31998L0064

SMERNICA KOMISIE 98/64/ES

z 3. septembra 1998,

ktorou sa ustanovujú analytické metódy spoločenstva na stanovenie aminokyselín, olejov a tukov a olaquindoxu v krmivách a ktorou sa mení a dopĺňa smernica 71/393/EHS

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 70/373/EHS z 20. júla 1970 o zavedení metód spoločenstva na odber vzoriek a analýzu na účely úradnej kontroly krmív ([1]), naposledy zmenenú a doplnenú Aktom o pristúpení Rakúska, Fínska a Švédska, a najmä jej článok 2,

keďže smernica 70/373/EHS ustanovuje, že úradné kontroly krmív s cieľom kontroly požiadaviek vyplývajúcich zo zákonov, iných právnych predpisov a administratívnych opatrení, ktorými sa riadi ich kvalita a zloženie, sa musia vykonávať s použitím metód vzorkovania a analýzy spoločenstva;

keďže, smernica Rady 79/373/EHS z 2. apríla 1979 o obchodovaní s kŕmnymi zmesami ([2]), naposledy zmenená a doplnená smernicou Komisie 97/47/ES ([3]) a smernica Rady 93/74/EHS z 13. septembra 1993 o krmivách určených na zvláštne nutričné účely ([4]), naposledy zmenená a doplnená smernicou 96/25/ES ([5]), stanovujú, že aminokyseliny a oleje a tuky majú byť uvedené v označovaní krmív;

keďže, smernica Rady 70/524/EHS z 23. novembra 1970, ktorá sa vzťahuje na doplnkové látky v krmivách ([6]), naposledy zmenená a doplnená smernicou Komisie 98/19/ES ([7]) ustanovuje, že obsah olaquindoxu je potrebné uviesť v označovaní, pokiaľ bola táto látka pridaná do kŕmnych zmesí;

keďže druhá smernica Komisie 71/393/EHS z 18. novembra 1971 ktorou sa ustanovujú analytické metódy na úradnú kontrolu krmív ([8]), naposledy zmenená a doplnená smernicou Komisie 84/4/EHS ([9]), ustanovuje analytické metódy na stanovovanie – okrem iného – olejov a tukov; keďže je vhodné opísanú metódu modifikovať;

keďže je potrebné ustanoviť analytické metódy spoločenstva na kontrolu týchto látok;

keďže opatrenia uvedené v tejto smernici sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty zabezpečia, že analýzy vykonávané s cieľom úradnej kontroly obsahu aminokyselín, olejov a tukov, a olaquindoxu v krmivách sa budú vykonávať pomocou metód ustanovených v prílohe k tejto smernici.

Článok 2

V prílohe k smernici Komisie 71/393/EHS sa bod „4. stanovenie olejov a tukov“ nahrádza časťou B prílohy k tejto smernici.

Článok 3

1. Členské štáty uvedú do účinnosti zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr do 31. decembra 1998. Budú o tom bezodkladne informovať Komisiu.

Opatrenia budú uplatňovať od 1. januára 1999.

Členské štáty uvedú priamo v prijatých ustanoveniach alebo pri ich úradnom uverejnení odkaz na túto smernicu. Podrobnosti o odkaze upravia členské štáty.

([1]) Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.
([2]) Ú. v. ES L 86, 6.4.1979, s. 30.
([3]) Ú. v. ES L 211, 5.8.1997, s. 45.
([4]) Ú. v. ES L 237, 22.9.1993, s. 23.
([5]) Ú. v. ES L 125, 23.5.1996. s. 35.
([6]) Ú. v. ES L 270, 14.12.1970, s. 1.
([7]) Ú. v. ES L 96, 28.3.1998, s. 39.
([8]) Ú. v. ES L 279, 30.12.1971, s. 7.
([9]) Ú. v. ES L 15, 18.1.1984, s. 28.

2. Členské štáty oznámia Komisii text hlavných ustanovení vnútroštátneho práva, ktoré prijmú v oblasti, ktorá sa riadi touto smernicou.

Článok 4

Táto smernica nadobúda účinnosť dvadsiaty deň po jej uverejnení v *Úradnom vestníku Európskych spoločenstiev*.

Článok 5

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 3. septembra 1998

Za Komisiu

Franz FISCHLER

člen Komisie

PRÍLOHA

ČASŤ A

STANOVENIE AMINOKYSELÍN

1. **Rozsah a účel**

Táto metóda slúži na stanovenie voľných (syntetických a prírodných) a celkových (viazaných peptidickou väzbou a voľných) aminokyselín v krmivách, s použitím analyzátora aminokyselín. Je použiteľná pre nasledovné aminokyseliny: cysteín, metionín, lyzín, treonín, alanín, arginín, kyselinu asparágovú, kyselinu glutámovú, glycín, histidín, izoleucin, leucín, fenylalanín, prolín, serín, tyrozín a valín.

Táto metóda nedokáže rozlíšiť soli aminokyselín a nedokáže diferencovať medzi D a L formami aminokyselín. Neplatí pre stanovenie tryptofánu alebo hydroxyanalógov aminokyselín.

2. **Princíp**

2.1. *Voľné aminokyseliny*

Voľné aminokyseliny sa extrahujú zriedenou kyselinou chlorovodíkovou. Spolu vyextrahované dusíkové makromolekuly sa vyzrážajú kyselinou sulfosalicylovou a odstránia sa filtráciou. pH prefiltrovaného roztoku sa upraví na hodnotu 2,20. Aminokyseliny sa oddelia pomocou iónovo – výmennej chromatografie a stanovia sa reakciou s ninhydrínom pomocou fotometrickej detekcie pri 570 nm.

2.2. *Celkové aminokyseliny*

Zvolený postup závisí od aminokyselín, ktoré sa majú skúmať. Cysteín a metionín sa musia pred hydrolýzou zoxidovať na kyselinu cysteovú a metionín sulfón. Tyrozín sa musí stanoviť v hydrolyzátoch neoxidovaných vzoriek. Všetky ostatné aminokyseliny uvedené v odseku 1 sa dajú stanoviť v oxidovanej alebo neoxidovanej vzorke.

Oxidácia sa vykoná pri 0°C zmesou kyseliny permravčej a fenolu. Prebytočné oxidačné činidlo sa rozloží pomocou disiričitanu disodného. Oxidovaná alebo neoxidovaná vzorka sa hydrolizuje 23 hodín kyselinou chlorovodíkovou (c = 6 mol/l) pH hydrolyzátu sa upraví na hodnotu 2,20. Aminokyseliny sa oddelia iónovo – výmennou chromatografiou a stanovia sa reakciou s ninhydrínom pomocou fotometrickej detekcie pri 570 nm. (v prípade prolínu 440 nm).

