E = skorygowana gęstość optyczna określona w pkt 5.2
p = masa próbki w g
a = podzielna część filtratu w ml

6.2. *Wyniki obliczane na podstawie krzywej kalibracyjnej*

6.2.1. Wolny gossypol

Przygotować 2 partie po 5 kolb miarowych o pojemności 25 ml. Do każdej partii kolb wprowadzić pipetą odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml roztworu A wzorcowego gossypolu (3.5). Uzupełnić do objętości 10 ml rozpuszczalnikiem A (3.2). Uzupełnić każdą partię kolbą miarową o pojemności 25 ml zawierającą jedynie 10 ml rozpuszczalnika A (3.2) (próba ślepa).

Uzupełnić do objętości 25 ml kolby w pierwszej partii, włączając kolbę ślepej próby, mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1) (partia odniesienia).

▼B

Dodać po 2 ml aniliny (3.4) do każdej kolby drugiej partii, stanowiącej partię wzorcową, włączając kolbę ślepej próby. Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej do wywołania reakcji barwnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1), homogenizować i odstawić na godzinę.

Oznaczyć w sposób określony w 5.2 gęstość optyczną roztworów w partii wzorcowej przez porównanie z odpowiadającymi im roztworami w partii odniesienia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, nanosząc gęstości optyczne względem ilości gossypolu (w µg).

6.2.2. Całkowity gossypol

Przygotować 6 kolb miarowych o pojemności 50 ml. Do pierwszej kolby dodać 10 ml rozpuszczalnika B (3.3), a do pozostałych odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml roztworu B wzorcowego gossypolu (3.6). Każdą kolbę uzupełnić do objętości 10 ml rozpuszczalnikiem B (3.3). Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-olheksanu (3.1) i homogenizować.

Do każdej z 2 partii po 6 kolb miarowych o pojemności 25 ml wprowadzić po 2,0 ml wyżej wspomnianych roztworów. 6 kolb pierwszej partii uzupełnić do objętości 25 ml mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1) (partia odniesienia).

Do każdej kolby drugiej partii, stanowiącej partię wzorcową, dodać po 2 ml aniliny (3.4). Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu (3.1), homogenizować i odstawić na godzinę (partia standardowa).

Oznaczyć w sposób określony w pkt 5.2 gęstość optyczną roztworów w partii wzorcowej przez porównanie z odpowiadającymi im roztworami w partii odniesienia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, nanosząc gęstości optyczne względem ilości gossypolu (w µg).

6.3. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 15 % najwyższej wartości względnej, dla zawartości gossypolu do 500 ppm,

— 75 ppm w wartości bezwzględnej, dla zawartości gossypolu od 500 do 750 ppm,

— 10 % najwyższej wartości względnej, dla zawartości gossypolu powyżej 750 ppm.

▼M6

B. OZNACZANIE POZIOMÓW DIOKSYN (PCDD/PCDF) I PCB

ROZDZIAŁ I

Metody pobierania próbek i interpretacja wyników analitycznych

1. **Zakres i definicje**

Próbki przeznaczone do urzędowej kontroli poziomów polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD), polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF), dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) ([1]) oraz niedioksynopodobnych PCB w paszy pobiera się zgodnie z przepisami załącznika I. Należy stosować wymagania ilościowe w stosunku do kontroli substancji lub produktów jednorodnie rozmieszczonych w paszy, zgodnie z załącznikiem I pkt 5.1. Otrzymane w ten sposób próbki zbiorcze uznaje się za próbki reprezentatywne dla partii lub podpartii, z których zostały pobrane. Zgodność z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami ustanowionymi w dyrektywie 2002/32/WE ustala się na podstawie poziomów oznaczonych w próbkach laboratoryjnych.

Do celów niniejszej części B znajdują zastosowanie definicje określone w załączniku I do decyzji Komisji 2002/657/WE ([2]).

([1]) Tabela TEF (= współczynnik równoważny toksyczności) dla PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB: WHO-TEF dla oceny zagrożenia dla ludzi, na podstawie konkluzji Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) – spotkanie ekspertów Międzynarodowego Programu Bezpieczeństwa Chemicznego (IPCS), które odbyło się w Genewie w czerwcu 2005 r. (Martin van den Berg et al., „The 2005 World Health Organization Re-evaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds" (Ponowna ocena współczynników równoważnych toksyczności dla ludzi i ssaków w odniesieniu do dioksyn i związków dioksynopodobnych, przeprowadzona w 2005 r. przez Światową Organizację Zdrowia), Toxicological Sciences 93(2), 223–241 (2006)).

Kongener	Wartość TEF	Kongener	Wartość TEF
Dibenzo-p-dioksyny („PCDD") i dibenzo-p-furany („PCDF")		„Dioksynopodobne" PCB Non-orto PCB + Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1		
1,2,3,7,8-PeCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 77	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	PCB 169	0,03
OCDD	0,0003	Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 114	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 118	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Zastosowane skróty: „T" = tetra (cztero); „P" = penta (pięcio); „Hx" = heksa (sześcio); „Hp" = hepta (siedmio); „O" = okta (ośmio); „CDD" = chlorodibenzodioksyna; „CDF" = chlorodibenzofuran; „CB" = chlorobifenyl.

([2]) Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8).

▼M6

Oprócz tych definicji do celów niniejszej części B stosuje się następujące definicje:

„Metody przesiewowe” są to metody wykorzystywane do wyboru próbek, w których poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB przekraczają najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania. Pozwalają one na względnie tanie i szybkie oznaczanie dużej liczby próbek, zwiększając w ten sposób szanse na wykrycie nowych przypadków wysokiego narażenia i ryzyka dla zdrowia konsumentów. Metody przesiewowe muszą opierać się na metodach bioanalitycznych lub metodach GC-MS. Wyniki przekraczające wartość odcięcia, które pochodzą z próbek zbadanych w celu kontroli zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem, należy zweryfikować, wykonując ponownie pełną analizę oryginalnej próbki laboratoryjnej z wykorzystaniem metody potwierdzającej.

„Metody potwierdzające” są to metody, które dostarczają pełnych lub uzupełniających informacji pozwalających na jednoznaczną identyfikację i ilościowe oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub w razie potrzeby na poziomie reagowania. W metodach tych wykorzystuje się chromatografię gazową z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (GC-HRMS) lub chromatografię gazową z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS).

2. **Zgodność partii lub podpartii z najwyższym dopuszczalnym poziomem**

2.1. *W odniesieniu do niedioksynopodobnych PCB*

Partia lub podpartia są zgodne z najwyższym dopuszczalnym poziomem, jeżeli suma PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180 (zwanych dalej niedioksynopodobnymi PCB) nie przekracza, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru ([1]), najwyższego dopuszczalnego poziomu ustanowionego w dyrektywie 2002/32/WE. Partia lub podpartia nie są zgodne z najwyższym dopuszczalnym poziomem ustanowionym w dyrektywie 2002/32/WE, jeżeli średnia dwóch wyników analizy uzyskanych metodą granicy oznaczalności ([2]) z wykorzystaniem analizy powtórnej ([3]) z uwzględnieniem niepewności rozszerzonej pomiaru przekracza ponad wszelką wątpliwość najwyższy dopuszczalny poziom, tj. do oceny zgodności wykorzystywane jest przeanalizowane stężenie po odjęciu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Niepewność rozszerzoną oblicza się przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, który daje poziom ufności około 95 %. Partia lub podpartia są niezgodne z wymogami, jeśli średnia mierzonych wartości po odjęciu niepewności rozszerzonej średniej jest wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom.

([1]) W stosownych przypadkach należy przestrzegać zasad opisanych w „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry” (Wytyczne dotyczące niepewności pomiaru dla laboratoriów wykonujących analizę PCDD/F i PCB z zastosowaniem spektrometrii mas z rozcieńczeniem izotopowym) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

([2]) Koncepcja „metody granicy oznaczalności” (ang. *upper-bound*) zakłada przyjęcie wartości równej granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów. Koncepcja „metody zerowej” (ang. *lower-bound*) zakłada przyjęcie wartości równej zero dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów. Koncepcja „połowy granicy oznaczalności” (ang. *medium-bound*) zakłada przyjęcie wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów.

([3]) Analiza powtórna: Odrębna analiza interesujących analitów przy użyciu drugiej podwielokrotnej części tej samej zhomogenizowanej próbki. Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące powtórnej analizy określone w załączniku II rozdział C pkt 3. W przypadku metod przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla ^{13}C dla odpowiednich analitów powtórna analiza jest konieczna tylko wtedy, gdy w pierwszym oznaczeniu z wykorzystaniem takich metod potwierdzających uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. W razie przeprowadzania analizy w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze powtórnej analizy, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z przypadkiem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności produktu, a stwierdzony poziom jest znacznie wyższy od najwyższego dopuszczalnego poziomu.

▼M6

Zasady wymienione w akapitach powyżej mają zastosowanie do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

2.2. *W odniesieniu do PCDD/F i dioksynopodobnych PCB*

Partia lub podpartia jest zgodna z wymaganiami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu, jeżeli wynik pojedynczej analizy:

— przeprowadzonej metodą przesiewową przy wskaźniku ilości wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % wskazuje, że poziom nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/F ani sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, określonych w dyrektywie 2002/32/WE,

— przeprowadzonej metodą potwierdzającą nie przekracza odpowiedniego najwyższego dopuszczalnego poziomu PCDD/F ani sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, określonych w dyrektywie 2002/32/WE, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Dla badań przesiewowych należy ustalić wartość odcięcia dla decyzji o zgodności próbki z odpowiednimi najwyższymi dopuszczalnymi poziomami ustanowionymi albo dla PCDD/F, albo dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

Partia lub podpartia nie są zgodne z najwyższym dopuszczalnym poziomem ustanowionym w dyrektywie 2002/32/WE, jeżeli średnia dwóch wyników analizy uzyskanych metodą granicy oznaczalności [1] z wykorzystaniem analizy powtórnej [2] przy zastosowaniu metody potwierdzającej z uwzględnieniem niepewności rozszerzonej pomiaru przekracza ponad wszelką wątpliwość najwyższy dopuszczalny poziom, tj. do oceny zgodności wykorzystywane jest przeanalizowane stężenie po odjęciu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Niepewność rozszerzoną oblicza się przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, który daje poziom ufności około 95 %. Partia lub podpartia są niezgodne z wymogami, jeśli średnia mierzonych wartości po odjęciu niepewności rozszerzonej średniej jest wyższa niż najwyższy dopuszczalny poziom.

Należy zastosować sumę szacowanych niepewności rozszerzonych dla odrębnych wyników analitycznych dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odniesieniu do sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

Zasady wymienione w akapitach powyżej mają zastosowanie do wyniku analitycznego otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub arbitrażu zastosowanie mają przepisy krajowe.

---

[1] Koncepcja „metody granicy oznaczalności” zakłada przyjęcie wartości równej granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów przy obliczaniu ich wkładu w równoważniku toksyczności (TEQ). Koncepcja „metody zerowej” zakłada przyjęcie wartości równej zero dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów przy obliczaniu ich wkładu w TEQ. Koncepcja „metody połowy granicy oznaczalności” zakłada przyjęcie wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów przy obliczaniu ich wkładu w TEQ.

[2] Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące powtórnej analizy określone w załączniku II rozdział C pkt 2. W przypadku metod potwierdzających przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla ^{13}C dla odpowiednich analitów powtórna analiza jest konieczna tylko wtedy, gdy w pierwszym oznaczeniu uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Powtórna analiza jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. W razie przeprowadzania analizy w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze powtórnej analizy, jeżeli próbki wybrane do analizy można powiązać z przypadkiem wystąpienia zanieczyszczenia na podstawie identyfikowalności produktu, a stwierdzony poziom jest znacznie wyższy od najwyższego dopuszczalnego poziomu.

▼M6

3. **Wyniki przekraczające poziomy reagowania ustanowione w załączniku II do dyrektywy 2002/32/WE**

Progi podejmowania działań są narzędziem wyboru próbek w przypadkach wymagających zidentyfikowania źródła zanieczyszczeń i podjęcia odpowiednich działań, aby je zredukować lub zlikwidować. Metody przesiewowe powinny ustanowić odpowiednie wartości odcięcia dla wyboru tych próbek. Jeśli zidentyfikowanie źródła i zredukowanie lub usunięcie zanieczyszczenia wymaga znacznego wysiłku, należy potwierdzić przekroczenie poziomu reagowania powtórną analizą przy zastosowaniu metody potwierdzającej i przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru ([1]).

ROZDZIAŁ II

Przygotowanie próbek i wymagania dotyczące metod analizy stosowanych w urzędowej kontroli poziomów dioksyn (PCDD/F) i dioksynopodobnych PCB w paszy

1. **Zakres stosowania**

Wymogi ustanowione w niniejszym rozdziale należy stosować w przypadku paszy analizowanej do celów urzędowych kontroli poziomów PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 oraz dioksynopodobnych PCB oraz w odniesieniu do przygotowywania próbek oraz wymogów analitycznych do innych celów regulacyjnych, co obejmuje kontrole wykonywane przez podmiot działający na rynku pasz w celu zapewnienia zgodności z przepisami rozporządzenia (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady ([2]).

Monitorowanie obecności PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w paszy można przeprowadzać przy wykorzystaniu dwóch różnych typów metod analitycznych:

a) *Metody przesiewowe*

Celem metod przesiewowych jest wybór próbek o poziomach PCDD/F i dioksynopodobnych PCB przekraczających najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania. Metody przesiewowe zapewniają względnie tanie i szybkie oznaczanie dużej liczby próbek, zwiększając w ten sposób szanse na wykrycie nowych przypadków wysokiego narażenia i ryzyka dla zdrowia konsumentów. Ich stosowanie ma na celu unikanie wyników fałszywie ujemnych. Mogą obejmować metody bioanalityczne i metody GC-MS.

Metody przesiewowe porównują wynik analityczny z wartością odcięcia, dając odpowiedź tak/nie odnośnie do ewentualnego przekroczenia najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Stężenie PCDD/F oraz sum PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach podejrzanych o to, że są niezgodne z wymogami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu, oznacza się lub potwierdza przy zastosowaniu metody potwierdzającej.

Ponadto metody przesiewowe mogą dać wskazania odnośnie do poziomów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB obecnych w próbce. W przypadku stosowania bioanalitycznych metod przesiewowych wynik wyrażony jest w równoważnikach bioanalitycznych (BEQ), a w przypadku stosowania fizykochemicznych metod GC-MS – jest on wyrażony w równoważnikach toksyczności (TEQ). Wyniki metod przesiewowych wyrażone liczbowo są odpowiednie do celów

([1]) Identyczne wyjaśnienie i wymagania dla powtórnej analizy w celu kontroli poziomów reagowania jak w przypisie 2 powyżej dla najwyższych dopuszczalnych poziomów.

([2]) Rozporządzenie (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz (Dz.U. L 35 z 8.2.2005, s. 1).

▼M6

wykazywania zgodności, podejrzewanej niezgodności z wymogami lub przekroczenia poziomów reagowania; wskazują one również na zakres poziomów w przypadku, gdy następnie zastosowane zostaną metody potwierdzające. Nie są one odpowiednie do celów takich, jak ocena poziomów tła, oszacowanie pobrania, śledzenie tendencji w czasie oraz ponowna ocena poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów.

b) *Metody potwierdzające*

Metody potwierdzające pozwalają na jednoznaczną identyfikację i ilościowe oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbce i dostarczają pełnych informacji na poziomie kongenerów. Dlatego metody te pozwalają na kontrolę najwyższych dopuszczalnych poziomów i poziomów reagowania, w tym potwierdzanie wyników uzyskanych metodami przesiewowymi. Ponadto wyniki mogą być wykorzystywane do innych celów, takich jak oznaczanie niskich poziomów tła w monitorowaniu paszy, śledzenie tendencji w czasie, ocena narażenia oraz tworzenie bazy danych na potrzeby ewentualnej ponownej oceny poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów. Są one także ważne dla ustanowienia profili kongenerów w celu zidentyfikowania źródła ewentualnego zanieczyszczenia. Metody te wykorzystują GC-HRMS. W celu potwierdzenia zgodności lub niezgodności z wymogami dotyczącymi najwyższego dopuszczalnego poziomu można również wykorzystywać GC-MS/MS.

2. **Informacje podstawowe**

W celu obliczenia stężeń wyrażonych jako stężenia TEQ należy pomnożyć stężenia poszczególnych substancji w danej próbce przez ich odpowiednie współczynniki równoważne toksyczności (TEF) (zob. rozdział I przypis 1), a następnie zsumować je, co da łączne stężenie związków dioksynopodobnych wyrażone jako TEQ.

Do celów niniejszej części B przyjęta swoista granica oznaczalności danego kongeneru jest to najniższa zawartość analitu, którą można zmierzyć z istotną pewnością statystyczną przy spełnieniu kryteriów identyfikacji opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze – Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668.

Granicę oznaczalności danego kongeneru można określić jako:

a) stężenie analitu w ekstrakcie próbki, które wywołuje odpowiedź instrumentu dla dwóch różnych jonów, monitorowaną przy stosunku sygnału do szumu (S/N) wynoszącym 3:1 dla mniej intensywnego sygnału danych surowych; lub

b) jeżeli z powodów technicznych obliczanie stosunku sygnału do szumu nie daje wiarygodnych wyników – najniższe stężenie na krzywej wzorcowej, które daje akceptowalne (≤ 30 %) i stałe (mierzone przynajmniej na początku i na końcu serii analitycznej próbek) odchylenie od średniego względnego współczynnika odpowiedzi obliczonego dla wszystkich punktów na krzywej wzorcowej w każdej serii próbek. Granica oznaczalności (LOQ) jest obliczana na podstawie najniższego stężenia na krzywej przy uwzględnieniu odzysku wzorców wewnętrznych i wielkości próbki.

▼M6

Bioanalityczne metody przesiewowe nie dają wyników na poziomie kongenerów, a jedynie wskazanie [1] poziomu TEQ wyrażonego w BEQ, aby uwzględnić fakt, że nie wszystkie związki obecne w ekstrakcie próbki, które wywołują odpowiedź w badaniu, spełniają wszystkie wymagania zasady TEQ.

