



ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2024/771

z dnia 29 lutego 2024 r.

zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz

(Tekst mający znaczenie dla EOG)

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG (rozporządzenie w sprawie kontroli urzędowych) ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 34 ust. 6,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu Komisji (WE) nr 152/2009 ⁽²⁾ ustanowiono metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz.
- (2) Metody pobierania próbek i dokonywania analiz ustanowione rozporządzeniem (WE) nr 152/2009 należy dostosować w świetle rozwoju wiedzy naukowej i technologicznej. Niniejsze rozporządzenie powinno wprowadzić kilka drobnych zmian, aby uwzględnić doświadczenia związane ze stosowaniem metody analizy lub doprecyzować niektóre przepisy.
- (3) Metoda pobierania próbek opisana w rozporządzeniu (WE) nr 152/2009 nie jest odpowiednia do pobierania próbek w celu kontroli zanieczyszczenia mikrobiologicznego i w związku z tym jest wyłączona z zakresu stosowania. W wyniku zmiany wprowadzonej rozporządzeniem Komisji (UE) nr 691/2013 ⁽³⁾ metoda ta nie była już wyraźnie wyłączona z zakresu stosowania, co doprowadziło do pewnych niejasności, w związku z czym należy ponownie wyraźnie wyłączyć ją z zakresu stosowania.
- (4) Należy wprowadzić przepisy szczegółowe dotyczące pobierania próbek pasz oferowanych do sprzedaży przez podmioty działające na rynku pasz za pomocą środków porozumiewania się na odległość, z uwagi na to, że sprzedaż pasz za pomocą środków porozumiewania się na odległość roślinie. Przepisy dotyczące niepewności pomiaru analitycznego i odzysku, które obowiązują w przypadku analizy substancji niepożądanych, należy również wprowadzić w odniesieniu do analizy zawartości dodatków paszowych, gdyż są one również istotne dla tej kwestii. W świetle dowodów na to, że stosowanie metody analizy do oznaczania mocznika poza zakresem zezwolenia na jego stosowanie jako dodatku paszowego prowadzi do nieprawidłowych wyników analitycznych, należy określić zakres tej metody oraz dodać informacje na temat oceny metody i wyników porównania międzylaboratoryjnego.
- (5) Należy skreślić kilka metod analizy ustanowionych rozporządzeniem (WE) nr 152/2009, ponieważ nie spełniają już one zamierzonego celu. Należy skreślić metodę analizy służącą do oznaczania lotnych zasad amonowych oraz metodę oznaczania węglanów, ponieważ w unijnym prawodawstwie paszowym nie ma już wymogu prawnego kontroli zgodności. Obecna metoda analizy w celu oznaczania diklazurilu zawiera błędy redakcyjne, w związku z czym nie dostarcza wiarygodnych wyników analitycznych. Należy ją zatem zastąpić dostosowaną metodą, która pozwala uzyskać wiarygodne wyniki. Nowe metody analizy wolnego i całkowitego gossypolu dostarczyły dowodów na to, że metoda analizy służąca do oznaczania wolnego i całkowitego gossypolu ustanowiona rozporządzeniem (WE)

⁽¹⁾ Dz.U. L 95 z 7.4.2017, s. 1.

⁽²⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz (Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1).

⁽³⁾ Rozporządzenie Komisji (UE) nr 691/2013 z dnia 19 lipca 2013 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 152/2009 w odniesieniu do metod pobierania próbek i dokonywania analiz (Dz.U. L 197 z 20.7.2013, s. 1).

nr 152/2009 nie daje wiarygodnych wyników i w związku z tym należy ją skreślić i zastąpić odniesieniem do norm europejskich (normy EN). Należy skreślić metody analizy do celów kontroli nielegalnej obecności w paszy dodatków, które już nie są dopuszczone, ponieważ od tego czasu opracowano bardziej czułe metody badań przesiewowych i metody analizy.

- (6) Oprócz metod analizy opisanych w załącznikach do niniejszego rozporządzenia należy wprowadzić odniesienie do norm EN do stosowania w ramach kontroli urzędowej.
- (7) Ponieważ rozporządzeniem wykonawczym Komisji (UE) 2021/2047 ⁽⁴⁾ zezwolono na stosowanie nowego dodatku paszowego amprolium, w załączniku IV do rozporządzenia (WE) nr 152/2009 należy dodać metodę analizy do oznaczania amprolium.
- (8) Ponieważ zmiany w rozporządzeniu (WE) nr 152/2009 są istotne i odnoszą się do wielu przepisów zawartych w załącznikach do tego rozporządzenia, należy, dla zachowania przejrzystości, zastąpić te załączniki w całości.
- (9) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Roślin, Zwierząt, Żywności i Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Zmiany w rozporządzeniu (WE) nr 152/2009

W rozporządzeniu (WE) nr 152/2009 wprowadza się następujące zmiany:

- 1) art. 1 akapit pierwszy otrzymuje brzmienie:

„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 ^(*) oraz niepożądanych substancji zdefiniowanych w dyrektywie 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady ^(**) przeprowadzane jest zgodnie z metodami opisanymi w załączniku I z wyjątkiem pobierania próbek do celów kontroli zanieczyszczenia mikrobiologicznego.

^(*) Rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt (Dz.U. L 268 z 18.10.2003, s. 29).

^(**) Dyrektywa 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 7 maja 2002 r. w sprawie niepożądanych substancji w paszach zwierzęcych (Dz.U. L 140 z 30.5.2002, s. 10).”;

- 2) załącznik I zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku I do niniejszego rozporządzenia;
- 3) załącznik II zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku II do niniejszego rozporządzenia;
- 4) załącznik III zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku III do niniejszego rozporządzenia;
- 5) załącznik IV zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku IV do niniejszego rozporządzenia;
- 6) załącznik V zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku V do niniejszego rozporządzenia;
- 7) załącznik VII zastępuje się tekstem znajdującym się w załączniku VI do niniejszego rozporządzenia;
- 8) uchyla się załącznik VIII.

⁽⁴⁾ Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2021/2047 z dnia 23 listopada 2021 r. dotyczące zezwolenia na stosowanie chlorowodoru amprolium (COXAM) jako dodatku paszowego dla kurcząt rzeźnych i kurcząt odchowujących na kury nioski (posiadacz zezwolenia: HuvePharma NV) (Dz.U. L 418 z 24.11.2021, s. 13).

Artykuł 2

Wejście w życie

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

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

Sporządzono w Brukseli dnia 29 lutego 2024 r.

W imieniu Komisji
Przewodnicząca
Ursula VON DER LEYEN

ZAŁĄCZNIK I

„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 jakiegokolwiek cechy szczególnej tej frakcji stanowi średnią cech całej partii. Próbki danej partii pobiera się 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 z kontroli wzrokowej lub inaczej uzyskanych istotnych informacji wynika, 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 zamieszcza się 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.

Pobieranie próbek może również obejmować pasze oferowane do sprzedaży przez podmioty działające na rynku pasz za pośrednictwem środków porozumiewania się na odległość zgodnie z art. 11 ust. 3 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 767/2009 ⁽¹⁾. Pobieranie próbek pasz oferowanych do sprzedaży za pomocą środków porozumiewania się na odległość podlega co do zasady punktom określonym w niniejszym załączniku. Szczegółowe aspekty pobierania próbek paszy sprzedawanej na odległość opisano w pkt 11.

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.
- Próbką zapieczętowaną: próbka zapieczętowana w sposób uniemożliwiający dostęp do niej bez złamania lub usunięcia pieczęci.
- Próbką pierwotną: ilość pobrana z jednego miejsca kontrolowanej części.
- Próbką zbiorczą: sumaryczna ilość pierwotnych próbek pobranych z tej samej kontrolowanej części.
- Próbką zredukowaną: część próbki zbiorczej otrzymana z niej w procesie reprezentatywnej redukcji.
- Próbką końcową: część próbki zbiorczej (wymieszanej), próbki zredukowanej lub zhomogenizowanej próbki zbiorczej, w zależności od rodzaju kontroli (zob. pkt 9.4.).
- Próbką laboratoryjną: próbka przeznaczona do celów laboratoryjnych (otrzymana przez laboratorium), która może być próbką końcową, zredukowaną lub zbiorczą.
- Próbką paszy sprzedawanej na odległość: próbka partii paszy oferowanej do sprzedaży za pośrednictwem środków porozumiewania się na odległość.

⁽¹⁾ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 767/2009 z dnia 13 lipca 2009 r. w sprawie wprowadzania na rynek i stosowania pasz, zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady i uchylające dyrektywę Rady 79/373/EWG, dyrektywę Komisji 80/511/EWG, dyrektywę Rady 82/471/EWG, 83/228/EWG, 93/74/EWG, 93/113/EWG i 96/25/EWG oraz decyzję Komisji 2004/217/EW (Dz.U. L 229 z 1.9.2009, s. 1).

3. PRZEPISY OGÓLNE

- Próbkę pobierane są przez osoby upoważnione do tego celu przez właściwy organ.
- W odniesieniu do próbki paszy sprzedawanej na odległość właściwy organ zwraca się do podmiotu działającego na rynku pasz o przekazanie określonej ilości paszy za pomocą środków porozumiewania się na odległość.
- Próbkę musi być zabezpieczona w sposób uniemożliwiający dostęp do niej bez złamania lub usunięcia pieczęci.
Znak pieczęci musi być łatwo identyfikowalny i widoczny.
- 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 lub zredukowanej pobiera się następujące próbki końcowe: należy pobrać jedną do celów kontroli (kontrola przestrzegania przepisów) i drugą dla podmiotu działającego na rynku pasz (próbka do celów obrony). Jedną dodatkową próbkę końcową 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.
- Zgodnie z art. 15 ust. 1 i 2 rozporządzenia (UE) 2017/625, jeżeli jest to konieczne do przeprowadzenia urzędowego pobierania próbek, w przypadku gdy wymagają tego właściwe organy, podmioty działające na rynku pasz:
 - zapewniają personelowi właściwych organów dostęp do wyposażenia znajdującego się pod ich kontrolą, w tym w razie potrzeby udostępniają odpowiedni sprzęt do pobierania próbek i środki ochrony indywidualnej;
 - pomagają personelowi właściwych organów i współpracują z nim w celu umożliwienia pobierania próbek, w tym udostępniają paszę personelowi właściwych organów.

4. APARATURA I 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 do pobierania próbek 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 otwory powinny być oddzielone przegródkami lub należy zastosować naprzemienne otwory rozmieszczone sekwencyjnie.

4.2.2. *Mechaniczne pobieranie próbek*

Stosowne urządzenie mechaniczne może być użyte do pobierania próbek paszy w ruchu. Urządzenie mechaniczne uznaje się za właściwe, jeżeli pobiera się próbki 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 w przybliżeniu na równe części.

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. Opisana metoda pobierania próbek jest ważna również w odniesieniu do ilości większych niż podana wielkość maksymalna kontrolowanej części, pod warunkiem że zignorowana zostanie maksymalna liczba próbek pierwotnych podana w tabelach poniżej w pkt 5.1.1, 5.1.3 i 5.1.5, liczba 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 metodę pobierania próbek przewidzianą w pkt 5.3.
- W przypadku próbek paszy sprzedawanej na odległość właściwy organ na ogół nie ma informacji na temat wielkości partii, z której prosi o przekazanie określonej ilości. W związku z tym nie można zastosować metody, o której mowa w pkt 5.1 i 5.2. W takim przypadku stosuje się metodę opisaną w pkt 11.
- 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 punkcie w celu uwzględnienia charakterystyki operacyjnej pod warunkiem że wykaże, w sposób wymagany przez właściwy organ, równoważność metody pobierania próbek pod względem 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	$\sqrt{}$ (dwudziestokrotności liczby ton stanowiących kontrolowaną część) (*), do 40 próbek pierwotnych

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

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, puszkki, beczki itd., określone w poniższej tabeli jako »jednostki«. Duże jednostki (≥ 500 kg lub litrów) muszą być kontrolowane zgodnie z przepisami dotyczącymi paszy luzem (zob. 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	$\frac{1}{4} \sqrt{\text{(liczby jednostek stanowiących kontrolowaną część) (***)}}$, 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, zaokrągla się ją 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 obejmującą 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	$\sqrt{\text{(pięciokrotności liczby ton stanowiących kontrolowaną część) (**)}}$, 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 sytuacjach można zastosować alternatywną metodę pobierania próbek – opracowano wytyczne dotyczące pobierania próbek takich partii, które są dostępne pod adresem https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/animal-feed-guidance_documents_691_2013_en.pdf

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

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

Wymogi ilościowe dotyczące próbek pierwotnych należy stosować w następujących przypadkach:

- kontrola aflatoksyn, sporyszu żyta, innych mikotoksyn i szkodliwych zanieczyszczeń botanicznych w materiałach paszowych,
- kontrola zanieczyszczenia krzyżowego przez składnik, w tym materiał modyfikowany genetycznie, lub substancję, które mogą nie być jednociele 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 + $\sqrt{\text{ton}}$ w odniesieniu do kontroli substancji lub produktów jednolicie rozmieszczonych w paszy lub 100 próbek pierwotnych + $\sqrt{\text{ton}}$ w odniesieniu do kontroli składników lub substancji, które mogą nie być jednolicie rozmieszczone w paszy.

6. WYMOGI ILOŚCIOWE DOTYCZĄCE PRÓBKII 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 (***)
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/ziaren.

(***) 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 małej gęstości właściwej (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 (UE) nr 619/2011 próbka końcowa do celów kontroli 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/ziaren.
(**)	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 oznaczenia pozostałości pestycydów minimalna wielkość próbki końcowej wynosi 1 kg zgodnie z przepisami dyrektywy Komisji 2002/63/WE z dnia 11 lipca 2002 r. ustanawiającej wspólnotowe metody pobierania próbek do celów urzędowej kontroli pozostałości pestycydów w produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni oraz uchylającej dyrektywę 79/700 (Dz.U. L 187 z 16.7.2002, s. 30).
(****)	W przypadku badania w drodze kontroli wzrokowej lub mikroskopii ilość próbki końcowej do badania wynosi 1 kg.

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 uniemożliwia 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 metod pobierania próbek przewidzianych w niniejszym punkcie podmiot działający na rynku pasz lub jego przedstawiciel jest informowany o metodzie pobierania próbek. Jeżeli metoda ta zostanie zakwestionowana przez podmiot działający na rynku pasz lub jego przedstawiciela, umożliwiają oni właściwemu organowi pobieranie próbek w całej partii na koszt podmiotu.

8.2. Duże partie transportowane statkiem

8.2.1. Dynamiczne pobieranie próbek z dużych partii transportowanych statkiem

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

Próbki pobiera się w podziale na ładownię (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. Zasadniczo próbki należy pobierać w regularnych odstępach czasu podczas całego rozładunku. Jednakże nie zawsze jest możliwe lub stosowne, aby urzędowny inspektor był obecny przy pobieraniu próbek podczas całego rozładunku. Dlatego zezwala się na pobieranie próbek z części partii (kontrolowana część). 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.

Nawet jeżeli urzędowa 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 zabezpieczonego pojemnika, co uniemożliwia ewentualne oszustwa, wówczas obecność inspektora jest wymagana tylko na początku pobierania próbek, przy każdej zmianie pojemnika i pod koniec pobierania próbek.

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 (silosy zamknięte) o rozmiarze > 100 ton

Pasze przechowywane w takich silosach nie mogą być kontrolowane w sposób statyczny. Jeżeli zatem 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 (silosy zamknięte) o rozmiarze < 100 ton

Metoda pobierania próbek polega na umieszczeniu 50–100 kg w pojemniku i pobraniu z niego próbki. 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.

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

Próbki z takich partii często mogą być pobrane dopiero 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. **Wskazówki ogólne**

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

9.2. **Próbki pierwotne**

Próbki pierwotne należy pobrać losowo z całej kontrolowanej części, przy czym muszą być one równomiernie rozmieszczone i mieć w przybliżeniu jednakową wielkość.

Wielkość próbki pierwotnej wynosi co najmniej 100 g lub 25 g w przypadku pasz objętościowych i włóknistych o małej gęstości właściwej.

Jeżeli, zgodnie z metodą pobierania próbek ustanowioną w pkt 8, pobranych ma zostać mniej niż 40 próbek pierwotnych, wielkość 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), wielkość próbki pierwotnej zależy od wielkości jednostki.

W przypadku próbek paszy sprzedawanej na odległość rozmiar próbki pierwotnej zależy od wielkości jednostki i w indywidualnych przypadkach może również zawierać mniej niż 100 g lub 100 ml.

9.2.1. *Pasze luzem*

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

9.2.2. *Pasze opakowane*

Po wybraniu wymaganej liczby jednostek w celu pobrania próbek zgodnie z pkt 5 część zawartości każdej jednostki usuwa się przy użyciu próbnika lub szuflki. 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 pkt 5 należy w razie potrzeby zhomogenizować zawartość i pobrać materiał z każdej jednostki.

Próbki pierwotne mogą być pobierane w trakcie opróżniania zawartości pojemnika.

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

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

Próbki mogą być także pobierane w trakcie opróżniania pojemników, przy czym pierwsze frakcje 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 lub lizawek w celu pobrania próbek zgodnie z pkt 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 ^(?).

^(?) Jakikolwiek zbrylenia muszą być rozbite (jeśli to konieczne – poprzez odseparowanie i zwrócenie do próbki).

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.

9.4.1. *Substancje rozmieszczone jednolicie*

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)⁽³⁾, 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 kontroli 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 próbki zbiorczej lub próbek zredukowanych pobiera się próbki końcowe (do celów kontroli i obrony oraz ewentualnie do celów referencyjnych), które mają w przybliżeniu tę samą wielkość i są zgodne z ilościowymi wymaganiami określonymi w pkt 7.

9.4.2. *Substancje rozmieszczone niejednolicie*

W przypadku kontroli składników, w tym materiału zmodyfikowanego genetycznie, lub substancji, które mogą nie być jednolicie rozmieszczone w paszy, próbka zbiorcza musi zostać:

- (i) całkowicie zhomogenizowana. Ze zhomogenizowanej próbki zbiorczej pobiera się następnie próbki końcowe (do celów kontroli i obrony oraz ewentualnie do celów referencyjnych), które mają w przybliżeniu tę samą wielkość i są zgodne z ilościowymi wymaganiami określonymi w pkt 7; lub
- (ii) zredukowana do co najmniej 2 kg lub 2 litrów⁽⁴⁾ przy użyciu rozdzielacza mechanicznego lub automatycznego. Jedynie w przypadku gdy charakter paszy nie zezwala na zastosowanie rozdzielacza, w razie potrzeby próbka może zostać zredukowana metodą ćwiartowania. Do celów kontroli 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 i obrony oraz ewentualnie do celów referencyjnych – zawierających co najmniej 10 000 nasion/ziaren (zob. przypis (**)) w pkt 6 i przypis (*) w pkt 7).

Z próbki zredukowanej pobiera się próbki końcowe, które mają w przybliżeniu tę samą wielkość i są zgodne z ilościowymi wymaganiami określonymi w pkt 7.

9.5. **Opakowanie próbek**

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

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 zapisuje się również wszelkie przypadki odejścia od metody 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.

⁽³⁾ Z wyjątkiem pasz objętościowych i włóknistych o małej gęstości właściwej.

⁽⁴⁾ Z wyjątkiem pasz objętościowych i włóknistych o małej gęstości właściwej.

11. PRÓBKA PASZY SPRZEDAWANEJ NA ODLEGŁOŚĆ

- W odniesieniu do próbki paszy sprzedawanej na odległość podmiot działający na rynku pasz proszony jest o przekazanie określonej ilości paszy za pomocą środków porozumiewania się na odległość. W takim przypadku występując o paszę, właściwy organ nie musi ujawniać podmiotowi działającemu na rynku pasz swojej urzędowej tożsamości i może wykorzystać inną tożsamość do jej ukrycia.
- Próbka zbiorcza i próbki końcowe z próbki paszy sprzedawanej na odległość muszą zostać pobrane niezwłocznie po otrzymaniu przesyłki przez osoby upoważnione do tego celu. W celu wytworzenia próbki zbiorczej należy pobrać próbki pierwotne w sposób losowy i równomierny z całkowitej otrzymanej ilości oraz starannie je wymieszać lub poddać homogenizacji, w miarę możliwości zgodnie z zasadami ustanowionymi w pkt 5 oraz w pkt 9.2 i 9.3. Jeżeli pasza jest pakowana w pojedyncze jednostki, należy uzyskać co najmniej 4 jednostki, z których należy pobrać co najmniej jedną próbkę pierwotną. Jeżeli zostanie wykazane w poszczególnych przypadkach, że otrzymane jednostki pochodzą z różnych partii, należy zmniejszyć liczbę jednostek, z których pobiera się próbki, i ograniczyć ją do jednostek pochodzących z tej samej partii. W przypadku analizy próbki paszy sprzedawanej na odległość pod kątem składników lub substancji, które są niejednolicie rozmieszczone w paszy, liczba próbek pierwotnych musi być co najmniej 2,5 razy wyższa niż w przypadku próbek analizowanych pod kątem substancji równomiernie rozmieszczonych w paszy.

Następnie z próbki zbiorczej pobiera się odpowiednie próbki końcowe (do celów kontroli i obrony oraz ewentualnie do celów referencyjnych), w miarę możliwości zgodnie z zasadami ustanowionymi w pkt 9.4, a protokół pobierania próbek wskazuje, że próbka jest próbką paszy sprzedawanej na odległość. Właściwy organ niezwłocznie informuje podmiot działający na rynku pasz o pobraniu próbek. Podmiot działający na rynku pasz powiadamia się również, że jedna próbka (do celów obrony) jest w miarę możliwości przechowywana w określonym miejscu do jego dyspozycji przez właściwy organ, do celów obrony, lub wysyłana do podmiotu działającego na rynku pasz lub do laboratorium wyznaczonego przez podmiot działający na rynku pasz zgodnie z obowiązującymi przepisami krajowymi.

Jeżeli próbka jest wysyłana bezpośrednio do laboratorium urzędowego, próbka końcowa musi zostać przygotowana i zapieczętowana w laboratorium przez osoby upoważnione do tego celu lub w obecności osób upoważnionych do tego celu. Protokół pobierania próbek paszy sprzedawanej na odległość należy przesłać niezwłocznie po sporządzeniu próbek końcowych do właściwego organu, który informuje podmiot działający na rynku pasz o pobraniu próbek.

Uważa się, że ilość dostarczona właściwemu organowi przez podmiot działający na rynku pasz stanowi część partii paszy tej samej klasy lub o tym samym opisie. Zgodnie z art. 15 rozporządzenia (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady⁽²⁾, jeżeli ta część partii została zidentyfikowana jako niespełniająca wymogów UE, zakłada się, również w przypadku próbki paszy sprzedawanej na odległość, że dotyczy to całej paszy w tej partii, chyba że po przeprowadzeniu szczegółowej oceny (w stosownych przypadkach podczas kontroli na miejscu) nie ma dowodów na to, że pozostała część partii nie spełnia wymogów UE.”

⁽²⁾ Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności (Dz.U. L 31 z 1.2.2002, s. 1).

ZAŁĄCZNIK II

„ZAŁĄCZNIK II

PRZEPISY OGÓLNE DOTYCZĄCE METODYKI ANALIZY PASZ

A. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY

1. Cel

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

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

Oprócz procedur opisanych w niniejszym załączniku należy postępować zgodnie z wytycznymi dotyczącymi przygotowywania próbek przewidzianymi w normie EN ISO 6498.

2. Niezbędne środki ostrożności

Wybór procedury przy przygotowaniu próbek zależy od stosowanej metodyki analizy oraz składników lub substancji, które mają zostać poddane kontroli. Z tego względu bardzo ważne jest, by wybrana procedura przygotowania próbki była 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.

Mielenie, mieszanie i przesiewanie należy wykonywać bezzwłocznie, przy ograniczonym dostępie powietrza i światła do próbki. Nie należy stosować młynków i rozdrabniarek, 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.

Wykazano, że homogenizacja próbki polegająca na przygotowaniu zawiesiny poprzez wymieszanie z wodą w mieszalniku szybkoobrotowym pozwala uzyskać w niektórych przypadkach bardziej jednorodne podpróbki niż w przypadku homogenizacji/mielenia na sucho, w szczególności w przypadku niejednorodnie rozmieszczonych substancji chemicznych. Homogenizacja poprzez wystarczające mielenie na sucho może jednak również zapewnić jednorodne podpróbki.