3. **Chemikálie**

Musí sa použiť dvakrát destilovaná voda alebo voda ekvivalentnej kvality (vodivosť < 10 μS).

3.1. peroxid vodíka, w = 30 %

3.2. kyselina mravčia, w = 98-100 %.

3.3. fenol

3.4. disiričitan disodný.

3.5. hydroxid sodný

3.6. dihydrát kyseliny 5 – sulfosalicilovej

3.7. kyselina chlorovodíková, hustota približne 1,18 g/ml.

3.8. dihydrát citranu trisodného.

3.9. 2,2-tiodietanol (tiodiglykol)).

3.10. chlorid sodný

3.11. ninhydrín

3.12. petroléter, rozmedzie bodu varu 40-60 °C.

3.13. norleucin, alebo iná zlúčenina vhodná na použitie ako vnútorný štandard.

3.14. plynný dusík (< 10 ppm kyslíka).

3.15. 1- oktanol

3.16. aminokyseliny

3.16.1. Štandardné látky uvedené v odseku 1. Čisté zlúčeniny, ktoré neobsahujú žiadnu kryštalizačnú vodu. Pred použitím sušte vo vákuu jeden týždeň nad P_2O_5 alebo H_2SO_4.

3.16.2. kyselina cysteová

3.16.3. metionín sulfón.

3.17. Roztok hydroxidu sodného, c = 7,5 mol/l

Rozpustite 300 g NaOH (3.5) vo vode a doplňte na 1 liter.

3.18. Roztok hydroxidu sodného, c = 1 mol/l

Rozpustite 40 g NaOH (3.5) vo vode a doplňte na 1 liter.

3.19. Roztok kyselina mravčia – fenol.

Zmiešajte 889 g kyseliny mravčej (3.2) so 111 g vody a pridajte 4,73 g fenolu (3.3).

3.20. Hydrolyzačná zmes, c = 6 mol HCl/l obsahujúcej 1g fenolu/l:

Pridajte 1 g fenolu (3.3) k 492 ml HCl (3.7) a doplňte vodou na 1 liter.

3.21. Extrakčná zmes, c = 0,1 mol HCl/l obsahujúcej 2 % tiodiglykolu:

Vezmite 8,2 ml HCl (3.7), zrieďte s cca 900 ml vody, pridajte 20 ml tiodiglykolu (3.9) a doplňte vodou na 1 liter (3.7 a 3.9 nezmiešavajte priamo).

3.22. Kyselina 5- sulfosalicilová, β = 6 %:

Rozpustite 60 g kyseliny 5- sulfosalicilovej (3.6) vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

3.23. Oxidačná zmes (kyselina permravčia – fenol):

Zmiešajte 0,5 ml peroxidu vodíka (3.1) s 4,5 ml roztoku kyseliny mravčej s fenolom (3.19) v malej kadičke. Inkubujte 1 hodinu pri teplote 20 – 30 °C, aby sa vytvorila kyselina permravčia a pred pridaním do vzorky ochladťe v ľadovom vodnom kúpeli (po dobu 15 minút)

Pozor: Vystríhajte sa kontaktu s pokožkou a používajte ochranný odev.

3.24. citranový tlmivý roztok c = 0,2 mol Na^+/l, pH 2,20:

Rozpustite 19,61 g citranu sodného (3.8), 5 ml tiodiglykolu (3.9), 1 g fenolu (3.3) a 16,50 ml HCl (3.7) v približne 800 ml vody. pH upravte na 2,20. Doplňte vodou na 1 liter.

3.25. Elučné tlmivé roztoky, pripravené v súlade s podmienkami pre používaný analyzátor (4.9).

3.26. Činidlo ninhydríd, pripravené v súlade s podmienkami pre používaný analyzátor (4.9).

3.27. Štandardné roztoky aminokyselín. Tieto roztoky sa musia skladovať pri teplote pod 5°C.

3.27.1. Zásobný štandardný roztok aminokyselín (3.16.1). c = 2,5 µmol/ml z každej aminokyseliny v kyseline chlorovodíkovej. Sú k dispozícii aj na komerčnej báze.

3.27.2. Zásobný štandardný roztok kyseliny cisteovej a metionín sulfónu, c = 1,25 µmol/ml.

Rozpustite 0,2115 g kyseliny cisteovej (3.16.2) a 0,2265 g metionín sulfónu (3.16.3) v citranovom tlmivom roztoku (3.24) v 1 litrovej odmernej banke a doplňte po značku citranovým tlmivým roztokom. Skladujte pri teplote pod 5 °C najviac 12 mesiacov. Tento roztok sa nepoužije ak zásobný štandardný roztok (3.27.1) obsahuje kyselinu cisteovú a metionín sulfón.

3.27.3. Zásobný štandadrný roztok vnútorného štandardu, napr. norleucín, c = 20 µmol/ml.

Rozpustite 0,6560 g norleucinu (3.13) v citranovom tlmivom roztoku (3.24) v odmernej banke a doplňte na 250 ml citranovým tlmivým roztokom. Skladujte pri teplote pod 5°C najviac 6 mesiacov.

3.27.4. Kalibračný roztok štandardných aminokyselín určený na použitie s hydrolyzátmi, c = 5nmol/50 µl kyseliny cisteovej a metionín sulfónu a c = 10 nmol/50µl ostatných aminokyselín.

Rozpustite 2,2 g chloridu sodného (3.10) v 100 ml kadičke s 30 ml citranového tlmivého roztoku.(3.24). Pridajte 4,00 ml zásobného štandardného roztoku aminokyselín (3.27.1), 4, 00 ml zásobného štandardného roztoku kyseliny cisteovej a metionín sulfónu (3.27.2) a pokiaľ sa používa, tak aj 0,50 ml zásobného štandardného roztoku vnútorného štandardu (3.27.3) Hydroxidom sodným (3.18) upravte pH na 2,20.

Preneste kvantitatívne do 50 ml odmernej banky a doplňte po značku citranovým tlmivým roztokom (3.24) a premiešajte.

Skladujte pri teplote pod 5 °C najviac 3 mesiacov.

Pozri taktiež poznámky 9.1.