Metody przesiewowe i potwierdzające mogą być stosowane tylko do kontroli niektórych matryc, jeżeli metody te są dostatecznie czułe, aby w sposób wiarygodny wykrywać substancje na poziomie reagowania lub najwyższym dopuszczalnym poziomie.

3. **Wymagania dotyczące zapewniania jakości**

3.1. Należy podjąć niezbędne środki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego na każdym etapie pobierania i analizy próbek.

3.2. Próbki należy przechowywać i transportować w pojemnikach szklanych, aluminiowych, polipropylenowych lub polietylenowych nadających się do tego celu i nie mających wpływu na poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach. Pojemnik na próbki należy oczyścić z pyłu papierowego.

3.3. Przechowywanie i przewożenie próbek należy przeprowadzać w sposób zachowujący integralność próbki paszy.

3.4. W razie potrzeby każdą próbkę laboratoryjną należy drobno zmielić i dokładnie wymieszać w sposób gwarantujący pełną homogenizację (np. w sposób umożliwiający przesianie przez sito o oczku 1 mm). Jeżeli zawartość wilgoci jest zbyt wysoka, próbki muszą zostać osuszone przed mieleniem.

3.5. Należy przeprowadzić kontrolę odczynników, aparatury i szkła laboratoryjnego pod kątem ewentualnego wpływu na wyniki oparte na TEQ lub BEQ.

3.6. Należy wykonać analizę ślepej próby, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej, ale bez próbki.

3.7. W przypadku metod bioanalitycznych należy upewnić się, że szkło laboratoryjne i rozpuszczalniki stosowane podczas analizy są wolne od związków przeszkadzających w wykrywaniu związków docelowych w zakresie roboczym. Szkło należy przemyć rozpuszczalnikami lub ogrzać do temperatur, w których z powierzchni usuwane są pozostałości PCDD/F, związków dioksynopodobnych i związków przeszkadzających.

3.8. Ilość próbki stosowanej do ekstrakcji musi być wystarczająca do spełnienia wymogów dotyczących wystarczająco niskiego zakresu roboczego, obejmującego stężenia na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub na poziomie reagowania.

3.9. Konkretne procedury przygotowania próbki stosowane do badanych produktów powinny być zgodne z międzynarodowymi wytycznymi.

[1] Metody bioanalityczne nie są swoiste dla kongenerów objętych schematem TEF. W ekstrakcie próbki mogą być obecne inne związki strukturalnie podobne do związków aktywujących receptor AhR, co przyczynia się do ogólnej odpowiedzi. Dlatego wyniki uzyskane metodami bioanalitycznymi nie mogą być traktowane jako szacunki, ale raczej jako wskazanie poziomu TEQ w próbce.

▼M6

4. **Wymagania dotyczące laboratoriów**

4.1. Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 laboratoria muszą być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z wytyczną ISO 58, aby zapewnić, że przy przeprowadzaniu analiz stosują system zapewniania jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025. W stosownych przypadkach należy stosować zasady opisane w wytycznych technicznych dotyczących szacowania niepewności pomiaru i granic oznaczalności w odniesieniu do analizy PCDD/F i PCB ([1]).

4.2. Biegłość laboratoriów należy udowadniać stałym uczestnictwem w międzylaboratoryjnych badaniach oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odpowiednich matrycach paszy i zakresach stężeń.

4.3. Laboratoria stosujące przesiewowe metody analityczne do rutynowej kontroli próbek powinny nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metody potwierdzające, zarówno w celach kontroli jakości, jak i potwierdzania wyników analitycznych podejrzanych próbek.

5. **Podstawowe wymagania dotyczące procedury analitycznej dla dioksyn (PCDD/F) i dioksynopodobnych PCB**

5.1. *Niski zakres roboczy i granica oznaczalności*

W przypadku PCDD/F wykrywalne ilości muszą osiągnąć wysokie poziomy rzędu femtogramów (10^{-15} g) z uwagi na ekstremalną toksyczność niektórych spośród tych związków. W przypadku większości kongenerów PCB granica oznaczalności rzędu nanogramów (10^{-9} g) jest już wystarczająca. W przypadku oznaczania bardziej toksycznych kongenerów dioksynopodobnych PCB (w szczególności kongenerów podstawionych w pozycji non-orto), dolna granica zakresu roboczego musi osiągnąć niskie poziomy rzędu pikogramów (10^{-12} g). W przypadku wszystkich pozostałych kongenerów PCB granica oznaczania rzędu nanogramów (10^{-9} g) jest już wystarczająca.

5.2. *Wysoka selektywność (swoistość)*

5.2.1. Konieczne jest rozróżnienie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB od wielu innych współekstrahowanych i ewentualnie interferujących związków występujących w stężeniach do kilku razy wyższych od stężeń interesujących analitów. W przypadku metod GC-MS konieczne jest rozróżnienie między różnymi kongenerami, takimi jako kongenery toksyczne (np. siedemnaście PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 oraz dwanaście dioksynopodobnych PCB) i pozostałe kongenery.

5.2.2. Metody bioanalityczne muszą być w stanie wykrywać docelowe związki jako sumę PCDD/F lub dioksynopodobnych PCB. Oczyszczanie próbki ma na celu usunięcie związków dających wyniki fałszywie dodatnie lub związków, które mogą zmniejszać odpowiedź, powodując wyniki fałszywie ujemne.

5.3. *Wysoka dokładność (prawdziwość i precyzja, odzysk testu biologicznego)*

5.3.1. W przypadku metod GC-MS oznaczenie musi dostarczyć wiarygodnych szacunków rzeczywistego stężenia w próbce. Wysoka dokładność jest konieczna, aby uniknąć odrzucenia wyniku analizy próbki z powodu słabej wiarygodności oznaczonego poziomu TEQ. Dokładność jest wyrażona jako *prawdziwość* (różnica między średnią wartością mierzoną

([1]) „Guidance Document on Measurement Uncertainty for Laboratories performing PCDD/F and PCB Analysis using Isotope Dilution Mass Spectrometry" (Wytyczne dotyczące niepewności pomiaru dla laboratoriów wykonujących analizę PCDD/F i PCB z zastosowaniem spektrometrii mas z rozcieńczeniem izotopowym) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en), „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" (Wytyczne dotyczące szacowania LOD i LOQ na potrzeby pomiarów w dziedzinie zanieczyszczeń w paszy i żywności) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

▼M6

w odniesieniu do analitu w certyfikowanym materiale a jego certyfikowaną wartością, wyrażona w procentach) i *precyzja* (RSD_R względne odchylenie standardowe obliczone na podstawie wyników osiągniętych w warunkach odtwarzalności).

5.3.2. W przypadku metod bioanalitycznych należy oznaczyć odzysk testu biologicznego. Odzysk testu biologicznego jest to poziom BEQ obliczony z krzywej wzorcowej TCDD lub PCB 126, skorygowany o wynik dla próbki ślepej, a następnie podzielony przez poziom TEQ oznaczony metodą potwierdzającą. Jego celem jest korekta takich czynników, jak strata PCDD/F i związków dioksynopodobnych podczas ekstrakcji i oczyszczania, związki współekstrahowane zwiększające lub zmniejszające odpowiedź (efekt agonistyczny lub antagonistyczny), jakość dopasowania krzywej lub różnice między wartościami TEF a wartościami względnego potencjału działania (REP). Odzysk testu biologicznego jest obliczany na podstawie wyników badania odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie zainteresowania.

5.4. *Walidacja w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu oraz środki ogólnej kontroli jakości*

5.4.1. Laboratoria muszą wykazać skuteczność metody w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu, np. 0,5-, 1- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu wraz z akceptowalną wartością współczynnika zmienności obliczonego dla wielokrotnych powtórzeń analizy podczas procedury walidacji oraz podczas rutynowej analizy.

5.4.2. W ramach wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości należy regularnie przeprowadzać ślepe próby i badania z wykorzystaniem próby wzbogaconej lub analizy próbek kontrolnych (zwłaszcza certyfikowanych materiałów referencyjnych, jeżeli materiały takie są dostępne). Wykresy kontroli jakości dla ślepych prób, badań z wykorzystaniem próby wzbogaconej lub analiz próbek kontrolnych należy rejestrować i kontrolować, aby upewnić się, że skuteczność analityczna jest zgodna z wymaganiami.

5.5. *Granica oznaczalności*

5.5.1. W przypadku bioanalitycznej metody przesiewowej ustanowienie granicy oznaczalności (LOQ) nie jest niezbędnym wymogiem, ale należy dowieść, że metoda pozwala na rozróżnienie między ślepą próbą a wartością odcięcia. Podając poziom BEQ, należy ustalić poziom zgłaszania, aby uwzględnić próbki wykazujące odpowiedź poniżej tego poziomu. Należy wykazać, że poziom zgłaszania jest różny od procedury ślepej próby co najmniej o współczynnik 3 przy odpowiedzi poniżej zakresu roboczego. W związku z powyższym należy go obliczyć z próbek zawierających związki docelowe w granicach wymaganego poziomu minimalnego, a nie ze współczynnika S/N lub ze ślepej próby.

5.5.2. Granica oznaczalności (LOQ) dla metody potwierdzającej powinna wynosić ok. jednej piątej najwyższego dopuszczalnego poziomu.

5.6. *Kryteria analityczne*

Dla uzyskania wiarygodnych wyników metodą potwierdzającą lub przesiewową, w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu należy spełnić poniższe kryteria dla wartości, odpowiednio, TEQ lub BEQ, niezależnie od tego, czy są oznaczane jako całkowita wartość TEQ czy całkowita wartość BEQ (jako suma PCDD/F i dioksynopodobnych PCB), czy oddzielnie dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB:

▼M6

	Bioanalityczna lub fizykochemiczna metoda przesiewowa	Metody potwierdzające
Wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych ([1])	< 5 %	
Prawdziwość		– 20 % do 20 %
Powtarzalność (RSD_r)	< 20 %	
Precyzja pośrednia (RSD_R)	< 25 %	< 15 %

([1]) W odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów.

5.7. *Szczegółowe wymagania dotyczące metod przesiewowych*

5.7.1. W metodach przesiewowych można stosować zarówno metody GC-MS, jak i metody bioanalityczne. W przypadku metod GC-MS zastosowanie mają wymagania ustanowione w pkt 6. W przypadku metod bioanalitycznych opierających się na oznaczeniach komórkowych zastosowanie mają szczegółowe wymogi ustanowione w pkt 7.

5.7.2. Laboratoria stosujące metody przesiewowe do rutynowej kontroli próbek muszą nawiązać ścisłą współpracę z laboratoriami stosującymi metodę potwierdzającą.

5.7.3. Weryfikacja skuteczności metody przesiewowej jest wymagana podczas rutynowej analizy w drodze kontroli jakości analizy i walidacji metody podczas analizy. Należy prowadzić ciągły program kontroli wyników ujemnych.

5.7.4. Należy sprawdzać, czy nie zachodzi ewentualne tłumienie odpowiedzi komórek i cytotoksyczności:

20 % ekstraktów próbek należy analizować rutynowo metodą przesiewową z dodanym 2,3,7,8-TCDD i bez, zgodnym z najwyższym dopuszczalnym poziomem lub poziomem reagowania, aby sprawdzić, czy odpowiedź jest ewentualnie tłumiona przez substancje przeszkadzające obecne w ekstrakcie próbki. Zmierzone stężenie próbki wzbogaconej należy porównać do sumy stężenia ekstraktu próbki niewzbogaconej i stężenia wzbogacenia. Jeżeli zmierzone stężenie jest o ponad 25 % niższe niż obliczone (zsumowane) stężenie, wskazuje to na ewentualne tłumienie sygnału, a odpowiednia próbka musi zostać przekazana do analizy metodą potwierdzającą GC/HRMS. Wyniki należy monitorować na wykresach kontroli jakości.

5.7.5. Kontrola jakości próbek ujemnych

Około 2–10 % próbek ujemnych, zależnie od matrycy próbki i doświadczenia laboratorium, należy potwierdzić metodą GC/HRMS.

5.7.6. Oznaczenie wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych z danych kontroli jakości

Należy oznaczyć wskaźnik ilości wyników fałszywie ujemnych z badań przesiewowych próbek poniżej i powyżej najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Wskaźnik rzeczywistej ilości wyników fałszywie ujemnych nie może przekraczać 5 %. Po uzyskaniu co najmniej 20 potwierdzonych wyników na matrycę/grupę matryc z kontroli jakości próbek ujemnych należy z tej bazy danych wyciągnąć wnioski dotyczące wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych. Do

▼M6

tych 20 wyników w celu oceny wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych można także włączyć wyniki uzyskane na próbkach analizowanych w badaniach biegłości lub podczas przypadków wystąpienia zanieczyszczenia, obejmujące zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu. Próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.

Chociaż badania przesiewowe powinny mieć na celu wykrywanie próbek przekraczających poziom reagowania, kryterium określania wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych jest najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru metody potwierdzającej.

5.7.7. Ewentualne dodatnie wyniki próbek z badania przesiewowego muszą zawsze zostać zweryfikowane za pomocą pełnej ponownej analizy oryginalnej próbki laboratoryjnej z zastosowaniem metody potwierdzającej. Próbki te mogą być też zastosowane do oceny odsetka wyników fałszywie dodatnich. W przypadku metod przesiewowych częstość wyników fałszywie dodatnich to odsetek wyników potwierdzonych jako ujemne metodą potwierdzającą, które we wcześniejszych badaniach przesiewowych były uznane za potencjalnie dodatnie. Ocena korzyści metody przesiewowej powinna być oparta na porównaniu próbek fałszywie dodatnich z całkowitą liczbą sprawdzonych próbek. Częstość ta musi być na tyle niska, aby stosowanie narzędzia przesiewowego było korzystne.

5.7.8. Metody bioanalityczne w warunkach walidacji muszą dostarczyć wiarygodnego wskazania poziomu TEQ, obliczonego i wyrażonego jako BEQ.

Także w przypadku metod bioanalitycznych przeprowadzanych w powtarzalnych warunkach wewnątrzlaboratoryjny RSD_r byłby zwykle niższy niż w warunkach odtwarzalności RSD_R.

6. **Szczegółowe wymagania dotyczące technik GC-MS w metodach przesiewowych lub potwierdzających**

6.1. *Dopuszczalne różnice między wynikami WHO-TEQ uzyskanymi metodą granicy oznaczalności i metodą zerową*

Do celów potwierdzenia, że zostały przekroczone najwyższe dopuszczalne poziomy lub, w razie potrzeby, poziomy reagowania, różnica między wynikiem uzyskanym metodą granicy oznaczalności a wynikiem uzyskanym metodą zerową nie powinna przekraczać 20 %.

6.2. *Kontrola poziomów odzysku*

6.2.1. Rozpoczynając analizę, np. przed ekstrakcją, należy dodać wzorce wewnętrzne PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C, oraz wzorce wewnętrzne dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C w celu walidacji procedury analitycznej. Dodaje się co najmniej jeden kongener dla każdej grupy homologicznej, od tetra- do oktachlorowanego PCDD/F oraz co najmniej 1 kongener dla każdej grupy homologicznej dioksynopodobnych PCB (alternatywnie, co najmniej 1 kongener na każdy wyselekcjonowany jon widma masowego, rejestrujący funkcję służącą do monitorowania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod potwierdzających należy zastosować wszystkie siedemnaście wzorców wewnętrznych PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie dwanaście wzorców wewnętrznych dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C.

▼M6

6.2.2. Dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C, należy również oznaczyć względne współczynniki odpowiedzi przez zastosowanie odpowiednich roztworów kalibracyjnych.

6.2.3. W przypadku paszy pochodzenia roślinnego i paszy pochodzenia zwierzęcego zawierających mniej niż 10 % tłuszczu dodawanie wzorców wewnętrznych przed ekstrakcją jest obowiązkowe. W przypadku paszy pochodzenia zwierzęcego zawierającej więcej niż 10 % tłuszczu wzorce wewnętrzne mogą zostać dodane przed albo po ekstrakcji tłuszczu. Zależnie od etapu, na którym wprowadza się wzorce wewnętrzne, należy dokonać właściwej walidacji skuteczności ekstrakcji.

6.2.4. Przed analizą GC-MS należy dodać 1 lub 2 wzorce odzysku.

6.2.5. Konieczna jest kontrola odzysku. W przypadku metody potwierdzającej odzysk poszczególnych wzorców wewnętrznych musi mieścić się w zakresie od 60 do 120 %. Dopuszczalne są niższe lub wyższe wartości odzysku dla poszczególnych kongenerów, w szczególności dla niektórych hepta- i oktachlorowanych dibenzo-p-dioksyn i dibenzofuranów, jeżeli ich udział w wartości TEQ nie przekracza 10 % całkowitej wartości TEQ (na podstawie PCDD/F oraz dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod przesiewowych GC-MS odzysk powinien miesić się w zakresie od 30 do 140 %.

6.3. *Usuwanie substancji przeszkadzających*

— Rozdzielenie PCDD/F od interferujących związków chlorowanych, takich jak niedioksynopodobne PCB czy polichlorowane difenyloetery, należy przeprowadzić przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych (najlepiej stosując jako wypełnienie kolumny florisil, tlenek glinu lub węgiel).

— Rozdzielanie izomerów metodą chromatografii gazowej musi wynosić < 25 % nakładania się pików pomiędzy 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

6.4. *Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej*

Zakres krzywej wzorcowej musi obejmować odpowiednie zakresy najwyższych dopuszczalnych poziomów lub poziomów reagowania.

6.5. *Szczegółowe kryteria dla metod potwierdzających*

— Dla GC-HRMS:

Przy HRMS rozdzielczość powinna zazwyczaj być większa albo równa 10 000 dla całego zakresu masy przy 10 % dolinie.

Spełnienie dalszych kryteriów identyfikacji i potwierdzenia opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze – Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668.

— Dla GC-MS/MS:

Monitorowanie przynajmniej 2 określonych jonów macierzystych, z których każdy posiada jeden określony odpowiadający mu przejściowy jon potomny, dla wszystkich znakowanych i nieznakowanych analitów w zakresie analizy.