W niektórych przypadkach, np. w celu oznaczenia sporyszu żyta, szkodliwych zanieczyszczeń botanicznych itp., homogenizacji próbki nie można dokonać poprzez mielenie, lecz przez wystarczające zmieszanie próbki.

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

3. Sposób postępowania

3.1. Procedura ogólna

Podwielokrotność do badań pobiera się ze zhomogenizowanej 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

— Próbkę końcową wymieszać oraz zgromadzić w odpowiednim czystym, suchym pojemniku, wyposażonym w szczelny korek. Wymieszać ponownie w celu zagwarantowania pełnej homogenizacji bezpośrednio przed odważeniem ilości przeznaczonej do analizy (podwielokrotności do badań).

3.1.2. Pasze, które mogą być zmielone po wysuszeniu

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

3.1.3. Pasze płynne lub półpłynne

- Próbkę końcową umieścić w odpowiednim, czystym i suchym pojemniku, wyposażonym w szczelny korek. Wymieszać dokładnie w celu zagwarantowania pełnej homogenizacji bezpośrednio przed odważeniem ilości przeznaczonej do analizy (podwielokrotności do badań).

3.1.4. Inne pasze

- Próbkę końcową, 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 w drodze kontroli wzrokowej lub mikroskopowej lub w przypadku gdy cała próbka zbiorcza jest zhomogenizowana

- W przypadku badania w drodze kontroli wzrokowej (bez mikroskopu) do badania stosuje się całą próbkę zbiorczą lub końcową.
- W przypadku badania mikroskopem laboratorium może zredukować próbkę zbiorczą lub zredukować próbkę zredukowaną. Próbkę końcową do celów obrony oraz ewentualnie do celów referencyjnych pobiera się zgodnie z procedurą równoważną procedurze pobierania próbek w odniesieniu do próbki końcowej w celu kontroli przestrzegania przepisów.
- Jeżeli cała próbka zbiorcza jest zhomogenizowana, próbki końcowe pobiera się ze zhomogenizowanej próbki zbiorczej.
- W celu oznaczenia sporyszu żyta i szkodliwych zanieczyszczeń botanicznych próbkę końcową należy podzielić na dwie podpróbki o równej masie około 500 gramów. Bada się jedną podpróbę. W przypadku gdy wynik z podpróbki jest równy lub niższy niż 50 % (próg analityczny) najwyższego dopuszczalnego poziomu, próbka jest zgodna z najwyższym dopuszczalnym poziomem. Jeżeli wynik przekracza 50 % najwyższego dopuszczalnego poziomu, należy zbadać inną podpróbę i wykorzystać średnią wyników z dwóch podpróbek do sprawdzenia zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem.

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 analizy śladowej czystość odczynników należy sprawdzić przez wykonanie próby ślepej. 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.

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 ($> 50\%$) 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 analiza powtórna (drugie oznaczenie) w celu wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Średnia z tych dwóch oznaczeń jest wykorzystywana do dalszej oceny.

W przypadku kontroli minimalnych lub najwyższych dopuszczalnych poziomów dodatków paszowych, jeżeli wyniki pierwszego oznaczenia przekraczają minimalny poziom lub są niższe od najwyższego dopuszczalnego poziomu, dodatkowe oznaczenia nie są konieczne, pod warunkiem że stosowane jest odpowiednie postępowanie w odniesieniu do jakości. W innych przypadkach konieczna jest analiza powtórna (drugie oznaczenie) w celu wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Średnia z tych dwóch oznaczeń jest wykorzystywana do dalszej oceny.

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 analiza powtórna (drugie oznaczenie) w celu wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Średnia z dwóch oznaczeń jest wykorzystywana do dalszej oceny (średni wynik analizy mieści się lub nie mieści się w dopuszczalnym zakresie zmienności deklarowanej zawartości).

W niektórych przypadkach taki dopuszczalny zakres zmienności jest określony w przepisach, takich jak rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 767/2009 i (UE) 2019/4 ⁽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.

Większość poziomów regulacyjnych (np. najwyższy dopuszczalny poziom, poziom minimalny) w prawodawstwie UE dotyczącym pasz ustala się w odniesieniu do paszy o wilgotności 12 %. W związku z tym w tych przypadkach, aby ocenić wynik analizy zmierzony w odniesieniu do próbki w porównaniu z poziomem regulacyjnym, wynik analityczny najpierw należy podzielić przez zawartość suchej masy w próbce ($w\%$) pomnożoną przez 88, jak wskazano we wzorze:

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

gdzie:

Mc: wilgotność próbki ($w\%$). $100 - Mc$ stanowi zatem zawartość suchej masy w próbce ($w\%$).

R_{ana} : wynik analizy zmierzony dla próbki

$R_{12\%}$: wynik dla paszy o wilgotności 12 %; należy ocenić w odniesieniu do poziomu regulacyjnego.

⁽¹⁾ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/4 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie wytwarzania, wprowadzania na rynek i stosowania paszy leczniczej, zmieniające rozporządzenie (WE) nr 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady oraz uchylające dyrektywę Rady 90/167/EWG (Dz.U. L 4 z 7.1.2019, s. 1).

Ponadto, jeżeli spełnione są następujące warunki:

- wynik analizy jest znacznie (> 50 %) niższy lub wyższy, niż wskazują informacje/specyfikacje w ramach etykietowania, które mają być kontrolowane (w zależności od tego, czy informacje/specyfikacje w ramach etykietowania odnoszą się do najwyższego dopuszczalnego, czy minimalnego poziomu);
- zawartość wilgoci w paszy, z której pobrano próbki, jest znana i można stwierdzić, że korekta pod kątem zawartości wilgoci nie zmieni oceny,

wówczas, pod warunkiem że stosowane jest odpowiednie postępowanie w odniesieniu do jakości, a analiza służy jedynie sprawdzeniu zgodności z przepisami prawnymi, korekta pod kątem zawartości wilgoci może zostać pominięta (np. w przypadku braku specyfikacji lub poziomu regulacyjnego), chyba że jest to konieczne do interpretacji.

Jeżeli wynik analizy jest korygowany do zawartości wilgoci, odpowiednia niepewność pomiaru musi również zostać skorygowana w ramach tej samej procedury.

W przypadku oznaczania sporyszu żyta lub szkodliwych zanieczyszczeń botanicznych poprzez badanie wzrokowe/mikroskopowe korekta pod kątem zawartości wilgoci nie jest konieczna.

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

W odniesieniu do substancji niepożądanych w rozumieniu dyrektywy 2002/32/WE Parlamentu Europejskiego i Rady uznaje się, że produkt przeznaczony do żywienia zwierząt jest niezgodny z ustaloną maksymalną zawartością, jeżeli wynik analizy wyrażony jako średnia dwóch niezależnych oznaczeń, w odniesieniu do paszy o wilgotności 12 %, wskazuje na przekroczenie maksymalnej zawartości, z uwzględnieniem niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2, który daje poziom ufności około 95 %, i korekty o odzysk. Oznacza to, że badane stężenie po uwzględnieniu korekty o odzysk i odjęciu niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego od wyniku stanowi podstawę oceny zgodności. Procedura ta ma zastosowanie jedynie w przypadkach, gdy metoda analizy pozwala na ustalenie niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego i korekty o odzysk (np. nie jest wymagana w przypadku badania wzrokowego/mikroskopowego).

Jeżeli wynik analizy próbki pobranej do celów obrony przekracza maksymalną zawartość (bez uwzględnienia niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego), potwierdza to niezgodność ustaloną w przypadku próbki kontrolnej, przy braku szczegółowych przepisów krajowych w tym zakresie.

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

- a) skorygowany o odzysk, w stosownych przypadkach, wraz z informacją o korekcie, jeśli miała ona miejsce. Należy podać stopień odzysku, chyba że wewnętrzna korekta z tytułu obciążenia metody jest częścią procedury, przy czym obciążenie metody jest różnicą między zmierzoną wartością a stężeniem odniesienia. Korekta o odzysk nie jest konieczna, jeśli stopień odzysku wynosi 90–110 %;
- b) jako »x +/- U«, gdzie x oznacza wynik analizy, a U – niepewność rozszerzoną pomiaru analitycznego, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2 ⁽²⁾, co daje wynik na poziomie ufności ok. 95 %.

Jeżeli wynik analizy jest jednak znacznie (> 50 %) niższy niż objęta kontrolą 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, informacje na temat stopnia odzysku i niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego można pominąć (np. w przypadku braku specyfikacji lub poziomu regulacyjnego), chyba że niepewność pomiaru jest konieczna do interpretacji.

7. Niepewność pomiaru analitycznego i stopień odzysku w przypadku analizy zawartości dodatków paszowych

W celu sprawdzenia zgodności z dozwoloną minimalną i maksymalną zawartością dodatków paszowych obecność dodatku paszowego uznaje się za niezgodną z ustaloną zawartością minimalną i maksymalną, jeżeli wynik analizy wyrażony jako średnia dwóch niezależnych oznaczeń w odniesieniu do paszy o wilgotności 12 % wskazuje na:

⁽²⁾ Przedział ufności wynoszący 95 % można osiągnąć, wykorzystując inny czynnik, taki jak współczynnik t-Studenta.

- przekroczenie maksymalnej zawartości, z uwzględnieniem niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego i korekty o odzysk. Oznacza to, że badane stężenie (tj. średnia z dwóch oznaczeń) po uwzględnieniu korekty o odzysk i odjęciu niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego od wyniku stanowi podstawę oceny zgodności.
- wartość niższą od minimalnej zawartości, z uwzględnieniem niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego i korekty o odzysk. Oznacza to, że badane stężenie (tj. średnia z dwóch oznaczeń) po uwzględnieniu korekty o odzysk i dodaniu niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego do wyniku stanowi podstawę oceny zgodności.

Jeżeli wynik analizy próbki pobranej do celów obrony przekracza maksymalną zawartość (bez uwzględnienia niepewności rozszerzonej pomiaru analitycznego), potwierdza to niezgodność ustaloną w przypadku próbki kontrolnej, przy braku szczegółowych przepisów krajowych w tym zakresie.

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

- a) skorygowany o odzysk, w stosownych przypadkach, wraz z informacją o korekcie, jeśli miała ona miejsce. Należy podać stopień odzysku, chyba że wewnętrzna korekta z tytułu obciążenia metody jest częścią procedury, przy czym obciążenie metody jest różnicą między zmierzoną wartością a stężeniem odniesienia. Korekta o odzysk nie jest konieczna, jeśli stopień odzysku wynosi 90–110 %;
- b) jako »x +/- U«, gdzie x oznacza wynik analizy (średnia z dwóch oznaczeń), a U – niepewność rozszerzoną pomiaru analitycznego, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia 2 ⁽³⁾, co daje wynik na poziomie ufności ok. 95 %.”

⁽³⁾ Przedział ufności wynoszący 95 % można osiągnąć, wykorzystując inny czynnik, taki jak współczynnik t-Studenta.

ZAŁĄCZNIK III

„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 liczba substancji lotnych.

Metody nie stosuje się do badania produktów mlecznych występujących jako materiały paszowe oraz mieszanek paszowych złożonych głównie z produktów mlecznych, a także badania tłuszczów i olejów pochodzenia zwierzęcego i roślinnego oraz nasion i owoców oleistych.

Oznaczanie zawartości wilgoci w nasionach oleistych należy przeprowadzać za pomocą metody przewidzianej w normie EN ISO 665 – Oznaczanie zawartości wilgoci i substancji lotnych, przy założeniu, że nasiona soi muszą być zmielone przed określeniem zawartości wilgoci.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Próbka jest suszona w warunkach dostosowanych do właściwości pasz. Ubytek masy jest określany metodą wagową. Jeżeli pasze stałe mają wysoką zawartość wilgoci, konieczne jest przeprowadzenie wstępnego suszenia.

3. **Aparatura i sprzęt**

- 3.1. Rozdrabniarka z materiału nieabsorbującego wilgoci, łatwa do czyszczenia, i umożliwiająca szybkie i równomierne rozdrabnianie bez wytwarzania znacznych ilości ciepła, uniemożliwiająca kontakt z powietrzem z zewnątrz, na ile jest to możliwe, i spełniająca wymagania podane w pkt 4.1.1 i 4.1.2 (np. mikrorozdrabniarki młotkowe lub chłodzone wodą, składane młynki stożkowe, rozdrabniarki powolne lub z walcami użębionymi)
- 3.2. Waga analityczna ważąca z dokładnością do 1 mg
- 3.3. Suche pojemniki z nierdzewnego metalu lub ze szkła z przykrywkami umożliwiającymi hermetyczne zamknięcie, o powierzchni roboczej umożliwiającej równomierne rozrowadzenie badanej próbki w warstwie 0,3 g/cm²
- 3.4. Suszarka elektryczna termostatowana (± 2 °C), dobrze wentylowana i pozwalająca na szybką regulację temperatury (¹⁾)
- 3.5. Suszarka próżniowa elektrycznie ogrzewana z regulacją temperatury zaopatrzona w pompę olejową oraz mechanizm umożliwiający nawiew gorącego suchego powietrza lub wprowadzenie środka suszącego (np. tlenku wapnia).
- 3.6. Eksykator z płytką z grubego perforowanego metalu lub porcelany, zawierający efektywny środek suszący.

4. **Sposób postępowania**

Uwaga: Czynności opisane w tej części należy wykonywać natychmiast po otwarciu opakowania próbki. Analizę należy wykonać co najmniej dwukrotnie.

(¹) Do suszenia zbóż, 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 badanych próbek do jednoczesnego wysuszenia. Wentylacja musi być taka, aby wyniki suszenia przez dwie godziny maksymalnej liczby próbek pszenicy zwyczajnej różniły się od wyników suszenia przez cztery godziny o mniej niż 0,15 %.

4.1. Przygotowanie

4.1.1. Pasze inne niż określone w pkt 4.1.2 i 4.1.3

Pobrać co najmniej 50 g próbki. Jeżeli to konieczne, rozdrobnić lub podzielić w taki sposób, aby zapobiec jakimkolwiek zmianom zawartości wilgoci (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 płynne lub w postaci pasty, pasze z przewagą olejów lub tłuszczów

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

4.2. Suszenie

Wysuszyć pojemnik (pkt 3.3) z przykrywką w suszarce ustawionej na temperaturę 103 °C przez 30 min ± 1 min. Wyjąć z suszarki i pozostawić do schłodzenia do temperatury otoczenia w eksykatorze (pkt 3.6).

4.2.1. Pasze inne niż określone w pkt 4.2.2 i 4.2.3

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

Pasze z przeważającym (> 50 %) udziałem olejów lub tłuszczów pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego suszyć ponownie w suszarce przez dodatkowe 30 minut w temperaturze 103 °C. Różnica pomiędzy dwoma ważeniami nie może przekraczać 0,1 % wilgotności.

4.2.2. Zboża, mąki, kasze i mączki

Zważyć pojemnik razem z przykrywką z dokładnością do 0,5 mg. Do zważonego pojemnika odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g rozdrobnionej próbki i równo rozmieścić. Wstawić pojemnik bez przykrywki do suszarki podgrzanej do temperatury 130 °C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić pojemnik w suszarce tak szybko, jak to możliwe. Suszyć przez dwie godziny od czasu, gdy suszarka ponownie osiągnie temperaturę 130 °C. Otworzyć suszarkę, natychmiast nałożyć przykrywkę na pojemnik, wyjąć go z suszarki, pozostawić do schłodzenia w eksykatorze (pkt 3.6) na 30–45 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, sład jęczmienny, susz buraczany, hydrolizaty rybne i cukrowe

Zważyć pojemnik razem z przykrywką z dokładnością do 0,5 mg. Do zważonego pojemnika odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki i równo rozmieścić. Wstawić pojemnik bez przykrywki do suszarki próżniowej (pkt 3.5) podgrzanej do temperatury od 80 do 85 °C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić pojemnik 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 środek 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, natychmiast nałożyć przykrywkę na pojemnik, wyjąć go 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. Wstępne (częściowe) suszenie

»Mokre« pasze o ułamku masowym wynoszącym mniej niż 85 % suchej masy (np. zielonki, całkowicie wymieszane dawki (TMR), pasza (inna niż) płynna) należy przed mieleniem na drobno poddać częściowemu suszeniu w celu przeanalizowania ich stabilnych substancji; w przypadku substancji niestabilnych częściowe suszenie nie jest możliwe.

Częściowe suszenie może być przeprowadzane przy użyciu suszarki z wymuszonym obiegiem powietrza lub kuchenki mikrofalowej, lub poprzez liofilizację. Z wyjątkiem częściowego suszenia w drodze liofilizacji paszę należy suszyć przy jednoczesnym utrzymaniu temperatury próbki poniżej 60 °C, tak aby w minimalnym stopniu wpłynąć na skład chemiczny. Suszenie w temperaturach wyższych niż 60 °C powoduje zmiany chemiczne w paszy (np. degradacja białka). Suszona pasza jest pozostawiona w temperaturze pokojowej przez około 15 minut przed pomiarem częściowej suchej masy, tak aby zminimalizować potencjalną zmianę wilgotności, jaka może wystąpić podczas mielenia i przechowywania. Suszenie w temperaturach niższych niż 60 °C nie usuwa całej wody z paszy; w związku z tym (początkowe) częściowe suszenie nie pozwala oznaczyć całkowitej suchej masy paszy. Po suszeniu podpróbkę mieli się i analizuje pod kątem (końcowej) suchej masy częściowo wysuszonej próbki (pozostałe 3–15 % wilgoci) przy oznaczaniu innych składników chemicznych.

W związku z tym zaleca się dwuetapową procedurę oznaczania suchej masy. Najpierw należy oznaczyć częściową zawartość suchej masy (jeżeli ma wartość niższą niż 85 % suchej masy), a następnie oznaczyć pozostałą zawartość suchej masy na zmielonej próbce badanej i pomnożyć częściową suchą masę przez pozostałą suchą masę w celu oznaczenia całkowitej zawartości suchej masy.

5. Obliczanie wyników

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

5.1. Suszenie bez suszenia wstępnego

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

gdzie:

m = początkowa masa w gramach badanej próbki

m₀ = masa w gramach badanej próbki po wysuszeniu

5.2. Suszenie z suszeniem wstępnym ⁽²⁾

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

gdzie:

m = początkowa masa w gramach badanej próbki

m₁ = masa w gramach badanej próbki po wstępnym suszeniu

m₂ = masa w gramach badanej próbki po rozdrobnieniu lub zmieleniu

m₀ = masa w gramach badanej próbki po wysuszeniu

⁽²⁾ Więcej informacji na temat obliczeń można znaleźć w normie EN ISO 6498 – Pasze – Wytyczne do przygotowania próbek.

5.3. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 0,2 % bezwzględnej wartości wilgotności, z wyjątkiem wilgotnej karmy dla zwierząt domowych i gryzaków dla psów, w przypadku których różnica nie przekracza 0,5 % bezwzględnej wartości wilgotności.

6. **Objaśnienia**

Jeżeli rozdrabnianie próbki jest konieczne i wpływa na zawartość wilgoci w produkcie, wyniki analizy składników paszy należy skorygować w oparciu 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 wynosić 1 mg lub mniej). 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. Łażnia piaskowa lub elektryczna płyta grzejna
- 3.4. Eksykator zawierający efektywny środek suszący
- 3.5. Waga analityczna

4. **Sposób postępowania**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 20 g zhomogenizowanej próbki do suchego, zważonego naczynia (pkt 3.1), zawierającego termometr (pkt 3.2). Ogrzewać na łaźni piaskowej lub płycie grzejnej (pkt 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 wilgoci należy 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 (pkt 3.4) i zważyć. Powtarzać czynności, dopóki ubytek masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie będzie większy niż 2 mg.

Uwaga Wzrost masy próbki po powtórnych ogrzewaniu wskazuje na utlenienie się tłuszczu. W takim przypadku do obliczenia wyniku wziąć masę próbki z ważenia przed wzrostem jej masy.

5. **Obliczanie wyników**

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

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

gdzie:

- m = masa w gramach badanej próbki
 m_1 = masa w gramach naczynia z zawartością przed ogrzewaniem
 m_2 = masa w gramach 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 0,1 % w wartości bezwzględnej.

C. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI AZOTU I OBLICZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA SUROWEGO

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości białka surowego w paszy 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 kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany roztworem wzorcowym wodorotlenku sodu.

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

3. Odczynniki

- 3.1. Siarczan potasu
- 3.2. Katalizator: tlenek miedzi(II) CuO lub pentahydrat siarczanu miedzi(II), CuSO₄ 5H₂O
- 3.3. Granulowany cynk
- 3.4. Kwas siarkowy, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml
- 3.5. Kwas siarkowy, roztwór mianowany, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25$ mol/l
- 3.6. Kwas siarkowy, roztwór mianowany, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10$ mol/l
- 3.7. Kwas siarkowy, roztwór mianowany, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05$ mol/l
- 3.8. Czerwień metylowa, wskaźnik: rozpuścić 300 mg czerwieni metylowej w 100 ml etanolu, $\sigma = 95-96$ % (v/v).
- 3.9. Roztwór wodorotlenku sodu (może być techniczny), $\beta = 40$ g/100 ml (m/v: 40 %).
- 3.10. Wodorotlenek sodu, roztwór mianowany $c(\text{NaOH}) = 0,25$ mol/l
- 3.11. Wodorotlenek sodu, roztwór mianowany $c(\text{NaOH}) = 0,10$ mol/l
- 3.12. Granulowany kamień pumeksowy, 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 (H₃BO₃)

^(?) Zawartość N można określić we wszystkich paszach, ale współczynnik przeliczeniowy wynoszący 6,25 do obliczenia zawartości białka surowego może nie mieć zastosowania do materiałów paszowych zawierających owady (niższy współczynnik przeliczeniowy) oraz niektórych rodzajów karmy dla zwierząt domowych i białek osocza krwi (wyższy współczynnik przeliczeniowy)

- 3.16. Roztwór czerwieni metylowej, wskaźnik: rozpuścić 100 mg czerwieni metylowej w 100 ml etanolu lub metanolu.
- 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 wyznaczania 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 (pkt 3.16) i 10 ml roztworu zieleni bromokrezolowej (pkt 3.17).

Odczyn pH roztworu kwasu borowego może różnić się między seriami w zależności od użytej wody. Odczyn pH roztworu kwasu borowego musi wynosić między 4,3 a 4,7. Często do uzyskania pozytywnej próby ślepej konieczne jest dostosowanie pH przy pomocy niewielkiej ilości zasady.

Uwaga: Dodanie ok. 3–4 ml NaOH (pkt 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, roztwór mianowany o stężeniu $c(\text{HCl}) = 0,10 \text{ mol/l}$

Uwaga: można zastosować inne stężenia roztworów wolumetrycznych (pkt 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, 1 g próbki i przenieść do kolby aparatu do mineralizacji. Dodać 15 g siarczanu potasu (pkt 3.1), odpowiednią ilość katalizatora (pkt 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 (pkt 3.4) oraz, w razie potrzeby, kilka granulek kamienia pumekowego (pkt 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 przylepaniu 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 (pkt 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 (pkt 3.5 lub 3.7), zależnie od przewidywanej zawartości azotu. Dodać kilka kropli wskaźnika czerwieni metylowej (pkt 3.8).

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 (pkt 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 (pkt 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 (pkt 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 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 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 roztworem mianowanym kwasu chlorowodorowego (pkt 3.19) lub kwasu siarkowego (pkt 3.6) przy pomocy biurety i odczytać ilość zużytego titrantu.

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

Można to przeprowadzić automatycznie za aparatury do destylacji z parą wodną 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 rozpoczęciu destylacji i stosowany jest 1 % roztwór kwasu borowego (pkt 3.18).