3.27.5. Kalibračný roztok štandardných aminokyselín určený na používanie s hydrolyzátmi pripravenými podľa odseku 5.3.3.1 a pre používanie s extraktmi (5.2). Kalibračný roztok sa pripraví v súlade s bodom 3.27.4 s vynechaním chloridu sodného.

Skladujte pri teplote pod 5 °C najviac 3 mesiacov.

4. **Prístroje**

4.1. 100 alebo 250 ml banka s okrúhlym dnom opatrená spätným chladičom.

4.2. 100 ml sklená fľaša z borosilikátového skla so skrutkovým uzáverom s gumovou/teflónovou podložkou (napr. Duran, Schott) určená na použitie v sušiarni.

4.3. Sušiareň s nútenou ventiláciou a regulátorom teploty s presnosťou vyššou ako 5 ± 2 °C.

4.4. pH meter (na tri desatinné miesta).

4.5. Membránový filter (0,2 μm).

4.6. Odstredivka.

4.7. Rotačná vákuová odparka.

4.8. Mechanická trepačka alebo magnetické miešadlo.

4.9. Analyzátor aminokyselín alebo zariadenie na HPLC s iónovo-výmennou kolónou, zariadenie na ninhydrín, postkolónová derivatizačná jednotka a fotometrický detektor.

Kolóna je plnená sulfónovanými polystyrénovými živicami schopnými oddeľovať jednotlivé aminokyseliny od seba a od ostatných materiálov pozitívnych na ninhydrín. Prietok pre tlmivý roztok a ninhydrín je zabezpečovaný čerpadlami, s prietokom stálym na ± 0,5 % počas ktorého savykoná aj kalibrácia pomocou štandardu aj analyzovanie vzorky.

U niektorých analyzátorov aminokyselín sa môžu použiť procesy hydrolýzy, v ktorých má hydrolyzát koncentráciu sodíka c = 0,8 mol/l a obsahuje všetku zvyšnú kyselinu mravčiu z oxidačného kroku. Iné zase nezabezpečujú uspokojivé oddelenie niektorých aminokyselín, ak hydrolyzát obsahuje prebytočnú kyselinu mravčiu a/alebo vysoké koncentrácie sodíkových iónov. V takomto prípade sa objem kyseliny zmenší odparením na približne 5 ml po hydrolýze a pred upravením pH.Odparenie musí prebehnúť pod vákuom pri teplote maximálne 40 °C.

5. **Postup**

5.1. *Príprava vzorky*

Vzorka sa pomelie tak, aby prepadla cez 0,5 mm sito. Vzorky s vysokým obsahom vlhkosti sa musia pred mletím buď vysušiť vzduchom pri teplote najviac 50 °C alebo vymraziť. Vzorky s vysokým obsahom tuku sa musia pred mletím extrahovať petroléterom.(3.12)

5.2. Stanovenie voľných aminokyselín v krmivách a premixoch

Odvážte s presnosťou na 0,2 mg príslušné množstvo (1-5 g) pripravenej vzorky (5.1) do Erlenmayerovej banky a pridajte 100,0 ml extrakčnej zmesi. (3.21). Zmes trepte 60 minút použitím mechanickej trepačky alebo magnetického miešadla (4.8). Nechajte sediment usadiť a pomocou pipety preneste 10,0 ml roztoku nad sedimentom do 100 ml kadičky.

Pridajte 5,0 ml roztoku kyseliny sulfosalicilovej (3.22) za stáleho miešania a pomocou magnetického miešadla miešajte ešte 5 minút. Kalný roztok prefiltrujte alebo odstreďte s cieľom odstrániť všetky zrazeniny. Preneste 10,0 ml výsledného roztoku do 100 ml kadičky a pH upravte na 2,20 s použitím roztoku hydroxidu sodného (3.18), preneste do odmernej banky vhodného objemu použitím citranového tlmivého roztoku (3.24) a doplňte po značku tlmivým roztokom (3.24).

Ak sa používa vnútorný štandard, tak pridajte 1,00 ml vnútorného štandardu (3.27.3) na každých 100 ml konečného roztoku a doplňte po značku tlmivým roztokom (3.24).

Ďalší postupje chromatografia v súlade s odsekom 5.4.

Ak sa extrakty neanalyzujú v ten istý deň, musia sa skladovať pri teplote pod 5 °C.

5.3. *Stanovenie celkových aminokyselín*

5.3.1. Oxidácia

Navážte s presnosťou na 0,2 mg 0,1 až 1 g pripravenej vzorky (5.1) do:

— 100 ml banky s guľatým dnom (4.1) na otvorenú hydrolýzu (5.3.2.3) alebo,

— 250 ml banky s guľatým dnom (4.1) pokiaľ sa vyžaduje nízka koncentrácia sodíka (5.3.3.1) alebo,

— 100 ml fľaše opatrenej skrutkovým uzáverom (4.2), (pre uzavretú hydrolýzu 5.3.2.4).

Navážené množstvo vzorky musí mať obsah dusíka cca 10 mg a obsah vlhkosti nesmie presiahnuť 100 mg.

Vložte banku/fľašu do ľadového vodného kúpeľa a ochladťe na 0°C, pridajte 5 ml oxidačnej zmesi (3.23) a zamiešajte použitím sklenej špachtle s ohnutým hrotom. Utesnite banku/fľašu v ktorej sa nachádza špachtľa vzduchotesnou fóliou., vložte ľadový vodný kúpeľ v ktorom sa nachádza utesnená nádobka do chladničky pri teplote 0 °C a nechajte pôsobiť 16 hodín. Po 16 hodinách vyberte z chladničky a prebytočné oxidačné činidlo rozložte pridaním 0,84 g disiričitanu disodného (3.4).

Postupujte podľa 5.3.2.1.

5.3.2. Hydrolýza

5.3.2.1. Hydrolýzy oxidovaných vzoriek

K oxidovanej vzorke pripravenej podľa 5.3.1. pridajte 25 ml hydrolyzačnej zmesi (3.20) pričom dbajte nato, aby ste zmyli všetky zvyšky vzorky prilepenej na bočných stranách nádoby a špachtle. V závislosti od používaného hydrolyzačného procesu postupujte podľa 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4.