Najwyższa dopuszczalna tolerancja dla względnych intensywności jonów wynosząca ± 15 % dla wybranych przejściowych jonów potomnych w porównaniu z wartościami obliczonymi lub zmierzonymi (średnia z wzorców), z zastosowaniem identycznych warunków MS/MS – w szczególności energii zderzenia i ciśnienia gazu przy zderzeniu – dla każdego przejścia analitu.

▼M6

Rozdzielczość dla każdego kwadrupola określa się jako równą lub lepszą w stosunku do jednostkowej rozdzielczości masy (jednostkowa rozdzielczość masy: rozdzielczość wystarczająca do rozdzielenia dwóch pików oddalonych o jedną jednostkę masy) w celu zminimalizowania możliwych interferencji dotyczących analitów będących przedmiotem zainteresowania.

Spełnienie dalszych kryteriów opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze – Oznaczanie dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668, z wyjątkiem obowiązku zastosowania GC-HRMS.

7. **Szczegółowe wymagania dotyczące metod bioanalitycznych**

Metody bioanalityczne są to metody oparte na zasadach biologicznych, np. oznaczenia wykorzystujące hodowle komórkowe, receptor lub testy immunologiczne. W pkt 7 ustanowiono ogólne wymogi dla metod bioanalitycznych.

Metoda przesiewowa zasadniczo pozwala zaklasyfikować próbkę jako ujemną lub podejrzaną o bycie dodatnią. W tym celu obliczony poziom BEQ jest porównywany z wartością odcięcia (zob. pkt 7.3). Próbki poniżej wartości odcięcia są uznawane za ujemne, a próbki równe wartości odcięcia lub ją przekraczające – za podejrzane o bycie dodatnimi i wymagające analizy metodą potwierdzającą. W praktyce poziom BEQ odpowiadający 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu może posłużyć jako wartość odcięcia, pod warunkiem że zapewnione są: wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych poniżej 5 % i dopuszczalny wskaźnik wyników fałszywie dodatnich. Przy odrębnych najwyższych dopuszczalnych poziomach dla PCDD/F i dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB sprawdzanie zgodności próbek bez frakcjonowania wymaga odpowiednich wartości odcięcia testu biologicznego dla PCDD/F. Jako wartość odcięcia do sprawdzenia próbek przekraczających poziomy reagowania wystarcza odpowiedni odsetek danego poziomu reagowania.

Jeśli orientacyjny poziom jest wyrażony w BEQ, wyniki próbek muszą być w zakresie roboczym i przekraczać poziom zgłaszania (zob. pkt 7.1.1 i 7.1.6).

7.1. *Ocena czułości badania*

7.1.1. Wymagania ogólne

— Podczas obliczania stężenia z krzywej wzorcowej TCDD wartości na górnej granicy krzywej wykazywać będą wysoką zmienność (wysoki współczynnik zmienności, CV). Zakres roboczy to obszar, w którym CV jest mniejszy niż 15 %. Dolna granica zakresu roboczego (poziom zgłaszania) musi zostać ustalona (co najmniej o współczynnik 3) powyżej ślepej próbki proceduralnej. Górna granica zakresu roboczego jest zwykle reprezentowana przez wartość EC_{70} (70 % najwyższego skutecznego stężenia), ale jest niższa, jeżeli CV jest wyższy niż 15 % w tym zakresie. Zakres roboczy musi być ustalony podczas walidacji. Wartości odcięcia (zob. pkt 7.3) muszą mieścić się w zakresie roboczym.

— Roztwory wzorcowe i ekstrakty próbek należy zbadać trzykrotnie lub co najmniej dwukrotnie. Przy stosowaniu dwukrotnego badania roztwór standardowy lub ekstrakt kontrolny badany w 4–6 dołkach rozmieszczonych na płytce musi wywołać odpowiedź lub dać stężenie (możliwe tylko w zakresie roboczym) w oparciu o CV < 15 %.

▼M6

7.1.2. Kalibracja

7.1.2.1. Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej

— Poziomy w próbkach należy oszacować przez porównanie czułości badania z krzywą wzorcową TCDD (lub PCB 126 albo mieszaniny wzorcowej PCDD/PCDF/dioksynopodobnych PCB) w celu obliczenia poziomu BEQ w ekstrakcie, a następnie w próbce.

— Krzywe wzorcowe powinny zawierać 8–12 stężeń (co najmniej w dwukrotnym badaniu) z wystarczającą ilością stężeń w dolnych zakresach krzywej (zakres roboczy). Szczególną uwagę należy zwrócić na jakość dopasowania krzywej w roboczym zakresie. Wartość R^2 jako taka ma niewielkie lub żadne znaczenie przy szacowaniu dopasowania w regresji nieliniowej. Lepsze dopasowanie jest osiągane poprzez minimalizowanie różnicy między obliczanym a obserwowanym poziomem w zakresie roboczym krzywej, np. przez minimalizowanie sumy kwadratów reszt.

— Oszacowany poziom w ekstrakcie próbki jest następnie korygowany o poziom BEQ obliczany dla ślepej próbki matrycowej lub próby odczynnikowej (aby uwzględnić zanieczyszczenia z zastosowanych rozpuszczalników i chemikaliów) oraz odzysk (obliczany z poziomu BEQ odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie zbliżonym do wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania). Dla przeprowadzenia korekty odzysku odzysk musi zawsze mieścić się w wymaganym zakresie (zob. pkt 7.1.4). Próbki referencyjne stosowane do korekty odzysku muszą być zgodne z wymaganiami podanymi w pkt 7.2.

7.1.2.2. Kalibracja przy zastosowaniu próbek referencyjnych

Alternatywnie można zastosować krzywą wzorcową przygotowaną na co najmniej 4 próbkach referencyjnych (zob. pkt 7.2.4): jedna ślepa próbka matrycowa plus trzy próbki referencyjne o wartości 0,5-, 1- i 2-krotnego najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania), eliminując potrzebę korekty o próbkę ślepą i odzysk, jeżeli właściwości matrycy próbek referencyjnych odpowiadają właściwościom nieznanych próbek. W takim przypadku czułość badania odpowiadającą 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu (zob. pkt 7.3) można obliczyć bezpośrednio z tych próbek i zastosować jako wartość odcięcia. Dla sprawdzenia próbek przekraczających poziomy reagowania jako wartość odcięcia wystarcza odpowiedni odsetek tych poziomów reagowania.

7.1.3. Oddzielne oznaczanie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB

Ekstrakty można rozdzielać na frakcje zawierające PCDD/F i dioksynopodobne PCB, umożliwiając oddzielne oznaczanie poziomów TEQ dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB (wyrażonych w BEQ). Do oceny wyników dla frakcji zawierającej dioksynopodobne PCB najlepiej zastosować standardową krzywą wzorcową PCB 126.

7.1.4. Odzysk testu biologicznego

„Odzysk testu biologicznego” należy obliczyć na odpowiednich próbkach referencyjnych z reprezentatywnymi profilami kongenerów w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania i wyrazić jako odsetek poziomu BEQ w porównaniu do poziomu TEQ. Zależnie od typu badania i zastosowanych TEF ([1]) różnice między czynnikami TEF i REP dla dioksynopodobnych PCB mogą spowodować

([1]) Aktualne wymogi są oparte na TEF opublikowanych w: M. Van den Berg et al, Toxicol Sci 93 (2), 223–241 (2006).

▼M6

niski odzysk dla dioksynopodobnych PCB w porównaniu z PCDD/F. Dlatego, jeżeli przeprowadzane jest odrębne oznaczenie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, odzysk testu biologicznego powinien wynosić: dla dioksynopodobnych PCB: 20–60 %, dla PCDD/F: 50–130 % (zakresy stosowane są do krzywej wzorcowej TCDD). Ponieważ udział dioksynopodobnych PCB w sumie PCDD/F i dioksynopodobnych PCB może różnić się zależnie od różnych matryc i próbek, odzyski testu biologicznego dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB odzwierciedlają te zakresy i powinny wynosić od 30 do 130 %. Każda znaczna zmiana wartości TEF w przepisach unijnych w odniesieniu do PCDD/F i dioksynopodobnych PCB wymaga zmiany tych zakresów.

7.1.5. Kontrola poziomów odzysku na potrzeby oczyszczania

Podczas walidacji należy sprawdzić stratę związków podczas oczyszczania. Ślepą próbkę wzbogaconą mieszaniną różnych kongenerów należy przekazać do oczyszczania (co najmniej n = 3), a odzysk i zmienność sprawdzić metodą potwierdzającą. Odzysk powinien wynosić od 60 do 120 % szczególnie dla kongenerów mających ponad 10 % udział w poziomie TEQ w różnych mieszaninach.

7.1.6. Poziom zgłaszania

Przy zgłaszaniu poziomów BEQ należy określić poziom zgłaszania na odpowiednich próbkach matrycy, obejmujących typowe profile kongenerów, ale nie z krzywej wzorcowej wzorców ze względu na niską precyzję w dolnym zakresie krzywej. Należy uwzględnić wpływy z ekstrakcji i oczyszczania. Poziom zgłaszania należy ustalić co najmniej o współczynnik 3 powyżej ślepej próbki proceduralnej.

7.2. *Stosowanie próbek referencyjnych*

7.2.1. Próbki referencyjne reprezentują matrycę próbki, profile kongenerów i zakresy stężeń dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.

7.2.2. Do każdej serii badań włącza się ślepą próbę matrycową lub, jeżeli to niemożliwe, ślepą próbę proceduralną oraz próbkę referencyjną na najwyższym dopuszczalnym poziomie lub na poziomie reagowania. Próbki te muszą zostać ekstrahowane i zbadane w tym samym czasie w identycznych warunkach. Próbka referencyjna musi dawać wyraźnie podwyższoną odpowiedź w porównaniu ze ślepą próbą, gwarantując w ten sposób przydatność badania. Próbki te można zastosować do korekty ślepej próby i korekty odzysku.

7.2.3. Próbki referencyjne wybrane do przeprowadzenia korekty odzysku muszą być reprezentatywne dla próbek badanych, co oznacza, że profile kongenerów nie mogą prowadzić do niedoszacowania poziomów.

7.2.4. Można włączyć dodatkowe próbki referencyjne zawierające np. 0,5- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania, aby wykazać właściwą skuteczność badania – w zakresie zainteresowania – do celów kontroli najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Próbki te można zastosować łącznie do obliczania poziomów BEQ w próbkach badanych (zob. pkt 7.1.2.2).

▼M6

7.3. *Oznaczenie wartości odcięcia*

Należy ustalić relację między wynikami bioanalitycznymi wyrażonymi w BEQ a wynikami metody potwierdzającej wyrażonymi w TEQ (np. w drodze eksperymentów kalibracji przy zastosowaniu dopasowanej matrycy, z użyciem próbek referencyjnych wzbogaconych o 0-, 0,5-, 1- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu przy 6 powtórzeniach na każdym poziomie (n = 24). Z tej relacji można oszacować współczynniki korekcji (ślepa próba i odzysk), jednak należy je sprawdzić zgodnie z pkt 7.2.2.

Wartości odcięcia należy ustalić dla decyzji o zgodności próbki z najwyższymi dopuszczalnymi poziomami lub dla celów kontroli poziomów reagowania, jeżeli ma to znaczenie, przy odpowiednich najwyższych dopuszczalnych poziomach lub poziomach reagowania ustanowionych dla PCDD/F i dla dioksynopodobnych PCB osobno albo dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB. Są one reprezentowane przez *dolną* granicę rozkładu wyników bioanalitycznych (skorygowaną o wynik badania próbki ślepej i odzysk), odpowiadającą decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej w oparciu o 95 % poziom ufności, zakładając wskaźnik liczby wyników fałszywie ujemnych na poziomie < 5 % oraz RSD_R < 25 %. Decyzyjna wartość graniczna metody potwierdzającej to najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Wartość odcięcia (w BEQ) można obliczyć według jednego ze sposobów podanych w pkt 7.3.1, 7.3.2 oraz 7.3.3 (zob. rysunek 1).

7.3.1. Zastosowanie *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej

$$\text{wartość odcięcia} = BEQ_{DL} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2}\sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2/Q_{xx}}$$

gdzie:

BEQ_{DL} wartość BEQ odpowiadająca decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej będącej najwyższym dopuszczalnym poziomem, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru

$s_{y,x}$ odchylenie standardowe reszt

$t_{\alpha,f=m-2}$ czynnik Studenta (α = 5 %, f = stopnie swobody, jednostronne)

m całkowita liczba punktów kalibracji (indeks j)

n liczba powtórzeń na każdym poziomie

x_i stężenie próbki (w TEQ) w punkcie kalibracji i określone metodą potwierdzającą

$\bar{x}$ średnia stężeń (w TEQ) wszystkich próbek kalibracji

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^{m}(x_i - \bar{x})^2 \text{ parametr kwadratu sumy, } i = \text{ indekspunktu kalibracji i}$$

7.3.2. Obliczenie z wyników bioanalitycznych (skorygowanych o próbkę ślepą i odzysk) wielokrotnych analiz próbek (n≥ 6) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych przy odpowiadającej średniej wartości BEQ:

$$\text{Wartość odcięcia} = BEQ_{DL} - 1{,}64 \times SD_R$$

gdzie:

SD_R odchylenie standardowe wyników testu biologicznego przy BEQ_{DL}, mierzone w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej

▼**M6**

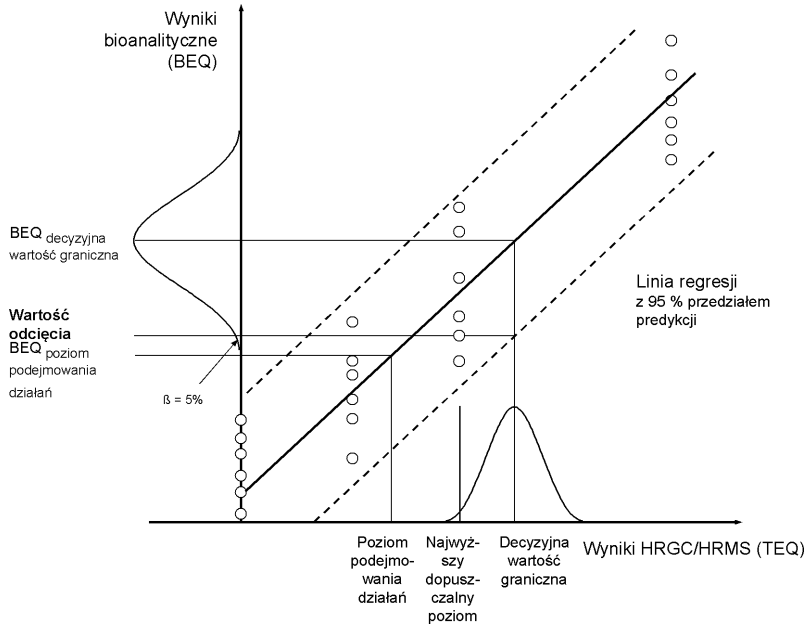
7.3.3. Obliczenie jako średniej wartości wyników bioanalitycznych (w BEQ, skorygowanych o próbę ślepą i odzysk) z wielokrotnej analizy próbek (n ≥ 6) zanieczyszczonych na poziomie 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania, oparte na obserwacji, że ten poziom będzie mieścił się w granicach odcięcia oznaczonych zgodnie z pkt 7.3.1 lub 7.3.2:

Obliczenie wartości odcięcia w oparciu o 95 % przedział ufności przy założeniu wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych na poziomie < 5 % oraz RSD_R < 25 %:

1) z *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej;

2) z wielokrotnych analiz próbek (n ≥ 6) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych (reprezentowana na rysunku przez krzywą dzwonową) przy odpowiadającej średniej wartości BEQ.

Rysunek 1



7.3.4. Ograniczenia wartości odcięcia:

Wartości odcięcia oparte na BEQ obliczone z RSD_R uzyskanego podczas walidacji przy zastosowaniu ograniczonej liczby próbek o różnych profilach matryc/kongenerów mogą przekraczać najwyższe dopuszczalne poziomy lub poziomy reagowania oparte na TEQ ze względu na lepszą precyzję niż precyzja osiągana rutynowo, kiedy trzeba kontrolować nieznane spektrum możliwych profili kongenerów. W takich przypadkach wartości odcięcia należy obliczać z RSD_R = 25 % lub należy wybrać 2/3 wartości najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania.

7.4. *Parametry skuteczności metody*

7.4.1. Ponieważ w metodach bioanalitycznych niemożliwe jest stosowanie wzorców wewnętrznych, należy przeprowadzić badania powtarzalności metod bioanalitycznych pozwalające na uzyskanie informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej serii badań i między tymi seriami. Powtarzalność powinna być na poziomie poniżej 20 %, a odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna – poniżej 25 %. Wyniki te powinny opierać się na obliczonych poziomach w BEQ po korekcie próby ślepej i odzysku.

▼M6

7.4.2. Jako część procesu walidacji należy wykazać, że badania pozwalają na odróżnienie między próbą ślepą a poziomem wartości odcięcia, umożliwiając identyfikację próbek powyżej odpowiadającej wartości odcięcia (zob. pkt 7.1.2).

7.4.3. Należy zdefiniować docelowe związki, możliwe interferencje oraz najwyższy dopuszczalny poziom sygnału próby ślepej.

7.4.4. Procent odchylenia standardowego w odpowiedzi lub stężeniu obliczonym z odpowiedzi (możliwy tylko w zakresie roboczym) potrójnego oznaczenia ekstraktu próbki nie może przekraczać 15 %.

7.4.5. Do oceny skuteczności metody bioanalitycznej w stałym okresie należy zastosować nieskorygowane wyniki próbek referencyjnych wyrażone w BEQ (próbka ślepa i najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania).

7.4.6. Wykresy kontroli jakości dla ślepej próbki proceduralnej i każdego typu próbki referencyjnej należy zarejestrować i sprawdzić, aby upewnić się, że skuteczność analityczna jest zgodna z wymogami, w szczególności ślepych próbek proceduralnych w odniesieniu do wymaganej minimalnej różnicy między dolną granicą zakresu roboczego oraz dla próbek referencyjnych w odniesieniu do odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Ślepe próbki proceduralne muszą być dobrze kontrolowane, aby uniknąć wyników fałszywie ujemnych podczas odejmowania.