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. Próba ślepa

W celu potwierdzenia, że zastosowane odczynniki nie zawierają azotu, przeprowadzić próbę ślepa (mineralizację, destylację i miareczkowanie), stosując 1 g sacharozy (pkt 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 wartość procentowa masy 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 (ml) NaOH (pkt 3.10 lub 3.11) zużytego do próby ślepej
 V_1 = objętość (ml) NaOH (pkt 3.10 lub 3.11) zużytego do miareczkowania próbki
 c = stężenie (mol/l) wodorotlenku sodu (pkt 3.10 lub 3.11)
 m = masa (g) próbki

6.2. Obliczenia do miareczkowania zgodnie z pkt 5.3.2

6.2.1. Miareczkowanie kwasem chlorowodorowym

Zawartość białka surowego jako wartość procentowa masy obliczana jest według następującego wzoru:

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

gdzie:

- m = masa (g) naważki
 c = stężenie (mol/l) roztworu mianowanego kwasu chlorowodorowego (pkt 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 wartość procentowa masy obliczana jest według następującego wzoru:

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

gdzie:

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

7. Sprawdzenie metody

7.1. Powtarzalność

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

- 0,4 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego niższej niż 20 %,
- 2,0 % względem wyższej wartości, dla zawartości białka surowego od 20 do 40 %,
- 0,8 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego wyższej niż 40 %.

7.2. Odtwarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych laboratoriach nie może przekraczać:

- 1,8 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego niższej niż 20 %,
- 9,0 % względem wyższej wartości, dla zawartości białka surowego od 20 do 40 %,
- 3,6 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego wyższej niż 40 %.

7.3. Dokładność

Przeprowadzić analizę (mineralizację, destylację i miareczkowanie), stosując odpowiednią ilość acetanilidu (pkt 3.13) (np. od 0,2 do 0,3 g) w obecności 1 g sacharozy (pkt 3.14); 1 g acetanilidu zużywa 14,80 ml kwasu siarkowego (pkt 3.5). Odzysk musi wynosić co najmniej 99 %.

8. Objasnienia

- 8.1. Sprzęt i aparatura mogą być obsługiwane ręcznie, półautomatycznie lub być całkowicie zautomatyzowane. W przypadku konieczności przeniesienia 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 oznaczenie, stosując większe ilości kwasu siarkowego (pkt 3.4) niż podano w pkt 5.1.
- 8.3. W przypadku produktów o niskiej zawartości azotu objętość kwasu siarkowego (pkt 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 analizy metody analitycznej zastosowanej do oznaczenia białka surowego.

D. OZNACZANIE MOCNIKA

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości mocznika stosowanego jako dodatek paszowy w paszach przeznaczonych dla przeżuwaczy.

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

- 3.1. Roztwór 4-dwumetyloaminobenzaldehydu: 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 cynku, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g kwasu octowego lodowego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.
- 3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasu, $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. 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. 35–40 obr./min
- 4.2. Probówki: 160 × 16 mm ze szlifowanymi korkami szklanymi
- 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 (pkt 3.4) w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 400 ml wody i 5 ml roztworu Carreza I (pkt 3.2), mieszać przez ok. 30 sekund, a następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II (pkt 3.3). Mieszać przez 30 minut w tumblerze. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, wstrząsnąć i przefiltrować.

Do probówek ze szlifowanymi korkami szklanymi przenieść po 5 ml przezroczystego, bezbarwnego filtratu, dodać 5 ml roztworu 4-DMAB (pkt 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 z roztworem do badań ze ślepej próby odczynnikowej.

5.2. Krzywa wzorcowa

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml nalać 1, 2, 4, 5 i 10 ml roztworu mocznika (pkt 3.5) i uzupełnić do pełnej objętości kolb wodą. Odląć 5 ml każdego z roztworów, dodać do każdej kolby po 5 ml roztworu 4-DMAB (pkt 3.1), zhomogenizować 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 wzorcową.

6. Obliczanie wyników

Na podstawie krzywej wzorcowej oznaczyć zawartość mocznika w próbce.

Wynik należy wyrazić w mg mocznika na kg próbki.

7. Ocena metody

7.1. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych dla tej samej próbki w tym samym laboratorium i przez tego samego analityka nie może przekraczać:

- przy 420 nm
 - 50 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika od 3 000 mg/kg do niższej niż 5 000 mg/kg,
 - 25 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika od 5 000 mg/kg do niższej niż 7 000 mg/kg,
 - 20 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika 7 000 mg/kg lub wyższej,
- przy 435 nm
 - 40 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika od 3 000 mg/kg do niższej niż 5 000 mg/kg,
 - 25 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika od 5 000 mg/kg do niższej niż 9 000 mg/kg,
 - 5 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika 9 000 mg/kg lub wyższej.

7.2. Odtwarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych laboratoriach lub przez różnych analityków nie może przekraczać:

- przy 420 nm
 - 3 000 mg/kg, w wartości bezwzględnej, dla zawartości mocznika od 3 000 mg/kg do niższej niż 12 000 mg/kg,
 - 4 500 mg/kg, w wartości bezwzględnej, dla zawartości mocznika 12 000 mg/kg lub wyższej,
- przy 435 nm
 - 50 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika od 3 000 mg/kg do niższej niż 8 000 mg/kg,
 - 25 % względem wyższej wartości, dla zawartości mocznika 8 000 mg/kg lub wyższej.

8. **Wyniki porównania międzylaboratoryjnego**

Zorganizowano porównanie międzylaboratoryjne UE, w którym wzięło udział 18 laboratoriów. Zbadano pięć pozytywnych próbek mieszanek paszowych dla przeżuwaczy (MAT w tabelach 1 i 2) (1 analiza) ze ślepych duplikatami, a jedna ślepa próbka mieszanki paszowej dla przeżuwaczy została zbadana raz.

Obliczenia wartości granicznych powtarzalności (r) i odtwarzalności (R), jak określono w wytycznych międzynarodowych, przeprowadzono po usunięciu wartości odstających przy użyciu analizy wariacji ważnych wartości.

Obliczone dane liczbowe dotyczące wydajności metody (powtarzalność, odtwarzalność) przedstawiono w tabelach poniżej. W odniesieniu do wszystkich badanych próbek, w tym ślepych, nie znaleziono wyników fałszywie pozytywnych ani wyników fałszywie negatywnych.

Tabela 1

Charakterystyka wydajności analitycznej dla mocznika zmierzona przy $\lambda = 420$ nm we wszystkich materiałach

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Owce	Bydło	Owce	Owce	Bydło
Docelowy ułamek masowy (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Średni ułamek masowy (mg kg ⁻¹)	4 241	6 993	7 830	9 962	12 071
Odchylenie standardowe odtwarzalności s_R (mg kg ⁻¹)	1 141	1 303	985	994	1 711
Odchylenie standardowe powtarzalności s_r (mg kg ⁻¹)	723	601	549	712	737
Względne odchylenie standardowe odtwarzalności RSD_R (%)	27	19	13	10	14
Względne odchylenie standardowe powtarzalności RSD_r (%)	17	9	7	7	6
Granica odtwarzalności, R [$R = 2,8 \times s_R$]	3 195	3 649	2 759	2 784	4 790
Granica powtarzalności, r [$r = 2,8 \times s_r$]	2 024	1 684	1 536	1 994	2 064

Tabela 2

Charakterystyka wydajności analitycznej dla mocznika zmierzona przy $\lambda = 435$ nm we wszystkich materiałach

	MAT 2	MAT 5	MAT 3	MAT 4	MAT 6
	Owce	Bydło	Owce	Owce	Bydło
Docelowy ułamek masowy (mg kg ⁻¹)	3 000	5 000	7 001	9 036	11 000
Średni ułamek masowy (mg kg ⁻¹)	4 101	6 467	7 890	10 062	11 642
Odchylenie standardowe odtwarzalności s_R (mg kg ⁻¹)	706	1 194	675	745	1 378
Odchylenie standardowe powtarzalności s_r (mg kg ⁻¹)	570	628	613	196	167

Względne odchylenie standardowe odtwarzalności RSD_R (%)	17	18	9	7	12
Względne odchylenie standardowe powtarzalności RSD_r (%)	14	10	8	2	1
Granica odtwarzalności, R [$R = 2,8 \times s_R$]	1 977	3 344	1 889	2 087	3 859
Granica powtarzalności, r [$r = 2,8 \times s_r$]	1 596	1 759	1 715	549	467

9. **Objaśnienia**

- 9.1. 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.
- 9.2. W przypadku niskiej zawartości mocznika zwiększać masę próbki na tyle, aby filtrat pozostał przezroczysty i bezbarwny.
- 9.3. Powyższe wyniki porównań międzylaboratoryjnych nie wskazują na znaczącą różnicę precyzji między mocznikiem zmierzonym przy 420 nm lub 435 nm.

E. OZNACZANIE AMINOKWASÓW (Z WYJĄTKIEM TRYPTOFANU)

Metody analizy, które należy stosować do oznaczania aminokwasów (z wyjątkiem tryptofanu):

- EN ISO 13903 Pasze – Oznaczanie zawartości aminokwasów;
- EN ISO 17180 Pasze – Oznaczanie lizyny, metioniny i treoniny w komercyjnych produktach aminokwasowych i premiksach⁽⁴⁾;
- metoda analizy opisana w pkt 1–10 poniżej.

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości wolnych (syntetycznych i naturalnych) oraz całkowitych (związanych i wolnych peptydów) aminokwasów w materiałach paszowych, mieszkach paszowych i premiksach zawierających mniej niż 10 %⁽⁵⁾ każdego aminokwasu z użyciem analizatora aminokwasów. Metoda ma zastosowanie do następujących aminokwasów: cystyny (cysteiny), metioniny, lizyny, treoniny, alaniny, argininy, kwasu asparaginoowego, kwasu glutaminowego, glicyny, histydyny, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, proliny, seryny, tyrozyny i waliny.

Metoda nie pozwala rozróżnić 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 dostosowuje się do pH 2,20. Aminokwasy są oddzielane w drodze chromatografii jonowymiennej i oznaczane z zastosowaniem reakcji z ninhydriną, poprzez fotometryczną detekcję przy 570 nm.

⁽⁴⁾ Metoda analizy przewidziana w normie EN 17180 określana jest jako alternatywna metoda stosowana do celów urzędowej kontroli oznaczania aminokwasów w paszy zawierającej więcej niż 10 % aminokwasów.

⁽⁵⁾ Metoda ta nie została zwalidowana w drodze porównania międzylaboratoryjnego w odniesieniu do premiksów zawierających więcej niż 10 % dodatków paszowych. Ma ona jednak również zastosowanie do tych matryc z odpowiednimi niewielkimi zmianami, pod warunkiem że metoda zostanie następnie zwalidowana wewnętrznie. Dodatkowe informacje można znaleźć na stronie <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

2.2. *Aminokwasy całkowite*

Wybór sposobu postępowania zależy od oznaczanych aminokwasów. Cystynę (cysteinę) i metioninę należy 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 (Celi zakres stosowania metody) mogą być oznaczane w próbce utlenionej albo niepoddanej utlenianiu.

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

3. **Odczynniki**

Należy stosować wodę podwójnie destylowaną lub równoważnej 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. Pirosiarczyn sodu
- 3.5. Wodorotlenek sodu
- 3.6. Kwas 5-sulfosalicylowy dihydrat
- 3.7. Kwas chlorowodorowy, gęstość około 1,18 g/ml
- 3.8. Cytrynian trisodu, dihydrat
- 3.9. 2,2' tiodietanol (tiodiglikol)
- 3.10. Chlorek sodu
- 3.11. Ninhydryna
- 3.12. Eter naftowy, zakres temperatur wrzenia od 40 do 60 °C
- 3.13. Norleucyna lub inny związek odpowiedni do stosowania jako wzorzec wewnętrzny.
- 3.14. Azot gazowy (< 10 ppm tlenu)
- 3.15. 1-oktanol
- 3.16. Aminokwasy
- 3.16.1. Substancje wzorcowe aminokwasów wymienione w pkt 1 (Cel i zakres stosowania metody). Czyste związki, nie zawierające wody krystalizacyjnej. Suszyć w warunkach próżni w obecności P₂O₅ lub H₂SO₄ 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 (pkt 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 (pkt 3.5) w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą.
- 3.19. Roztwór kwasu mrówkowego i fenolu:
Zmieszać 889 g kwasu mrówkowego (pkt 3.2) z 111 g wody i dodać 4,73 g fenolu (pkt 3.3).

- 3.20. Mieszanina hydrolizująca, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, zawierająca 1 g fenolu/l:
Dodać 1 g fenolu (pkt 3.3) do 492 ml HCl (pkt 3.7) i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą.
- 3.21. Mieszanina ekstrakcyjna, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, zawierająca 2 % tiodiglikolu: Pobrać 8,2 ml HCl (pkt 3.7), rozpuścić w około 900 ml wody, dodać 20 ml tiodiglikolu (pkt 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, $\beta = 6 \%$:
Rozpuścić 60 g kwasu 5-sulfosalicylowego (pkt 3.6) w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 l wodą.
- 3.23. Mieszanina utleniająca (kwas nadmanganowy – fenol):
Zmieszać w małej zlewce 0,5 ml nadtlenku wodoru (pkt 3.1) z 4,5 ml roztworu kwasu mrówkowego i fenolu (pkt 3.19). Inkubować w temperaturze od 20 do 30 °C przez godzinę w celu utworzenia kwasu nadmanganowego, następnie schłodzić w łaźni lodowej (15 minut) przed dodaniem tej mieszaniny do próbek.
Uwaga: Unikać kontaktu ze skórą i nosić odzież ochronną.
- 3.24. Bufor cytrynianowy, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+/\text{l}$, pH 2,20:
Rozpuścić 19,61 g cytrynianu sodu (pkt 3.8), 5 ml tiodiglikolu (pkt 3.9), 1 g fenolu (pkt 3.3) i 16,50 ml HCl (pkt 3.7) w około 800 ml wody. Dostosować pH do 2,20. Uzupełnić do objętości 1 l wodą.
- 3.25. Bufory elucyjne, przygotowane zgodnie z warunkami stosowanego analizatora (pkt 4.9)
- 3.26. Odczynnik ninhydrynowy, przygotowany zgodnie z warunkami stosowanego analizatora (pkt 4.9)
- 3.27. Wzorcowe roztwory aminokwasów. Roztwory te należy przechowywać w temperaturze niższej niż 5 °C.
- 3.27.1. Podstawowy roztwór wzorcowy aminokwasów (3.16.1)
Każdy o stężeniu $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$, w kwasie chlorowodorowym.
Mogą być otrzymane w handlu.
- 3.27.2. Podstawowy roztwór wzorcowy kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/ml}$
Rozpuścić 0,2115 g kwasu cysteinowego (pkt 3.16.2) i 0,2265 g sulfonu metioniny (pkt 3.16.3) w buforze cytrynianowym (pkt 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 roztwór wzorcowy (pkt 3.27.1) zawiera kwas cysteinowy i sulfon metioniny.
- 3.27.3. Podstawowy roztwór wzorcowy wzorca wewnętrznego, np. norleucyny, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/ml}$
Rozpuścić 0,6560 g norleucyny (pkt 3.13) w buforze cytrynianowym (pkt 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 sześć miesięcy.
- 3.27.4. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do użycia z hydrolizatami, $c = 5 \text{ nmol}/50 \text{ } \mu\text{l}$ kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny i $c = 10 \text{ nmol}/50 \text{ } \mu\text{l}$ pozostałych aminokwasów. Rozpuścić 2,2 g chlorku sodu (pkt 3.10) w zlewce o pojemności 100 ml z 30 ml buforu cytrynianowego (pkt 3.24). Dodać 4,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego aminokwasów (pkt 3.27.1), 4,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny (pkt 3.27.2) i, jeżeli jest stosowany, 0,50 ml podstawowego roztworu wzorcowego wzorca wewnętrznego (pkt 3.27.3). Dostosować pH do 2,20 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu (pkt 3.18).
Przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym (pkt 3.24) i zmieszać.
Przechowywać w temperaturze niższej niż 5 °C nie dłużej niż przez trzy 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 (pkt 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 trzy 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 wentylacją wymuszoną 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. Rotacyjna wyparka próżniowa
- 4.8. Wytrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne
- 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 $\pm 0,5$ % zarówno 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

Zmilić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 0,5 mm. Próbki o dużej zawartości wilgoci przed zmieleniem wysuszyć albo na powietrzu w temperaturze nieprzekraczającej 50 °C, albo przez liofilizację. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed zmieleniem należy poddać ekstrakcji eterem naftowym (3.12).

5.2. Oznaczanie wolnych aminokwasów

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 100,0 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (pkt 3.21). Wytrząsać mieszaninę przez 60 minut, używając mechanicznej wytrząsarki lub mieszadła magnetycznego (pkt 4.8). Odstawić do sedimentacji osadu i pobrać pipetą 10,0 ml supernatantu do zlewki o objętości 100 ml.

Dodać, mieszając, 5,0 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego (pkt 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 (pkt 3.18), przenieść do kolby o miarowej odpowiedniej pojemności, z użyciem buforu cytrynianowego (3.24) i uzupełnić roztworem buforowym do pełnej objętości tej kolby (pkt 3.24).

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

Przeprowadzić chromatografię w sposób określony w 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 (pkt 4.1) do hydrolizy otwartej (pkt 5.3.2.3) lub
- kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml (pkt 4.1), jeżeli wymagane jest niskie stężenie sodu (pkt 5.3.3.1), lub
- butelki o pojemności 100 ml z nakrętką (pkt 4.2) (w przypadku hydrolizy zamkniętej pkt 5.3.2.4).

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

Umieścić kolbę lub butelkę w lodowej łaźni wodnej i schłodzić do temperatury 0 °C, dodać 5 ml mieszaniny utleniającej (pkt 3.23) i zamieszać, używając szklanej szpatułki z wygiętym końcem. Uszczelnić kolbę/butelkę wraz ze szpatułką, stosując hermetyczną powłokę, 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 pirosiarczynu sodu (pkt 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 (pkt 3.20), zwracając uwagę, aby zmyć pozostałości próbki przywierające do bocznych ścianek naczynia i szpatułki.

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 (pkt 4.1) lub do butelki o pojemności 100 ml z nakrętką (pkt 4.2). Odważona część próbki musi zawierać około 10 mg azotu. Ostrożnie dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej (pkt 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 koraliki i gotować, utrzymując stan wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 23 godziny. Po zakończonej hydrolizie przemyć chłodnicę 5 ml buforu cytrynianowego (pkt 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 (pkt 4.3) w temperaturze 110 °C. W czasie pierwszej godziny hydrolizy, aby uniknąć gwałtownego wzrostu ciśnienia (w wyniku powstawania substancji gazowych) i wybuchu, umieścić nakrętkę na naczyniu. Nie zamykać naczynia nakrętką. Po godzinie dokręcić nakrętkę i pozostawić w suszarce (pkt 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 (pkt 5.3.3) przenieść ilościowo zawartość butelki do zlewki lub kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml, stosując bufor cytrynianowy (pkt 3.24).

Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3.3.

5.3.3. Dostosowanie pH

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

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

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

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

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

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

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

5.3.3.2. Dla pozostałych analizatorów aminokwasów (pkt 4.9)

Pobrać hydrolizaty otrzymane w sposób określony w pkt 5.3.2.3 lub 5.3.2.4 i częściowo je zneutralizować poprzez ostrożne dodanie 17 ml roztworu wodorotlenku sodu (pkt 3.17) i jednoczesne mieszanie, przy czym należy zwrócić uwagę, aby temperatura roztworu była niższa niż 40 °C.

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

5.3.4. Roztwór próbki do analizy chromatograficznej

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

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

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

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

Zasadniczo częstość przeprowadzania kalibracji zależy od stabilności odczynnika ninhydrinowego i od systemu analitycznego. Wzorec lub próbka są rozcieńczane buforem cytrynianowym (pkt 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 składników reagujących z ninhydriną. W badanym zakresie stosowany system chromatograficzny musi dawać liniową odpowiedź na zmiany ilości aminokwasów dodawanych na kolumnę.

W czasie analizy chromatograficznej opisany poniżej stosunek pik – dolina odnosi się do przypadku, gdy jest analizowany roztwór równomolowy oznaczanego aminokwasu. Roztwór równomolowy aminokwasu musi zawierać co najmniej 30 % maksymalnej zawartości każdego aminokwasu, co można dokładnie zmierzyć z użyciem analizatora aminokwasów (pkt 4.9).

Dla oddzielenia treoniny od seryny stosunek pik – dolina 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 sąsiednich 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.

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

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

- A = powierzchnia pików hydrolizatu lub ekstraktu
- B = powierzchnia pików kalibracyjnego roztworu wzorcowego
- C = powierzchnia pików wzorca wewnętrznego w hydrolizacie lub ekstrakcie
- D = powierzchnia pików wzorca wewnętrznego, kalibracyjny roztwór wzorcowy
- M = masa molowa oznaczanego aminokwasu
- c = stężenie wzorca w $\mu\text{mol/ml}$
- m = masa próbki w g (przeliczona na masę oryginalnej próbki w przypadku podsuszania lub odtłuszczenia)
- V = hydrolizat ogółem w ml (pkt 5.3.4) lub obliczona całkowita objętość w ml rozcieńczonego ekstraktu (pkt 6.1)

Cystyna i cysteina są oznaczane jako kwas cysteinowy w hydrolizatach utlenionej próbki, ale są obliczane jak cystyna ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, M 240,30 g/mol), przy zastosowaniu M 120,15 g/mol (= $0,5 \times 240,30$ g/mol).

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

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

- 6.1. Całkowitą objętość rozcieńczonych ekstraktów (F) w przypadku oznaczania zawartości wolnych aminokwasów (pkt 5.2) oblicza się 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 ekstraktu

7. Ocena metody

W 1990 r. przeprowadzono międzynarodowe badanie porównawcze metody z użyciem czterech pasz (mieszanki paszowej dla świń, mieszanki paszowej dla brojlerów, koncentratu białkowego i premiksu).

Uwaga: Metoda została przebadana podczas drugiego międzynarodowego badania porównawczego w 2003 r., z wykorzystaniem ślepych, pobranych dwukrotnie próbek paszy dla brojlerów do tuczu końcowego, paszy startowej dla brojlerów, kukurydzy, mączki rybnej i mączki drobiowej. Szczegółowe informacje można znaleźć w normie EN ISO 13903.

W tabelach w niniejszym punkcie podano wyniki badania porównawczego z 1990 r. po odrzuceniu wartości odstających oraz odchyleń przeciętnych i standardowych:

Średnie wielkości w g/kg

Materiał referencyjny	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 w ramach laboratorium« badania porównawczego przedstawionego w tabeli powyżej jest przedstawiona w poniższych tabelach:

Współczynnik zmienności (%) dla powtarzalności (CV_t)

Materiał referencyjny	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:

Współczynnik zmienności (%) dla odtwarzalności (CV_R)

Materiał referencyjny	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

8. Stosowanie materiałów odniesienia

Prawidłowe stosowanie metody weryfikuje się przez wykonywanie powtórnych pomiarów certyfikowanych materiałów odniesienia, 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. pkt 3.27.4 i 3.27.5) oraz hydrolizatu (zob. pkt 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 pików o średnim zasięgu.

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

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

10. Kryteria wydajności

Zestawienie wyników (z wyjątkiem tyrozyny) pochodzących z dwóch porównań międzylaboratoryjnych (z 1990 r. przedstawionych w pkt 7 powyżej i z 2005 r. opisanych w normie EN/ISO 13903) daje następujące kryteria powtarzalności i odtwarzalności. Wartości uzyskane w tych dwóch badaniach międzylaboratoryjnych mogą nie mieć zastosowania do zakresów stężeń i matryc innych niż podane.

10.1. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch oznaczeń przeprowadzonych dla tej samej próbki w tym samym laboratorium i przez tego samego analityka nie może przekraczać:

- 6 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasów w przypadku glicyny, alaniny, lizyny, proliny, kwasu glutaminowego, izoleucyny i histydyny;
- 8 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasów w przypadku treoniny, fenyloalaniny, metioniny, kwasu asparaginowego i leucyny;
- 10 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasów w przypadku argininy i waliny;
- 12 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasu seryna;
- 15 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasu cystyna (cysteina).

10.2. Odtwarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych laboratoriach lub przez różnych analityków nie może przekraczać:

- 15 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasów w przypadku glicyny, alaniny i treoniny;
- 20 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasów w przypadku lizyny, proliny, fenyloalaniny, metioniny i kwasu asparaginowego;
- 22 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasów w przypadku kwasu glutaminowego i leucyny;
- 27 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasu arginina;
- 32 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasu izoleucyna;

- 35 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasów w przypadku waliny i seryny;
- 40 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasu histydyna;
- 50 % względem wyższej wartości, dla całkowitej zawartości aminokwasu cystyna (cysteina).