5.3.2.2. Hydrolýzy neoxidovaných vzoriek

Navážte buď do 100 ml alebo do 250 ml banky s guľatým dnom (4.1) alebo do 100 ml fľaše opatrenej skrutkovým uzáverom (4.2) s presnosťou na 0,2 mg 0,1 až 1 g pripravenej vzorky, (5.1) Navážené množstvo vzorky musí mať obsah dusíka cca 10 mg. Opatrne pridajte 25 ml hydrolyzačnej zmesi (3.20) a zmiešajte so vzorkou. Postupujte buď podľa 5.3.2.3. alebo 5.3.2.4.

5.3.2.3. Otvorené hydrolýzy

Pridajte 3 sklené guľôčky do zmesi v banke (pripravenej podľa 5.3.2.1 alebo 5.3.2.2) a varte za trvalého prebublávania s refluxom po dobu 23 hodín. Po ukončení hydrolýzy chladič vypláchnite 5 ml citranového tlmivého roztoku (3.24). Banku odpojte a ochladťe ju v ľadovom kúpeli. Postupujte podľa 5.3.3..

5.3.2.4. Uzavreté hydrolýzy

Vložte fľašu obsahujúcu zmes pripravenú podľa 5.3.2.1 alebo 5.3.2.2. do sušiarne (4.3) pri teplote 110 °C. Prvú hodinu s cieľom zabrániť nárastu tlaku (v dôsledku vyvíjania plynných látok) a s cieľom zabrániť explózii, položte skrutkový uzáver na hornú časť nádoby. Nádobu neuzatvárajte uzáverom. Po uplynutí jednej hodiny uzatvorte nádobu uzáverom a ponechajte v sušičke (4.3) 23 hodín. Po ukončení hydrolýzy fľašu zo sušičky vyberte, opatrne otvorte uzáver a fľašu vložte do ľadového vodného kúpeľa. Nechajte vychladnúť.

V závislosti od spôsobu úpravy pH (5.3.3) kvantitatívne preneste obsah fľaše do 250 ml kadičky alebo do 250 ml banky s guľatým dnom, s použitím citranového tlmivého roztoku (3.24).

Postupujte podľa 5.3.3..

5.3.3. Úprava pH

V závislosti od tolerancie analyzátora aminokyselín (4.9) na sodík postupujte pri upravovaní pH podľa 5.3.3.1 alebo 5.3.3.2.

5.3.3.1. V prípade chromatografických systémov (4.9).vyžadujúcich nízku koncentráciu sodíka:

Doporučuje sa používať zásobný roztok vnútorného štandardu (3.27.3), ak sa používajú analyzátory aminokyselín vyžadujúce nízku koncentráciu sodíka (ak sa objem kyseliny musí zmenšiť).

V takomto prípade pridajte 2,00 ml roztoku vnútorného zásobného štandardu (3.27.3) k hydrolyzátu pred odparovaním.

Pridajte 2 kvapky 1-oktanolu (3.15) k hydrolyzátu získanému podľa odseku 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4.

Použitím vákuovej rotačnej odparky (4.7) znížte objem na 5-10 ml vo vákuu a pri teplote 40 °C. Ak sa objem nedopatrením zníži na menej ako 5 ml, tak hydrolyzát sa musí vyhodiť a analýza sa musí vykonať znovu.

Upravte pH na 2,20 roztokom hydroxidu sodného (3.18) a postupujte v súlade s odsekom 5.3.4..

5.3.3.2. Pre všetky ostatné analyzátory aminokyselín (4.9)

Vezmite hydrolyzáty získané podľa 5.3.2.3 alebo 5.3.2.4 a čiastočne ich zneutralizujte opatrným pridaním za miešania 17 ml roztoku hydroxidu sodného (3.17), pričom teplota zostane pod 40°C.

Upravte pH na 2,20 pri izbovej teplote použitím roztoku hydroxidu sodného (3.17) a nakoniec roztoku hydroxidu sodného (3.18). Postupujte podľa 5.3.4.

5.3.4. Roztok vzorky pre chromatografiu

Kvantitatívne preneste hydrolyzát s upraveným pH (5.3.3.1 alebo 5.3.3.2) s citranovým tlmivým roztokom (3.24) do 200 ml odmernej banky a doplňte po značku tlmivým roztokom (3.24).

Pokiaľ ešte nebol použitý vnútorný štandard, pridajte 2,00 ml vnútorného štandardu (3.27.3) a doplňte po značku citranovým roztokom (3.24). Dôkladne premiešajte.

Ďalší postup je chromatografia v súlade s odsekom (5.4).

Ak sa roztoky vzoriek neanalyzujú v ten istý deň, musia sa skladovať pri teplote pod 5°C.

5.4. *Chromatografia*

Pred začatím chromatografie vytemperujte exktrakt (5.2) alebo hydrolyzát (5.3.4) na izbovú teplotu. Zmes premiešajte a vhodné množstvo prefiltrujte cez 0,2 μm membránový filter (4.5). Výsledný číry roztok sa podrobí iónovo výmennej chromatografii s použitím analyzátora aminokyselín (4.9).

Nastreknutie sa môže vykonať ručne alebo automaticky. Je dôležité, aby sa na kolónu nadávkovalo rovnaké analyzované množstvo roztoku štandardov a vzoriek ± 0,5 %, s výnimkou prípadov používania vnútorného štandardu a aby pomery sodík: aminokyselina v roztoku štandardu a vzorky boli tak podobné ako je to len prakticky možné.

Vo všeobecnosti frekvencia kalibračných meraní závisí od stálosti ninhydrínového činidla a analytického systému. Štandard alebo vzorka sa zriedi citranovým tlmivým roztokom (3.24) tak, aby sa dosiahla plocha píku štandardu, ktorá bude činiť 30 – 200 % plochy píku vzorky aminokyseliny.

Chromatografia aminokyselín sa bude mierne líšiť vzhľadom na druh použitého analyzátora a živice. Zvolený systém musí byť schopný oddeliť jednotlivé aminokyseliny od seba a od ninhydrín pozitívnych materiálov. V pracovnom rozsahu musí chromatografický systém poskytovať lineárnu odozvu na zmeny v množstvách aminokyselín pridávaných do kolóny.

Počas chromatografického kroku sa používajú nižšie uvedené pomery údolie: výška píku, keď sa analyzuje ekvimolárny roztok (aminokyselín, ktoré sa stanovujú). Tento ekvimolárny roztok musí obsahovať najmenej 30 % maximálnej dávky každej aminokyseliny, ktorá sa dá presne zmerať pomocou systému analyzátora aminokyselín (4.9).