7.4.7. Należy zgromadzić wyniki z analizy metodami potwierdzającymi podejrzanych próbek oraz 2–10 % próbek ujemnych (co najmniej 20 próbek na matrycę) i zastosować je do oceny skuteczności metody przesiewowej oraz związku między BEQ i TEQ. Tę bazę danych można zastosować do ponownej oceny wartości odcięcia stosowanej do rutynowych próbek dla zwalidowanych matryc.

7.4.8. Skuteczność metody można także wykazać przez uczestnictwo w badaniach biegłości. Wyniki z próbek analizowanych w badaniach biegłości, obejmujących zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu, mogą zostać włączone do oceny wskaźnika ilości wyników fałszywie ujemnych, jeżeli laboratorium jest w stanie wykazać skuteczność metody. Próbki powinny obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.

7.4.9. Podczas incydentów można ponownie ocenić wartości odcięcia odzwierciedlające konkretne profile matryc i kongenerów danego incydentu.

8. **Przedstawianie wyników**

8.1. *Metody potwierdzające*

8.1.1. Wyniki analiz muszą zawierać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB, przy czym podaje się wartości TEQ zgodnie z metodą zerową, metodą granicy oznaczalności i metodą połowy granicy oznaczalności, aby zawrzeć w sprawozdaniu na temat wyników maksymalną ilość informacji i umożliwić tym samym dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.

8.1.2. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

▼M6

8.1.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 6.2.5, lub gdy przekroczono najwyższy dopuszczalny poziom (w tym przypadku wartości odzysku dla jednej z dwóch analiz powtórnych), a w pozostałych przypadkach na żądanie.

8.1.4. Ponieważ przy ustalaniu zgodności próbki uwzględnia się niepewność rozszerzoną pomiaru, należy podać ten parametr. W związku z powyższym wyniki badań należy podawać jako x +/– U, gdzie x oznacza wynik analizy, a U niepewność rozszerzoną pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, co daje poziom ufności około 95 %. W przypadku odrębnego oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB należy zastosować sumę szacowanej niepewności rozszerzonej dla odrębnych wyników analitycznych dla PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odniesieniu do sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

8.1.5. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.

8.2. *Bioanalityczne metody przesiewowe*

8.2.1. Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako ujemny lub podejrzany o bycie dodatnim („podejrzany”).

8.2.2. Ponadto można podać orientacyjny wynik dla PCDD/F lub dla dioksynopodobnych PCB wyrażony w BEQ, a nie w TEQ.

8.2.3. Próbki dające odpowiedź poniżej poziomu zgłaszania należy oznaczyć jako „poniżej poziomu zgłaszania”. Próbki dające odpowiedź powyżej zakresu roboczego wskazuje się jako „przekraczające zakres roboczy”, a poziom odpowiadający górnej granicy zakresu roboczego podaje się w BEQ.

8.2.4. W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania, na którym opiera się ocena.

8.2.5. W sprawozdaniu należy podać zastosowany rodzaj badania, podstawowe zasady badania i rodzaj kalibracji.

8.2.6. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

8.2.7. W przypadku próbek podejrzanych o bycie dodatnimi, sprawozdanie musi zawierać uwagę o działaniach, jakie należy podjąć. Stężenie PCDD/F oraz sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach, które zawierają ich podwyższone poziomy, trzeba oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.

8.2.8. Wyniki dodatnie zgłasza się wyłącznie w wyniku analizy potwierdzającej.

8.3. *Fizykochemiczne metody przesiewowe*

8.3.1. Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako ujemny lub podejrzany o bycie dodatnim („podejrzany”).

8.3.2. W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania, na którym opiera się ocena.

▼M6

8.3.3. Ponadto można podać poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i dioksynopodobnych PCB oraz wartości TEQ przedstawione zgodnie z metodą zerową, metodą granicy oznaczalności i metodą połowy granicy oznaczalności. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.

8.3.4. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 6.2.5, lub gdy przekroczono najwyższy dopuszczalny poziom (w tym przypadku wartości odzysku dla jednej z dwóch analiz powtórnych), a w pozostałych przypadkach na żądanie.

8.3.5. W sprawozdaniu należy podać zastosowaną metodę GC-MS.

8.3.6. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

8.3.7. W przypadku próbek podejrzanych o bycie dodatnimi, sprawozdanie musi zawierać uwagę o działaniach, jakie należy podjąć. Stężenie PCDD/F oraz sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach, które zawierają ich podwyższone poziomy, trzeba oznaczyć lub potwierdzić przy zastosowaniu metody potwierdzającej.

8.3.8. Niezgodność można stwierdzić dopiero po przeprowadzeniu analizy potwierdzającej.

ROZDZIAŁ III

Przygotowanie próbek i wymagania dotyczące metod analizy stosowanych w urzędowej kontroli poziomów niedioksynopodobnych PCB w paszy

1. **Zakres stosowania**

Wymogi ustanowione w niniejszym rozdziale należy stosować w przypadku paszy analizowanej do celów urzędowych kontroli poziomów niedioksynopodobnych PCB oraz w odniesieniu do przygotowywania próbek oraz wymogów analitycznych do innych celów regulacyjnych, co obejmuje kontrole wykonywane przez podmiot działający na rynku pasz w celu zapewnienia zgodności z przepisami rozporządzenia (WE) nr 183/2005.

2. **Możliwe metody oznaczania**

Chromatografia gazowa/detekcja wychwytu elektronów (GC-ECD), GC-LMRS, GC-MS/MS, GC-HRMS lub metody równoważne.

3. **Identyfikacja i potwierdzenie analitów będących przedmiotem zainteresowania**

3.1. Względny czas retencji w stosunku do wzorców wewnętrznych lub referencyjnych (akceptowane odchylenia +/– 0,25 %).

3.2. Rozdzielenie metodą chromatografii gazowej niedioksynopodobnych PCB od substancji przeszkadzających, przede wszystkich wymywających PCB, w szczególności jeżeli poziomy próbek mieszczą się w zakresie granic ustanowionych w przepisach i jeżeli należy potwierdzić niezgodność ([1]).

3.3. Wymagania dla technik GC-MS

Monitorowanie co najmniej następującej liczby jonów molekularnych lub jonów charakterystycznych w klastrze molekularnym:

a) dwóch jonów o specyficznej wartości dla HRMS;

([1]) Kongenery, które są często wymywane, to np. PCB 28/31, PCB 52/69 oraz PCB 138/163/164. W przypadku GC-MS należy rozważyć także ewentualne interferencje z fragmentów wyżej chlorowanych kongenerów.

▼M6

b) trzech jonów o specyficznej wartości dla LRMS;

c) dwóch określonych jonów macierzystych, z których każdy posiada jeden określony odpowiadający mu przejściowy jon potomny dla MS-MS.

Najwyższa dopuszczalna tolerancja dla stosunków nadmiaru dla wybranych fragmentów mas:

Względne odchylenie stosunku nadmiaru wybranych fragmentów mas z teoretycznego nadmiaru lub wzorca kalibracji dla jonu docelowego (monitorowany najbardziej nadmiarowy jon) i jonów kwalifikowanych: ± 15 %.

3.4. Wymagania dla technik GC-ECD

Potwierdzenie wyników przekraczających najwyższy dopuszczalny poziom przy pomocy dwóch kolumn GC z fazami stacjonarnymi o różnej polarności.

4. **Wykazanie skuteczności metody**

Walidacja skuteczności metody w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu (0,5- do 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu) przy akceptowanym współczynniku zmienności dla powtarzanej analizy (zob. wymagania dotyczące precyzji pośredniej w pkt 9).

5. **Granica oznaczalności**

Suma LOQ ([1]) niedioksynopodobnych PCB nie może być wyższa niż jedna trzecia najwyższego dopuszczalnego poziomu ([2]).

6. **Kontrola jakości**

Regularne analizy próbki ślepej, analiza próbek wzbogaconych, próbki do kontroli jakości, uczestnictwo w międzylaboratoryjnych badaniach odpowiednich matryc.

7. **Kontrola poziomów odzysku**

7.1. Stosowanie właściwych wzorców wewnętrznych o właściwościach fizycznych i chemicznych porównywalnych z właściwościami analitów będących przedmiotem zainteresowania.

7.2. Dodanie wzorców wewnętrznych:

dodanie do produktów (przed ekstrakcją i oczyszczaniem).

7.3. Wymagania dla metod z wykorzystaniem wszystkich sześciu kongenerów niedioksynopodobnych PCB znakowanych izotopowo:

a) korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych;

b) poziomy odzysku wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo muszą mieścić się między 60 a 120 %;

c) akceptuje się niższe lub wyższe poziomy odzysku dla poszczególnych kongenerów, których udział w sumie niedioksynopodobnych PCB wynosi poniżej 10 %.

7.4. Wymagania dla metod niewykorzystujących wszystkich sześciu wzorców wewnętrznych znakowanych izotopowo ani innych wzorców wewnętrznych:

a) kontrola odzysku wzorców wewnętrznych dla każdej próbki;

([1]) W stosownych przypadkach korzysta się z zasad opisanych w dokumencie „Guidance Document on the Estimation of LOD and LOQ for Measurements in the Field of Contaminants in Feed and Food" (Wytyczne dotyczące szacowania LOD i LOQ na potrzeby pomiarów w dziedzinie zanieczyszczeń w paszy i żywności) (http://ec.europa.eu/food/safety/animal-feed_en).

([2]) Zaleca się, aby w próbce znajdował się niższy poziom odczynnika próbki ślepej względem poziomu zanieczyszczenia. Laboratorium odpowiada za kontrolowanie zróżnicowania poziomów próbki ślepej, w szczególności jeżeli poziomy próbki ślepej są odejmowane.

▼M6

b) poziomy odzysku wzorców wewnętrznych między 60 a 120 %;

c) korekta wyników dla poziomów odzysku wzorców wewnętrznych.

7.5. Poziomy odzysku kongenerów nieznakowanych należy sprawdzić przez próbki wzbogacone lub kontrolę jakości próbek o stężeniach w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu. Poziomy odzysku tych kongenerów należy uznać za akceptowalne, jeżeli mieszczą się pomiędzy 60 a 120 %.

8. **Wymagania dotyczące laboratoriów**

Zgodnie z przepisami rozporządzenia (WE) nr 882/2004 laboratoria muszą być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z wytyczną ISO 58, aby zapewnić, że przy przeprowadzaniu analiz stosują system zapewniania jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025. Ponadto w stosownych przypadkach należy stosować zasady opisane w wytycznych technicznych dotyczących szacowania niepewności pomiaru i granic oznaczalności w odniesieniu do analizy PCB ([1]).

9. **Parametry skuteczności metody: kryteria dla sumy niedioksynopodobnych PCB na najwyższym dopuszczalnym poziomie**

	Spektrometria mas z rozcieńczeniem izotopowym ([1])	Inne techniki
Prawdziwość	– 20 do + 20 %	– 30 do + 30 %
Precyzja pośrednia (RSD %)	≤ 15 %	≤ 20 %
Różnica między obliczeniem uzyskanym metodą granicy oznaczalności a obliczeniem uzyskanym metodą zerową	≤ 20 %	≤ 20 %

([1]) Wymagane wykorzystanie wszystkich sześciu analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C jako wzorców wewnętrznych.

10. **Przedstawianie wyników**

10.1. Wyniki analiz muszą zawierać poziomy poszczególnych niedioksynopodobnych PCB oraz sumę kongenerów tych PCB przedstawionych zgodnie z metodą zerową, metodą granicy oznaczalności i metodą połowy granicy oznaczalności, aby zawrzeć w sprawozdaniu na temat wyników maksymalną ilość informacji i umożliwić tym samym dokonanie interpretacji wyników zgodnie z konkretnymi wymaganiami.

10.2. Sprawozdanie takie musi zawierać opis metody zastosowanej do ekstrakcji PCB.

10.3. Należy udostępnić poziomy odzysku poszczególnych wzorców wewnętrznych, jeżeli te poziomy odzysku znajdują się poza zakresem, o którym mowa w pkt 7, lub gdy przekroczono najwyższy dopuszczalny poziom, a w pozostałych przypadkach na żądanie.

10.4. Ponieważ przy ustalaniu zgodności próbki uwzględnia się niepewność rozszerzoną pomiaru, należy podać również ten parametr. W związku z powyższym wyniki badań należy podawać jako x +/– U, gdzie x oznacza wynik analizy, a U niepewność rozszerzoną pomiaru, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, co daje poziom ufności około 95 %.

10.5. Wyniki należy wyrazić w tych samych jednostkach i z co najmniej tą samą liczbą cyfr znaczących, co najwyższe dopuszczalne poziomy określone w dyrektywie 2002/32/WE.

([1]) Zob. przypis 12.

▼M2

ZAŁĄCZNIK VI

METODY ANALIZY DOTYCZĄCE OZNACZANIA SKŁADNIKÓW POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO DO CELÓW URZĘDOWEJ KONTROLI PASZ

1. CEL I ZAKRES

Składniki pochodzenia zwierzęcego w paszach oznacza się metodą mikroskopii świetlnej lub łańcuchową reakcją polimerazy (PCR), zgodnie z przepisami określonymi w niniejszym załączniku.

Te dwie metody umożliwiają wykrycie występowania składników pochodzenia zwierzęcego w materiałach paszowych i mieszankach paszowych. Nie umożliwiają one jednak obliczenia ilości takich składników w materiałach paszowych i mieszankach paszowych. W przypadku obu metod granica wykrywalności wynosi poniżej 0,1 % (w/w).

Metoda PCR umożliwia określenie grupy taksonomicznej składników pochodzenia zwierzęcego obecnych w materiałach paszowych i mieszankach paszowych.

Metody te stosuje się do kontroli stosowania zakazów ustanowionych w art. 7 ust. 1 i w załączniku IV do rozporządzenia (WE) nr 999/2001 oraz w art. 11 ust. 1 rozporządzenia (WE) nr 1069/2009.

W zależności od rodzaju badanej paszy metody te mogą być stosowane, w ramach jednego protokołu operacyjnego, samodzielnie albo wspólnie, zgodnie ze standardowymi procedurami operacyjnymi, ustanowionymi przez laboratorium referencyjne UE ds. białek zwierzęcych w paszach (EURL-AP) i opublikowanymi na jego stronie internetowej ([1]).

2. METODY

2.1. **Metoda mikroskopii świetlnej**

2.1.1. ►M7 *Zasada*

Składniki pochodzenia zwierzęcego, które mogą być obecne w materiałach paszowych i mieszankach paszowych przesłanych do analizy, są identyfikowane na podstawie typowych i mikroskopowo identyfikowalnych cech charakterystycznych, np. włókien mięśniowych i innych cząstek tkanki mięsnej, chrząstki, kości, rogów, włosów, szczeciny, krwi, globulek mleka, kryształów laktozy, piór, skorup jaj, ości ryb i łusek. ◄

2.1.2. *Odczynniki i sprzęt*

2.1.2.1. Odczynniki

2.1.2.1.1. Odczynnik zagęszczający

2.1.2.1.1.1. Tetrachloroetylen (gęstość 1,62)

2.1.2.1.2. Odczynnik barwiący

2.1.2.1.2.1. Roztwór czerwieni alizarynowej (rozcieńczyć 2,5 ml 1 M kwasu chlorowodorowego w 100 ml wody i dodać do tego roztworu 200 mg czerwieni alizarynowej)

2.1.2.1.3. Środki zamykające

2.1.2.1.3.1. Ług (NaOH 2,5 %, w/v lub KOH 2,5 %, w/v)

([1]) http://eurl.craw.eu/

▼M2

2.1.2.1.3.2. ►M7 Glicerol (nierozcieńczony, lepkość: 1 490 cP) lub środek zamykający o równoważnych właściwościach do przygotowania nietrwałych preparatów mikroskopowych ◄

2.1.2.1.3.3. Norland ® Optical Adhesive 65 (lepkość: 1 200 cP) lub żywica o równoważnych właściwościach do przygotowania trwałych preparatów mikroskopowych

2.1.2.1.4. Środki zamykające o właściwościach barwiących

2.1.2.1.4.1. Płyn Lugola (rozpuścić 2 g jodku potasu w 100 ml wody i dodać 1 g jodu, często wstrząsając)

2.1.2.1.4.2. Odczynnik cystynowy (2 g octanu ołowiu, 10 g NaOH/100 ml wody)

2.1.2.1.4.3. Odczynnik Fehlinga (sporządzony przed użyciem z równych części (1/1) roztworów podstawowych A i B. Roztwór A: rozpuścić 6,9 g pentahydratu siarczanu miedzi(II) w 100 ml wody. Roztwór B: rozpuścić 34,6 g tetrahydratu winianu potasowo-sodowego i 12 g NaOH w 100 ml wody)

2.1.2.1.4.4. Tetrametylobenzydyna/nadtlenek wodoru. (rozpuścić 1 g 3,3',5,5' tetrametylobenzydyny (TMB) w 100 ml kwasu octowego lodowatego i 150 ml wody. Przed użyciem zmieszać 4 części tego roztworu TMB z 1 częścią 3 % nadtlenku wodoru)

2.1.2.1.5. Odczynniki chemiczne do płukania

2.1.2.1.5.1. Etanol ≥ 96 % (techniczny)

2.1.2.1.5.2. Aceton (techniczny)

2.1.2.1.6. Odczynnik bielący

2.1.2.1.6.1. Handlowy roztwór podchlorynu sodowego (9–14 % aktywnego chloru)

2.1.2.2. Sprzęt

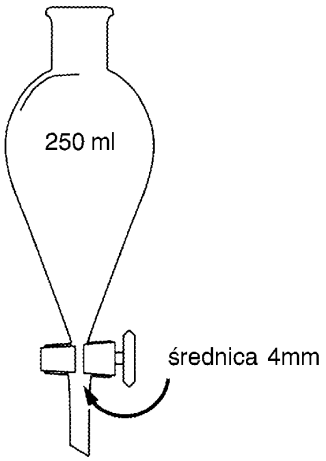
2.1.2.2.1. Waga analityczna ważąca z dokładnością do 0,001 g

2.1.2.2.2. ►M7 Sprzęt do rozdrabniania: nóż lub młynek wirnikowy. Jeżeli stosowany jest młynek wirnikowy, sita do młynka ≤ 0,5 mm są zakazane ◄

2.1.2.2.3. ►M7 Sita o kwadratowych oczkach o szerokości 0,25 mm i 1 mm. Z wyjątkiem wstępnego przesiewu próbki średnica sit nie powinna przekraczać 10 cm, aby uniknąć strat materiałów. Kalibracja sit nie jest wymagana ◄

2.1.2.2.4. Szklany stożkowy rozdzielacz o pojemności 250 ml z kranem z teflonu lub szkła szlifowanego u podstawy stożka. Średnica otworu kranu musi wynosić ≥ 4 mm. Alternatywnie można użyć zlewki osadowej ze stożkowym dnem, pod warunkiem że laboratorium wykazało, iż poziomy wykrywalności są równoważne z poziomami uzyskanymi przy użyciu szklanego rozdzielacza.