F. OZNACZANIE TRYPTOFANU

Metody analizy, które należy stosować do oznaczania tryptofanu:

- EN ISO 13904 Pasze – Oznaczanie zawartości tryptofanu;
- metoda analizy opisana w pkt 1–9 poniżej.

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 °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 oznaczany metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną.

3. Odczynniki

- 3.1. Należy stosować wodę podwójnie destylowaną lub o równoważnej jakości (przewodność < 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 $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ 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, zakres temperatur wrzenia od 40 do 60 °C
- 3.10. Roztwór wodorotlenku sodu, c = 1 mol/l
Rozpuścić 40,0 g NaOH (pkt 3.5) w wodzie i uzupełnić do objętości 1 l wodą (pkt 3.1).
- 3.11. Kwas chlorowodorowy, c = 6 mol/l:
Odmierzyć 492 ml HCl (pkt 3.7) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.
- 3.12. Kwas chlorowodorowy, c = 1 mol/l:
Odmierzyć 82 ml HCl (pkt 3.7) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

- 3.13. Kwas chlorowodorowy, $c = 0,1 \text{ mol/l}$:
Odmierzyć 8,2 ml HCl (pkt 3.7) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.
- 3.14. Kwas ortofosforowy, $c = 0,5 \text{ mol/l}$:
Odmierzyć 34 ml kwasu ortofosforowego (pkt 3.6) i uzupełnić do objętości 1 l wodą (pkt 3.1).
- 3.15. Stężony roztwór tryptofanu (pkt 3.2), $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2553 g tryptofanu (pkt 3.2) w kwasie chlorowodorowym (pkt 3.13) i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym (pkt 3.13). Przechowywać w temperaturze $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ nie dłużej niż przez 4 tygodnie.
- 3.16. Stężony roztwór wzorca wewnętrznego, $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$:
W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2728 g α -metylo-tryptofanu (pkt 3.3) w kwasie chlorowodorowym (pkt 3.13) i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym (pkt 3.13). Przechowywać w temperaturze $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ nie dłużej niż przez 4 tygodnie.
- 3.17. Kalibracyjny roztwór wzorcowy tryptofanu i wzorca wewnętrznego:
Odmierzyć 2,00 ml stężonego roztworu tryptofanu (pkt 3.15) i 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α -metylo-tryptofanu) (pkt 3.16). Rozcieńczyć wodą (pkt 3.1) i metanolem (pkt 3.8) w przybliżeniu do tej samej objętości i tego samego stężenia metanolu (10–30 %) jak w końcowym hydrolizacie.
Roztwór 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 (pkt 3.19) w 100 ml metanolu (pkt 3.8)
- 3.22. Faza ruchoma do HPLC: 3,00 g kwasu octowego (pkt 3.18) + 900 ml wody (pkt 3.1) + 50,0 ml roztworu (pkt 3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (pkt 3.19) w metanolu (pkt 3.8) (1 g/100 ml). Dostosować pH do 5,00 z użyciem etanoloaminy (pkt 3.20). Uzupełnić do objętości 1 000 ml wodą (pkt 3.1).
4. **Aparatura i sprzęt**
- 4.1. Wyposażenie HPLC z detektorem spektrofluorometrycznym
- 4.2. Kolumna do chromatografii cieczowej, 125 mm \times 4 mm, C_{18} , wypełnienie 3 μm lub równoważna
- 4.3. Pehametr
- 4.4. Kolba z polipropylenu o pojemności 125 ml, z szeroką szyjką i nakrętką
- 4.5. Filtr membranowy, 0,45 μm
- 4.6. Autoklaw, 110 (\pm 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 (\pm 0,1) bar.
- 4.7. Wyrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne
- 4.8. Wstrząsarka

5. Sposób postępowania

5.1. Przygotowanie próbek

Zmilić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 0,5 mm. Próbki o dużej zawartości wilgoci przed zmieleniem wysuszyć albo na powietrzu w temperaturze nieprzekraczającej 50 °C, albo przez liofilizację. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed zmieleniem należy poddać ekstrakcji eterem naftowym (pkt 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 (pkt 3.13) i 5,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.16). Wstrząsać lub mieszać przez 60 minut z użyciem wytrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego (pkt 4.7). Pozostawić do oddzielenia się osadu i przenieść pipetą 10,0 ml supernatantu do zlewki. Dodać 5 ml kwasu ortofosforowego (pkt 3.14). Dostosować pH do 3 z użyciem wodorotlenku sodu (pkt 3.10). Dodać odpowiednią ilość metanolu (pkt 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 (pkt 3.17)).

Przefiltrować kilka ml roztworu przez filtr membranowy 0,45 µm (pkt 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 z polipropylenu (pkt 4.4). Odważona część próbki musi zawierać około 10 mg azotu. Dodać 8,4 g oktahydratu wodorotlenku baru (pkt 3.4) i 10 ml wody. Wymieszać przy użyciu wstrząsarki (pkt 4.8) lub mieszadła magnetycznego (pkt 4.7). Pozostawić osłonięty teflonem magnes w mieszaninie. Spłukać ściany naczynia z użyciem 4 ml wody. Nałożyć nakrętkę i zamknąć luźno kolbę. Przenieść kolbę do autoklawu (pkt 4.6) z wrzącą wodą i parować przez 30 do 60 minut. Zamknąć autoklaw i autoklawować w temperaturze 110 (± 2) °C przez 20 godzin.

Przed otwarciem autoklawu obniżyć temperaturę nieco poniżej 100 °C. W celu uniknięcia krystalizacji Ba(OH)₂·8 H₂O 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) (pkt 3.16). Studzić naczynia w łaźni wodnej lub lodowej przez 15 minut.

Następnie dodać 5 ml kwasu ortofosforowego (pkt 3.14). Utrzymując naczynie w zimnej łaźni, zubożnić z użyciem HCl (pkt 3.11), mieszając, i dostosować pH do 3,0 z HCl (pkt 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.

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

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

5.4. Oznaczanie HPLC

Poniższe parametry elucji izokratycznej podano jako przykładowe; inne parametry mogą być stosowane, pod warunkiem że ich zastosowanie doprowadzi do otrzymania równoważnych wyników (zob. również objaśnienia pkt 9.1 i 9.2):

Kolumna do chromatografii cieczowej (pkt 4.2):	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 3 µm lub równoważna kolumna
Temperatura kolumny:	temperatura pokojowa
Faza ruchoma (pkt 3.22):	3,00 g kwasu octowego (pkt 3.18) + 900 ml wody (pkt 3.1) + 50,0 ml roztworu (pkt 3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (pkt 3.19) w metanolu (pkt 3.8) (1 g/100 ml). Dostosować pH do 5,00 z użyciem etanoloaminy (pkt 3.20). Uzupełnić do objętości 1 000 ml wodą (pkt 3.1)
Prędkość przepływu:	1 ml/min
Całkowity czas analizy:	około 34 min
Długość fali przy detekcji:	wzbudzenie: 280 nm, emisja: 356 nm
Dozowana objętość:	20 µl

6. Obliczanie wyników

Oblicza się zawartość tryptofanu (X) w g na 100 g próbki.

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

- A = powierzchnia piku wzorca wewnętrznego, kalibracyjny roztwór wzorcowy (pkt 3.17)
- B = powierzchnia piku tryptofanu, ekstraktu (pkt 5.2) lub hydrolizatu (pkt 5.3)
- V₁ = objętość w ml (2 ml) stężonego roztworu tryptofanu (pkt 3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (pkt 3.17)
- c = stężenie w µmol/ml (= 2,50) stężonego roztworu tryptofanu (pkt 3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (pkt 3.17)
- V₂ = objętość w ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.16) dodanego przy ekstrakcji (pkt 5.2) (= 5,00 ml) lub do hydrolizatu (pkt 5.3) (= 2,00 ml)
- C = powierzchnia piku wzorca wewnętrznego, ekstrakt (pkt 5.2) lub hydrolizat (pkt 5.3)
- D = powierzchnia piku tryptofanu, kalibracyjny roztwór wzorcowy (pkt 3.17)
- V₃ = objętość w ml (= 2,00 ml) stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.16) dodanego do kalibracyjnego roztworu wzorcowego (pkt 3.17)
- m = masa próbki w g (skorygowana względem masy wyjściowej, jeżeli była suszona lub odłuszczana)
- M = masa molowa 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.

8. Wyniki porównania międzylaboratoryjnego

W UE przeprowadzono porównanie międzylaboratoryjne (czwarte badanie porównawcze), w którym trzy próbki były analizowane przez maksymalnie 12 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy. W odniesieniu do każdej próbki przeprowadzono powtórne analizy (pięciokrotnie). W poniższej tabeli podano wyniki przeprowadzonych badań.

	Próbka 1 Pasza 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_f [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, które przedłożyły wyniki

n = liczba pojedynczych wyników zachowanych po eliminacji wartości odstających (według Cochrańa, test na wartość odstającą Dixona)

s_f = odchylenie standardowe powtarzalności

S_R = odchylenie standardowe odtwarzalności

r = powtarzalność

R = odtwarzalność

CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności w %

CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności w %

W innym porównaniu międzylaboratoryjnym przeprowadzonym w UE (trzecie badanie porównawcze) dwie próbki były analizowane przez maksymalnie 13 laboratoriów w celu sprawdzenia metody ekstrakcji wolnego tryptofanu. W odniesieniu do każdej próbki przeprowadzono powtarzalne analizy (pięciokrotnie). W poniższej tabeli podano wyniki przeprowadzonych badań.

	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_f [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, które przedłożyły wyniki
n =	liczba pojedynczych wyników zachowanych po eliminacji wartości odstających (według Cochrańa, test na wartość odstającą Dixona)
s_r =	odchylenie standardowe powtarzalności
S_R =	odchylenie standardowe odtwarzalności
r =	powtarzalność
R =	odtwarzalność
CV_r =	współczynnik zmienności powtarzalności w %
CV_R =	współczynnik zmienności odtwarzalności w %

W kolejnym badaniu porównawczym przeprowadzonym w UE cztery próbki były analizowane przez maksymalnie 7 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy tryptofanu. Wyniki są podane poniżej. W odniesieniu do każdej próbki przeprowadzono powtórne analizy (pięciokrotnie).

	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, które przedłożyły wyniki
n =	liczba pojedynczych wyników zachowanych po eliminacji wartości odstających (według Cochrańa, test na wartość odstającą Dixona)
s_r =	odchylenie standardowe powtarzalności
S_R =	odchylenie standardowe odtwarzalności
r =	powtarzalność
R =	odtwarzalność
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 szczególnych warunków chromatograficznych.

Elucja izokratyczna po gradientowym czyszczeniu kolumny:

Kolumna do chromatografii cieczowej:	125 mm x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 5 µm lub równoważna	
Temperatura kolumny:	32 °C	
Faza ruchoma:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /metanol, 95 + 5 (V+V) B: metanol	
Program czyszczenia gradientowego:	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:	około 33 min	

- 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 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.

G. OZNACZANIE SUROWEGO OLEJU I TŁUSZCZU

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości surowych olejów i tłuszczów w paszach.

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

W celu oznaczenia surowych olejów i tłuszczów w nasionach i owocach oleistych, a także w paszy, w której zawartość olejów/tłuszczów surowych jest wyższa niż 15 %, ekstrakcję należy przeprowadzić metodą A, a ponowną ekstrakcję – metodą B (pkt 5.3).

- 1.1. Postępowanie A – Bezpośrednio ekstrahowane surowe 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 wartość prawdziwą.

2. Sposób przeprowadzenia metody

2.1. Postępowanie A

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

2.2. Postępowanie B

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

3. Odczynniki

3.1. Eter naftowy, zakres 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, $c = 3 \text{ mol/l}$

3.4. Pomocniczy materiał filtracyjny, np. Kieselgur, Hyflo-supercel

4. Aparatura i sprzęt

4.1. Aparat ekstrakcyjny. Jeżeli aparat jest wyposażony w syfon (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 ekstrakcyjne, niezawierające substancji rozpuszczalnych w eterze naftowym, o porowatości odpowiadającej wymaganiom określonym w pkt 4.1

4.3. Suszarka – suszarka próżniowa z możliwością ustawienia temperatury suszenia na $75 \pm 3 \text{ °C}$ lub suszarka nawiewna z możliwością ustawienia temperatury na $100 \pm 3 \text{ °C}$

5. Sposób postępowania

5.1. Postępowanie A (zob. pkt 8.1)

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

Umieścić gilzę w aparacie ekstrakcyjnym (pkt 4.1) i ekstrahować przez sześć godzin eterem naftowym (pkt 3.1). Zebrać ekstrakt eterowy do suchej, zważonej kolby zawierającej kawałki kamienia pumeksowego ^(e).

Oddestylować rozpuszczalnik. Suszyć pozostałość, umieszczając kolbę w suszarce (pkt 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).

^(e) Jeśli olej lub tłuszcz musi zostać poddany późniejszym próbom badania jakości, kawałki kamienia pumeksowego należy zastąpić koralikami szklanymi.

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 (pkt 3.3) oraz kawałki kamienia pumeksowego. Przykryć zlewkę szkłem zegarkowym lub dopasować kolbę stożkową z chłodnicą zwrotną. Doprowadzić mieszaninę do spokojnego wrzenia w małym płomieniu palnika lub na płycie grzejnej i utrzymywać wrzenie przez godzinę. Nie dopuszczać do osadzania się produktu na ścianach pojemnika.

Schłodzić i dodać pomocniczy materiał filtracyjny (pkt 3.4) w ilości zapobiegającej jakimkolwiek stratom oleju i tłuszczu podczas filtracji. Przefiltrować przez zwilżoną, beztłuszczową podwójną bibułę filtracyjną. Przemycać 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 szkle zegarkowym podwójną bibułę filtracyjną z pozostałością i suszyć przez 1,5 godziny w suszarce nawiewnej (pkt 4.3) w temperaturze 100 ± 3 °C.

Umieścić podwójną bibułę filtracyjną zawierającą suchą pozostałość w gilzie ekstrakcyjnej (pkt 4.2) i przykryć zwitkiem beztłuszczowej waty bawełnianej. Umieścić gilzę w aparacie ekstrakcyjnym (pkt 4.1) i postępować w sposób określony w pkt 5.1 akapity drugi i trzeci.

5.3. *Postępowanie A i ponowna ekstrakcja metodą B*

W celu oznaczenia surowych olejów i tłuszczów w nasionach i owocach oleistych, a także w paszy, w której zawartość surowych olejów/tłuszczów jest wyższa niż 15 %, ekstrakcję należy przeprowadzić metodą A, a ponowną ekstrakcję – metodą B.

Oznacza to, że po ekstrakcji eterem naftowym (postępowanie A) pozostałość lub część pozostałości ponownie ekstrahuje się kwasem chlorowodorowym (procedura B). Zawartość surowych olejów i tłuszczów jest sumą wyniku postępowania A i B.

6. **Wyrażanie wyników**

Masę pozostałości wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. **Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki przez tego samego analityka nie może przekraczać:

- 0,2 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości surowych olejów i tłuszczów niższej niż 5 %,
- 4,0 % względem najwyższego wyniku dla zawartości od 5 do 10 %,
- 0,4 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości wyższej niż 10 %.

8. **Objaśnienia**

8.1. Dla produktów o wysokiej zawartości olejów i tłuszczów, które są trudne do rozdrobnienia lub w przypadku których trudno jest uzyskać jednorodną zredukowaną próbkę badaną, postępować w sposób podany poniżej.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 20 g próbki i mieszać z co najmniej 10 g bezwodnego siarczanu sodu (pkt 3.2). Ekstrahować eterem naftowym (pkt 3.1) w sposób określony w pkt 5.1. Otrzymany ekstrakt uzupełnić do objętości 500 ml eterem naftowym (pkt 3.1) i mieszać. Pobrać 50 ml roztworu i przenieść do małej, suchej i zwężonej kolby zawierającej kawałki kamienia pumeksowego. 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 olejów i tłuszczów obliczyć jako udział procentowy w próbce, według następującego wzoru:

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

gdzie:

m_1 = masa w gramach pozostałości po pierwszej ekstrakcji (podwielokrotność ekstraktu)

m_2 = masa w gramach pozostałości po drugiej ekstrakcji

- 8.2. Dla niektórych produktów (np. o niskiej zawartości olejów i tłuszczów) badaną próbkę można zwiększyć.
- 8.3. W przypadku karmy dla zwierząt domowych o wysokiej zawartości wody może wystąpić potrzeba zmieszania jej 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 może być konieczne przedłużenie czasu suszenia wynoszącego 1,5 godziny. Należy jednak unikać nadmiernego suszenia, gdyż może to prowadzić do zaniżania wyników. Można również stosować kuchenki mikrofalowe.

H. OZNACZANIE WŁÓKNA SUROWEGO

1. Cel i zakres stosowania metody

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

Metoda ta nie ma zastosowania w przypadku lignocelulozy i węgla roślinnego (cząstki zbyt drobne).

2. Sposób przeprowadzenia metody

Próbkę, w razie konieczności odtłuszczoną, poddaje się działaniu wrzących roztworów kwasu siarkowego i wodorotlenku potasu o odpowiednim stężeniu. Pozostałość jest rozdzielana przez filtrację na filtry ze szkła spiekane, przemywana, suszona i spopiela w temperaturze od 475 do 500 °C. Ubytek masy po spopieleniu odpowiada zawartości włókna surowego w badanej próbce.

3. Odczynniki

- 3.1. Kwas siarkowy, $c = 0,13 \text{ mol/l}$
- 3.2. Substancja przeciwpieniąca (np. n-oktanol)
- 3.3. Pomocniczy materiał filtracyjny (Celit 545 lub równoważny), wyprażony w temperaturze 500 °C przez cztery godziny (pkt 8.6)
- 3.4. Aceton
- 3.5. Eter naftowy o temperaturze wrzenia od 40 do 60 °C
- 3.6. Kwas chlorowodorowy, $c = 0,5 \text{ mol/l}$
- 3.7. Roztwór wodorotlenku potasu, $c = 0,23 \text{ mol/l}$

4. Aparatura i sprzęt

- 4.1. Urządzenie grzewcze do mineralizacji kwasem siarkowym i roztworem wodorotlenku potasu, wyposażone w podstawkę mocującą tygiel filtracyjny (pkt 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. Tygiel filtracyjny z filtrem ze szkła spiekane o porach od 40 do 90 μm . Przed pierwszym użyciem ogrzewać przez kilka minut w temperaturze 500 °C i schłodzić (pkt 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 (pkt 4.2) i rurki odprowadzającej z kranem, służącej do odprowadzenia cieczy i próżni
- 4.7. Pierścienie łączące, służące do połączenia urządzenia grzewczego (pkt 4.1) z tygłem filtracyjnym (pkt 4.2) i cylindrem (pkt 4.3) oraz do dołączenia zestawu ekstrakcyjnego do ekstrakcji na zimno (pkt 4.6) i tygla

5. Sposób postępowania

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 1 g przygotowanej próbki do tygla (pkt 4.2) (zob. objaśnienia 9.1, 9.2 i 9.3) i dodać 1 g pomocniczego materiału filtracyjnego (pkt 3.3).

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

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

Otworzyć kran rurki odprowadzającej (pkt 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 (pkt 3.7) do cylindra połączonego z tygłem i dodać kilka kropli substancji przeciwpieniącej (pkt 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 zestawu ekstrakcyjnego do ekstrakcji na zimno (pkt 4.6). W warunkach próżni przemywać pozostałość w tyglu trzema kolejnymi porcjami 25 ml acetonu (pkt 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 nie może przekraczać 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 spopieleniu 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

m₀ = ubytek masy po spopieleniu w trakcie oznaczania, w g

m₁ = ubytek masy po spopieleniu w trakcie próby ślepej, w g

7. Powtarzalność

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

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

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

8. Odtwarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki w różnych laboratoriach nie może przekraczać:

- 1,0 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości włókna surowego niższej niż 10 %,
- 10 % względem wyższego wyniku, dla zawartości włókna surowego równej lub wyższej niż 10 %.

9. objaśnienia

- 9.1. Pasze zawierające więcej niż 10 % tłuszczu surowego przed analizą należy odtłuścić eterem naftowym (pkt 3.5). Podłączyć tygiel filtracyjny (pkt 4.2) wraz z jego zawartością do zestawu ekstrakcyjnego do ekstrakcji na zimno (pkt 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 (pkt 4.1) i postępować w sposób określony w pkt 5.
- 9.2. Pasze zawierające tłuszcze, które nie mogą być bezpośrednio ekstrahowane eterem naftowym (pkt 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 zestawu ekstrakcyjnego do ekstrakcji na zimno (pkt 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 od postępowania z wodorotlenkiem potasu.
- 9.3. Jeżeli pasza zawiera więcej niż 5 % węglanów, wyrażonych jako węglan wapnia, podłączyć tygiel (pkt 4.2) z odważoną próbką do urządzenia grzewczego (pkt 4.1). Przemyć próbkę trzykrotnie 30 ml porcjami kwasu chlorowodorowego (pkt 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.
- 9.4. Jeżeli używana jest aparatura stojąca (kilka tygli podłączonych do jednego urządzenia grzewczego), nie należy wykonywać dwóch pojedynczych oznaczeń tej samej próbki w tej samej serii.
- 9.5. Jeżeli po gotowaniu filtrowanie roztworu kwasowego i zasadowego jest trudne, przepuścić sprężone powietrze przez rurkę podłączaną do urządzenia grzewczego i następnie kontynuować filtrowanie.
- 9.6. Temperatura spoielania nie może być wyższa niż 500 °C ze względu na wytrzymałość szklanego tygla filtracyjnego. Postępować w taki sposób, aby uniknąć szoku termicznego podczas ogrzewania i schładzania.

I. 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.

Metoda ta ma być stosowana do oznaczania zawartości cukrów w celu obliczania wartości energetycznej paszy.

W przypadku gdy zawartość cukrów ma być oznaczona do innych celów, można zastosować inne metody analizy.

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

- 3.1. Etanol, roztwór 40 % (v/v), gęstość: 0,948 g/ml przy temperaturze 20 °C, obojętny wobec fenoloftaleiny

- 3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g kwasu octowego lodowatego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.
- 3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasu $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. 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
- 3.7. Roztwór wodorotlenku sodu, 0,1 mol/l
- 3.8. Odczynnik Luff-Schoorla:
Ostrożnie mieszając, dodać roztwór kwasu cytrynowego (pkt 3.8.2) do roztworu węglanu sodu (pkt 3.8.3). Następnie dodać roztwór siarczanu miedzi (pkt 3.8.1) i uzupełnić do objętości 1 l wodą. Zostawić na noc do osadzenia i przefiltrować.
Sprawdzić stężenie otrzymanego odczynnika (Cu 0,05 mol/l; Na_2CO_3 1 mol/l), zob. pkt 5.4 akapit ostatni. Wartość pH roztworu musi wynosić około 9,4.
- 3.8.1. Roztwór siarczanu miedzi: rozpuścić 25 g siarczanu miedzi $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 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 sodu, 0,1 mol/l
- 3.10. Roztwór skrobi: do 1 litra 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 % roztwór jodku potasu (w/v)
- 3.13. Granulki kamienia pumekowego gotowane w kwasie chlorowodorowym, przemyte wodą i wysuszone
- 3.14. 3-metylobutan-1-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 (pkt 3.1) i mieszać w tumblerze przez godzinę. Dodać 5 ml roztworu Carreza I (pkt 3.2) i mieszać przez ok. 30 sekund. Dodać 5 ml roztworu Carreza II (pkt 3.3) i ponownie mieszać przez minutę. Uzupełnić do pełnej objętości kolby etanolem (pkt 3.1), zhomogenizować 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, zhomogenizować 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 metyloвого (pkt 3.4) i następnie, ciągle mieszając, dodawać ostrożnie kwas chlorowodorowy (pkt 3.5) aż do zmiany barwy cieczy na mocno czerwoną. Dodać 15 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.6) i zanurzyć kolbę we wrzącej łaźni wodnej na 30 minut. Szybko schłodzić do temperatury około 20 °C i dodać 15 ml roztworu wodorotlenku sodu (pkt 3.7). Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml wodą i zhomogenizować. 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*

Odmierzyć pipetą 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (pkt 3.8) i przenieść do kolby Erlenmeyera o pojemności 300 ml; dodać dokładnie 25 ml klarownego roztworu cukru. Dodać dwie granulki kamienia pumekowego (pkt 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 Erlenmeyera. Dopasować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera. Gotować dokładnie 10 minut. Schłodzić natychmiast zimną wodą i po około pięciu minutach miareczkować w następujący sposób:

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

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

6. **Obliczanie wyników**

Wykorzystując tabelę, określić ilość glukozy w mg, która odpowiada różnicy między wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonych w ml tiosiarczanu 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 jednorodne, odważyć 20 g próbki i umieścić w 500 ml wody w kolbie miarowej o pojemności 1 l. Mieszać przez godzinę w tumblerze. Skłarować roztworami Carreza I (pkt 3.2) i II (pkt 3.3) w sposób określony w pkt 5.1, z użyciem czterokrotnie większych ilości każdego odczynnika. Uzupełnić kolbę do objętości 80 % etanolem (v/v).