Pri oddeľovaní treonín –serín pomer údolie:výška píku nižšej z dvoch aminokyselín prekrývajúcej sa na chromatograme nesmie prekročiť 2:10 (ak sa stanovujú iba cystín, cisteín, metionín, treonín a lyzín, tak nedostatočné oddelenie od priľahlých píkov negatívne ovplyvní stanovenie). V prípade všetkých ostatných aminokyselín musí byť oddelenie lepšie ako 1:10.

Systém musí zabezpečiť, aby lyzín bol oddelený od „artefaktov lyzínu“ a ornitínu.

6. **Výpočet výsledkov**

Plocha píkov vzorky a štandardu sa zmeria pre každú jednotlivú aminokyselinu a vypočíta sa množstvo v g aminokyseliny na kg vzorky.

$$\frac{A \times B \times MW \times F}{B \times W \times 1\,000} = \text{g aminokyselín na kg vzorky}$$

Ak sa použije vnútorný štandard, tak vynásobte faktorom: $\frac{D}{C}$

A = plocha píku, hydrolyzát alebo extrakt

B = plocha píku, kalibračný štandardný roztok

C = plocha píku, vnútorný štandard v hydrolyzáte alebo extrakte

D = plocha píku, vnútorný štandard, kalibračný štandardný roztok

MW = molekulová hmotnosť stanovovanej aminokyseliny

E = koncentrácia štandardu v µmol/ml

W = hmotnosť vzorky g) (korigovaná na pôvodnú hmotnosť ak je sušená alebo odtučnená).

F = celkové ml hydrolyzátu (5.3.4) alebo vypočítaný objem celkového zriedenia extraktu v ml (6.1).

Cystín a cysteín sa obidva stanovujú ako kyselina cysteová v hydrolyzátoch oxidovanej vzorky, avšak vypočítajú sa ako cystín. ($C_6 H_{12} N_2 O_4 S_2$, MW 240,30 s použitím MW 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Metionín sa stanoví ako metionín sulfón v hydrolyzátoch oxidovanej vzorky, vypočíta sa však ako metionín s použitím MW metionínu:149,21.

Pridaný voľný metionín sa stanoví po extrakcii ako metionín, pre výpočet sa použije rovnaká MW.

6.1. Objem celkového zriedenia extraktov (F) pre stanovenie voľných aminokyselín (5.2) sa vypočíta nasledovne:

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

V = objem konečného extraktu

7. **Vyhodnotenie metódy**

Táto metóda bola odskúšaná v rámci vzájomného porovnávania realizovaného na medzinárodnej úrovni v roku 1990 použitím štyroch rôznych krmív (kŕmna zmes pre ošípané, kŕmna zmes pre brojlery, bielkovinový koncentrát, premix). Výsledky, po vylúčení odľahlých výsledkov, priemernej a smerodajnej odchýlky sú uvedené v nasledujúcej tabuľke:

Stredné hodnoty g/kg

referenčný materiál	aminokyselina			
	treonín	cystín (cysteín)	metionín	lyzín
kŕmna zmes pre ošípané	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
kŕmna zmes pre brojlery	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
bielkovinový koncentrát	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
premix	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = počet participujúcich laboratórií

7.1. *Opakovateľnosť*

Opakovateľnosť vyjadrená ako „vnútrolaboratórna smerodajná odchýlka“ vyššie uvedeného vzájomného porovnania je uvedená v nasledovných tabuľkách:

Vnútrolaboratórna smerodajná odchýlka (S_r) v g/kg

referenčný materiál	aminokyselina			
	treonín	cystín (cysteín)	metionín	lyzín
kŕmna zmes pre ošípané	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
kŕmna zmes pre brojlery	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
bielkovinový koncentrát	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
premix	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = počet participujúcich laboratórií

Variačný koeficient (%) pre vnútrolaboratórnu smerodajnú odchýlku (S_r)

referenčný materiál	aminokyselina			
	treonín	cystín (cysteín)	metionín	lyzín
kŕmna zmes pre ošípané	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
kŕmna zmes pre brojlery	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
bielkovinový koncentrát	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
premix	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = počet participujúcich laboratórií

7.2. *Reprodukovateľnosť*

Výsledky smerodajnej odchýlky medzi laboratóriami na základe vyššie uvedeného vzájomného porovnania sú uvedené v tabuľkách nižšie:

Smerodajná odchýlka medzi laboratóriami (S_R) v g/kg

referenčný materiál	aminokyselina			
	treonín	cystín (cysteín)	metionín	lyzín
kŕmna zmes pre ošípané	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
kŕmna zmes pre brojlery	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
bielkovinový koncentrát	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
premix	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = počet participujúcich laboratórií

Variačný koeficient (%) pre medzilaboratórnu smerodajnú odchýlku (S_R)

referenčný materiál	aminokyselina			
	treonín	cystín (cysteín)	metionín	lyzín
kŕmna zmes pre ošípané	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
kŕmna zmes pre brojlery	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
bielkovinový koncentrát	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
premix	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = počet participujúcich laboratórií

8. **Používanie referenčných materiálov**

Správna aplikácia danej metódy sa overí vykonaním opakovaných meraní certifikovaných referenčných materiálov, pokiaľ sú k dispozícii. Doporučuje sa kalibrácia pomocou certifikovaného kalibračného roztoku aminokyseliny.

9. **Pozorovania**

9.1. Vzhľadom na rozdiely medzi analyzátormi aminokyselín sa ako orientačné musia zobrať konečné koncentrácie kalibračných roztokov štandardných aminokyselín (pozri 3.27.4 a 3.27.5) a hydrolyzátu (5.3.4).

Rozsah lineárnej odozvy prístroja sa musí overiť pre všetky aminokyseliny.

Štandardný roztok sa zriedi citranovým tlmivým roztokom tak, aby poskytoval plochy píkov v strede rozsahu.

9.2. Ak sa na analyzovanie hydrolyzátov používa zariadenie na vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu, tak podmienky skúšky sa musia optimalizovať v súlade s doporučeniami výrobcu.

9.3. Pri použití tejto metódy na krmivá obsahujúce viac ako 1 % chloridov (koncentráty, minerálne krmivá, doplnkové krmivá), tak môže dôjsť k podhodnoteniu metionínu a musí sa vykonať špeciálna úprava.

ČASŤ B

STANOVENIE OLEJOV A TUKOV

1. **Rozsah a účel**

Táto metóda je určená na stanovenie olejov a tukov v krmivách. Nevzťahuje sa na analýzu olejnatých semien a olejnatého ovocia definované v Nariadení Rady 136/66/EHS z 22. septembra 1966.