Rozdzielacz



▼M2

2.1.2.2.5. Mikroskop stereoskopowy umożliwiający powiększenie końcowe w zakresie co najmniej 6,5×–40×

2.1.2.2.6. Mikroskop złożony, z jasnym polem widzenia, umożliwiający powiększenie końcowe w zakresie co najmniej 100×–400×. Dodatkowo można wykorzystać światło spolaryzowane i kontrast interferencyjno-różniczkowy

2.1.2.2.7. Standardowe szkło laboratoryjne

2.1.2.2.8. Sprzęt do przygotowania preparatów mikroskopowych: podstawowe szkiełka mikroskopowe, szkiełka podstawowe z wgłębieniem, szkiełka nakrywkowe (20 × 20 mm), pincety, cienka łopatka

▼M7

2.1.2.2.9. Suszarka laboratoryjna

2.1.2.2.10. Wirówka

2.1.2.2.11. Bibuła filtracyjna: filtr celulozowy jakościowy (rozmiar porów 4–11 μm)

▼M2

2.1.3. *Pobieranie i przygotowywanie próbek*

2.1.3.1. ►M7 Pobieranie próbek

Należy użyć reprezentatywnej próbki, pobranej zgodnie z przepisami określonymi w załączniku I do niniejszego rozporządzenia. ◄

2.1.3.2. Niezbędne środki ostrożności

W celu uniknięcia w laboratorium zanieczyszczenia krzyżowego wszelki sprzęt wielokrotnego użytku należy starannie czyścić przed użyciem. Części rozdzielacza muszą być demontowane przed czyszczeniem. Części rozdzielacza oraz szkło laboratoryjne należy wstępnie wymyć ręcznie, a następnie wymyć w zmywarce. Sita czyści się z użyciem szczotki o twardym syntetycznym włosiu. Po przesianiu substancji tłuszczowej, np. mączki rybnej, zaleca się ostateczne czyszczenie sit acetonem i sprężonym powietrzem.

2.1.3.3. Przygotowanie próbek innych niż tłuszczu lub oleju

2.1.3.3.1. ►M7 Suszenie próbek: próbki o wilgotności > 14 % muszą być przed obróbką wysuszone zgodnie z załącznikiem III do niniejszego rozporządzenia. ◄

2.1.3.3.2. ►M7 Wstępny przesiew próbki: w celu zebrania informacji na temat możliwego zanieczyszczenia środowiskowego pasz zaleca się wstępne przesianie pasz granulowanych i ziarnistych przez sito o oczkach 1 mm, a następnie przygotowanie i analizę dwóch uzyskanych frakcji, które należy traktować jako odrębne próbki, i przedstawienie wyników dotyczących tych dwóch frakcji. ◄

2.1.3.3.3. Pobieranie podpróbek i rozdrabnianie: z co najmniej 50 g próbki należy utworzyć podpróbkę do analizy, a następnie rozdrobnić.

2.1.3.3.4. Ekstrakcja i przygotowanie osadu: porcję rozdrobnionej podpróbki o masie 10 g (z dokładnością do 0,01 g) umieszcza się w rozdzielaczu lub zlewce osadowej ze stożkowym dnem i dodaje się 50 ml tetrachloroetylenu. Porcję umieszczoną w rozdzielaczu ogranicza się do 3 g w przypadku mączki rybnej lub innych czystych produktów zwierzęcych, składników mineralnych lub premiksów, które wytwarzają więcej niż 10 % osadu. Mieszaniną należy wstrząsać energicznie przez co najmniej 30 s i ostrożnie dodać co najmniej kolejne 50 ml tetrachloroetylenu, zmywając wewnętrzną powierzchnię rozdzielacza, aby usunąć wszelkie przylegające cząstki. Otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na co najmniej 5 minut przed oddzieleniem osadu poprzez otwarcie kranu.

W przypadku użycia zlewki osadowej ze stożkowym dnem mieszaninę należy energicznie mieszać przez co najmniej 15 sekund, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując co najmniej 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Mieszaninę należy pozostawić na 3 minuty, a następnie mieszać ponownie przez 15 sekund, a wszelkie cząstki przylegające do ścianek zlewki należy ostrożnie zmyć z wewnętrznej powierzchni, stosując co najmniej 10 ml czystego tetrachloroetylenu. Otrzymaną mieszaninę należy pozostawić na co najmniej 5 minut, a następnie usunąć płynną frakcję poprzez staranną dekantację, przy czym należy uważać, aby nie utracić części osadu.

▼M7

Osad należy zebrać na bibule filtracyjnej umieszczonej w lejku, aby umożliwić oddzielenie pozostałego trójchloroetylenu, unikając osadzania się tłuszczu w osadzie. Osad należy osuszyć. Zaleca się następnie zważyć osad (z dokładnością do 0,001 g) w celu kontroli etapu sedymentacji. Na koniec osad należy przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje, chyba że przesiewania nie uznaje się za konieczne.

▼M2

2.1.3.3.5. Ekstrakcja i przygotowanie flotatu: po odzyskaniu osadu metodą opisaną powyżej, w rozdzielaczu powinny pozostać dwie fazy: faza płynna składająca się z tetrachloroetylenu oraz faza stała utworzona z materiału flotacyjnego. Ta faza stała jest flotatem i należy ją odzyskać poprzez całkowite odlanie tetrachloroetylenu z rozdzielacza przez otwarcie kranu. Poprzez odwrócenie rozdzielacza flotat przenosi się na dużą płytkę Petriego i suszy powietrzem w okapie wyciągowym. Jeżeli więcej niż 5 % flotatu stanowią cząstki > 0,50 mm, należy go przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

2.1.3.3.6. Przygotowanie surowca: należy przygotować co najmniej 5 g porcję rozdrobnionej podpróbki. Jeżeli więcej niż 5 % materiału stanowią cząstki > 0,50 mm, należy go przesiać przez sito o oczkach 0,25 mm i zbadać dwie uzyskane frakcje.

2.1.3.4. Przygotowanie próbek składających się z tłuszczu lub oleju

Do przygotowania próbek składających się z tłuszczu lub oleju stosuje się następujący protokół:

— jeżeli tłuszcz znajduje się w stanie stałym, należy go ogrzewać w suszarce aż do uzyskania postaci płynnej,

— pipetą przenieść 40 ml tłuszczu lub oleju z dna próbki do probówki wirówkowej,

— wirować przez 10 minut przy 4 000 obr./min,

— jeżeli tłuszcz jest zestalony po odwirowaniu, należy go ogrzewać w suszarce aż do uzyskania postaci płynnej,

— ponownie wirować przez 5 minut przy 4 000 obr./min,

— małą łyżką lub łopatką laboratoryjną przenieść połowę zdekantowanych zanieczyszczeń na szkiełka mikroskopowe w celu zbadania; jako środek zamykający zaleca się glicerynę,

— pozostałe zanieczyszczenia wykorzystuje się do przygotowania osadu w sposób opisany w pkt 2.1.3.3.

2.1.3.5. Stosowanie odczynników barwiących

W celu ułatwienia poprawnej identyfikacji składników pochodzenia zwierzęcego, podczas przygotowania próbki laborant może używać odczynników barwiących zgodnie z wytycznymi wydanymi przez EURL-AP i opublikowanymi na jego stronie internetowej.

W przypadku użycia do barwienia osadu roztworu czerwieni alizarynowej stosuje się następujący protokół:

— wysuszony osad przenieść do szklanej probówki i dwukrotnie przepłukać stosując około 5 ml etanolu (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, rozpuszczalnik pozostawić na około 1 min 30 s do osadzenia i następnie go odlać,

— osad wybielić przez dodanie co najmniej 1 ml roztworu podchlorynu sodowego. Pozwolić na przebieg reakcji przez 10 minut. Probówkę napełnić wodą, osad musi osadzać się od 2 do 3 minut, a wodę z zawieszonymi cząstkami delikatnie odlać,

▼M2

— osad przepłukać jeszcze dwukrotnie około 10 ml wody (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, pozostawić do osadzenia i odlać wodę),

— dodać 2 do 10 kropli roztworu czerwieni alizarynowej, a następnie mieszaninę wymieszać wstrząsarką. Pozwolić na przebieg reakcji przez 30 s i dwukrotnie przepłukać zabarwiony osad stosując około 5 ml etanolu, a następnie przepłukać go raz acetonem (za każdym razem stosować wstrząsarkę przez 30 s, rozpuszczalnik pozostawić na około 1 min do osadzenia i następnie go odlać),

— zabarwiony osad należy osuszyć.

2.1.4. *Badanie mikroskopowe*

2.1.4.1. Przygotowanie preparatów

▼M7

Preparaty mikroskopowe przygotowuje się z osadu i, w zależności od wyboru laboranta, z flotatu albo z surowca.

▼M2

Należy przygotować wystarczającą liczbę preparatów w celu zapewnienia pełnej realizacji protokołu badawczego określonego w pkt 2.1.4.2.

Preparaty mikroskopowe montuje się przy użyciu odpowiedniego środka zamykającego zgodnie ze standardową procedurą operacyjną ustaloną przez EURL-AP i opublikowaną na jego stronie internetowej. Preparaty należy przykryć szkiełkami nakrywkowymi.

▼M7

2.1.4.2. Diagram obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszankach paszowych i materiałach paszowych

Preparaty mikroskopowe bada się zgodnie z diagramami obserwacji określonymi na schematach 1 i 2.

Przy użyciu mikroskopu złożonego przeprowadza się obserwację mikroskopową osadu i, w zależności od wyboru laboranta, flotatu lub surowca. W przypadku frakcji gruboziarnistych poza mikroskopem złożonym można dodatkowo użyć mikroskopu stereoskopowego. Każdy preparat należy obserwować w całości, stosując różne powiększenia. Szczegółowe wyjaśnienia dotyczące sposobu korzystania z diagramów obserwacji są szczegółowo określone w standardowej procedurze operacyjnej ustalonej przez EURL-AP i opublikowanej na jego stronie internetowej.

Należy ściśle przestrzegać minimalnej liczby preparatów, jakie zgodnie z diagramami obserwacji należy obserwować na każdym etapie, chyba że cały podzielony na frakcje materiał nie pozwala osiągnąć wymaganej liczby preparatów, na przykład w przypadku, gdy nie uzyskano osadu. Nie można stosować więcej niż 6 preparatów na jedno oznaczenie do rejestrowania liczby cząstek stałych.

Jeżeli sporządza się dodatkowe preparaty na flotacie lub na surowcu z zastosowaniem bardziej specyficznego środka zamykającego o właściwościach barwiących, określonego w pkt 2.1.2.1.4, aby dokładniej scharakteryzować struktury (np. pióra, włosy, cząstki tkanki mięsnej i krwi), które wykryto przy pomocy innych środków zamykających, określonych w pkt 2.1.2.1.3, liczba cząstek stałych jest liczona na podstawie liczby preparatów na jedno oznaczenie, nieprzekraczającej 6, z uwzględnieniem dodatkowych preparatów z bardziej specyficznym środkiem zamykającym.

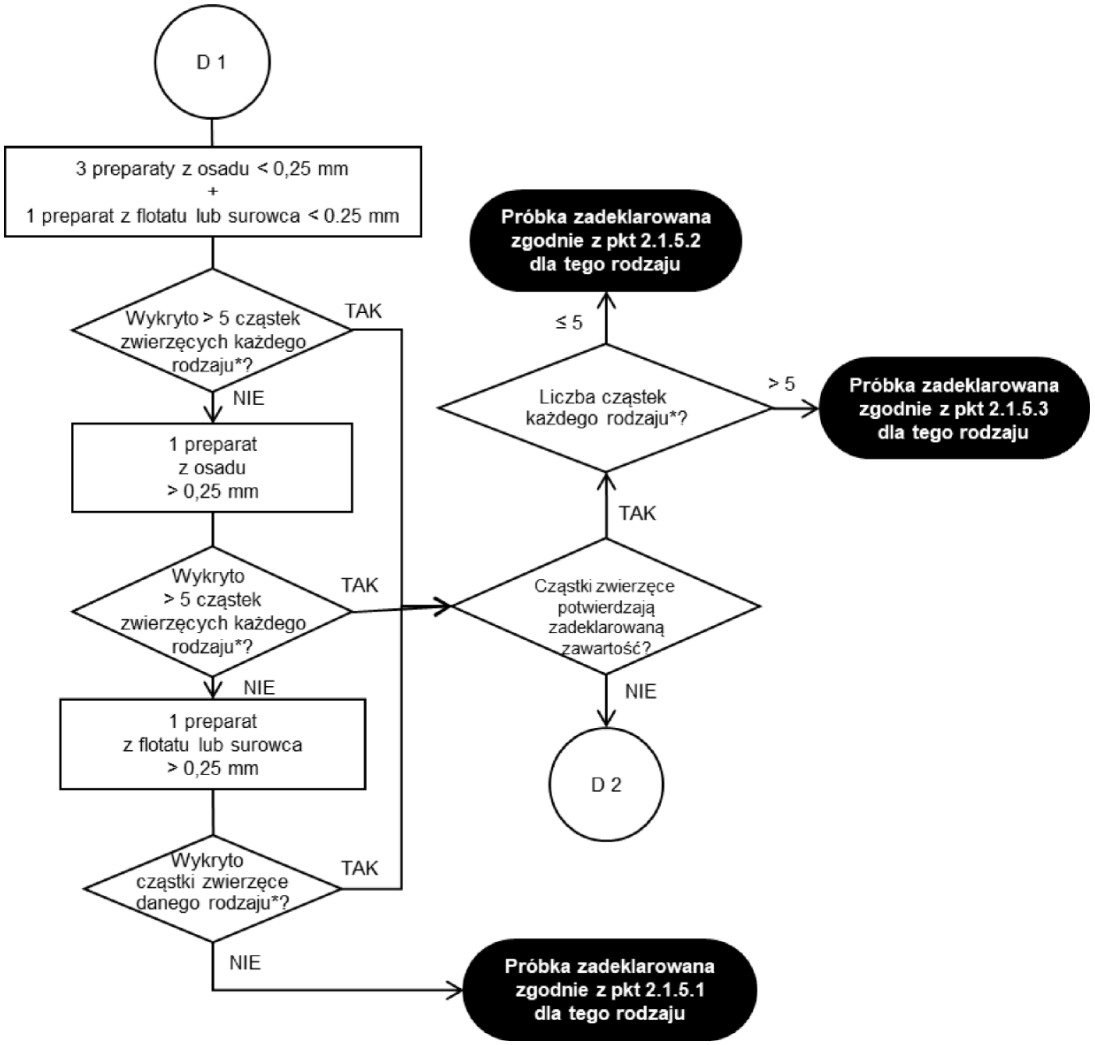
W celu ułatwienia identyfikacji rodzaju oraz pochodzenia cząstek laborant może wykorzystać narzędzia pomocnicze, takie jak systemy wspomagające podejmowanie decyzji, biblioteki obrazów oraz próbki referencyjne.

▼M7

Schemat 1

Diagram obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszankach paszowych i materiałach paszowych na potrzeby pierwszego oznaczenia

(D1 i D2 odnoszą się do pierwszego i drugiego oznaczenia; *: kręgowce lądowe, ryby)

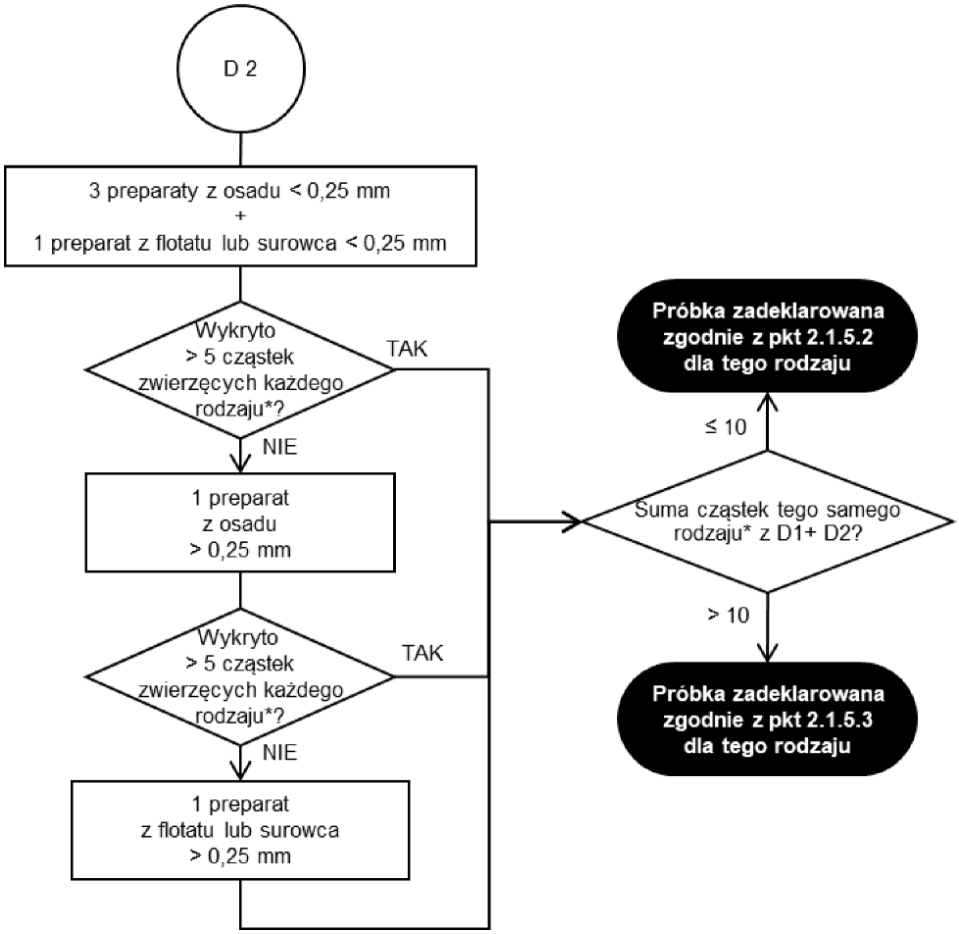


▼M7

Schemat 2

Diagram obserwacji w celu wykrycia cząstek zwierzęcych w mieszankach paszowych i materiałach paszowych na potrzeby drugiego oznaczenia

(D1 i D2 odnoszą się do pierwszego i drugiego oznaczenia; *: kręgowce lądowe, ryby)



▼M2

2.1.4.3. ►M7 Liczba oznaczeń

Oznaczenia wykonuje się na różnych podpróbkach o masie po 50 g każda.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji przedstawionym na schemacie 1 nie wykryto żadnej cząstki zwierzęcej, dodatkowe oznaczanie nie jest konieczne, a wynik analizy przekazuje się, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.1.