Zhomogenizować i przefiltrować. Usunąć etanol w sposób określony w pkt 5.1. Jeżeli nie ma dekstrynizowanej 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 tumblerze przez godzinę lub, jeśli to konieczne, dłużej. Roztwór klarować roztworami Carreza I (3.2) i II (pkt 3.3) w sposób określony w pkt 5.1. Uzupełnić do pełnej objętości kolby zimną wodą, zhomogenizować i przefiltrować. Następnie postępować w sposób określony w pkt 5.3 w celu określenia całkowitej zawartości cukrów.

8. **Objaśnienia**

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

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 250 mg dla każdego oznaczenia.

W pierwszym przypadku zużyte zostało 17 ml roztworu tiosiarczanu sodu o stężeniu 0,1 mol/l, co odpowiada 44,2 mg 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 Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, podgrzewanie przez dwie 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		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
	ml	mg	różnica	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

J. 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

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

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

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

3.4. Odczynnik Luff-Schoorla:

Ostrożnie mieszając, dodać roztwór kwasu cytrynowego (pkt 3.4.2) do roztworu węglanu sodu (pkt 3.4.3). Następnie dodać roztwór siarczanu miedzi (pkt 3.4.1) i uzupełnić do objętości 1 l wodą. Zostawić na noc do osadzenia i przefiltrować. Sprawdzić stężenie 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 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 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 kamienia pumeksowego 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 litra 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. Wstawić kolbę do wrzącej łaźni wodnej na 30 minut, a następnie ostudzić do temperatury około 35 °C. Dodać 5 ml zawiesiny drożdży (pkt 3.1) i zhomogenizować. 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 (pkt 3.2) i mieszać przez 30 sekund, następnie dodać 2,5 ml roztworu Carreza II (pkt 3.3) i ponownie mieszać przez 30 sekund. Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml wodą, zmieszać i przefiltrować. Używając pipety, pobrać nie więcej niż 25 ml filtratu, który powinien zawierać 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 próbę ślepą z 5 ml zawiesiny drożdży (pkt 3.1). Oznaczyć zawartość laktozy według Luff-Schoorla, w następujący sposób: dodać 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (pkt 3.4) i dwie granulki kamienia pumeksowego (pkt 3.5). 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 Erlenmeyera. Dopasować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera. Gotować dokładnie 10 minut. Schłodzić natychmiast zimną wodą i po około pięciu minutach miareczkować w następujący sposób:

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

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie na mieszaninie 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (pkt 3.4) i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasu (pkt 3.6) i 25 ml kwasu siarkowego (pkt 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 tiosiarczanu sodu 0,1 mol/l.

Wynik wyrazić jako udział procentowy bezwodnej laktozy w próbce.

7. objaśnienia

1. W przypadku produktów zawierających ponad 40 % cukrów fermentujących dodać więcej niż 5 ml zawiesiny drożdży (pkt 3.1).
2. W paszach o obniżonej zawartości laktozy (np. w mleku dla kotów) laktozę przekształca się we fruktozę, która nie jest całkowicie sfermentowana w ciągu 2 godzin, co daje wyższe lub fałszywie pozytywne wyniki (ponieważ pozostałości fruktozy pozostają w ekstrakcie).

Tabela wartości dla 25 ml odczynnika Luff-Schoorla

ml Na₂ S₂ O₃ 0,1 mol/l, podgrzewanie przez dwie 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		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 mol/l
	ml	mg	różnica	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	22
23	62,2		88,0		23

K. OZNACZANIE SKROBI

- METODA POLARYMETRYCZNA -

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości skrobi i wysokocząsteczkowych produktów jej degradacji w paszach w celu sprawdzenia zgodności z zadeklarowaną wartością energetyczną (przepisy zawarte w załączniku VII) oraz rozporządzeniem (WE) nr 767/2009.

Metoda ta ma być stosowana do oznaczania zawartości skrobi w celu obliczania wartości energetycznej paszy.

W przypadku gdy zawartość skrobi ma być oznaczona do innych celów, można zastosować inne metody analizy.

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

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 $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g kwasu octowego lodowatego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.4. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasu $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. 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 badanej próbki i dodać następną porcję 25 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.2). Kolbę zanurzyć we wrzącej łaźni wodnej. Aby zapobiec aglomeracji, przez pierwsze trzy minuty nieprzerwanie i energicznie wstrząsać kolbą. Ilość wody w łaźni wodnej musi być wystarczająca, aby pozostała ona 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 (pkt 3.3) i wstrząsać przez ok. 30 sekund. Następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II (pkt 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 oznaczenie 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') substancji 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. W międzyczasie sześciokrotnie energicznie wytrząsnąć kolbę, tak aby badana próbka została dobrze zmieszana z etanolem. Uzupełnić do pełnej objętości kolby etanolem (pkt 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 (pkt 3.1) i energicznie wstrząsnąć. Dopasować 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 (pkt 3.3) i Carreza II (pkt 3.4), uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, zmieszać, przefiltrować i zmierzyć skręcalność optyczną w sposób określony w pkt 5.2 akapity drugi i trzeci.

6. Obliczanie wyników

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

6.1. Pomiary z użyciem polarymetru

$$\text{Zawartość skrobi (\%)} = \frac{2000 \times (P - P')}{[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}}}$$

P = całkowita skręcalność optyczna w stopniach kątowych

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

$[\alpha]_{\text{D}}^{20^{\circ}}$ = skręcalność właściwa czystej skrobi. 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 mieszkankach paszowych

6.2. *Pomiary z użyciem sacharymetru*

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

- S = całkowita skręcalność optyczna w stopniach sacharymetrycznych
- S' = skręcalność optyczna w stopniach sacharymetrycznych 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
- $[\alpha]_D^{20}$ = skręcalność właściwa 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 dużej zawartości laktozy, takich jak serwatka w proszku lub mleko odtłuszczone w proszku, postępować w następujący sposób: po dodaniu 80 ml etanolu (pkt 3.5) dopasować 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 melasowy z buraków (cukrowych), cukier (buraczany),
 - miazga (pulpa, wysłodki) cytrusowa,
 - siemię lniane, wyciągi z siemienia lnianego, siemię lniane ekstrahowane,
 - nasiona rzepaku, makuch rzepakowy, ekstrahowane nasiona rzepaku, łuski nasion rzepaku,
 - nasiona słonecznika, ekstrahowane nasiona słonecznika, nasiona słonecznika częściowo łuskane, ekstrahowane,
 - wyciągi z kopry, kopra ekstrahowana,
 - miazga (pulpa) ziemniaczana,
 - drożdże odwodnione,
 - produkty bogate w inulinę, a w szczególności krajanka i mączka z karczochów jerozolimskich,
 - skwarki,
 - produkty sojowe.

W takich przypadkach można zastosować metodę analizy przewidzianą w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 121/2008 ⁽⁷⁾. Metoda ta może być również stosowana w paszy zawierającej mniej niż 1 % skrobi.

(7) Rozporządzenie Komisji (WE) nr 121/2008 z dnia 11 lutego 2008 r. określające metodę analizy do oznaczania zawartości skrobi w preparatach w rodzaju stosowanych do karmienia zwierząt (kod CN 2309) (Dz.U. L 37 z 12.2.2008, s. 3).

L. OZNACZANIE POPIOŁU SUROWEGO

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości popiołu surowego w paszach.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

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

3. **Odczynniki**

20 % roztwór azotanu amonu (w/v)

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Płyta grzejna

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem

4.3. Krzemionkowe, 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 grzejnej 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 czerwonej, w którym nie widać cząstek zawierających węgiel. Umieścić tygiel w ekzykatorze, 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 ekzykatorze, pozostawić do schłodzenia i niezwłocznie zważyć. Ponownie spopielać przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy popiołu (ubytek masy między dwoma kolejnymi ważeniami nie może przekraczać 1 mg).

6. **Obliczanie wyników**

Masę pozostałości obliczyć, odejmując tarę.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. **Objaśnienia**

7.1. *Substancje, które trudno się spopielają*, należy wstępnie spopielać co najmniej przez trzy 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 lub wody. Po wysuszeniu kontynuować zwęglanie w piecu. Powtarzać czynności w razie potrzeby aż do całkowitego spopielenia.

7.2. W przypadku *substancji, które trudno poddają się postępowaniu* określonego w pkt 7.1, postępuje się w następujący sposób: po spopieleniu przez trzy 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 wyschnięcia, 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 sączka bezpopiołowego. Po spaleniu pozostałość zwilżyć jak najmniejszą ilością wody. Wysuszyć i spopielać w sposób określony w pkt 5.

M. 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 organicznych materiałów paszowych i do większości mieszanek paszowych;
- 1.2. *Metoda B*: mająca zastosowanie do mieszanek paszowych i mieszanin mineralnych 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 spopielaana, 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

- 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 grzejna
- 4.2. Elektryczny piec mufłowy z termostatem
- 4.3. Krzemionkowe, porcelanowe lub platynowe tygle do spalań, prostokątne (ok. 60 × 40 × 25 mm) lub okrągłe (średnica: 60–75 mm, wysokość: 20–40 mm)
- 4.4. Filtry bezpopiołowe

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 (pkt 3.1). Powoli doprowadzić do wrzenia i gotować ostrożnie przez 15 minut. Przefiltrować ciepły roztwór przez sącdek bezpopiołowy i przemywać pozostałość gorącą wodą, aż reakcja z kwasem przestanie być widoczna. Wysuszyć filtr zawierający pozostałość i spopielić go w wytarowanym tyglu w temperaturze nie niższej niż 550 °C i nie wyższej niż 700 °C. Ochłodzić 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 (pkt 3.1), wymieszać i odczekać, aż roztwór przestanie się burzyć. Dodać kolejne 50 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 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 hydrolyzy skrobi. Ciepły roztwór przefiltrować przez sącdek bezpopiołowy i przemyć go 50 ml ciepłej wody (zob. objaśnienia pkt 7). Filtr z pozostałością umieścić w tyglu do spalań, wysuszyć i spopielać w temperaturze nie niższej niż 550 °C i nie wyższej niż 700 °C. Popiół przenieść do zlewki o pojemności od 250 do 400 ml z użyciem 75 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.1). Kontynuować czynności opisane w pkt 5.1 akapit drugi.

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 (pkt 3.1) 50 ml roztworu 20 % (w/v) kwasu trichlorooctowego (pkt 3.2) i przemywając filtr ciepłym 1 % roztworem kwasu trichlorooctowego (pkt 3.3).

N. OZNACZANIE CAŁKOWITEJ ZAWARTOŚCI FOSFORU

Fosfor całkowity ma być oznaczany z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 15510 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie wapnia, sodu, fosforu, magnezu, potasu, żelaza, cynku, miedzi, manganu, kobaltu, molibdenu i ołowiu z zastosowaniem ICP-AES lub
- metody analizy przewidzianej w normie EN 15621 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie wapnia, sodu, fosforu, magnezu, potasu, siarki, żelaza, cynku, miedzi, manganu i kobaltu po mineralizacji ciśnieniowej metodą ICP-AES lub
- metody fotometrycznej, jak opisano poniżej.

METODA FOTOMETRYCZNA

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania całkowitej zawartości fosforu w paszy. Metoda ta jest w szczególności odpowiednia do analizy paszy o niskiej zawartości fosforu. W niektórych przypadkach (produkty bogate w fosfor) dopuszcza się stosowanie metody grawimetrycznej.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

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

3. **Odczynniki**

3.1. Węglan wapnia

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

3.3. Kwas azotowy, $\rho_{20} = 1,045$ g/ml

3.4. Kwas azotowy, $\rho_{20} =$ od 1,38 do 1,42 g/ml

3.5. Kwas siarkowy, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml

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

3.6.1. Roztwór heptamolibdenianu amonu: rozpuścić w gorącej wodzie 100 g heptamolibdenianu amonu (NH_4) $6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Dodać 10 ml amoniaku (o gęstości 0,91 g/ml) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.6.2. Roztwór metawanadanu amonu: 2,35 g metawanadanu amonu NH_4VO_3 rozpuścić w 400 ml gorącej wody. Stale mieszając, dodawać powoli 20 ml rozcieńzonego 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 diwodorofosforanu potasu KH_2PO_4 w wodzie. Uzupełnić do objętości 1 l wodą.

4. Aparatura i sprzęt

- 4.1. Krzemionkowe, porcelanowe lub platynowe tygły do spielania
- 4.2. Elektryczny piec mufłowy 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 około 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 badaną próbkę w kolbie Kjeldahla, dodać 20 ml kwasu siarkowego (3.5), wstrząsnąć do całkowitego nasycenia kwasem i nie dopuścić do przyklejania cząstek do ścianek kolby, podgrzać i utrzymywać w temperaturze wrzenia przez 10 minut. Nieznacznie schłodzić, dodać 2 ml kwasu azotowego (pkt 3.4), ostrożnie podgrzać, ponownie nieznacznie schłodzić i dodać nieco więcej kwasu azotowego (pkt 3.4), a następnie ponownie doprowadzić do wrzenia. Powtarzać te czynności aż do uzyskania bezbarwnego roztworu. Schłodzić, dodać trochę wody, zdekantować ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml, spłukać kolbę Kjeldahla gorącą wodą. Pozostawić do schłodzenia, uzupełnić do pełnej objętości wodą, zhomogenizować i przefiltrować.

5.1.2. Próbkę zawierające substancje organiczne, wolne od diwodorofosforanów magnezu i wapnia

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 2,5 g próbki i umieścić w tyglu do spielania. Zmieszać dokładnie próbkę badaną z 1 g węgla wapnia (pkt 3.1). Spieścić 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 (pkt 3.2) aż do zaprzestania pienienia się. Następnie dodać kolejne 10 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.2). Umieścić zlewkę na łaźni piaskowej i odparować do wyschnięcia, aby uczynić krzemionkę nierozpuszczalną. Pozostałość rozpuścić w 10 ml kwasu azotowego (pkt 3.3) i gotować na łaźni piaskowej lub płycie grzejnej przez 5 minut, nie doprowadzając do zupełnego odparowania cieczy. Zdekantować ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml, spłukując kilkakrotnie zlewkę gorącą wodą. Pozostawić do schłodzenia, uzupełnić do pełnej objętości wodą, zhomogenizować i przefiltrować.

5.2. Wywołanie zabarwienia i pomiar gęstości optycznej

Rozcieńczyć podwielokrotną 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 (pkt 4.6) i dodać 10 ml odczynnika molibdenowanadowego (pkt 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 (pkt 3.6) do 10 ml wody.

5.3. Krzywa wzorcowa

Z roztworu wzorcowego (pkt 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 (pkt 3.6). Zhomogenizować i pozostawić co najmniej na 10 minut w temperaturze 20 °C. Zmierzyć gęstość optyczną w sposób określony w pkt 5.2. Wykreślić krzywą wzorcową, 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 wzorcowej.

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 % w wartości bezwzględnej, dla zawartości fosforu równej lub wyższej niż 5 %.

O. OZNACZANIE CHLORU Z CHLORKÓW

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości chloru w chlorkach, które są rozpuszczalne w wodzie, umownie wyrażonego jako chlorek sodu. 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

- 3.1. Roztwór tiocyjanianu amonu 0,1 mol/l
- 3.2. Roztwór azotanu srebra 0,1 mol/l
- 3.3. Nasycony roztwór siarczanu amonu i żelaza $(\text{NH}_4)\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$
- 3.4. Kwas azotowy, gęstość: 1,38 g/ml
- 3.5. Eter dietylowy
- 3.6. Aceton
- 3.7. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g kwasu octowego lodowego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.
- 3.8. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasu $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. 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 próbę ślepa, pomijając analizowaną próbkę.

5.1.1. Próbkę 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 tumblerze, uzupełnić do pełnej objętości kolby, zhomogenizować i przefiltrować.

- 5.1.2. Próbki zawierające substancje organiczne, z wyłączeniem produktów wymienionych 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 (pkt 3.7), mieszać przez 30 sekund i dodać 5 ml roztworu Carreza II (pkt 3.8). Mieszać przez 30 minut w tumblerze, uzupełnić do pełnej objętości kolby, zhomogenizować i przefiltrować.

- 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. dekstrynizowana skrobia)

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 (pkt 3.6) i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym rozpuszczalnikiem, zhomogenizować 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. Podwielokrotna 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 (pkt 3.4), 2 ml nasyconego roztworu siarczanu amonu i żelaza (pkt 3.3) i dwie krople roztworu tiocyjanianu amonu (pkt 3.1) przeniesionego z zastosowaniem biurety wypełnionej do znaku 0. Stosując biuretę, przenieść roztwór azotanu srebra (pkt 3.2), tak aby nadmiar wyniósł 5 ml. Dodać 5 ml eteru dietylowego (pkt 3.5) i mocno wstrząsać do skoagulowania się osadu. Nadmiar azotanu srebra miareczkować roztworem tiocyjanianu amonu (pkt 3.1) aż do uzyskania czerwono-brązowego 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 = objętość w ml dodanego roztworu azotanu srebra o stężeniu 0,1 mol/l

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

m = masa w g próbki w podwielokrotnej części

Jeżeli próba ślepa 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 lub amperometryczne.

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

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

ZAŁĄCZNIK IV

„ZAŁĄCZNIK IV

METODY ANALIZY DO CELÓW KONTROLI POZIOMU DOPUSZCZONYCH DODATKÓW W PASZACH

A. OZNACZANIE WITAMINY A

Witamina A ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17547 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie zawartości witaminy A, E i D ⁽¹⁾ – Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z oczyszczaniem (HPLC) za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub
- za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z zastosowaniem detektora UV lub fluorescencyjnego, jak opisano w pkt 1–9 poniżej.

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości witaminy A (retinolu) w paszy. 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 etanolewym 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 w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z zastosowaniem detektora UV lub detektora fluorescencyjnego. Parametry chromatograficzne zostały tak dobrane, że nie zachodzi rozdział pomiędzy wszystkimi formami alkoholowymi *trans*-witaminy A i jej izomerami *cis*.

3. Odczynniki

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Eter naftowy, zakres temperatur wrzenia 40–60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (zob. objaśnienia pkt 7.7)
- 3.6. Siarczek sodu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
 - 3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$ w glicerolu, $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$ (dla $x = 9$) (zob. objaśnienia pkt 7.8)
- 3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ w etanolu (pkt 3.1)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (pkt 3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v). Dokładny współczynnik jest określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.
- 3.10. Azot wolny od tlenu

⁽¹⁾ Metoda analizy przewidziana w normie EN 17547 jest określana jako metoda alternatywna stosowana do celów urzędowej kontroli oznaczania witamin A i E zamiast metody opisanej dla oznaczania witaminy A w części A niniejszego załącznika oraz witaminy E w części B niniejszego załącznika.

- 3.11. Wszystkie formy octanowe *trans*-witaminy A, ekstra czyste, o 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 (pkt 3.11) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (pkt 3.8) i uzupełnić do pełnej objętości tym samym rozpuszczalnikiem. Stężenie nominalne tego roztworu wynosi 1 400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość oznacza się w sposób określony w pkt 5.6.3.1.
- 3.12. Wszystkie formy palmitynianowe *trans*-witaminy A, ekstra czyste, o certyfikowanej aktywności, np. $1,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.12.1. Roztwór podstawowy wszystkich form palmitynianowych *trans*-witaminy A: odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 80 mg palmitynianu witaminy A (pkt 3.12) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (pkt 3.8) i uzupełnić do pełnej objętości tym samym rozpuszczalnikiem. Stężenie nominalne tego roztworu wynosi 1 400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość oznacza się w sposób określony w pkt 5.6.3.2.

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

4. Aparatura i sprzęt

- 4.1. Próżniowa wyparka rotacyjna
- 4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe
- 4.2.1. Kolby płaskodenne lub stożkowe o pojemności 500 ml, ze szlifem szklanym wewnętrznym
- 4.2.2. Kolby miarowe o wąskich szyjkach o pojemnościach 10, 25, 100 i 500 ml, ze szlifowanymi korkami szklanymi
- 4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1 000 ml, ze szlifowanymi korkami szklanymi
- 4.2.4. Kolby gruszkowe o pojemności 250 ml, ze szlifem szklanym wewnętrznym
- 4.3. Chłodnica kulkowa o długości płaszczka 300 mm, ze szlifem szklanym, z nasadką do podłączenia gazu
- 4.4. Sączek karbowany 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 \times 4 mm, C₁₈, wypełnienie 5 lub 10 μ m lub równoważna (kryterium wydajności: pojedynczy pik dla wszystkich izomerów retinolu w warunkach HPLC)
- 4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z regulacją długości fali
- 4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami o długości drogi optycznej 10 mm
- 4.7. Łażnia wodna z mieszadłem magnetycznym
- 4.8. Aparat ekstrakcyjny (zob. rys. 1) zawierający:
- 4.8.1. Szklany cylinder o pojemności 1 l, z szyjką ze szlifem i z korkiem
- 4.8.2. Nasadkę szklaną ze szlifem z ramieniem i ruchomą nastawną rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Nastawna rurka musi mieć zakończenie w kształcie litery U na dole i ujście na górze, tak aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza.

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 z nad cieczy należy zastąpić azotem (zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając od czasu do czasu korek).

5.1. Przygotowanie próbki

Zmilić próbkę, tak aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 1 mm, uważając, aby podczas mielenia nie wydzielano ciepła. Mielenie musi być przeprowadzone tuż przed ważeniem i zmydleniem, gdyż w przeciwnym razie mogą wystąpić straty witaminy A. Próbkę nie należy mielić, jeżeli rozkład wielkości cząstek jest odpowiedni (np. premiksy i dodatki paszowe).

5.2. Zmydlenie

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 (pkt 4.2.1). W przypadku niskich stężeń masa próbki może zostać zwiększona w celu uzyskania wystarczającej ilości cząstek w naważce. Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu (pkt 3.1), około 100 mg BHT (pkt 3.13), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (pkt 3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (pkt 3.6). Założyć chłodnicę (pkt 4.3) na kolbę i umieścić kolbę w łaźni wodnej z mieszałką magnetycznym (pkt 4.7). Ogrzać do wrzenia i skraplać przez pięć minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (pkt 3.4) przez chłodnicę (pkt 4.3) i skraplać przez 25 minut, mieszając w trakcie powolnego przepływu strumienia azotu. Następnie spłukać chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

5.3. Ekstrakcja

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

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza (pkt 4.2.3)

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

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

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu ekstrakcyjnego (pkt 4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielone (zob. objaśnienia pkt 7.3), zastąpić korek szklanego cylindra (pkt 4.8.1) nasadką ze szlifem (pkt 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 ramię nasadki przenieść eter naftowy z górnej warstwy do rozdzielacza o pojemności 1 000 ml (pkt 4.2.3). Do szklanego cylindra dodać 100 ml eteru naftowego (pkt 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 (pkt 3.2), a następnie stosując dwukrotnie porcję 50 ml eteru naftowego (pkt 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 podwielokrotną część roztworu eteru naftowego (z pkt 5.3.1 lub 5.3.2) do kolby gruszkowej o pojemności 250 ml (pkt 4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na wyparce rotacyjnej (pkt 4.1) przy obniżonym ciśnieniu w temperaturze łaźni nie wyższej niż 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (pkt 3.10) i zdjąć kolbę z wyparki rotacyjnej. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (pkt 3.10) i szybko rozpuścić pozostałość w znanej objętości (10–100 ml) metanolu (pkt 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 w odwróconym układzie faz C_{18} (pkt 4.5.1), a stężenie jest mierzone z użyciem detektora UV (325 nm) lub detektora fluorescencyjnego (wzbudzenie: 325 nm; emisja: 475 nm) (pkt 4.5.2).