Používanie dvoch nižšie používaných metód závisí od charakteru a zloženia krmiva a od dôvodu vykonávania analýzy.

1.1. *Postup A – priamo extrahovateľné oleje a tuky*

Táto metóda je použiteľná pre kŕmne suroviny rastlinného pôvodu, s výnimkou tých, ktoré spadajú pod postup B.

1.2. *Postup B- celkové oleje a tuky*

Táto metóda je použiteľná pre kŕmne suroviny živočíšneho pôvodu a na všetky kŕmne zmesi. Musí sa používať pre všetky materiály,z ktorých sa oleje a tuky nedajú úplne extrahovať bez predchádzajúcej hydrolýzy (glutény, kvasnice, zemiakové bielkoviny a produkty, ktoré prešli takými procesmi ako je extrúzia, vločkovanie a zahrievanie).

1.3. *Interpretácia výsledkov*

Vo všetkých prípadoch, kde sa použitím postupu B získajú vyššie výsledky ako v prípade postupu A, za skutočnú hodnotu sa bude považovať výsledok dosiahnutý postupom B.

2. **Princíp**

2.1. *Postup A*

Vzorka sa extrahuje petroléterom. Rozpúšťadlo sa oddestiluje a zvyšok sa vysuší a odváži.

2.2. *Postup B*

Vzorka sa vystaví účinkom kyseliny chlorovodíkovej za horúca. Zmes a ochladí a prefiltruje. Zvyšok sa premyje, vysuší a podrobí stanoveniu podľa postupu A.

3. **Chemikálie**

3.1. Petroléter, rozmedzie varu: 40 až 60 °C. Brómové číslo musí byť nižšia ako 1 a odparok menší ako 2 mg/100ml.

3.2. Síran sodný, bezvodý.

3.3. Kyselina chlorovodíková, c = 3 mol HCl/l

3.4. Filtračná pomôcka, napr, kremelina, hyflo-supercel.

4. **Prístroje**

4.1. Extrakčný prístroj. Ak je vybavený sifónom(Soxhletov prístroj), množstvo refluxu musí byť také, aby vykazovalo 10 cyklov za hodinu, ak sa jedná o zariadenie bez sifónu, tak množstvo refluxu musí byť 10 ml za minútu.

4.2. Extrakčné patróny, neobsahujúce látky rozpustné v petroléteri a s poréznosťou,ktorá je v súlade s požiadavkami bodu 4.1.

4.3. Sušiareň, buď vákuová pec nastavená na teplotu 75 °C ± 3 °C alebo teplovzdušná sušiareň nastavená na teplotu 100 °C ± 3 °C.

5. **Postup**

5.1. *Postup A (pozri bod 8.1)*

Navážte s presnosťou na 1 mg 5 g vzorky, preneste ju do extrakčnej patróny (4.2) a prikryte zátkou z odmastenej vaty.

Vložte patrónu do extraktora (4.1) a extrahujte šesť hodín petroléterom (3.1). Extrakt petroléteru zachyťte do suchej odváženej banky obsahujúcej fragmenty pemzového kameňa ([1]).

Oddestilujte rozpúšťadlo Sušte zvyšok ktorý zostal v banke jeden a pól hodiny v sušiacej peci (4.3). Nechajte vychladnúť v exsikátore a odvážte. Znovu sušte 30 minút a presvedčte sa, či hmotnosť olejov a tukov zostáva konštantná (strata na hmotnosti medzi dvomi následnými váženiami musí byť menšia ako 1 mg).

5.2. *Postup B*

Navážte s presnosťou na 1 mg 2,5 g vzorky (pozri bod 8.2), vložte do 400 ml kadičky alebo do 300 ml Erlenmayerovej banky a pridajte 100 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.3) a fragmenty pemzového kameňa. Kadičku prikryte hodinovým sklíčkom alebo na Erlenmayerovu banku nasaďte spätný chladič. Uveďte zmes do mierneho varu nad nízkym plameňom alebo na horúcej platni a ponechajte ju tak po dobu jednej hodiny. Nedovoľte, aby savzorka prilepovala na steny nádobky.

Ochladťe a pridajte také množstvo filtračného prípravku (3.4), ktoré bude dostatočné na zabránenie akýmkoľvek stratám oleja a tuku počas filtrácie. Prefiltrujte cez navlhčený, odmastený, dvojitý filtračný papier. Zvyšok premývajte v studenej vode, kým nezískate neutrálny filtrát. Skontrolujte, či filtrát neobsahuje olej alebo tuky. Ich prítomnosť indikuje, že vzorka sa musí pred hydrolýzou extrahovať petroléterom podľa postupu A.

Položte dvojitý filtračný papier obsahujúci zvyšok na hodinové sklíčko a sušte jeden a pól hodiny v teplovzdušnej sušiarni (4.3) pri teplote 100 °C ± 3 °C.

Vložte dvojitý filtračný papier obsahujúci suchý zvyšok do extrakčnej patróny (4.2) a prikryte zátkou z odmastenej vaty. Patrónu vložte do extraktora (4.1) a postupujte tak, ako je uvedené v druhom a treťom odseku bodu 5.1.

([1]) Tam, kde olej alebo tuk musí prejsť následnými skúškami kvality, nahraďte fragmenty pemzového kameňa sklenými guľôčkami.

6. **Vyjadrenie výsledkov**

Hmotnosť zvyšku vyjadrite ako percento vzorky.

7. **Opakovateľnosť**

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke tým istým analytikom nesmie prekročiť:

— 0,2 % v absolútnej hodnote, pre obsahy olejov a tukov pod 5 %,

— 4,0 % relatívnych z najvyššieho výsledku pre obsahy 5-10 %,

— 0,4 % v absolútnej hodnote pre obsahy nad 10 %.

8. **Pozorovania**

8.1. V prípade produktov s vysokým obsahom olejov a tukov, ktoré sa dajú ťažko rozdrviť alebo ktoré sú nevhodné na získanie homogénnej redukovanej skúšobnej vzorky, postupujte nasledovne.

Navážte s presnosťou na 1 mg 20 g vzorky a zmiešajte s 10 g alebo viac bezvodého síranu sodného (3.2). Extrahujte petroléterom (3.1) spôsobom uvedeným v bode 5.1. Získaný extrakt doplňte na 500 ml petroléterom (3.1) a premiešajte. Odoberte 50 ml roztoku a vložte do malej, suchej, odváženej banky obsahujúcej fragmenty pemzového kameňa ([1]). Rozpúšťadlo oddestilujte, vysušte a postupujte spôsobom uvedeným v poslednom odseku bodu 5.1.