Jeżeli w wyniku pierwszego oznaczenia wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji przedstawionym na schemacie 1 wykryto cząstkę zwierzęcą lub cząstki zwierzęce danego rodzaju (tj. kręgowca lądowego lub ryby), a rodzaj wykrytych cząstek potwierdza deklarowaną zawartość próbki, drugie oznaczenie nie jest konieczne. Jeżeli liczba cząstek zwierzęcych danego rodzaju wykrytych podczas pierwszego oznaczenia jest wyższa niż 5, wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.3. W przeciwnym wypadku wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.2.

W innych przypadkach, w tym gdy do laboratorium nie dostarczono żadnej deklaracji zawartości, przeprowadza się drugie oznaczenie z nowej podpróbki.

Jeżeli w wyniku drugiego oznaczenia wykonanego zgodnie z diagramem obserwacji przedstawionym na schemacie 2 suma cząstek zwierzęcych danego rodzaju wykrytych podczas dwóch oznaczeń jest wyższa niż 10, wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.3. W przeciwnym wypadku wynik analizy przekazuje się dla każdego rodzaju zwierzęcia oddzielnie, stosując terminologię określoną w pkt 2.1.5.2. ◄

2.1.5. ►M7 *Przedstawianie wyników*

Przekazując wyniki, laboratorium musi podać, jakiego typu materiał poddano analizie (osad, flotat czy surowiec). W sprawozdaniu należy wyraźnie wskazać, ile oznaczeń wykonano oraz czy nie przeprowadzono przesiewu frakcji przed sporządzeniem preparatu zgodnie z pkt 2.1.3.3.4 akapit ostatni.

Sprawozdanie laboratoryjne musi zawierać co najmniej informacje o występowaniu składników pochodzących z kręgowców lądowych i z ryb.

Sprawozdania dotyczące poszczególnych przypadków należy składać w następujący sposób.

2.1.5.1. Nie wykryto żadnych cząstek zwierzęcych danego rodzaju:

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących z kręgowców lądowych.”,

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce nie wykryto żadnych cząstek pochodzących z ryb.”.

▼M2

2.1.5.2. Od 1 do 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju wykrytych po wykonaniu tylko jednego oznaczenia lub od 1 do 10 cząstek danego rodzaju wykrytych w przypadku dwóch oznaczeń (liczba wykrytych cząstek jest poniżej decyzyjnej wartości granicznej ustanowionej w standardowych procedurach operacyjnych (SOP) laboratorium referencyjnego UE ds. białek zwierzęcych w paszach (EURL-AP) i opublikowanych na jego stronie internetowej [1]):

W przypadku gdy wykonano tylko jedno oznaczenie:

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto nie więcej niż 5 cząstek pochodzących z kręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi …]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.”,

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto nie więcej niż 5 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzela …]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.”.

W przypadku gdy wykonano dwa oznaczenia:

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń nie więcej niż 10 cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi …]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.”,

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń nie więcej niż 10 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzela …]. Ta niewielka obecność jest niższa od decyzyjnej wartości granicznej ustalonej dla tej metody mikroskopowej.”.

Ponadto:

— W przypadku wstępnego przesiewu próbki w sprawozdaniu laboratoryjnym należy określić, w jakiej frakcji (sitowej, granulowanej czy ziarnistej) wykryto cząstki zwierzęce, ponieważ wykrycie cząstek zwierzęcych tylko we frakcji sitowej może wynikać z zanieczyszczenia środowiskowego.

— W przypadku wykrycia jedynie cząstek zwierzęcych, których nie można sklasyfikować ani jako kręgowce lądowe, ani jako ryby (np. włókna mięśniowe), w sprawozdaniu należy wskazać, że wykryto jedynie takie cząstki zwierzęce i że nie można wykluczyć, iż pochodzą one od kręgowców lądowych.

2.1.5.3. Wykryto więcej niż 5 cząstek zwierzęcych danego rodzaju po wykonaniu tylko jednego oznaczenia lub wykryto więcej niż 10 cząstek danego rodzaju w przypadku dwóch oznaczeń:

[1] http://eurl.craw.eu/

▼M2

W przypadku gdy wykonano tylko jedno oznaczenie:

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto więcej niż 5 cząstek pochodzących z kręgowców lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi …].”,

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto więcej niż 5 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzela …].”.

W przypadku gdy wykonano dwa oznaczenia:

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń więcej niż 10 cząstek pochodzących ze zwierząt lądowych. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [kości, chrząstki, mięśnie, sierść, rogi …].”,

— „Używając mikroskopu świetlnego, w badanej próbce wykryto podczas dwóch oznaczeń więcej niż 10 cząstek pochodzących z ryb. Cząstki zostały zidentyfikowane jako … [ości, rybie łuski, chrząstki, mięśnie, otolit, skrzela …].”.

Ponadto:

— W przypadku wstępnego przesiewu próbki w sprawozdaniu laboratoryjnym należy określić, w jakiej frakcji (sitowej, granulowanej czy ziarnistej) wykryto cząstki zwierzęce, ponieważ wykrycie cząstek zwierzęcych tylko we frakcji sitowej może wynikać z zanieczyszczenia środowiskowego.

— W przypadku wykrycia jedynie cząstek zwierzęcych, których nie można sklasyfikować ani jako kręgowce lądowe, ani jako ryby (np. włókna mięśniowe), w sprawozdaniu należy wskazać, że wykryto jedynie takie cząstki zwierzęce i że nie można wykluczyć, iż pochodzą one od kręgowców lądowych. ◀

2.2. **PCR**

2.2.1. *Zasada*

Fragmenty kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) pochodzenia zwierzęcego, które mogą się znajdować w materiałach paszowych i mieszankach paszowych, wykrywa się techniką amplifikacji genów stosując metodę PCR skierowaną na sekwencje DNA charakterystyczne dla określonych gatunków.

Metoda PCR wymaga w pierwszej kolejności etapu ekstrakcji DNA. Otrzymany w ten sposób ekstrakt DNA poddaje się później amplifikacji w celu wykrycia gatunków zwierząt uwzględnianych w badaniu.

2.2.2. *Odczynniki i sprzęt*

2.2.2.1. Odczynniki

2.2.2.1.1. Odczynniki stosowane na etapie ekstrakcji DNA

Można stosować wyłącznie odczynniki zatwierdzone przez EURL-AP i wymienione na jego stronie internetowej.

2.2.2.1.2. Odczynniki stosowane na etapie amplifikacji genów

▼M2

2.2.2.1.2.1. Startery i sondy

Można stosować wyłącznie startery i sondy z sekwencjami oligonukleotydów zatwierdzone przez EURL-AP ([1]).

2.2.2.1.2.2. Master Mix

Można stosować wyłącznie roztwory Master Mix niezawierające odczynników, które mogłyby prowadzić do fałszywych wyników z uwagi na obecność DNA zwierzęcego ([2]).

2.2.2.1.2.3. Odczynniki odkażające

2.2.2.1.2.3.1. Roztwór kwasu chlorowodorowego (0,1 N).

2.2.2.1.2.3.2. Środek bielący (roztwór podchlorynu sodowego zawierający 0,15 % aktywnego chloru)

2.2.2.1.2.3.3. Odczynniki niewykazujące działania żrącego do odkażania kosztownych urządzeń, takich jak wagi analityczne (np. DNA Erase™ produkowany przez MP Biomedicals)

2.2.2.2. Sprzęt

2.2.2.2.1.
Waga analityczna ważąca z dokładnością do 0,001 g

2.2.2.2.2. Sprzęt do rozdrabniania

2.2.2.2.3. Termocykler do przeprowadzania PCR w czasie rzeczywistym,

2.2.2.2.4. Mikrowirówka do mikroprobówek

2.2.2.2.5. Zestaw mikropipet umożliwiających odmierzanie od 1 µl do 1 000 µl

2.2.2.2.6. Standardowe wyroby z tworzywa sztucznego stosowane w laboratorium biologii molekularnej: mikroprobówki, końcówki z tworzywa sztucznego do mikropipet, z filtrem, płytki nadające się do termocyklera.

2.2.2.2.7. Zamrażarki do przechowywania próbek i odczynników

2.2.3. *Pobieranie i przygotowywanie próbek*

2.2.3.1. Pobieranie próbek

Należy użyć reprezentatywnej próbki, pobranej zgodnie z przepisami określonymi w załączniku I.

2.2.3.2. Przygotowanie próbek

Przygotowanie próbek laboratoryjnych do ekstrakcji DNA musi być zgodne z wymaganiami określonymi w załączniku II. Z co najmniej 50 g próbki należy utworzyć podpróbkę do analizy, a następnie rozdrobnić.

Próbki przygotowuje się w pomieszczeniu innym niż przeznaczone do ekstrakcji DNA i reakcji amplifikacji genów zgodnie z opisem w normie ISO 24276.

Należy przygotować dwie naważki o wadze co najmniej 100 mg każda.

2.2.4. *Ekstrakcja DNA*

Ekstrakcję DNA przeprowadza się dla każdej naważki zgodnie ze standardową procedurą operacyjną ustaloną przez EURL-AP i opublikowaną na jego stronie internetowej.

Dla każdej serii ekstrakcji należy przygotować dwa kontrolne roztwory ekstrakcyjne zgodnie z opisem w normie ISO 24276.

— ślepy roztwór ekstrakcyjny,

— dodatni kontrolny roztwór ekstrakcyjny DNA.

([1]) Wykaz tych starterów i sond dla każdego gatunku zwierząt uwzględnianego w badaniu jest dostępny na stronie internetowej EURL-AP.

([2]) Przykłady odpowiednich roztworów Master Mix są dostępne na stronie internetowej EURL-AP.

▼M2

2.2.5. *Amplifikacja genów*

Amplifikację genów przeprowadza się przy użyciu metod zatwierdzonych dla każdego gatunku wymagającego identyfikacji. Metody te określono w standardowej procedurze operacyjnej ustalonej przez EURL-AP i opublikowanej na jego stronie internetowej. Każdy ekstrakt DNA powinien być analizowany w dwóch różnych rozcieńczeniach w celu oceny inhibicji.

Dwa kontrolne roztwory amplifikacji przygotowuje się dla każdego gatunku docelowego, zgodnie z opisem w normie ISO 24276.

— dodatni kontrolny roztwór docelowego DNA stosuje się dla każdej płytki lub serii badań PCR,

— kontrolny roztwór odczynnika do amplifikacji (tzw. kontrola negatywna reakcji) stosuje się dla każdej płytki lub serii badań PCR.

2.2.6. *Interpretacja i przedstawianie wyników*

Przekazując wyniki laboratorium musi podać co najmniej wagę użytych naważek, zastosowaną metodę ekstrakcji, liczbę wykonanych oznaczeń oraz granicę wykrywalności metody.

Wyniki nie mogą być interpretowane i przekazywane jeżeli dodatni kontrolny roztwór ekstrakcyjny DNA i dodatnie kontrolne roztwory docelowego DNA nie dają dodatnich wyników w odniesieniu do badanego celu, podczas gdy kontrolny roztwór odczynnika do amplifikacji jest ujemny.

W przypadku gdy wyniki otrzymane z dwóch naważek nie są zgodne, należy powtórzyć co najmniej etap amplifikacji genów. Jeżeli laboratorium podejrzewa, że powodem niezgodności mogą być ekstrakty DNA, przeprowadza się ponowną ekstrakcję DNA, a przed interpretacją wyników należy przeprowadzić amplifikację genów.

Ostateczne wyrażenie wyników należy oprzeć na integracji i interpretacji wyników otrzymanych z dwóch naważek zgodnie ze standardową procedurą operacyjną ustaloną przez EURL-AP i opublikowaną na jego stronie internetowej.

2.2.6.1. Wynik ujemny

Wynik ujemny przekazuje się w następujący sposób:

W badanej próbce nie wykryto DNA X (gdzie X oznacza gatunek zwierząt lub grupę gatunków zwierząt, które stanowią przedmiot analizy).

2.2.6.2. Wynik dodatni

Wynik dodatni przekazuje się w następujący sposób:

W badanej próbce wykryto DNA X (gdzie X oznacza gatunek zwierząt lub grupę gatunków zwierząt, które stanowią przedmiot analizy).

▼B

ZAŁĄCZNIK VII

METODA OBLICZANIA WARTOŚCI ENERGETYCZNEJ PASZ DLA DROBIU

1. **Metoda obliczania i wyrażania wartości energetycznej**

Wartość energetyczna mieszanek paszowych dla drobiu musi być obliczana zgodnie ze wzorem określonym poniżej, na podstawie procentowej zawartości niektórych składników analitycznych paszy. Wartość ta musi być wyrażana w megadżulach (MJ) energii metabolicznej (EM), skorygowanej azotem, na kilogram mieszanki paszowej:

MJ/kg EM = 0,1551 × % białka surowego + 0,3431 × % tłuszczu surowego + 0,1669 × % skrobi + 0,1301 × % całkowitej zawartości cukru (wyrażonego jako sacharoza).

2. **Tolerancje mające zastosowanie do podawanych wartości**

Jeżeli urzędowa kontrola wykaże rozbieżność (wyższą lub niższą wartość energetyczną paszy) między wynikiem kontroli a podaną wartością energetyczną, dopuszczalna jest tolerancja minimalna wynosząca 0,4 MJ/kg EM.

3. **Wyrażanie wyników**

Wynik otrzymany po zastosowaniu podanego powyżej wzoru należy podawać z dokładnością do jednego miejsca po przecinku.

4. **Pobieranie próbek i metody analizy**

Pobieranie próbek mieszanki paszowej oraz określanie zawartości składników analitycznych wskazanych w metodzie obliczania muszą odbywać się odpowiednio zgodnie ze wspólnotowymi metodami pobierania próbek oraz metodami analizy dla urzędowej kontroli pasz.

Należy stosować następujące metody:

— do oznaczania zawartości tłuszczu surowego: postępowanie B z metody oznaczania surowych olejów i tłuszczów, określone w załączniku III część H,

— do oznaczania zawartości skrobi: metoda polarymetryczna, określona w załączniku III część L.

▼B

ZAŁĄCZNIK VIII

METODY ANALIZY DO CELÓW KONTROLI NIELEGALNEJ OBECNOŚCI W PASZACH DODATKÓW, KTÓRE JUŻ NIE SĄ DOPUSZCZONE

Ważne uwagi:

Do wykrywania w paszach dodatków nielegalnych, które już nie są dopuszczone, można stosować bardziej wrażliwe metody analizy, niż określone w niniejszym załączniku.

Metody analizy, o których mowa w niniejszym załączniku, należy stosować do celów potwierdzania.

A. OZNACZANIE METYLOBENZOQUATU

7-benzyloksy-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości metylobenzoquatu w paszach. Granica oznaczalności wynosi 1 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Metylobenzoquat ekstrahuje się z próbki metanolowym roztworem kwasu metanosulfonowego. Ekstrakt oczyszcza się dwuchlorometanem metodą chromatografii jonowymiennej, a następnie ponownie dwuchlorometanem. Zawartość metylobenzoquatu jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą (HPLC) z użyciem detektora UV.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Dwuchlorometan.

3.2. Metanol do HPLC.

3.3. Faza ruchoma HPLC.

Mieszanina metanolu, o którym mowa w 3.2, i wody do HPLC, w stosunku 75 + 25 (v+v).

Przefiltrować przez filtr 0,22 μm (4.5) i odgazować roztwór, np. przy zastosowaniu ultradźwięków przez 10 minut.

3.4. Roztwór kwasu metanosulfonowego, c = 2 %.

Rozcieńczyć 20,0 ml kwasu metanosulfonowego metanolem (3.2) do objętości 1 000 ml.

3.5. Roztwór kwasu chlorowodorowego, c = 10 %.

Rozcieńczyć 100 ml kwasu chlorowodorowego (ρ_{20} = 1,18 g/ml) wodą do objętości 1 000 ml.

3.6. Żywica kationowowymienna Amberlit CG-120 (Na), 100 do 200 oczek.

Żywicę częściowo przygotowuje się przed użyciem, sporządzając zawiesinę ze 100 g żywicy i 500 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (3.5), i ogrzewa na płycie grzewczej do wrzenia, ciągle mieszając. Pozostawić do schłodzenia i zdekantować kwasem. Przefiltrować w warunkach próżni na filtrze z bibuły. Żywicę przemyć dwukrotnie 500 ml porcjami wody, a następnie 250 ml metanolu (3.2). Żywicę przemyć ponownie 250 ml metanolu i wysuszyć, przepuszczając powietrze przez warstwę żywicy na filtrze. Wysuszoną żywicę przechowywać w zakorkowanej butelce.

3.7. Substancja wzorcowa: czysty metylobenzoquat (7-benzyloksy-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon).

▼B

3.7.1. Roztwór wzorcowy podstawowy metylobenzoquatu, 500 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg substancji wzorcowej (3.7), rozpuścić w roztworze kwasu metanosulfonowego (3.4) w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem i zmieszać.

3.7.2. Rozwór wzorcowy pośredni metylobenzoquatu, 50 µg/ml

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml przenieść 5,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego metylobenzoquatu (3.7.1) uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem (3.2) i zmieszać.