Zadozować podwielokrotną część roztworu metanolowego (np. 20 μ l) otrzymanego w sposób określony w pkt 5.4 i wymywać fazą ruchomą (pkt 3.9). Obliczyć średnią wysokość (powierzchnię) pików kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku dozowań roztworów kalibracyjnych (pkt 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 (pkt 4.5.1):	250 mm \times 4 mm, C_{18} , wypełnienie 5 lub 10 μ m, lub równoważne
Faza ruchoma (pkt 3.9):	mieszanka metanolu (pkt 3.3) i wody np. 980 + 20 (v + v)
Prędkość przepływu:	1–2 ml/min
Detektor (pkt 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 (pkt 3.11.1) lub 20 ml podstawowego roztworu palmitynianowej witaminy A (pkt 3.12.1) do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (pkt 4.2.1) i hydrolizować w sposób określony w pkt 5.2, lecz bez dodawania BHT. Następnie ekstrahować eterem naftowym (pkt 3.2) w sposób określony w pkt 5.3 i uzupełnić do objętości 500 ml eterem naftowym (pkt 3.2). Odparować prawie do sucha 100 ml tego ekstraktu na wyparce rotacyjnej (zob. pkt 5.4), usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (pkt 3.10) i ponownie rozpuścić pozostałość w 10,0 ml metanolu (pkt 3.3). Stężenie nominalne tego roztworu wynosi 560 IU witaminy A w 1 ml. Należy oznaczyć dokładną zawartość w sposób określony w pkt 5.6.3.3. Roboczy roztwór wzorcowy przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

Przenieść pipetą 2,0 ml tego roboczego roztworu wzorcowego do kolby miarowej o pojemności 20 ml, uzupełnić metanolem (pkt 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 roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml rozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolb metanolem (pkt 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 μ l każdego roztworu kalibracyjnego i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików. Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) pików, wykreślić krzywą kalibracyjną, uwzględniając wyniki kontroli UV (pkt 5.6.3.3).

5.6.3. Standaryzacja UV roztworów wzorcowych

5.6.3.1. Roztwór podstawowy octanowej witaminy A

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

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

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

5.6.3.2. Roztwór podstawowy palmitynianowej witaminy A

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

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

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

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 (pkt 4.2.2) i uzupełnić 2-propanolem (pkt 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 (pkt 3.8). Stężenie nominalne tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A w 1 ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (pkt 3.8) w spektrofotometrze (pkt 4.6) pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum ekstynkcji musi znajdować się pomiędzy 325 nm a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

$$\text{IU witaminy A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

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

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 (pkt 5.6.2).

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

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [IU/kg]}$$

gdzie:

c = stężenie w IU/ml witaminy A w roztworze próbki (pkt 5.4)

V₁ = objętość w ml roztworu próbki (pkt 5.4)

V_2 = objętość w ml pobranej podwielokrotnej części, o której 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 masie 25 g każda) w jeden roztwór próbki przeznaczony do oznaczania HPLC.

7.2. Próbką pobrana do analizy nie może zawierać więcej niż 2 g tłuszczu.

7.3. Jeżeli nie dochodzi do rozdzielania faz, dodać około 10 ml etanolu (pkt 3.1), aby rozwarstwić emulsję.

7.4. W przypadku oleju z wątroby dorsza i innych czystych tłuszczów czas zmydlenia należy przedłużyć do 45–60 minut.

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu kolumny do chromatografii w normalnym układzie faz możliwe jest oddzielenie izomerów retinolu. W tym wypadku do obliczeń sumuje się jednak 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:

- zmydlenie (pkt 5.2): ze względu na zawartość tłuszczu w próbce konieczne może być zwiększenie ilości roztworu wodorotlenku potasu (pkt 3.4),
- ekstrakcję (pkt 5.3): ze względu na obecność emulsji konieczne może być dostosowanie proporcji wody i etanolu wynoszącej 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.

9. **Wyniki porównania międzylaboratoryjnego ^(?)**

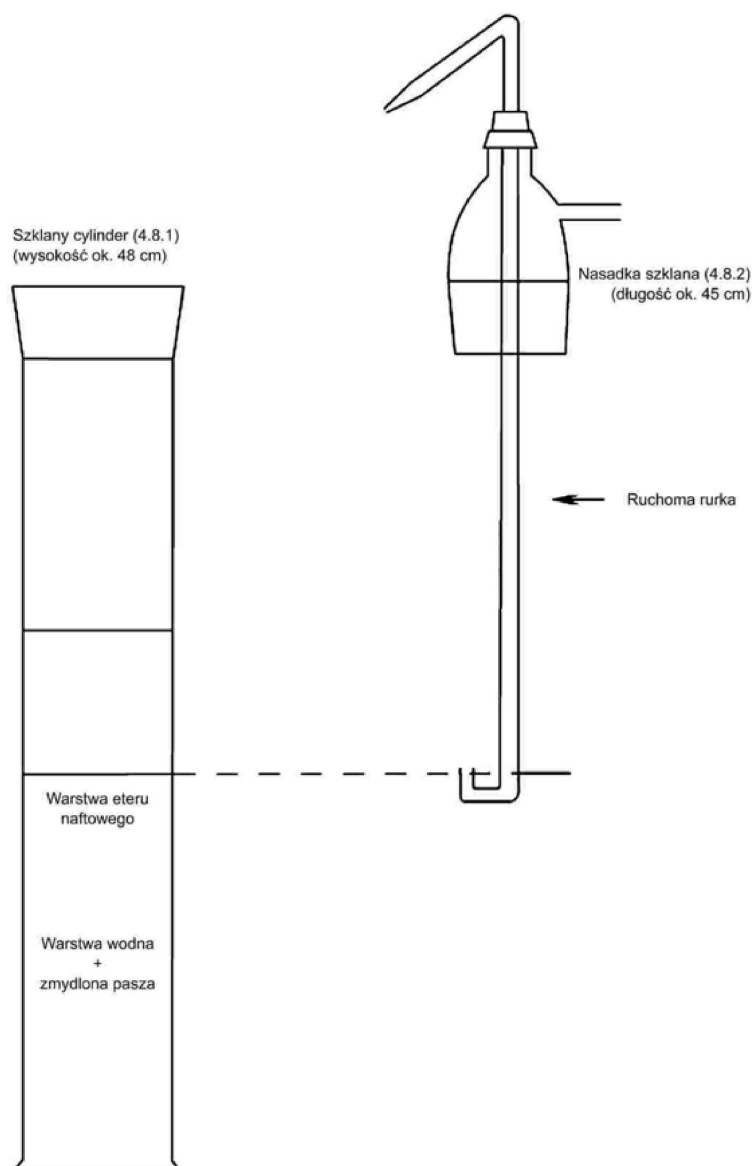
	Premiks	Pasza z premiksem	Mieszanka paszowa mineralna	Pasza białkowa	Pasza dla prosiąt
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
średnia [IU/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119

(?) Przeprowadzone przez grupę roboczą ds. pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
L:	liczba laboratoriów				
n:	liczba pojedynczych wartości				
sr:	odchylenie standardowe powtarzalności				
sR:	odchylenie standardowe odtwarzalności				
r:	powtarzalność				
R:	odtwarzalność				
CVr:	współczynnik zmienności powtarzalności				
CVR:	współczynnik zmienności odtwarzalności				

Rysunek 1

Aparatu ekstrakcyjnego (pkt 4.8)



B. OZNACZANIE WITAMINY E

Witamina E ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17547 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie zawartości witaminy A, E i D ⁽³⁾ – Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej z oczyszczaniem (HPLC) za pomocą ekstrakcji do fazy stałej (SPE) lub
- za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z zastosowaniem detektora UV lub fluorescencyjnego, jak opisano w pkt 1–9 poniżej.

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości witaminy E w paszy. 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 etanolem w roztworze 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 w odwróconym układzie faz (RP-HPLC) z zastosowaniem detektora UV lub detektora fluorescencyjnego.

3. Odczynniki

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$
- 3.2. Eter naftowy, zakres temperatur wrzenia 40–60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, $c = 50\text{ g}/100\text{ ml}$
- 3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $c = 10\text{ g}/100\text{ ml}$ (zob. objaśnienia pkt 7.7)
- 3.6. Siarczek sodu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$)
 - 3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5\text{ mol}/\text{l}$ w glicerolu, $\beta = 120\text{ g}/\text{l}$ (dla $x = 9$) (zob. objaśnienia pkt 7.8)
- 3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $c = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ w etanolu (pkt 3.1)
- 3.8. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (pkt 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 ekstra czysty, o certyfikowanej aktywności
 - 3.10.1. Roztwór podstawowy octanu DL- α -tokoferolu: odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg octanu DL- α -tokoferolu (pkt 3.10) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (pkt 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⁾ Metoda analizy przewidziana w normie EN 17547 jest określana jako metoda alternatywna stosowana do celów urzędowej kontroli oznaczania witamin A i E zamiast metody opisanej dla oznaczania witaminy A w części A niniejszego załącznika oraz witaminy E w części B niniejszego załącznika.

- 3.11. DL- α -tokoferol ekstra czysty, o certyfikowanej aktywności
- 3.11.1. Roztwór podstawowy DL- α -tokoferolu: odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg DL- α -tokoferolu (pkt 3.11) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (pkt 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-di-*tert*-butylo-4-metylofenol (BHT) (zob. objaśnienia pkt 7.5)

4. Aparatura i sprzęt

- 4.1. Obrotowa wyparka warstwowa
- 4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe
 - 4.2.1. Kolby płaskodenne lub stożkowe o pojemności 500 ml, ze szlifem szklanym wewnętrznym
 - 4.2.2. Kolby miarowe o wąskich szyjkach o pojemnościach 10, 25, 100 i 500 ml, ze szlifowanymi korkami szklanymi
 - 4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1 000 ml, ze szlifowanymi korkami szklanymi
 - 4.2.4. Kolby gruszkowe o pojemności 250 ml, ze szlifem szklanym wewnętrznym
- 4.3. Chłodnica kulkowa o długości płaszcza 300 mm, ze szlifem szklanym, z nasadką do podłączenia gazu
- 4.4. Sączek karbowany 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 cieczerwowej, 250 mm \times 4 mm, C₁₈, wypełnienie 5 lub 10 μ m lub równoważna
 - 4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z regulacją długości fali
- 4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami o długości drogi optycznej 10 mm
- 4.7. Łażnia wodna z mieszadłem magnetycznym
- 4.8. Aparat ekstrakcyjny (zob. rys. 1) zawierający:
 - 4.8.1. Szklany cylinder o pojemności 1 l, z szyjką ze szlifem i z korkiem
 - 4.8.2. Nasadkę szklaną ze szlifem z ramieniem i ruchomą nastawną rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Nastawna rurka musi mieć zakończenie w kształcie litery U na dole i ujście na górze, tak aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza.

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 nad cieczą należy zastąpić azotem (zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając od czasu do czasu korki).

5.1. Przygotowanie próbki

Zmilić próbkę, tak aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 1 mm, uważając, aby podczas mielenia nie wydzielano ciepła. Mielenie musi być przeprowadzone tuż przed ważeniem i zmydleniem, 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 (pkt 4.2.1). Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu (pkt 3.1), około 100 mg BHT (pkt 3.12), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (pkt 3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (pkt 3.6). Założyć chłodnicę (pkt 4.3) na kolbę i umieścić kolbę na łaźni wodnej z mieszałdem magnetycznym (pkt 4.7). Ogrzać do wrzenia i skraplać przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (pkt 3.4) przez chłodnicę (pkt 4.3) i skraplać przez 25 minut, mieszając w trakcie powolnego przepływu strumienia azotu. Następnie spłukać chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

5.3. Ekstrakcja

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

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza (pkt 4.2.3)

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

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

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu ekstrakcyjnego (pkt 4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielone (zob. objaśnienia pkt 7.3), zastąpić korek szklanego cylindra (pkt 4.8.1) nasadką ze szlifem (pkt 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 ramię nasadki przenieść eter naftowy z górnej warstwy do rozdzielacza o pojemności 1 000 ml (pkt 4.2.3). Do szklanego cylindra dodać 100 ml eteru naftowego (pkt 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 (pkt 3.2), a następnie stosując dwukrotnie porcję 50 ml eteru naftowego (pkt 3.2), i dodać warstwę 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 podwielokrotną część roztworu eteru naftowego (z pkt 5.3.1 lub 5.3.2) do kolby gruszkowej o pojemności 250 ml (pkt 4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na wyparce rotacyjnej (pkt 4.1) przy obniżonym ciśnieniu w temperaturze łaźni nie wyższej niż 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (pkt 3.9) i zdjąć kolbę z wyparki rotacyjnej. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (pkt 3.9) i szybko rozpuścić pozostałość w znanej objętości (10–100 ml) metanolu (pkt 3.3) (stężenie DL- α -tokoferolu musi wynosić od 5 do 30 μ g/ml).

5.5. Oznaczanie HPLC

Witamina E jest rozdzielana na kolumnie w odwróconym układzie faz C_{18} (pkt 4.5.1), a stężenie jest mierzone z użyciem detektora fluorescencyjnego (wzbudzenie: 295 nm; emisja: 330 nm) lub detektora UV (292 nm) (pkt 4.5.2).

Zadozować podwielokrotną część roztworu metanolowego (np. 20 µl) otrzymanego w sposób określony w pkt 5.4 i wymywać fazą ruchomą (pkt 3.8). Obliczyć średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku dozowań roztworów kalibracyjnych (pkt 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 (pkt 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 5 lub 10 µm, lub równoważna
Faza ruchoma (pkt 3.8):	mieszanina metanolu (pkt 3.3) i wody np. 980 + 20 (v + v)
Prędkość przepływu:	1–2 ml/min
Detektor (pkt 4.5.2):	detektor fluorescencyjny (wzbudzenie: 295 nm/ emisja: 330 nm) lub detektor UV (292nm)

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 roztworu podstawowego octanu DL- α - tokoferolu (pkt 3.10.1) do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (pkt 4.2.1) i hydrolizować w sposób określony w pkt 5.2. Następnie ekstrahować eterem naftowym (pkt 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 wyparce rotacyjnej (zob. pkt 5.4), usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (pkt 3.9) i ponownie rozpuścić pozostałość w 25,0 ml metanolu (pkt 3.3). Stężenie nominalne tego roztworu wynosi 45,5 µg DL- α - tokoferolu na ml, co odpowiada 50 µg octanu DL- α - tokoferolu na ml. Roboczy roztwór wzorcowy przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

5.6.1.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych 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 (pkt 3.3) i zmieszać. Stężenia nominalne tych roztworów wynoszą odpowiednio 2,5, 5,0, 10,0 i 25,0 µg/ml octanu DL- α - tokoferolu, co odpowiada stężeniom 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 (pkt 3.10.1)

Rozcieńczyć 5,0 ml roztworu podstawowego octanu DL- α - tokoferolu (pkt 3.10.1) do 25,0 ml etanolem i zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem etanolu (pkt 3.1) w spektrofotometrze (pkt 4.6) pomiędzy 250 i 320 nm.

Maksimum absorpcji musi wystąpić przy 284 nm:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ przy } 284 \text{ nm w etanolu}$$

Przy tym rozcieńczeniu wartość ekstynkcji musi wynosić od 0,84 do 0,88.

5.6.2. Wzorzec DL- α - tokoferolu

5.6.2.1. Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego

Pobrać pipetą 2 ml roztworu podstawowego DL- α - tokoferolu (pkt 3.11.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, rozpuścić w metanolu (pkt 3.3) i uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem. Stężenie nominalne tego roztworu wynosi 40 µg DL- α - tokoferolu na ml, co odpowiada 44,0 µg octanu DL- α - tokoferolu na ml. Roboczy roztwór wzorcowy przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

5.6.2.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych 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 (pkt 3.3) i mieszać. Stężenia nominalne tych roztworów wynoszą odpowiednio 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 µg/ml DL-α-tokoferolu, co odpowiada stężeniom 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 (pkt 3.11.1)

Rozcieńczyć 2,0 ml roztworu podstawowego DL-α-tokoferolu (pkt 3.11.1) do 25,0 ml etanolem i zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem etanolu (pkt 3.1) w spektrofotometrze (pkt 4.6) pomiędzy 250 i 320 nm. Maksimum absorpcji musi wystąpić przy 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ przy } 292 \text{ nm w etanolu}$$

Przy tym rozcieńczeniu wartość ekstynkcji musi wynosić 0,6.

6. Obliczanie wyników

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików witaminy E roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml (obliczone jako octan DL-α-tokoferolu), odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (pkt 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 (pkt 5.4)
- V₁ = objętość w ml roztworu próbki (pkt 5.4)
- V₂ = objętość w ml pobranej podwielokrotnej części, o której mowa w pkt 5.4
- m = masa naważki w g

7. Objasnienia

- 7.1. W przypadku próbek o niskim stężeniu witaminy E wskazane jest połączenie ekstraktów eteru naftowego dwóch zmydlonych naważek (o masie 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 rozdzielania faz, dodać około 10 ml etanolu (pkt 3.1), aby rozwarstwić emulsję.
- 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 około 10 mg BHT (pkt 3.12) do roztworu (pkt 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 kolumny do chromatografii w normalnym układzie faz 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 rozkład enzymatyczny witaminy E bez zmydiania zasadą.
8. Powtarzalność
Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie może przekraczać 15 % względem wyższego wyniku.
9. **Wyniki porównania międzylaboratoryjnego (*)**

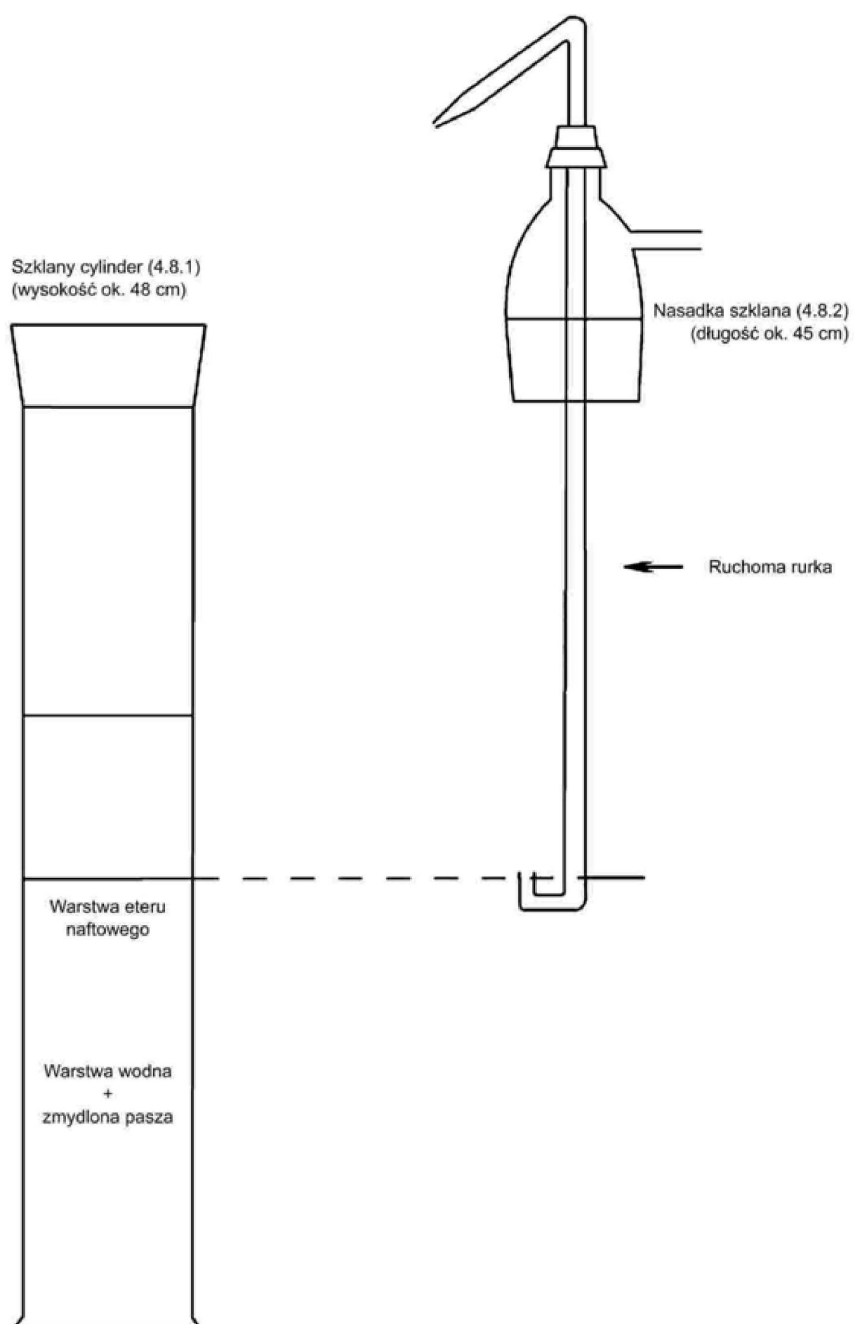
	Premiks	Pasza z premiksem	Mieszanka paszowa mineralna	Pasza białkowa	Pasza dla prosiąt
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Średnia [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
sr [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CVr [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
sR [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CVR [%]	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
R:	odtwarzalność
CV _r :	współczynnik zmienności powtarzalności
CV _R :	współczynnik zmienności odtwarzalności

(*) Przeprowadzone przez grupę roboczą ds. pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Rysunek 2

Aparatu ekstrakcyjnego (pkt 4.8)



C) OZNACZANIE PIERWIASTKÓW ŚLADOWYCH: ŻELAZA, MIEDZI, MANGANU I CYNKU

Zawartość żelaza, miedzi, manganu i cynku ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 15510 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie wapnia, sodu, fosforu, magnezu, potasu, żelaza, cynku, miedzi, manganu, kobaltu, molibdenu i ołowiu z zastosowaniem ICP-AES lub
- metody analizy przewidzianej w normie EN 15621 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie wapnia, sodu, fosforu, magnezu, potasu, siarki, żelaza, cynku, miedzi, manganu i kobaltu po mineralizacji ciśnieniowej metodą ICP-AES, lub
- metody analizy przewidzianej w normie EN 17053 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie pierwiastków śladowych, metali ciężkich i innych pierwiastków w paszy metodą ICP-MS (metoda wielopierwiastkowa), lub
- metody analizy przewidzianej w normie EN ISO 6869 Pasze: Oznaczanie zawartości wapnia, miedzi, żelaza, magnezu, manganu, potasu, sodu i cynku. Metoda absorpcyjnej spektrometrii atomowej, lub
- metody atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (FAAS), jak opisano w pkt 1–8 poniżej.

1) Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości pierwiastków śladowych: żelaza, miedzi, manganu i cynku w paszy^(*). 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 atomowej spektrometrii absorpcyjnej.

3. Odczynniki

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 jonowymienniej.

Stosować odczynniki o czystości co najmniej analitycznej. Nieobecność oznaczanych pierwiastków należy sprawdzać poprzez próbę ślepą. Odczynniki, jeżeli to konieczne, poddaje się oczyszczeniu przed zastosowaniem.

Zamiast przygotowania wzorcowych roztworów opisanych poniżej dopuszcza się stosowanie innych dostępnych w handlu 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/litr)
- 3.3. Kwas chlorowodorowy (0,5 mol/litr)
- 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.

^(*) Metoda ta została zwalidowana w drodze porównania międzylaboratoryjnego obejmującego różne matryce paszowe. Dodatkowe informacje można znaleźć na stronie <https://ec.europa.eu/jrc/en/eurl/feed-additives/authorisation>.

- 3.5. Kwas siarkowy (d: 1,84 g/ml)
- 3.6. Nadtlenek wodoru (około 100 objętości tlenu (30 % w/w))
- 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 (pkt 3.2), dodać 16 ml nadtlenu wodoru (pkt 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 (pkt 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 (pkt 3.2), dodać 5 ml nadtlenu wodoru (pkt 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 (pkt 3.8) wodą w stosunku 1:9, a następnie przez rozcieńczenie jednej części uzyskanego roztworu wodą w stosunku 1:9
- 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 (pkt 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 (pkt 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 (pkt 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 (pkt 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 (pkt 3.2) i uzupełnić do objętości 1 l wodą.
4. **Aparatura i sprzęt**
- 4.1. Piec muflowy z regulacją temperatury i w miarę możliwości z rejestratorem
- 4.2. Naczynie szklane z odpornego borokrzemowego szkła; zalecane jest stosowanie sprzętu przeznaczonego wyłącznie do oznaczania mikroelementów.
- 4.3. Spektrofotometr do pomiaru absorpcji atomowej o czułości i precyzji w zakresie prezentowanej metody

5. Sposób postępowania ⁽⁶⁾

5.1. Próbkę zawierającą substancję organiczną

5.1.1. Spopielenie i przygotowanie roztworu do analizy ⁽⁷⁾

- 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 w temperaturze 105 °C i wstawić tygiel do zimnego pieca muflowego (pkt 4.1). Zamknąć piec, (zob. uwaga c)) i stopniowo podwyższać temperaturę do 450–475 °C w czasie około 90 minut. Utrzymywać tę temperaturę od 4 do 16 godzin, np. przez noc, aby usunąć materiał zawierający węgiel, następnie otworzyć piec i pozostawić do schłodzenia (zob. uwaga d)).