Odstráňte rozpúšťadlo z extrakčného zvyšku ktorý zostal v patróne, zvyšok rozdrvte na jemnosť 1 mm, dajte ho naspäť do extrakčnej patróny (síran sodný nepridávajte) a postupujte spôsobom uvedeným v druhom a treťom odseku bodu 5.1.

Vypočítajte obsah olejov a tukov ako percento vzorky s použitím nasledovného vzorca:

(10 a + b) x 5

kde:

a = hmotnosť v gramoch zvyšku po prvej extrakcii (alikvotná časť extraktu),

b = hmotnosť v gramoch zvyšku po druhej extrakcii.

8.2. V prípade produktov s nízkym obsahom olejov a tukov sa môže množstvo skúšobnej vzorky zvýšiť na 5 g.

8.3. V prípade krmív pre spoločenské zvieratá s vysokým obsahom vody sa môže stať, že ich bude treba zmiešať bezvodým síranom sodným ešte pred hydrolýzou a extrakciou podľa postupu B.

8.4. V odseku 5.2 môže byť na premytie zvyšku po filtrácii efektívnejšie použiť namiesto studenej vody horúcu vodu.

8.5. Môže byť potrebné dobu sušenia v trvaní 1,5 hodiny u niektorých krmív predĺžiť. Nadmerného sušenia sa treba vystríhať, nakoľko by to mohlo viesť k nízkym výsledkom. Je možné použiť aj mikrovlnnú rúru.

8.6. Ak je obsah oleja/tuku vyšší ako 15 %, tak sa doporučuje predbežná extrakcia podľa postupu A pred hydrolýzou a reextrakcia podľa postupu B. Toto závisí do určitej miery od charakteru krmiva a od charakteru oleja-tuku v krmive.

ČASŤ C

STANOVENIE OLAQUINDOXU

(2-[N-2-(hydroxyetyl)karbamoyl]-3-metylchinoxalín-N^1,N^4-dioxid)

1. **Rozsah a účel**

Táto metóda je určená na stanovenie olaquindoxu v krmivách. Dolná medza stanoviteľnosti je 5 mg/kg.

2. **Princíp**

Vzorka sa extrahuje zmesou voda-metanol. Obsah olaquindoxu sa stanoví pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie s obrátenými fázami (HPLC) s použitím UV detektora.

([1]) Tam, kde olej alebo tuk musí prejsť následnými skúškami kvality, nahraďte fragmenty pemzového kameňa sklenými guľôčkami.

3. **Chemikálie**

3.1. Metylalkohol

3.2. Metylalkohol, čistoty HPLC

3.3. Voda, HPLC čistoty

3.4. Mobilná fáza pre HPLC:

Zmes voda (3.3) – Metylalkohol (3.2), 900 + 100 (obj. + obj.).

3.5. Štandardná látka: čistý olaquindox 2-[N-2-(hydroxyetyl)karbamoyl]-3-metylchinoxalín-N^1,N^4-dioxid), E 851.

3.5.1. Zásobný štandardný roztok olaquindoxu 250 µg/ml

Navážte s presnosťou na 0,1 mg 50 mg olaquindoxu (3.5) do odmernej banky a pridajte cca 190 ml vody. Potom banku vložte na 20 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.1). Po pôsobení ultrazvuku roztok upravte na izbovú teplotu, doplňte po značku vodou a premiešajte. Banku zabaľte do hliníkovej fólie a skladujte v chladničke. Tento roztok musí byť čerstvo pripravený každý mesiac.

3.5.2. Pracovný štandardný roztok olaquindoxu, 25 µg/ml

Preneste 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.5.1) do 100 ml odmernej banky, doplňte po značku mobilnou fázou (3.4) a premiešajte. Banku zabaľte do hliníkovej fólie a skladujte v chladničke. Tento roztok musí byť čerstvo pripravený každý deň.

3.5.3. Kalibračné roztoky:

Do série 50 ml odmerných baniek preneste 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0, a 20,0 ml pracovného štandardného roztoku (3.5.2). Doplňte po značku mobilnou fázou (3.4) a premiešajte. Banku zabaľte do hliníkovej fólie. Tieto roztoky zodpovedajú 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 a 10,0 µg olaquindoxu na 1 ml.

Tieto roztoky sa musia čerstvo pripravovať každý deň.

4. **Prístroje**

4.1. Ultrazvukový kúpeľ

4.2. Mechanická trepačka

4.3. HPLC (vysokoúčinný kvapalinový chromatograf) s UV detektorom s nastaviteľnou vlnovou dĺžkou alebo s diode – array detektorom.

4.3.1. Kolóna na kvapalinovú chromatografiu, 250 mm x 4 mm, C18, 10 µm náplň, alebo ekvivalentná

4.4. Membránové filtre, 0,45 µm

5. **Postup**

Poznámka: Olaquindox je citlivý na svetlo. Všetky procedúry vykonávajte pri tlmenom svetle alebo používajte jantárové (žltohnedé) laboratórne sklo.

5.1. *Všeobecne*

5.1.1. Analyzujte slepú vzorku krmiva s cieľom skontrolovať že nie je prítomný ani olaquindox a ani interferujúce látky.

5.1.2. Test návratnosti sa musí vykonať analyzovaním slepéjvzorky, ktorá bola obohatená pridaním množstva olaquindoxu podobného tomu, aké sa nachádza vo vzorke. Za účelom obohatiť na úroveň 50 mg/kg, preneste 10,0 ml zásobného štandardného roztoku (3.5.1) do 250 ml Erlenmayerovej banky a roztok odparte na približne 0,5 ml. Pridajte 50 g slepéj vzorky, dôkladne premiešajte a nechajte 10 minút stáť, potom premiešajte opäť niekoľkokrát predďalším extrakčným krokom (5.2).

Poznámka: Pre účely tejto metódy slepá vzorka musí byť druhovo podobná analyzovanej vzorke a pri analýze nesmie byť zistený olaquindoxín.