3.7.3. Roztwory kalibracyjne

Do kolb miarowych o pojemności 25 ml przenieść kolejno 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego metylobenzoquatu (3.7.2). Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą (3.3) i zmieszać. Roztwory te mają odpowiednio stężenia 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 µg/ml metylobenzoquatu. Roztwory te przygotować bezpośrednio przed użyciem.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Wstrząsarka laboratoryjna

4.2. Próżniowa wyparka rotacyjna

4.3. Kolumna szklana (250 mm × 15 mm) z kranem i zbiornikiem o pojemności około 200 ml

4.4. Sprzęt do HPLC z detektorem UV o zmiennej długości fali miarowej lub z detektorem diodowym

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 300 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 10 µm lub równoważne

4.5. Filtry membranowe, 0,22 µm

4.6. Filtry membranowe, 0,45 µm

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepą próbę paszy należy poddać analizie w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona metylobenzoquatu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości metylobenzoquatu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby fortyfikować na poziomie 15 mg/kg, dodać 600 µl roztworu wzorcowego podstawowego (3.7.1) do 20 g ślepej próby paszy, zmieszać i odczekać 10 minut do rozpoczęcia ekstrakcji (5.2).

Ślepa próba paszy musi być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie może potwierdzać obecności metylobenzoquatu.

5.2. *Ekstrakcja*

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 20 g przygotowanej próby i umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać 100,0 ml roztworu kwasu metanosulfonowego (3.4) i wstrząsać mechanicznie przy zastosowaniu wstrząsarki (4.1) przez 30 minut. Roztwór filtrować przez filtr z bibuły i zachować filtrat do rozdziału w układzie ciecz-ciecz (5.3).

5.3. *Rozdział w układzie ciecz-ciecz*

Do rozdzielacza o pojemności 500 ml zawierającego 100 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (3.5) wprowadzić 25,0 ml otrzymanego wcześniej filtratu (5.2). Dodać 100 ml dwuchlorometanu (3.1) i wstrząsać przez minutę. Pozostawić do rozdzielenia się warstw, a następnie dolną warstwę (dwuchlorometanową) spuścić do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję fazy wodnej, dodając 2 porcje 40 ml dwuchlorometanu, i połączyć je z pierwszym ekstraktem w kolbie

▼B

okrągłodennej. Odparować ekstrakt dwuchlorometanu do sucha na próżniowej wyparce rotacyjnej (4.2) przy zmniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C. Pozostałość rozpuścić w 20 do 25 ml metanolu (3.2), zamknąć kolbę i zachować całość ekstraktu do chromatografii jonowymiennej (5.4).

5.4. *Chromatografia jonowymienna*

5.4.1. Przygotowanie kolumny kationowowymiennej

Dolny koniec kolumny szklanej (4.3) zatkać zwitkiem waty szklanej. Przygotować zawiesinę 5,0 g żywicy kationitowowymiennej (3.6) i 50 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (3.5). Wlać ją do kolumny i pozostawić do ustabilizowania się. Zlać nadmiar kwasu znad powierzchni żywicy i przemywać kolumnę wodą do obojętnego odczynu wycieku wobec lakmusu. Przenieść 50 ml metanolu (3.2) do kolumny i pozwolić, aby przesączył się do powierzchni żywicy.

5.4.2. Chromatografia kolumnowa

Filtrat uzyskany w sposób, o którym mowa w pkt 5.3, przenieść ostrożnie pipetą do kolumny. Kolbę okrągłodenną przemyć 2 porcjami od 5 do 10 ml metanolu (3.2), a następnie roztwór z przemycia nanieść na kolumnę. Poczekać aż ekstrakt dojdzie do powierzchni żywicy, następnie przemyć kolumnę 50 ml metanolu, tak aby prędkość wzbierania ekstraktu nie była wyższa niż 5 ml na minutę. Wyciek odrzucić. Metylobenzoquat wymyć z kolumny przy użyciu 150 ml roztworu kwasu metanosulfonowego (3.4) i zebrać eluent w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml.

5.5. *Rozdział w układzie ciecz-ciecz*

Eluent otrzymany w sposób określony w pkt 5.4.2 przenieść do rozdzielacza o pojemności 1 l. Przemyć kolbę stożkową od 5 do 10 ml metanolu (3.2) i roztwór po przemyciu dołączyć do zawartości rozdzielacza. Dodać 300 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (3.5) i 130 ml dwuchlorometanu (3.1). Wstrząsać przez minutę i pozostawić do rozdzielenia faz. Dolną warstwę (dwuchlorometan) przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję fazy wodnej następnymi 2 porcjami 70 ml dwuchlorometanu i ekstrakty dołączyć do zawartości pierwszej kolby okrągłodennej.

Ekstrakt dwuchlorometanu odparować do sucha na próżniowej wyparce rotacyjnej (4.2) przy zmniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C. Pozostałość rozpuścić w kolbie zawierającej około 5 ml metanolu (3.2) i roztwór przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Przemyć dwa razy kolbę okrągłodenną następnymi 2 porcjami od 1 do 2 ml metanolu, a następnie przenieść do kolby miarowej. Uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem i zmieszać. Podzielna część jest filtrowana przez filtr membranowy (4.6). Roztwór zachować do oznaczania HPLC (5.6).

5.6. *Oznaczanie HPLC*

5.6.1. Parametry

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników:

— kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1),

— faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu z wodą (3.3),

— prędkość przepływu: 1 do 1,5/min,

— długość fali przy detekcji: 265 nm,

— dozowana objętość: 20 do 50 µl.

▼B

Sprawdzić stabilność układu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.7.3) zawierający 4 µg/ml, aż do ustalenia stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

5.6.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów (3.7.3) i określić wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.6.3. Badany roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki (5.5) stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i wyznaczyć średnią wysokość (powierzchnię) piku metylobenzoquatu.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików metylobenzoquatu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (5.6.2).

Zawartość metylobenzoquatu w (mg/kg) w próbce oblicza się według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

gdzie:

c = stężenie metylobenzoquatu w g/ml w roztworze próbki
m = masa naważki w g

7. **Sprawdzenie metody**

7.1. *Sprawdzanie tożsamości*

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego (3.7.3) zawierającego 10 µg/ml metylobenzoquatu.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości pośredniego roztworu wzorcowego (3.7.2). Ilość dodanego metylobenzoquatu musi być podobna do ilości metylobenzoquatu w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku metylobenzoquatu. Szerokość piku w połowie jego wysokości nie może przekraczać około 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka piku zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm;

▼B

b) w zakresie od 220 do 350 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji wzorcowego analitu;

c) w zakresie od 220 do 350 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać: 10 % względem wyższego wyniku, dla zawartości metylobenzoquatu od 4 do 20 mg/kg.

7.3. *Odzysk*

W przypadku fortyfikowanej ślepej próby odzysk nie może być mniejszy niż 90 %.

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

W ramach współpracy 10 laboratoriów przeprowadzono analizę pięciu próbek. Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie.

	Ślepa próba	Mączka 1	Granulat 1	Mączka 2	Granulat 2
Średnia [mg/kg]	n.w.	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	—	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	—	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
Odzysk [%]	—	92,00	93,00	92,00	89,00

n.w. = nie wykryto
s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności w %
s_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności w %

B. OZNACZANIE OLAQUINDOKSU

2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksalino-N^1,N^4-dioksyd

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości olaquindoksu w paszach. Granica oznaczalności wynosi 5 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest ekstrahowana mieszaniną wody i metanolu. Zawartość olaquindoksu jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z fazą odwróconą przy użyciu detektora UV.

▼B

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Metanol.

3.2. Metanol do HPLC.

3.3. Woda do HPLC.

3.4. Faza ruchoma do HPLC.

Mieszanina wody (3.3) i metanolu (3.2) w stosunku 900 + 100 (V + V).

3.5. Substancja wzorcowa: czysty olaquindoks 2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksalino-N^1,N^4-dioksyd, E 851.

3.5.1. Roztwór wzorcowy podstawowy olaquindoksu, 250 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg olaquindoksu (3.5) do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać około 190 ml wody. Następnie umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (4.1) na 20 minut. Po zastosowaniu ultradźwięków roztwór doprowadzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Roztwór należy przygotowywać raz w miesiącu.

3.5.2. Roztwór wzorcowy pośredni olaquindoksu, 25 µg/ml

Przenieść 10,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.5.1) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby fazą ruchomą (3.4) i zmieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Roztwór należy przygotowywać codziennie.

3.5.3. Roztwory kalibracyjne

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego (3.5.2). Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą (3.4) i zmieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, i 10,0 µg olaquindoksu/ml.

Roztwory należy przygotowywać codziennie.

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.2. Wstrząsarka mechaniczna.

4.3. Aparat do HPLC z detektorem o zmiennej długości fali lub detektorem diodowym.

4.3.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 250 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 10 µm lub równoważne

4.4. Filtr membranowy, 0,45 µm.

5. **Sposób postępowania**

Uwaga: Olaquindoks jest wrażliwy na światło. Wszystkie czynności należy przeprowadzać przy ograniczonym dostępie światła lub z zastosowaniem szkła oranżowego.

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepą próbę paszy należy poddać analizie w celu potwierdzenia braku olaquindoksu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości olaquindoksu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie

▼B

50 mg/kg, przenieść 10,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.5.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby paszy, dokładnie zmieszać i pozostawić na 10 minut, kilkakrotnie mieszając przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Uwaga: Ślepa próba paszy musi być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie może potwierdzać obecności olaquindoksu.

5.2. *Ekstrakcja*

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 50 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 1 000 ml, dodać 100 ml metanolu (3.1) i umieścić kolbę na 5 minut w łaźni ultradźwiękowej (4.1). Dodać 410 ml wody i pozostawić w łaźni ultradźwiękowej na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez 30 minut z użyciem wstrząsarki mechanicznej (4.2), następnie przefiltrować przez pofałdowany filtr. Przenieść 10,0 ml filtratu do kolby miarowej o pojemności 20 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Przefiltrować podzielną część przez filtr membranowy (4.4) (zob. objaśnienia pkt 9). Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.3. *Oznaczanie HPLC*

5.3.1. Parametry:

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników.

Kolumna analityczna (4.3.1)	
Faza ruchoma (3.4):	mieszanina wody (3.3) i metanolu (3.2), 900 + 100 (V + V)
Prędkość przepływu:	1,5–2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	380 nm
Dozowana objętość:	20 µl–100 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.5.3) zawierający 2,5 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości piku i czasów retencji.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (3.5.3) i określić średnie wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki (5.2) stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku dla pików olaquindoksu.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików olaquindoksu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (5.3.2).

Zawartość olaquindoksu w próbce w mg/kg oblicza się według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

▼B

gdzie:

c = stężenie olaquindoksu w µg/ml w ekstrakcie próbki (5.2)
m = masa naważki w g/ml (5.2)

7. **Sprawdzenie metody**

7.1. *Sprawdzenie tożsamości*

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki (5.2) i roztworu kalibracyjnego (3.5.3) zawierającego 5 µg/ml olaquidoksu.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki (5.2) fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.5.3). Ilość dodanego olaquindoksu musi odpowiadać ilości olaquindoksu w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku olaquindoksu. Szerokość piku w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości piku niefortyfikowanego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka piku zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ± 2 nm;

b) w zakresie pomiędzy 220 a 400 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji wzorcowego agalitu;

c) w zakresie od 220 do 400 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 15 % najwyższego wyniku, dla zawartości olaquindoksu od 10 do 200 mg/kg.

7.3. *Odzysk*

Odzysk olaquindoksu dodanego do ślepej próby paszy nie może być niższy niż 90 %.

▼B

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

We Wspólnocie Europejskiej przeprowadzono badania porównawcze, w których cztery próbki pasz dla prosiąt, w tym jedna ślepa, były analizowane przez maksymalnie 13 laboratoriów. Wyniki są podane poniżej:

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Średnia [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
Nominalna zawartość [mg/kg]	—	15	50	100
Odzysk %	—	97,3	96,0	95,4

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych wartości
S_r = odchylenie standardowe powtarzalności
S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności

9. **Objaśnienia**

Metoda nie była sprawdzana dla pasz zawierających więcej niż 100 mg/kg olaquindoksu, zakłada się jednak otrzymanie zadowalających wyników poprzez zmniejszenie odważki analitycznej lub rozcieńczenie ekstraktu (5.2) w celu otrzymania stężenia w zakresie krzywej kalibracyjnej (5.3.2).

C. OZNACZANIE AMPROLIUM

chlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidyno-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości amprolium w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 1 mg/kg, granica oznaczalności wynosi 5 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest ekstrahowana mieszaniną metanolu i wody. Po rozcieńczeniu fazą ruchomą i filtrowaniu przez filtr membranowy zawartość amprolium jest oznaczana metodą kationowo wymienną wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC przy wykorzystaniu detektora UV.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitryl do HPLC.

3.3. Woda do HPLC.

3.4. Roztwór dwuwodorofosforanu sodu, c = 0,1 mol/l.

Rozpuścić 13,80 g monohydratu dwuwodorofosforanu sodu w wodzie (3.3) w kolbie miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą (3.3) i zmieszać.

3.5. Roztwór nadchloranu sodu, c = 1,6 mol/l.

Rozpuścić 224,74 g monohydratu nadchloranu sodu w wodzie (3.3) w kolbie miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą (3.3) i zmieszać.

▼B

3.6. Faza ruchoma do HPLC (zob. objaśnienia pkt 9.1).

Mieszanina, w stosunku 450+450+100 (v+v+v): acetonitrylu (3.2), roztworu dwuwodorofosforanu sodu (3.4), oraz roztworu nadchloranu sodu (3.5). Przed użyciem przefiltrować przez filtr membranowy 0,22 µm (4.3) i odgazować roztwór, np. przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej (4.4) co najmniej przez 15 minut.

3.7. Substancja wzorcowa: czyste amprolium, chlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidyno-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny, E 750 (zob. pkt 9.2)

3.7.1. Roztwór wzorcowy podstawowy amprolium, 500 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg amprolium (3.7) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w 80 ml metanolu (3.1) i umieścić kolbę na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej (4.4). Następnie doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Roztwór przechowywany w temperaturze ≤ 4 °C zachowuje stabilność nie dłużej niż miesiąc.

3.7.2. Pośredni wzorcowy roztwór amprolium, 50 µg/ml

Przenieść pipetą 5,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.7.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby roztworem do ekstrakcji (3.8) i zmieszać. Roztwór przechowywany w temperaturze ≤ 4 °C zachowuje stabilność nie dłużej niż miesiąc.

3.7.3. Roztwory kalibracyjne

Przenieść 0,5, 1,0 i 2,0 ml pośredniego wzorcowego roztworu (3.7.2) do partii kolb miarowych o pojemności 50 ml. Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą (3.6) i zmieszać. Roztwory odpowiadają odpowiednio 0,5, 1,0 i 2,0 µg/ml amprolium. Roztwory sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

3.8. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny.

Mieszanina metanolu (3.1) i wody, 2 + 1 (v + v)

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Zestaw do HPLC z dozownikiem umożliwiającym dozowanie 100 µl cieczy.

4.1.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 125 mm × 4 mm, z Nucleosil 10 SA, wypełnienie 5 lub 10 µm, lub równoważne

4.1.2. Detektor UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy

4.2. Filtr membranowy, PTFE, 0,45 µm.

4.3. Filtr membranowy, 0,22 µm.

4.4. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.5. Wstrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne.

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepa próba paszy

W celu zbadania odzysku (5.1.2) należy przeprowadzić analizę ślepej próby paszy, aby sprawdzić, czy nie zawiera ona amprolium ani substancji interferujących. Ślepa próba paszy musi być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie może potwierdzać obecności amprolium lub substancji interferujących.

▼B

5.1.2 Badanie odzysku

Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości amprolium, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby fortyfikować na poziomie 100 mg/kg, dodać 10,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.7.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do objętości około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut, mieszając kilkakrotnie przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy podobnej do badanej próbki (5.1.1), badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest fortyfikowana przez dodanie znanej ilości amprolium, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. *Ekstrakcja*

5.2.1. Premiksy (zawartość amprolium < 1 %) i pasze

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 5 do 40 g próbki, w zależności od zawartości amprolium, do kolby stożkowej o pojemności 500 ml i dodać 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (4.4) na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez godzinę na wstrząsarce lub mieszadle magnetycznym (4.5). Rozcieńczyć podzielną część ekstraktu fazą ruchomą (3.6) do zawartości amprolium od 0,5 do 2 µg/ml i zmieszać (zob. objaśnienia pkt 9.3). Przefiltrować od 5 do 10 ml rozcieńczonego roztworu przez filtr membranowy (4.2). Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.2.2. Premiksy (zawartość amprolium ≥ 1 %)

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, od 1 do 4 g premiksu, w zależności od zawartości amprolium, do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (4.4) na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez godzinę na wstrząsarce lub mieszadle magnetycznym (4.5). Rozcieńczyć podzielną część ekstraktu fazą ruchomą (3.6) do zawartości amprolium od 0,5 do 2 µg/ml i zmieszać. Przefiltrować od 5 do 10 ml rozcieńczonego roztworu przez filtr membranowy (4.2). Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.3. *Oznaczanie HPLC*

5.3.1. Parametry:

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.1.1):	125 mm × 4 mm, wymienny kation Nucleosil 10 SA, wypełnienie 5 lub 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.6):	Mieszanina acetonitrylu (3.2),roztworu dwuwodorofosforanu sodu (3.4) i roztworu nadchloranu sodu (3.5), 450+450+100 (v+v+v).
Prędkość przepływu:	0,7–1 ml/min
Długość fali przy detekcji:	264 nm
Dozowana objętość:	100 µl

▼B

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.7.3) zawierający 1,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości piku i czasów retencji.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (3.7.3) i określić średnie wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki (5.2), stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku dla pików amprolium.

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików amprolium roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (5.3.2).