Zwilżyć spopielałe pozostałości wodą i przenieść do zlewki o pojemności 250 ml. Przemyc tygiel z użyciem około 5 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.1) i dodawać kwas powoli i ostrożnie do zlewki (może zajść gwałtowna reakcja w wyniku powstania CO₂). Dodawać kroplami kwas chlorowodorowy (pkt 3.1) mieszając do zaniku burzenia się mieszaniny. Odparować do sucha, od czasu do czasu mieszając szklanym prętem.

Następnie dodać do pozostałości 15 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (pkt 3.2), a następnie około 120 ml wody. Zamieszać szklanym prętem, który należy pozostać w zlewce, i przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym. Doprowadzić ostrożnie do wrzenia i pozostawić w tym stanie aż do całkowitego rozpuszczenia popiołu. Przefiltrować przez sączek bezpopiołowy 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 (pkt 3.2) i dwukrotnie wrzącą wodą. Uzupełnić kolbę miarową do pełnej objętości wodą (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. Spopielenie, które wymaga jedynie 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 (pkt 3.1), odparować do sucha i dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 mol/l (pkt 3.2). Podgrzać, przefiltrować roztwór do kolby miarowej i uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą (stężenie HCl około 0,5 mol/l).

Uwagi:

- a) Przy oznaczaniu pierwiastków śladowych należy zwrócić szczególną uwagę na ryzyko zanieczyszczenia, zwłaszcza cynkiem, miedzią i żelazem. Dlatego sprzęt stosowany podczas przygotowania próbki nie może zawierać tych metali.

W celu zmniejszenia ogólnego ryzyka zanieczyszczenia należy wykonywać oznaczenie w środowisku wolnym od kurzu, dokładnie czyszcząc wyposażenie i myjąc naczynia szklane. Zwłaszcza przy oznaczaniu cynku występuje ryzyko zanieczyszczeń, np. z naczyń szklanych, odczynników, kurzu.

- b) Masę próbki, która ma być spopielenona, 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) Spopielenie należy przeprowadzać w zamkniętym piecu bez dostępu powietrza lub tlenu.
- d) Temperatura według wskazań pirometru nie może być wyższa niż 475 °C.

⁽⁶⁾ Inne metody mineralizacji mogą być stosowane, pod warunkiem iż wykazano, że zapewniają podobne wyniki (np. mineralizacja ciśnieniowo-mikrofalowa).

⁽⁷⁾ 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 przemyc bibułę filtracyjną zawierającą nierozpuszczalną pozostałość i umieścić w kwarcowym lub platynowym tyglu. Należy włączyć piec mufłowy (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, gdy przestanie wytwarzać się biały dym. Po dodaniu 5 ml kwasu chlorowodorowego 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.

5.1.2. Spektrofotometryczne oznaczanie

5.1.2.1. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych

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 kalibracyjne 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 roztworów kalibracyjnych; w zależności od typu i czułości stosowanego spektrofotometru może zachodzić konieczność wyboru innych stężeń.

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 (pkt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (pkt 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 (pkt 3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (pkt 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 (pkt 3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
ml HCl (pkt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (pkt 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 (pkt 3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
ml HCl (pkt 3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (pkt 3.11) i uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

5.1.2.2. Przygotowanie roztworu do analizy

W przypadku oznaczania miedzi zazwyczaj może być wykorzystany roztwór przygotowany w sposób określony w pkt 5.1.1. W przypadku konieczności dostosowania jego stężenia do zakresu stężeń roztworów kalibracyjnych pobrać pipetą podwielokrotną część roztworu do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym o stężeniu 0,5 mol/l (pkt 3.3).

Przy oznaczaniu żelaza, manganu i cynku pobrać pipetą podwielokrotną część roztworu przygotowanego w sposób określony w pkt 5.1.1 do kolby miarowej o pojemności 100 ml, dodać 10 ml roztworu chlorku lantanu (pkt 3.1.1) i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym o stężeniu 0,5 mol/l (pkt 3.3) (zob. objaśnienia pkt 8).

5.1.2.3. Próba ślepa

Próbkę ślepa przeprowadzić zgodnie z kolejnością wykonywania czynności metody, ale bez użycia materiału próbki. Nie stosować roztworu kalibracyjnego »0« do ślepej próby.

5.1.2.4. Pomiar absorpcji atomowej

Zmierzyć absorpcję atomową roztworów kalibracyjnych i badanego roztworu z użyciem utleniającego płomienia powietrzno-acetylenowego przy następujących długościach fal:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Każdy pomiar przeprowadzić czterokrotnie.

5.2. Mieszanki paszowe mineralne

Jeżeli próbka 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 wzorcowej obliczyć stężenie 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 przez tego samego analityka nie może przekraczać:

- 5 mg/kg w wartości bezwzględnej, dla zawartości danego pierwiastka śladowego nie wyższej niż 50 mg/kg,
- 10 % wyższego wyniku, dla zawartości danego pierwiastka śladowego od 50 do 100 mg/kg,
- 10 mg/kg w wartości bezwzględnej, dla zawartości danego pierwiastka śladowego od 100 do 200 mg/kg,
- 5 % wyższego wyniku, dla zawartości danego pierwiastka śladowego wyższej niż 200 mg/kg.

8. Objasnienia

Obecność znacznych ilości fosforanów może interferować przy oznaczaniu żelaza, manganu i cynku. Takie interferencje należy skorygować przez dodanie chlorku lantanu (pkt 3.11). Jeżeli jednak w próbce stosunek wagowy Ca + Mg/P jest > 2, to dodanie roztworu chlorku lantanu (pkt 3.11) do analizowanego roztworu i roztworów kalibracyjnych może być pominięte.

D) OZNACZANIE HALOFUGINONU

Bromowoderek DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetonylo]-chinazolin-4-(3H)-onu

Zawartość halofuginonu ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (HPLC) z zastosowaniem detektora UV, jak opisano w pkt 1–8 poniżej.

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości halofuginonu w paszach. Granica oznaczalności wynosi 1 mg/kg.

2. Sposób przeprowadzenia metody

Po potraktowaniu gorącą wodą halofuginon ekstrahuje się w postaci wolnej zasady w octanie etylu, a następnie rozdziela jako chlorowoderek w wodnym roztworze kwasu. Ekstrakt jest oczyszczany z wykorzystaniem chromatografii jonowymiennej. Zawartość halofuginonu określa się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. Odczynniki

3.1. Acetonitryl do HPLC

3.2. Żywica Amberlit XAD-2

3.3. Octan amonu

3.4. Octan etylu

3.5. Kwas octowy lodowaty

3.6. Substancja wzorcowa halofuginonu (bromowoderek DL-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetonylo]-chinazolin-4-(3H)-onu, E 764)

3.6.1. Podstawowy roztwór wzorcowy halofuginonu o stężeniu 100 µg/ml

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg halofuginonu (pkt 3.6) do kolby miarowej o pojemności 500 ml, rozpuścić w roztworze buforowym octanu amonu (pkt 3.18), uzupełnić do pełnej objętości kolby roztworem buforowym i wymieszać. Roztwór zachowuje stabilność do trzech tygodni, jeżeli jest przechowywany bez dostępu światła w temperaturze 5 °C.

3.6.2. Roztwory kalibracyjne

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml przenieść kolejno 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego halofuginonu (pkt 3.6.1). Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą (pkt 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 (kwas etylenodiaminotetraoctowy, sól dwusodowa)
- 3.14. Woda do HPLC
- 3.15. Roztwór węgłanu sodu, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.16. Roztwór węgłanu sodu nasyconego chlorkiem sodu, $c = 5 \text{ g}/100 \text{ ml}$
Rozpuścić 50 g węgłanu sodu (pkt 3.11) w wodzie, rozcieńczyć do objętości 1 l i dodać chlorek sodu (pkt 3.12), aż do otrzymania roztworu nasyconego.
- 3.17. Kwas chlorowodorowy, stężenie około 0,1 mol/l
Rozcieńczyć 10 ml HCl (pkt 3.7) wodą do objętości 1 l.
- 3.18. Roztwór buforowy octanu amonu, około 0,25 mol/l
Rozpuścić 19,3 g octanu amonu (pkt 3.3) i 30 ml kwasu octowego (pkt 3.5) w wodzie (pkt 3.14) i rozcieńczyć do objętości 1 l.
- 3.19. Przygotowanie żywicy Amberlit XAD-2
Odpowiednią ilość żywicy (pkt 3.2) przemywać wodą aż do zaniku wszystkich jonów chlorku, co sprawdza się z użyciem azotanu srebra (pkt 3.20) w odrzucanej fazie wodnej. Następnie przemyć żywicę 50 ml metanolu (pkt 3.8), usunąć metanol i przechowywać żywicę w świeżym metanolu.
- 3.20. Roztwór azotanu srebra około 0,1 mol/l
Rozpuścić 0,17 g azotanu srebra (pkt 3.9) w 10 ml wody.
- 3.21. Faza ruchoma HPLC
Zmieszać 500 ml acetonitrylu (pkt 3.1) z 300 ml roztworu buforowego octanu amonu (pkt 3.18) i 1 200 ml wody (pkt 3.14). Przy użyciu kwasu octowego (pkt 3.5) dostosować pH do 4,3. Przefiltrować przez filtr 0,22 μm (pkt 4.8), a następnie odgazować roztwór (np. poprzez zastosowanie ultradźwięków przez 10 minut). Roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc, jeżeli jest przechowywany w zamkniętym naczyniu, bez dostępu światła.
4. **Aparatura i sprzęt**
 - 4.1. Łaźnia ultradźwiękowa
 - 4.2. Obrotowa wyparka warstwowa
 - 4.3. Wirówka
 - 4.4. Sprzęt do HPLC z detektorem UV z regulacją długości fali lub z detektorem diodowym
 - 4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczerwowej o wymiarach 300 mm \times 4 mm, C_{18} , wypełnienie 10 μm lub równoważna kolumna
 - 4.5. Kolumna szklana o wymiarach 300 mm \times 10 mm z kranem i filtrem ze spiekanej szkła
 - 4.6. Filtry z włókna szklanego 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 etylu. Nie może pozostawać w octanie etylu dłużej niż przez 30 minut.

 - 5.1. *Wskazówki ogólne*
 - 5.1.1. Ślepą próbkę paszy należy przeanalizować w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona halofuginonu i innych substancji interferujących.

- 5.1.2. Należy przeprowadzić test odzysku, analizując ślepą próbkę paszy wzbogaconej znaną ilością halofuginonu, zbliżoną do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby wzbogacić na poziomie 3 mg/kg, dodać 300 µl podstawowego roztworu wzorcowego (pkt 3.6.1) do 10 g ślepej próbki paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji (pkt 5.2).

Uwaga: dla celów niniejszej metody ślepa próbka paszy musi być podobnego rodzaju co próbka badana, 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 (pkt 3.10), 0,5 g EDTA (pkt 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 węgla sodu (pkt 3.15) i zmieszać. Niezwłocznie dodać 100 ml octanu etylu (pkt 3.4) i energicznie wstrząsać ręcznie przez 15 sekund. Następnie umieścić probówkę w łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.1) na trzy minuty i obluźować korek. Wirować przez dwie minuty i zdekantować fazę octanu etylu przez filtr z włókna szklanego (pkt 4.6) do rozdzielacza o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję tej próbki drugą porcją 100 ml octanu etylu. Przemycać połączone ekstrakty przez minutę 50 ml roztworu chlorku sodu nasyczonego węglanem sodu (pkt 3.16) i usunąć warstwę wodną.

Warstwę organiczną ekstrahować przez minutę 50 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.17). Dolną kwasową warstwę spuścić do rozdzielacza o pojemności 250 ml. Przez 1,5 minuty powtarzać ekstrakcję warstwy organicznej przy użyciu kolejnej porcji 50 ml kwasu chlorowodorowego i połączyć z ekstraktem uzyskanym z pierwszego procesu. Przemycić połączone ekstrakty kwasu, wirując z 10 ml octanu etylu (pkt 3.4) przez około 10 sekund.

Warstwę wodną przenieść ilościowo do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml i usunąć warstwę organiczną. Znajdujący się jeszcze w roztworze kwasu octanu etylu odparować na obrotowej wyparce warstwowej (pkt 4.2). Temperatura łaźni wodnej nie może przekraczać 40 °C. W warunkach podciśnienia wynoszącego około 25 mbar i w temperaturze 38 °C cała pozostała część octanu etylu zostanie usunięta w ciągu 5 min.

5.3. Oczyszczanie

5.3.1. Przygotowanie kolumny z Amberlitem

Dla każdego ekstraktu próbki przygotować kolumnę XAD-2. Przygotowany Amberlit o masie 10 g (pkt 3.19) umieścić w szklanej kolumnie (pkt 4.5) z metanolem (pkt 3.8). Wprowadzić mały zwitek szklanej waty w górną część warstwy żywicy. Odprowadzić metanol z kolumny, a następnie przemycić żywicę 100 ml wody, zatrzymując proces, gdy ciecz osiągnie górną część warstwy żywicy. Pozostawić kolumnę do ustabilizowania na 10 minut przed użyciem. Nie dopuścić do osuszenia kolumny.

5.3.2. Oczyszczanie próbki

Ekstrakt (pkt 5.2) przenieść ilościowo na górną powierzchnię kolumny z Amberlitem (pkt 5.3.1) i eluować, usuwając eluat. Prędkość elucji nie może przekraczać 20 ml/min. Przemycić kolbę okrągłodenną 20 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.17). Użyć tego kwasu do przemycia kolumny z żywicą. Usunąć pozostałości roztworu kwasu strumieniem powietrza. Wylać popłuczyny. Dodać 100 ml metanolu (pkt 3.8) na kolumnę i pozwolić na elucję od 5 do 10 ml, zbierając eluat 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 eluat do tej samej kolby okrągłodennej. Odparować metanol na obrotowej wyparce warstwowej (pkt 4.2), przy czym temperatura wody w łaźni nie może być wyższa niż 40 °C. Za pomocą fazy ruchomej (pkt 3.21) przenieść ilościowo pozostałość do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Uzupełnić do pełnej objętości fazą ruchomą i zmieszać. Podwielokrotna część jest filtrowana przez filtr membranowy (pkt 4.7). Roztwór ten zastosować do oznaczania HPLC (pkt 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 (pkt 4.4.1)

Faza ruchoma do HPLC (pkt 3.21)

Prędkość przepływu: od 1,5 do 2 ml/min

Długość fali przy detekcji: 243 nm

Dozowana objętość: 40 do 100 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny (pkt 3.6.2) o stężeniu 3,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) pików i czasów retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Zadobować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (pkt 3.6.2) i określić wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Nakreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki

Zadobować kilka razy ekstrakt próbki (pkt 5.3.2), stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików dla pików halofuginonu.

6. Obliczanie wyników

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików halofuginonu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w in µg/ml, odnosząc się do krzywej kalibracyjnej (pkt 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 metody

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez chromatografię równoległą lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego (pkt 3.6.2) zawierającego 6,0 µg/ml.

7.1.1. Chromatografia równoległa

Ekstrakt próbki jest wzbogacany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (pkt 3.6.2). Ilość dodanego halofuginonu musi być podobna do szacowanej ilości halofuginonu obecnego w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość pików halofuginonu. Szerokość pików w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

- długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji widm próbki i wzorca zapisana w maksimum pików na chromatogramie musi być taka sama, w granicach 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 widma próbki i wzorca zapisane przy maksimum pików na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorbancji. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest wyższa niż 15 % absorbancji wzorca analitycznego;
- c) w zakresie od 225 do 300 nm widma strony wstępującej, maksimum i strony zstępującej pików ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest wyższa niż 15 % absorbancji widma maksimum pików.

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 0,5 mg/kg dla zawartości halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku wzbogaconej próbki ślepej odzysk nie może być mniejszy niż 80 %.

8. Wyniki porównania międzylaboratoryjnego

W ramach porównania międzylaboratoryjnego osiem laboratoriów przeprowadziło analizę ⁽⁸⁾ trzech próbek.

Wyniki

	Próbka A (ślepa) Przy odbiorze	Próbka B (mączka)		Próbka C (granulki)	
		Przy odbiorze	Po dwóch miesiącach	Przy odbiorze	Po dwóch 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 odtwarzalności

CV_R= współczynnik zmienności odtwarzalności (%)

Rec.= odzysk (%)

E) OZNACZANIE ROBENIDYNY

Chlorowodorek 1,3-bis[(4-chlorobenzylideno)amino]guanidyny

Zawartość robenidyny ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (HPLC) z zastosowaniem detektora UV, jak opisano w pkt 1–8 poniżej.

⁽⁸⁾ »The Analyst« 108 z 1983 r., s. 1252–1256.

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 podwielokrotną 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 wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. Odczynniki

3.1. Metanol

3.2. Zakwaszony metanol

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml umieścić 4,0 ml kwasu chlorowodorowego ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$), uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem (pkt 3.1) i wymieszać. Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.3. Acetonitryl do HPLC

3.4. Sito molekularne

Typ 3 A, granulki 8–12 mesh (granulki z glinokrzemianu krystalicznego 1,6–2,5 mm, średnica porów 0,3 mm).

3.5. Tlenek glinu I stopnia aktywności kwasowej do chromatografii kolumnowej

100 g tlenku glinu umieścić w odpowiednim pojemniku i dodać 2,0 ml wody. Zakorkować i wstrząsać przez około 20 minut. Przechowywać w dobrze zamkniętym pojemniku.

3.6. Roztwór diwodorofosforanu potasu, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Rozpuścić 3,40 g diwodorofosforanu potasu w wodzie do HPLC w kolbie miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby i wymieszać.

3.7. Roztwór wodorofosforanu disodu, $c = 0,025 \text{ mol/l}$

Rozpuścić 3,55 g bezwodnego lub 4,45 g dihydratu, lub 8,95 g dodekahydratu wodorofosforanu disodu w wodzie do HPLC w kolbie miarowej o pojemności 1 l, uzupełnić do pełnej objętości kolby i wymieszać.

3.8. Faza ruchoma HPLC

Zmieszać razem:

650 ml acetonitrylu (pkt 3.3),

250 ml wody do HPLC,

50 ml roztworu diwodorofosforanu potasu (pkt 3.6),

50 ml roztworu wodorofosforanu disodu (pkt 3.7).

Filtrować przez filtr 0,22 μm (pkt 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. Podstawowy roztwór wzorcowy robenidyny: 300 $\mu\text{g/ml}$

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 30 mg substancji wzorcowej robenidyny (pkt 3.9). Rozpuścić w zakwaszonym metanolu (pkt 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. Pośredni roztwór wzorcowy robenidyny: 12 µg/ml
Przenieść 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (pkt 3.9.1) do kolby miarowej o pojemności 250 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby fazą ruchomą (pkt 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 pośredniego roztworu wzorcowego robenidyny (pkt 3.9.2). Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą (pkt 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

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. Wytrząsarka mechaniczna lub mieszałdo magnetyczne
- 4.3. Obrotowa wyparka warstwowa
- 4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem promieniowania ultrafioletowego z regulacją długości fali lub detektorem diodowym pracującym w zakresie od 250 do 400 nm
- 4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 300 mm x 4 mm, C₁₈ wypełnienie 10 µm lub równoważna
- 4.5. Bibuła filtracyjna z włóknem szklanym (Whatman GF/A lub równoważna)
- 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. Należy przebadać ślepą próbkę paszy w celu sprawdzenia, czy nie zawiera robenidyny ani substancji interferujących.
- 5.1.2. Należy przeprowadzić test odzysku, analizując ślepą próbkę paszy (pkt 5.1.1) wzbogaconą znaną ilością robenidyny, zbliżoną do tej, która znajduje się w próbce. Aby wzbogacić na poziomie 60 mg/kg, przenieść 3,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego robenidyny (pkt 3.9.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Odparować roztwór w strumieniu azotu do około 0,5 ml. Dodać 15 g ślepej próbki paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji (pkt 5.2).

Uwaga: Na potrzeby tej metody ślepa próbka paszy musi być podobnego rodzaju co próbka badana, a jej analiza nie może potwierdzać obecności robenidyny.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 15 g przygotowanej próbki. Odważkę umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml i dodać 100,0 ml zakwaszonego metanolu (pkt 3.2), zakorkować i wstrząsać przez godzinę na wstrząsarce (pkt 4.2). Roztwór filtrować przez bibułę filtracyjną z włóknem szklanym (pkt 4.5), a filtrat zebrać do kolby stożkowej o pojemności 150 ml. Dodać 7,5 g sita molekularnego (pkt 3.4), zamknąć i wstrząsać przez pięć minut. Natychmiast filtrować przez bibułę filtracyjną z włóknem szklanym. Roztwór zachowuje się do etapu oczyszczania (pkt 5.3).

5.3. Oczyszczanie

5.3.1. Przygotowanie kolumny z tlenkiem glinu

Umieścić w dolnym końcu szklanej kolumny (pkt 4.1) zwitek szklanej waty i wbić ją, używając szklanego pręcika. Odważyć 11,0 g przygotowanego tlenku glinu (pkt 3.5) i przenieść do kolumny. Czynność tę należy wykonywać tak, aby ograniczyć do minimum działanie powietrza atmosferycznego. Delikatnie postukać w napętnioną kolumnę od strony dna w celu osadzenia tlenku glinu.

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 (pkt 3.1) przy prędkości przepływu od 2 do 3 ml na minutę, a eluat zebrać do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml. Na obrotowej wyparce warstwowej (pkt 4.3) odparować roztwór metanolu do sucha, przy zmniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C. Pozostałość ponownie rozpuścić w 3–4 ml fazy ruchomej (pkt 3.8) i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Kolbę przemyć kilkakrotnie 1–2 ml porcjami fazy ruchomej, a popłuczyny wlać do kolby miarowej. Uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Podwielokrotna część jest filtrowana przez filtr membranowy 0,45 µm (pkt 4.7). Roztwór zastosować do oznaczania HPLC (pkt 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 (pkt 4.4.1)

Faza ruchoma do HPLC (pkt 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 (pkt 3.9.3) zawierający 3,6 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości pików i czasów retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Zadobować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (pkt 3.9.3) i określić wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą wzorcową, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki

Zadobować kilka razy ekstrakt próbki (pkt 5.3.2), stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików 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 (pkt 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 $\mu\text{g/ml}$ robenidyny w roztworze próbki

$m =$ masa naważki w g

7. Sprawdzenie metody

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez chromatografię równoległą lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego (pkt 3.9.3) zawierającego 6 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Chromatografia równoległa

Ekstrakt próbki jest wzbogacany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (pkt 3.9.3). Ilość dodanej robenidyny musi być podobna do szacowanej ilości robenidyny w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość pików robenidyny. Szerokość pików w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach ok. 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

- długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji widm próbki i wzorca zapisana w maksimum pików zarejestrowanego na chromatogramie musi być taka sama, w granicach marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm;
- w zakresie pomiędzy 250 a 400 nm widma próbki i wzorca zapisane przy maksimum pików na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest wyższa niż 15 % absorpcji wzorca analitycznego;
- w zakresie od 250 do 400 nm widma strony wstępującej, maksimum i strony zstępującej pików ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest wyższa niż 15 % widma maksimum pików.

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 % wyższego wyniku dla zawartości robenidyny powyżej 15 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku wzbogaconej próbki ślepego odzysk nie może być mniejszy niż 85 %.

8. Wyniki porównania międzylaboratoryjnego

W ramach porównania międzylaboratoryjnego na szczeblu UE, w którym uczestniczyło 12 laboratoriów, przeprowadzono analizę czterech próbek paszy dla drobiu i królików, w postaci mączki lub granulatu. Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. W poniższej tabeli podano wyniki przeprowadzonych badań.