5.2. *Extrakcia*

Navážte s presnosťou na 0,01 g približne 50 g vzorky. Preneste do 1 000 ml Erlenmayerovej banky, pridajte 100 ml metylalkoholu (3.1) a banku vložte na 5 minút do ultrazvukového kúpeľa (4.1). Pridajte 410 ml vody a nechajte v ultrazvukovom kúpeli ďalších 15 minút. Banku z ultrazvukového kúpeľa vyberte, trepte ju 30 minút na trepačke (4.2) a prefiltrujte cez skladaný filter. Preneste 10,0 ml filtrátu do 20 ml odmernej banky, doplňte po značku vodou a premiešajte. Alikvotná časť sa potom prefiltruje cez membránový filter (4,4). (pozri 9. Upozornenie).Pokračujte HPLC stanovením (5.3).

5.3. *HPLC stanovenie*

5.3.1. Parametre:

Nasledujúce podmienky majú slúžiť ako usmerňujúce. Je možné použiť iné podmienky za predpokladu, že poskytnú ekvivalentné výsledky.

Analytická kolóna (4.3.1)

Mobilná fáza (3.4):	Zmes voda (3.3)metylalkohol (3.2), 900 + 100 (obj. + obj.)
Prietok:	1,5-2 ml/min.
Vlnová dĺžka detekcie:	380 nm
Objem nástreku:	20 µl-100 µl

Skontrolujte stabilitu chromatografického systému tým, že vstreknete niekoľkokrát kalibračný roztok (3.5.3) obsahujúci 2,5 µg/ml, dovtedy kým sa nedosiahnu konštantné výšky píkov a retenčné časy.

5.3.2. Kalibračná krivka

Nastreknite každý kalibračný roztok (3.5.3) niekoľko krát a stanovte priemerné výšky (plochy) píkov pre každú koncentráciu. Zostrojte kalibračnú krivku použitím priemerných výšok (plôch) píkov kalibračných roztokov na ordinátu a príslušné koncentrácie v µg/ml na abscisu.

5.3.3. Roztok vzorky

Nastreknite extrakt vzorky (5.2) niekoľkokrát použitím rovnakého objemu aký ste použili na kalibračné roztoky a stanovte priemernú výšku (plochu) píku pre píky olaquindoxu.

6. **Výpočet výsledkov**

Z priemernej výšky (plochy) píkov olaquindoxu v roztoku vzorky stanovte koncentráciu roztoku vzorky v µg/ml odčítaním z kalibračného grafu (5.3.2).

Obsah olaquindoxu w v mg/kg vo vzorke je dané nasledovným vzorcom:

$$w = \frac{c \times 1\,000}{m}$$

kde:

c = koncentrácia olaquindoxu v extrakte vzorky (5.2) v µg/ml

m = hmotnosť skúšobnej vzorky v g (5.2).

7. **Validácia výsledkov**

7.1. *Identita*

Identitu analytu môžeme potvrdiť paralelnou chromatografiou alebo použitím diode – array detektora, pomocou ktorého porovnáme spektrá extraktu vzorky (5.2) a kalibračného roztoku (3.5.3) obsahujúceho 5 µg/ml.

7.1.1. Paralelná chromatografia

Do extraktu vzorky (5.2) sa pridá vhodné množstvo kalibračného roztoku (3.5.3). Množstvo pridaného olaquindoxu musí byť podobné množstvu olquindoxu, zistenému v extrakte vzorky.

Vzhľadom na pridané množstvo a riedenie extraktu sa zvýši len výška píku olaquindoxu Šírka píku v polovici jeho výšky musí byť v rozmedzí ± 10 % pôvodnej šírky píku olaquindoxu v neobohatenom extrakte vzorky.

7.1.2. Diode – array detekcia

Výsledky sa vyhodnotia podľa nasledovných kritérií:

a) vlnová dĺžka maximálnej absorpcie vzorky a štandardných spektier, zaznamenaných na vrchole píku na chromatograme, musí byť v rozsahu určenom rozlišovacou schopnosťou detekčného systému. V prípade diode – array detekcie sa obyčajne pohybuje v rozsahu ± 2 nm.

b) spektrá vzorky a štandardu zaznamenané na vrchole píku chromatogramu nesmú byť odlišné v časti spektra medzi 220 a 400 nm v rozsahu od 10 až 100 % relatívnej absorbancie. Táto požiadavka je splnená, keď sú prítomné tie isté maximá a ak odchýlka medzi oboma spektrami v žiadnom pozorovanom bode nepresiahne 15 % absorbancie analytu štandardu;

c) Spektrá stúpajúcej časti absorbčnej krivky, vrcholu a klesajúcej časti absorbčnej krivky píku vytvorené extraktom vzorky, sa nesmú odlišovať od ostatných častí spektra medzi 220 a 400 nm v rozsahu od 10 do 100 % relatívnej absorbancie. Táto požiadavka je splnená, ak sú prítomné rovnaké maximá a ak vo všetkých sledovaných bodoch odchýlka medzi spektrami nepresiahne 15 % absorbancie spektra vrcholu píku.

Ak niektoré z týchto kritérií nebude splnené, tak prítomnosť analyzovanej zložky sa nepotvrdila.

7.2. *Opakovateľnosť*

Rozdiel medzi výsledkami dvoch paralelných stanovení vykonaných na tej istej vzorke nesmie prekročiť 15 % relatívnych z vyššieho výsledku obsahu olaquindoxu pre obsahy olaquindoxu medzi 10 a 200 mg/kg.

7.3. *Návratnosť*

V prípade obohatenej slepej vzorky musí návratnosť činiť najmenej 90 %.

8. **Výsledky kruhového testu**

V rámci spolupráce bola vypracovaná štúdia ES v ktorej až 13 laboratórií analyzovalo štyri vzorky krmiva pre malé prasiatka vrátane jednej slepej vzorky. Výsledky sú uvedené nižšie.

	vzorka 1	vzorka 2	vzorka 3	vzorka 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
priemer 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
menovitý obsah (mg/kg)	—	15	50	100
návratnosť (%)	—	97,3	96,0	95,4

L : počet laboratórií
n : počet jednotlivých hodnôt
S_r : smerodajná odchýlka opakovateľnosti
S_R : smerodajná odchýlka reprodukovateľnosti
CV_r : variačný koeficient opakovateľnosti
CV_R : variačný koeficient reprodukovateľnosti

9. **Pozorovanie**

Hoci táto metóda nebola overená pre krmivá obsahujúce viac ako 100 mg/kg olaquindoxu, dajú sa dosiahnuť uspokojivé výsledky, ak sa zoberú vzorky s nižšou hmotnosťou a/alebo extrakt zriedi tak (5.2) aby sa dosiahla koncentrácia v rozsahu kalibračnej krivky (5.3.2)