Zawartość amprolium w mg/kg próbki obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

gdzie:

V = objętość rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w ml (3.8); zgodnie z pkt 5.2 (np. 200 ml)
c = stężenie amprolium w µg/ml w ekstrakcie próbki (5.2)
f = współczynnik rozcieńczania zgodny z pkt 5.2
m = masa naważki w g

7. **Sprawdzanie metody**

7.1. *Sprawdzenie tożsamości*

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki (5.2) i roztworu kalibracyjnego (3.7.3) zawierającego 2,0 µg/ml.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki (5.2) fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.7.3). Ilość dodanego amprolium musi odpowiadać ilości amprolium znajdującego się w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku amprolium. Szerokość piku w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości piku amprolium niefortyfikowanego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka piku zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ±2 nm;

▼B

b) w zakresie od 210 do 320 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji wzorcowego agalitu;

c) w zakresie od 210 do 320 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. *Powtarzalność*

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać:

— 15 % względem wyższej wartości, dla zawartości amprolium od 25 mg/kg do 500 mg/kg,

— 75 mg/kg, dla zawartości amprolium od 500 mg/kg do 1 000 mg/kg,

— 7,5 % względem wyższej wartości, dla zawartości amprolium powyżej 1 000 mg/kg.

7.3. *Odzysk*

W przypadku fortyfikacji (ślepej) próby paszy odzysk musi wynosić co najmniej 90 %.

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

W ramach współpracy kilku laboratoriów przeprowadzono analizę 3 pasz dla drobiu (próbki 1–3), paszy mineralnej (próbka 4) i premiksu (próbka 5). W poniższej tabeli podano wyniki przeprowadzonych badań.

	Próbka 1 (ślepa)	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Średnia [mg/kg]	—	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	—	2,26	3,57	178	550
CVr [%]	—	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	—	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	—	6,47	6,27	5,19	3,00
Zawartość nominalna [mg/kg]	—	50	200	5 000	25 000

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych oznaczeń
s_r = odchylenie standardowe powtarzalności
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności
s_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności

▼B

9. **Objaśnienia**

9.1. Jeżeli próbka zawiera tiaminę, pik tiaminy na chromatogramie ukazuje się na krótko przed pikiem amprolium. W tej metodzie amprolium i tiamina należy rozdzielić. Jeżeli amprolium i tiamina nie zostaną rozdzielone w kolumnie (4.1.1) użytej w tej metodzie, zastąpić do 50 % acetonitrylu fazy ruchomej (3.6) metanolem.

9.2. Według Farmakopei Brytyjskiej widmo roztworu amprolium: (c = 0,02 mol/l) w kwasie chlorowodorowym (c = 0,1 mol/l) wykazuje maksima przy 246 nm i 262 nm. Absorbancja musi wynieść 0,84 przy 246 nm i 0,80 przy 262 nm.

9.3. Ekstrakt zawsze rozcieńczyć fazą ruchomą, gdyż w przeciwnym razie czas retencji piku amprolium może się znacznie przesunąć, z uwagi na zmiany siły jonowej.

D. OZNACZANIE KARBADOKSU

Metylo 3-(2-chinoksalinylometyleno)pikrynian N^1 ,N^4 -dwutlenek

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości karbadoksu w paszach, premiksach i preparatach. Granica wykrywalności wynosi 1 mg/kg. Granica oznaczalności wynosi 5 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest równoważona wodą i poddawana ekstrakcji przy użyciu mieszaniny metanolu i acetonitrylu. W przypadku pasz podzielną część przefiltrowanego ekstraktu zostaje oczyszczona na kolumnie z tlenkiem glinu. W przypadku premiksów i preparatów podzielną część przefiltrowanego ekstraktu zostaje rozcieńczona do odpowiedniego stężenia wodą, metanolem i acetonitrylem. Zawartość karbadoksu oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. **Odczynniki i roztwory**

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitryl do HPLC.

3.3. Kwas octowy, w = 100 %.

3.4. Tlenek glinu: obojętny, stopień aktywności I.

3.5. Metanol-acetonitryl 1 + 1 (v + v).

Zmieszać 500 ml metanolu (3.1) z 500 ml acetonitrylu (3.2).

3.6. Kwas octowy, σ = 10 %.

Rozcieńczyć 10 ml kwasu octowego (3.3) wodą do objętości 100 ml.

3.7. Octan sodu.

3.8. Woda do HPLC.

3.9. Roztwór buforu octanowego, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.

Rozpuścić 0,82 g octanu sodu (3.7) w 700 ml wody (3.8) i dostosować pH do 6 kwasem octowym (3.6). Przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą (3.8) i zmieszać.

3.10. Faza ruchoma do HPLC.

Zmieszać 825 ml roztworu buforu octanowego (3.9) i 175 ml acetonitrylu (3.2).

Przefiltrować przez filtr 0,22 μm (4.5) i odgazować roztwór, np. przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut.

▼B

3.11. Substancja wzorcowa.

Czysty karbadoks: Metylo 3-(2-chinoksalinylometyleno)pikrynianN^1, N^4-dwutlenek, E 850.

3.11.1. Roztwór wzorcowy podstawowy karbadoksu, 100 µg/ml, (zob. *uwaga* pkt 5). Sposób postępowania:

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej (3.11) do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Rozpuścić w mieszaninie metanolu i acetonitrylu (3.5) na łaźni ultradźwiękowej (4.7). Po zastosowaniu ultradźwięków doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną metanolu i acetonitrylu (3.5) i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub zastosować oranżowe szklane naczynie laboratoryjne i przechowywać w lodówce. Roztwór w temperaturze ≤ 4 °C zachowuje stabilność do miesiąca.

3.11.2. Roztwory kalibracyjne

Przenieść 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego karbadoksu (3.11.1) do partii kolb miarowych o pojemności 100 ml. Dodać 30 ml wody, uzupełnić mieszaniną metanolu i acetonitrylu (3.5) do pełnej objętości kolb i zmieszać. Kolby owinąć folią aluminiową. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 µg/ml karbadoksu.

Roztwory kalibracyjne sporządza się bezpośrednio przed użyciem.

Uwaga: Do oznaczenia karbadoksu w paszach zawierających mniej niż 10 mg/kg sporządza się roztwory kalibracyjne o stężeniu niższym niż 2,0 µg/ml.

3.12. Mieszanina wody i mieszanina metanolu z acetonitrylem (3.5), 300 + 700 (v + v)

Zmieszać 300 ml wody z 700 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu (3.5).

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Wstrząsarka laboratoryjna lub mieszadło magnetyczne.

4.2. Bibuła filtracyjna z włóknem szklanym (Whatman GF/A lub podobna).

4.3. Szklana kolumna o długości od 300 do 400 mm, wewnętrznej średnicy około 10 mm, ze spiekiem szklanym oraz zaworem odpływowym.

Uwaga: Dopuszcza się użycie szklanej kolumny z kurkiem lub ze ściętym końcem i w takim przypadku w dolnym końcu umieszcza się zwitek waty szklanej, ubity szklanym prętem.

4.4. Sprzęt do HPLC z systemem do dozowania umożliwiającym dozowanie 20 µl.

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 300 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 10 µm lub równoważne

4.4.2. Detektor UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy pracujący w zakresie do 225 do 400 nm

4.5. Filtr membranowy, 0,22 µm.

4.6. Filtr membranowy, 0,45 µm.

4.7. Łaźnia ultradźwiękowa.

▼B

5. **Sposób postępowania**

Uwaga: Karbadoks jest wrażliwy na światło. Wszystkie czynności należy przeprowadzać przy ograniczonym dostępie światła lub z zastosowaniem szkła oranżowego lub szkła zabezpieczonego folią aluminiową.

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepa próba paszy

Do badania odzysku (5.1.2) należy przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona karbadoksu i substancji interferujących. Ślepa próba paszy musi być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie może potwierdzać obecności karbadoksu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku należy przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy (5.1.1) fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości karbadoksu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 50 mg/kg, dodać 5,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego karbadoksu (3.11.1) do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Odparować roztwór w strumieniu azotu do objętości około 0,5 ml. Dodać 10 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy podobnej do badanej próbki (zob. pkt 5.1.1) badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest fortyfikowana przez dodanie znanej ilości karbadoksu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. *Ekstrakcja*

5.2.1. Pasze

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 10 g próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Dodać 15,0 ml wody, zmieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35,0 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu (3.5), zamknąć korkiem i wstrząsać przez 30 minut z zastosowaniem wstrząsarki lub mieszadła magnetycznego (4.1). Przefiltrować roztwór przez bibułę filtracyjną z włóknem szklanym (4.2). Roztwór zachowuje się do etapu oczyszczania (5.3).

5.2.2. Premiksy (zawartość karbadoksu od 0,1 do 2 %)

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, 1 g niezmielonej próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Dodać 15,0 ml wody, zmieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35,0 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu (3.5), zamknąć korkiem i wstrząsać przez 30 minut z użyciem wstrząsarki lub mieszadła magnetycznego (4.1). Przefiltrować ten roztwór przez bibułę filtracyjną z włóknem szklanym (4.2).

Pipetą przenieść podzielną część filtratu do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 15,0 ml wody, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną metanolu z acetonitrylem (3.5) i zmieszać. Stężenie karbadoksu w roztworze końcowym musi wynieść około 10 µg/ml. Podzielną część roztworu przefiltrować przez filtr 0,45 µm (4.6).

Przystąpić do oznaczania HPLC (5.4).

5.2.3. Preparaty (zawartość karbadoksu > 2 %)

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, 0,2 g niezmielonej próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać 45,0 ml wody, zmieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 105,0 ml mieszaniny

▼B

metanolu z acetonitrylem (3.5), zamknąć korkiem i homogenizować. Poddać próbkę działaniu ultradźwięków przez 15 minut (4.7), a następnie wstrząsać z zastosowaniem wstrząsarki lub mieszadła magnetycznego (4.1) przez 15 minut. Przefiltrować roztwór przez bibułę filtracyjną z włóknem szklanym (4.2).

Rozcieńczyć podzielną część filtratu mieszaniną wody i mieszaniną metanolu z acetonitrylem (3.12), aby uzyskać ostateczne stężenie karbadoksu od 10 do 15 µg/ml (w przypadku preparatów 10 %, współczynnik rozcieńczania wynosi 10). Podzielną część przefiltrować przez filtr (4.6).

Przystąpić do analizy HPLC (5.4).

5.3. *Oczyszczanie*

5.3.1. Przygotowanie kolumny tlenku glinu

Odważyć 4 g tlenku glinu (3.4) i przenieść do szklanej kolumny (4.3).

5.3.2. Czyszczenie próbki

Umieścić 15 ml odfiltrowanego ekstraktu (5.2.1) w kolumnie z tlenkiem glinu i usunąć pierwsze 2 ml eluentu. Następnie zebrać kolejne 5 ml i przefiltrować podzielną część przez filtr 0,45 µm (4.6).

Przystąpić do oznaczania HPLC (5.4).

5.4. *Oznaczanie HPLC*

5.4.1. Parametry

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile gwarantują otrzymanie równoważnych wyników:

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1):	300 mm × 4 mm, C_{18}, wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.10):	Mieszanina roztworu buforu octanowego (3.9) i acetonitrylu (3.2), 825 + 175 (v + v)
Prędkość przepływu:	1,5–2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	365 nm
Dozowana objętość:	20 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny (3.11.2) zawierający 5,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (3.11.2) i określić wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki otrzymany dla pasz (5.3.2), dla premiksów (5.2.2) oraz dla preparatów (5.2.3), i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku dla pików karbadoksu.

▼B

6. **Obliczanie wyników**

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików karbadoksu roztworu próbki, określić stężenie karbadoksu w roztworze próbki w µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (5.4.2).

6.1. *Pasze*

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie karbadoksu w ekstrakcie próbki w µg/ml (5.3.2)
V_1 = objętość ekstraktu w ml (np. 50 ml)
m = masa naważki w g

6.2. *Premiksy i preparaty*

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, oblicza się według następującego wzoru:

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

gdzie:

c = stężenie karbadoksu w ekstrakcie próbki w µg/ml (5.2.2 lub 5.2.3)
V_2 = objętość ekstraktu w ml (np. 50 ml w przypadku premiksów lub 150 ml w przypadku preparatów)
f = współczynnik rozcieńczenia zgodny z pkt 5.2.2 (premiksy) lub z pkt 5.2.3 (preparaty)
m = masa naważki w g

7. **Sprawdzenie metody**

7.1. *Sprawdzenie tożsamości*

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego (3.11.2) zawierającego 10,0 µg/ml karbadoksu.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstraky próbki fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.11.2). Ilość dodanego karbadoksu musi odpowiadać ilości karbadoksu w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku karbadoksu. Szerokość piku w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ok. 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka piku zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ±2 nm;

▼B

b) w zakresie pomiędzy 225 a 400 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest wyższa niż 15 % absorbancji wzorcowego analitu;

c) w zakresie od 225 do 400 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest wyższa niż 15 % widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. *Powtarzalność*

Dla zawartości karbadoksu równej lub wyższej niż 10 mg/kg różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 15 % najwyższego wyniku.

7.3. *Odzysk*

W przypadku fortyfikacji (ślepej) próby paszy odzysk musi wynosić co najmniej 90 %.

8. **Wyniki badań międzylaboratoryjnych**

W ramach współpracy 8 laboratoriów przeprowadzono analizę 6 próbek pasz, 4 premiksów i 3 preparatów. Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. (Bardziej szczegółowe informacje dotyczące tych badań można znaleźć w *Journal of the AOAC, tom 71, 1988, s. 484–490*). Wyniki (z wyłączeniem wartości oddalonych) podano poniżej:

Tabela 1

Wyniki badań porównawczych dla pasz

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Średnia (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_r (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S_R (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Zawartość nominalna (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabela 2

Wyniki badań porównawczych dla premiksów i preparatów

	Premiksy				Preparaty		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Średnia (mg/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S_r (g/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV_r (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
SR (g/kg)	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7

▼B

	Premiksy				Preparaty		
	A	B	C	D	A	B	C
CV_R (%)	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Zawartość nominalna (g/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L = liczba laboratoriów
n = liczba pojedynczych wartości
S_r = odchylenie standardowe powtarzalności
CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności
S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności
CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności

▼B

ZAŁĄCZNIK IX

TABELE KORELACJI, O KTÓRYCH MOWA W ART. 6

1. **Dyrektywa 71/250/EWG**

Dyrektywa 71/250/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1, pierwszy akapit	Artykuł 3
Artykuł 1, drugi akapit	Artykuł 2
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik, część 1	Załącznik II
Załącznik, część 2	—
Załącznik, część 3	—
Załącznik, część 4	Załącznik III, część O
Załącznik, część 5	Załącznik III, część M
Załącznik, część 6	Załącznik III, część N
Załącznik, część 7	Załącznik III, część Q
Załącznik, część 9	Załącznik III, część K
Załącznik, część 10	—
Załącznik, część 11	—
Załącznik, część 12	Załącznik III, część J
Załącznik, część 14	Załącznik III, część D
Załącznik, część 16	—

2. **Dyrektywa 71/393/EWG**

Dyrektywa 71/393/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik, część I	Załącznik III, część A
Załącznik, część II	Załącznik III, część E
Załącznik, część III	Załącznik III, część P
Załącznik, część IV	Załącznik III, część H

3. **Dyrektywa 72/199/EWG**

Dyrektywa 72/199/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Załącznik I, część 1	Załącznik III, część L
Załącznik I, część 2	Załącznik III, część C
Załącznik I, część 3	—
Załącznik I, część 4	—
Załącznik I, część 5	Załącznik V, część A
Załącznik II	—

4. **Dyrektywa 73/46/EWG**

Dyrektywa 73/46/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Załącznik I, część 1	Załącznik III, część B
Załącznik I, część 2	—
Załącznik I, część 3	Załącznik III, część I

▼B

5. **Dyrektywa 76/371/EWG**

Dyrektywa 76/371/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 1
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik	Załącznik I

6. **Dyrektywa 76/372/EWG**

Dyrektywa 76/372/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	—
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik	—

7. **Dyrektywa 78/633/EWG**

Dyrektywa 78/633/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik, część 1	—
Załącznik, część 2	—
Załącznik, część 3	Załącznik IV, część C

8. **Dyrektywa 81/715/EWG**

Dyrektywa 81/715/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	—
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik	—

9. **Dyrektywa 84/425/EWG**

Dyrektywa 84/425/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	—
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik	—

10. **Dyrektywa 86/174/EWG**

Dyrektywa 86/174/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 4
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik	Załącznik VII

11. **Dyrektywa 93/70/EWG**

Dyrektywa 93/70/EWG	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik	Załącznik IV, część D

▼B

12. **Dyrektywa 93/117/WE**

Dyrektywa 93/117/WE	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuły 3 i 5
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Załącznik, część 1	Załącznik IV, część E
Załącznik, część 2	Załącznik VIII, część A

13. **Dyrektywa 98/64/WE**

Dyrektywa 98/64/WE	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuły 3 i 5
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Załącznik, część A	Załącznik III, część F
Załącznik, część C	Załącznik VIII, część B

14. **Dyrektywa 1999/27/WE**

Dyrektywa 1999/27/WE	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuły 3 i 5
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Artykuł 5	—
Artykuł 6	—
Artykuł 7	—
Załącznik, część A	Załącznik VIII, część C
Załącznik, część B	Załącznik IV, część F
Załącznik, część C	Załącznik VIII, część D

15. **Dyrektywa 1999/76/WE**

Dyrektywa 1999/76/WE	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Załącznik	Załącznik IV, część G

16. **Dyrektywa 2000/45/WE**

Dyrektywa 2000/45/WE	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Załącznik, część A	Załącznik IV, część A
Załącznik, część B	Załącznik IV, część B
Załącznik, część C	Załącznik III, część G

▼B

17. **Dyrektywa 2002/70/WE**

Dyrektywa 2002/70/WE	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 1
Artykuł 2	Artykuły 2 i 3
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Artykuł 5	—
Załącznik I	Załącznik I i załącznik V, część B (I)
Załącznik II	Załącznik II i załącznik V, część B (II)

18. **Dyrektywa 2003/126/WE**

Dyrektywa 2003/126/WE	Niniejsze rozporządzenie
Artykuł 1	Artykuł 3
Artykuł 2	—
Artykuł 3	—
Artykuł 4	—
Artykuł 5	—
Artykuł 6	—
Załącznik	Załącznik VI