	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 w %

S_r= odchylenie standardowe odtwarzalności

CV_R= współczynnik zmienności odtwarzalności w %

F) OZNACZANIE DIKLAZURILU

(±)4-chlorofenylo[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2-yl)fenylo]acetonitryl

Zawartość diklazurilu ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z potrójnym gradientem (HPLC) z zastosowaniem detektora UV, jak opisano w pkt 1–9 poniżej.

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości diklazurilu w mieszankach paszowych i premiksach ^(*). Granica wykrywalności wynosi 0,1 mg/kg, granica oznaczalności 0,5 mg/kg. Możliwe jest osiągnięcie niższych granic oznaczalności, ale musi to zostać zwalidowane przez użytkownika.

2. Sposób przeprowadzenia metody

Po dodaniu wzorca wewnętrznego próbka jest ekstrahowana zakwaszonym metanolem. W przypadku pasz podwielokrotna część ekstraktu zostaje oczyszczona na wkładzie do ekstrakcji fazy stałej C18. 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 za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z potrójnym gradientem (HPLC) z zastosowaniem detektora UV.

3. Odczynniki

- 3.1. Woda do HPLC
- 3.2. Octan amonu
- 3.3. Wodorosiarczan tetrabutylamonowy (TBHS)
- 3.4. Acetonitryl do HPLC
- 3.5. Metanol do HPLC
- 3.6. N, N-dwumetyloformamid (DMF)
- 3.7. Kwas chlorowodorowy, ρ₂₀ = 1,19 g/ml
- 3.8. Substancja wzorcowa: diklazuril:
(±)4-chlorofenylo[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2-yl)fenylo]acetonitryl o gwarantowanej czystości

^(*) Metoda ta może być również stosowana do oznaczania diklazurilu w materiałach paszowych.

- 3.8.1. Podstawowy roztwór wzorcowy diklazurilu, 500 µg/ml
- Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej (pkt 3.8) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (pkt 3.6), uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF (pkt 3.6) i wymieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze 4 °C lub niższej roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc⁽¹⁰⁾.
- 3.8.2. Roztwór wzorcowy diklazurilu, 50 µg/ml
- Przenieść 5,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego (pkt 3.8.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF (pkt 3.6) i wymieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze 4 °C lub niższej roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.
- 3.9. Substancja wzorcowa wewnętrzna: 2,6-dichloro- α -(4-chlorofenylo)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2(3H)-yl) α -metylobenzeno-acetonitryl (diklazuril metylu)
- 3.9.1. Podstawowy roztwór wzorcowy wzorca wewnętrznego, 500 µg/ml
- Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej wewnętrznej (pkt 3.9), do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (pkt 3.6), uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF (pkt 3.6) i wymieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze 4 °C lub niższej roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.
- 3.9.2. Roztwór wzorca wewnętrznego, 50 µg/ml
- Przenieść 5,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF (pkt 3.6) i wymieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze 4 °C lub niższej roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.
- 3.9.3. Roztwór wzorca wewnętrznego dla premiksów, p/1 000 mg/ml (p = zawartość nominalna diklazurilu w premiksie w mg/kg)
- Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, p/10 mg substancji wzorcowej wewnętrznej do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w DMF (pkt 3.6) w łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.7), uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF i wymieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze 4 °C lub niższej roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.
- 3.10. Roztwory kalibracyjne
- 3.10.1. Roztwór kalibracyjny, 1 µg/ml (diklazuril)
- Odmierzyć pipetą 1,00 ml roztworu wzorcowego diklazurilu (pkt 3.8.2) i 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.2) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 17 ml DMF (pkt 3.6), uzupełnić do pełnej objętości wodą (pkt 3.1) i wymieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.
- 3.10.2. Roztwór kalibracyjny, 2 µg/ml (diklazuril)
- Odmierzyć pipetą 2,00 ml roztworu wzorcowego diklazurilu (pkt 3.8.2) i 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.2) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 16 ml DMF (pkt 3.6), uzupełnić do pełnej objętości wodą (pkt 3.1) i wymieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.
- 3.10.3. Roztwór kalibracyjny, 3 µg/ml (diklazuril)
- Odmierzyć pipetą 3,00 ml roztworu wzorcowego diklazurilu (pkt 3.8.2) i 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.2) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 15 ml DMF (pkt 3.6), uzupełnić do pełnej objętości wodą (pkt 3.1) i wymieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

⁽¹⁰⁾ Większa stabilność (do 1 roku) może być możliwa, ale musi zostać potwierdzona przez dane laboratorium.

3.10.4. Roztwór kalibracyjny, 4 µg/ml (diklazuril)

Odmierzyć pipetą 4,00 ml roztworu wzorcowego diklazurilu (pkt 3.8.2) i 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.2) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 14 ml DMF (pkt 3.6), uzupełnić do pełnej objętości wodą (pkt 3.1) i wymieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.5. Roztwór kalibracyjny, 5 µg/ml (diklazuril)

Odmierzyć pipetą 5,00 ml roztworu wzorcowego diklazurilu (pkt 3.8.2) i 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.2) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 13 ml DMF (pkt 3.6), uzupełnić do pełnej objętości wodą (pkt 3.1) i wymieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

UWAGA: roztwory kalibracyjne (pkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 i 3.10.5) obejmują stężenie diklazurilu w paszy wynoszące od 0,5 do 2,5 mg/kg przy stosowaniu obecnego protokołu.

3.11. C₁₈, wkład do ekstrakcji fazy stałej np. Mega Bond Elut, rozmiar: 20 cc, masa sorbentu: 5 000 mg (kondycjonowanie wstępne zgodnie z wytycznymi dostawcy).

3.12. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny: zakwaszony metanol

Odmierzyć pipetą 5,0 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.7) do 1 000 ml metanolu (pkt 3.5) i wymieszać.

3.13. Faza ruchoma do HPLC

3.13.1. Eluent A: roztwór octanu amonu – wodorosiarczan tetrabutylamoniowy

Rozpuścić 5 g octanu amonu (pkt 3.2) i 3,4 g TBHS (pkt 3.3) w 1 000 ml wody (pkt 3.1) i wymieszać.

3.13.2. Eluent B: acetonitryl (pkt 3.4)

3.13.3. Eluent C: metanol (pkt 3.5)

4. **Aparatura i sprzęt**

4.1. Wytrząsarka mechaniczna

4.2. Sprzęt do HPLC z potrójnym gradientem

4.2.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, Hypersil ODS, wypełnienie 3 µm, 100 mm × 4,6 mm lub równoważna

4.2.2. Detektor UV z regulacją długości fali lub detektor diodowy

4.3. Obrotowa wyparka warstwowa

4.4. Filtr membranowy (np. chemicznie odporny Nylon), 0,45 µm

4.5. Strzykawka jednorazowa, 5 ml

4.6. Rozdzielnik próżni do jednoczesnej próżniowej izolacji

4.7. Łażnia ultradźwiękowa

5. **Sposób postępowania**

5.1. *Wskazówki ogólne*

5.1.1. Ślepa próbka paszy

Należy przeprowadzić analizę ślepej próbki paszy w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona diklazurilu ani substancji interferujących. Ślepa próbka paszy musi być podobnego rodzaju co próbka badana, a jej analiza nie może potwierdzać obecności diklazurilu i substancji interferujących.

5.1.2. Test odzysku

Należy przeprowadzić test odzysku, analizując ślepą próbkę paszy wzbogaconą znaną ilością diklazurilu, zbliżoną do tej, która znajduje się w próbce. Aby wzbogacić na poziomie 1 mg/kg, należy dodać 0,1 ml podstawowego roztworu wzorcowego (pkt 3.8.1) do 50 g ślepej próbki paszy, dokładnie wymieszać i pozostawić na 10 minut, a następnie ponownie kilkakrotnie wymieszać przed przejściem do następnego etapu (pkt 5.2).

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próbki paszy podobnego rodzaju co próbka badana (zob. pkt 5.1.1), można przeprowadzić test odzysku, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest wzbogacana znaną ilością diklazurilu o masie zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niewzbogaconą próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od próbki fortyfikowanej masy próbki niewzbogaconej.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Mieszanki paszowe

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 50 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.2), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (pkt 3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce (pkt 4.1) przez noc. Pozostawić na 10 minut do odstania. Przelać 20 ml podwielokrotnej części supernatantu do odpowiedniego szklanego pojemnika i rozcieńczyć 20 ml wody (pkt 3.1). Przenieść ten roztwór na wkład do ekstrakcji (pkt 3.11) i przepuścić przez niego, stosując rozdzielnik próżni (pkt 4.6). Przepłukać wkład 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (pkt 3.12) i wody (pkt 3.1), 65 + 35 (V + V). Odrzucić zebrane frakcje i eluować związki, stosując 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (pkt 3.12) i wody, 80 + 20 (V + V). Odparować tę frakcję do osuszenia przy zastosowaniu wyparki rotacyjnej (pkt 4.3) w temperaturze 60 °C. Rozpuścić pozostałość w 1,0 ml DMF (pkt 3.6), dodać 1,5 ml wody (pkt 3.1) i wymieszać. Przefiltrować przez filtr membranowy (pkt 4.4) zamontowany na jednorazowej strzykawce (pkt 4.5). Przystąpić do oznaczania HPLC (pkt 5.3).

5.2.2. Premiksy

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 1 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (pkt 3.9.3), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (pkt 3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce (pkt 4.1) przez noc. Pozostawić na 10 minut do odstania. Przenieść podwielokrotną część 10 000/p ml (p = zawartość nominalna 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 wyparki rotacyjnej (pkt 4.3). Ponownie rozpuścić pozostałość w 10,0 ml DMF (pkt 3.6), dodać 15,0 ml wody (pkt 3.1) i wymieszać. Przystąpić do oznaczania HPLC (pkt 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 lub lepszych wyników.

- Kolumna do chromatografii cieczowej (pkt 4.2.1): 100 × 4,6 mm, Hypersil ODS, wypełnienie 3 µm, lub równoważna
- Faza ruchoma
 - Eluent A (pkt 3.13.1): wodny roztwór octanu amonu i wodorosiarczanu tetrabutylamoniowego
 - Eluent B (pkt 3.13.2): acetonitryl
 - Eluent C (pkt 3.13.3): metanol
- Elucja – gradient liniowy
 - warunki początkowe: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V)
 - po 10 minutach elucja gradientowa przez 30 minut do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V)
 - następnie 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 kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (pkt 3.10.2) zawierający 2 µg/ml diklazurolu i wzorca wewnętrznego, aż do uzyskania stałych wysokości pików i czasów retencji.

5.3.2. Analiza chromatograficzna roztworów kalibracyjnych

Zadozować dwukrotnie 20 µl roztworów kalibracyjnych (pkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 i 3.10.5), zidentyfikować i zintegrować piki diklazurolu i wzorca wewnętrznego oraz sporządzić krzywą wzorcową na podstawie stosunku średniej wysokości lub powierzchni pików diklazurolu do średniej wysokości lub powierzchni pików wzorca wewnętrznego w odniesieniu do stężenia diklazurolu w roztworach kalibracyjnych (µg/ml).

5.3.3. Analiza chromatograficzna roztworów próbki

Zadozować dwukrotnie 20 µl roztworu próbki (pkt 5.2.1 lub 5.2.2) i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików diklazurolu i wzorca wewnętrznego.

6. Obliczanie wyników

6.1. Mieszanki paszowe

Zawartość diklazurolu w próbce (w mg/kg) oblicza się według następującego wzoru:

$$w = \frac{\text{Wysokość}(d,s) - b}{\text{Wysokość}(i,s) - b} \times \frac{10V}{m} \text{ lub } w = \frac{\text{Powierzchnia}(d,s) - b}{\text{Powierzchnia}(i,s) - b} \times \frac{10V}{m}$$

gdzie:

- Wysokość(d,s) jest wysokością pików diklazurolu w roztworze próbki (pkt 5.2.1)
- Powierzchnia(d,s) jest powierzchnią pików diklazurolu w roztworze próbki (pkt 5.2.1)
- Wysokość(i,s) jest wysokością pików wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (pkt 5.2.1)
- Powierzchnia(i,s) jest powierzchnią pików wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (pkt 5.2.1)
- b oznacza punkt przecięcia krzywej wzorcowej wykreślonej z roztworów kalibracyjnych (pkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 i 3.10.5) zgodnie z pkt 5.3.2
- a oznacza nachylenie krzywej wzorcowej wykreślonej z roztworów kalibracyjnych (pkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 i 3.10.5) zgodnie z pkt 5.3.2
- m oznacza masę naważki w gramach
- V oznacza końcową objętość ekstraktu próbki w mililitrach po ponownym rozpuszczeniu zgodnie z pkt 5.2.1 (tj. 2,5 ml)

6.2. Premiksy

Zawartość diklazurolu w próbce (w mg/kg) oblicza się według następującego wzoru:

$$w = \frac{\text{Wysokość}(d,s) - b}{\text{Wysokość}(i,s) - b} \times \frac{0,02V}{m} \times p \text{ lub } w = \frac{\text{Powierzchnia}(d,s) - b}{\text{Powierzchnia}(i,s) - b} \times \frac{0,02V}{m} \times p$$

gdzie:

- Wysokość(d,s) jest wysokością pików diklazurolu w roztworze próbki (pkt 5.2.2)
- Powierzchnia(d,s) jest powierzchnią pików diklazurolu w roztworze próbki (pkt 5.2.2)
- Wysokość(i,s) jest wysokością pików wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (pkt 5.2.2)
- Powierzchnia(i,s) jest powierzchnią pików wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (pkt 5.2.2)

- b oznacza punkt przecięcia krzywej wzorcowej wykreślonej z roztworów kalibracyjnych (pkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 i 3.10.5) zgodnie z pkt 5.3.2
- a oznacza nachylenie krzywej wzorcowej wykreślonej z roztworów kalibracyjnych (pkt 3.10.1, 3.10.2, 3.10.3, 3.10.4 i 3.10.5) zgodnie z pkt 5.3.2
- m oznacza masę naważki gramach
- V oznacza końcową objętość ekstraktu próbki w mililitrach po ponownym rozpuszczeniu zgodnie z pkt 5.2.2 (tj. 25 ml)
- p oznacza zawartość nominalną w mg/kg diklazuurilu w premiksie

7. Sprawdzenie metody

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez chromatografię równoległą lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki (pkt 5.2.1 lub 5.2.2) i roztworu kalibracyjnego (pkt 3.10.2).

7.1.1. Chromatografia równoległa

Ekstrakt próbki (pkt 5.2.1 lub 5.2.2) wzbogaca się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (pkt 3.10.2). Ilość dodanego diklazuurilu musi odpowiadać ilości diklazuurilu znajdującej się w ekstrakcie próbki.

Po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu, zwiększyć się może tylko wysokość piku diklazuurilu i piku wzorca wewnętrznego. Szerokość piku w połowie jego wysokości musi mieścić się w granicach $\pm 10\%$ pierwotnej szerokości piku diklazuurilu lub piku wzorca wewnętrznego niewzbogaconego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

- a) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji widm próbki i wzorca zapisana w maksimum piku na chromatogramie musi być taka sama, w granicach marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ± 2 nm;
- b) w zakresie od 230 do 320 nm widma próbki i wzorca zapisane w maksimum piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorca analitycznego;
- c) w zakresie od 230 do 320 nm widma strony wstępującej, maksimum i strony zstępującej piku ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji widma maksimum piku.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch niezależnych pomiarów wykonanych dla dwóch podpróbek nie może przekraczać:

- 30 % względem wyższej wartości, dla zawartości diklazuurilu od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg dla zawartości diklazuurilu od 2,5 mg/kg do 5 mg/kg,
- 15 % względem wyższej wartości, dla zawartości diklazuurilu powyżej 5 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku wzbogaconej (ślepej) próbki odzysk musi wynosić co najmniej 80 %.

8. Wyniki porównania międzylaboratoryjnego

Zorganizowano dwa porównania międzylaboratoryjne. W pierwszym, przeprowadzonym przez inną grupę laboratoriów w 1994 r., zbadano próbki dwóch premiksów (O 100, A 100) i trzy próbki mieszanek paszowych uzupełniających dla drobiu (L1, Z1, K1). Próbkę jednego premiksu wymieszano z matrycą organiczną (O 100), a drugiego – z matrycą nieorganiczną (A 100). Zawartość teoretyczna diklazuurilu wynosiła 100 mg/kg. Analizę każdej próbki przeprowadzono raz lub dwukrotnie (bardziej szczegółowe informacje dotyczące pierwszego porównania międzylaboratoryjnego można znaleźć w *Journal of AOAC International*, tom 77, nr 6, 1994, s. 1359–1361).

W drugim porównaniu międzylaboratoryjnym przeanalizowano trzy mieszanki paszowe dla drobiu zawierające diklazuuril w stężeniach 0,9 mg/kg (MAT 1), 1,5 mg/kg (MAT 2) i ślepą próbkę paszy (MAT 3) (szczegółowe informacje dotyczące drugiego porównania można znaleźć w sprawozdaniu technicznym JRC (2016) i w *Journal of AOAC International*, tom 102, nr 2, 2019, s. 646–652). Wyniki obu porównań międzylaboratoryjnych przedstawiono w poniższej tabeli.

	Próbka 1 A 100	Próbka 2O 100	Próbka 3 L1	Próbka 4 Z1	Próbka 5 K1	Próbka 6 MAT 1	Próbka 7 MAT 2	Próbka 8 MAT 3
L	11	11	11	11	6	10	9	10
n	19	18	19	19	12	20	18	10
Średnia (mg/kg)	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89	1,0	1,5	< LOQ
S _r (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03	0,11	0,07	—
CV _r (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34	11,2	4,5	—
S _R (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12	0,18	0,21	—
CV _R (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65	18,1	14,3	—
Zawartość nominalna (mg/kg)	100	100	1,0	1,0	1,0	0,9	1,5	—
Źródło (*)	Pierwsze porównanie z 1994 r.	Pierwsze porównanie z 1994 r.	Pierwsze porównanie z 1994 r.	Pierwsze porównanie z 1994 r.	Pierwsze porównanie z 1994 r.	Drugie porównanie z 2015 r.	Drugie porównanie z 2015 r.	Drugie porównanie z 2015 r.

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

LOQ = granica oznaczalności

(*) Pierwsze porównanie z 1994 r.: *Journal of AOAC International*, tom 77, nr 6, 1994, s. 1359–1361; drugie porównanie z 2015 r.: sprawozdanie techniczne JRC *Re-validation of a method for the determination of diclazuril by collaborative study [Ponowna walidacja metody oznaczania diklazuurilu w ramach porównania międzylaboratoryjnego]* (2016).

9. Uwagi ogólne

Należy uprzednio wykazać, że reakcja diklazuurilu jest liniowa w zakresie mierzonych stężeń.

Przynajmniej w przypadku analizy diklazuurilu w mieszankach paszowych o wysokiej zawartości tłuszczu (w tym przypadku przekraczającej 12 % tłuszczu) metodę analityczną można zastąpić innymi metodami opartymi na HPLC, np. metodą wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas (HPLC-MS), pod warunkiem że metoda alternatywna ma równoważne parametry wydajności (stopień odzysku, precyzja w warunkach powtarzalności i odtwarzalności).

G) OZNACZANIE SOLI SODOWEJ LASALOCIDU

Sól sodowa polietereowego kwasu karboksylowego wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*

Zawartość soli sodowej lasalocidu ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (HPLC) z zastosowaniem detektora spektrofluometrycznego (fluorescencyjnego), jak opisano w pkt 1–8 poniżej.

1. **Cel i zakres stosowania metody**

Metoda służy do oznaczania zawartości soli sodowej lasalocidu w paszy. Granica wykrywalności wynosi 5 mg/kg, granica oznaczalności wynosi 10 mg/kg.

2. **Sposób przeprowadzenia metody**

Sól sodowa lasalocidu jest ekstrahowana z próbki zakwaszonym metanolem i oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (HPLC) przy wykorzystaniu detektora spektrofluometrycznego (fluorescencyjnego).

3. **Odczynniki**

3.1. Diwodorofosforan 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 (pkt 3.2) wodą do objętości 100 ml.

3.4. 6-metylo-2-heptyloamina(1,5-dimetyloheksyloamina), 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 (pkt 3.1) w 500 ml wody (pkt 3.11), dodać 3,5 ml kwasu ortofosforowego (pkt 3.2) i 10,0 ml 6-metylo-2-heptyloaminy (pkt 3.4). Dostosować pH do 4,0 przy użyciu roztworu kwasu ortofosforowego (pkt 3.3) i rozcieńczyć wodą (pkt 3.11) do objętości 1 000 ml.

3.8. Zakwaszony metanol

Przenieść 5,0 ml kwasu chlorowodorowego (pkt 3.6) do kolby miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem (pkt 3.5) i wymieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.9. Faza ruchoma HPLC: roztwór buforu fosforanowego i metanolu w stosunku 5 + 95 (V +V)

Zmieszać 5 ml roztworu buforu fosforanowego (pkt 3.7) i 95 ml metanolu (pkt 3.5).

3.10. Substancja wzorcowa soli sodowej lasalocidu o gwarantowanej czystości, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sól sodowa polietereowego kwasu karboksylowego 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 (pkt 3.10) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w zakwaszonym metanolu (pkt 3.8), uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.2. Pośredni roztwór wzorcowy soli sodowej lasalocidu, 50 µg/ml

Przenieść pipetą 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego soli sodowej lasalocidu (pkt 3.10.1) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby zakwaszonym metanolem (pkt 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 pośredniego roztworu wzorcowego (pkt 3.10.2). Uzupełnić do pełnej objętości kolb zakwaszonym metanolem (pkt 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 sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Woda do HPLC

4. Aparatura i sprzęt

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa (lub łaźnia wodna z wytrząsaniem), z możliwością kontroli temperatury

4.2. Filtry membranowe, 0,45 µm

4.3. Zestaw HPLC z systemem dozowania, umożliwiającym dozowanie 20 µl

4.3.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 125 mm × 4 mm, w odwróconym układzie faz C₁₈, wypełnienie 5 µm lub równoważna

4.3.2. Spektrofluorymetr z regulacją długości fali wzbudzenia i emisji

5. Sposób postępowania

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Ślepa próbka paszy

W celu przeprowadzenia testu odzysku (pkt 5.1.2) należy przeprowadzić analizę ślepej próbki paszy, aby sprawdzić, czy badana pasza nie zawiera soli sodowej lasalocidu i substancji interferujących. Ślepa próbka paszy musi być podobnego rodzaju co próbka badana i nie może zawierać lasalocidu sodu ani interferujących substancji.

5.1.2. Test odzysku

Należy przeprowadzić test odzysku, analizując ślepą próbkę paszy wzbogaconą znaną ilością soli sodowej lasalocidu, zbliżoną do tej, która znajduje się w próbce. Aby wzbogacić na poziomie 100 mg/kg, przenieść 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (pkt 3.10.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do objętości około 0,5 ml. Dodać 50 g paszy użytej do ślepej próbki, dokładnie wymieszać i pozostawić na 10 minut, a następnie kilkakrotnie zamieszać i przejść do etapu ekstrakcji (pkt 5.2).

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próbki paszy podobnego rodzaju co próbka badana (zob. pkt 5.1.1), można przeprowadzić test odzysku, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest wzbogacana znaną ilością soli sodowej lasalocidu, o masie zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niewzbogaconą próbką, a odzysk oblicza się przez odjęcie od próbki wzbogaconej masy próbki niewzbogaconej.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Pasze

Zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 5 do 10 g próbki do kolby stożkowej o pojemności 250 ml wyposażonej w korek. Dodać przy użyciu pipety 100,0 ml zakwaszonego metanolu (pkt 3.8). Zamknąć luźno korkiem i zamieszać w celu rozproszenia. Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.1) w temperaturze około 40 °C na 20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Pozostawić kolbę na około godzinę, dopóki zawiesina nie opadnie, następnie przefiltrować podwielokrotną część przez filtr membranowy 0,45 µm (pkt 4.2) do odpowiedniego naczynia. Przystąpić do oznaczania HPLC (pkt 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 (pkt 3.8) i zamieszać w celu rozproszenia. Umieścić kolbę z zawartością w łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.1) w temperaturze około 40 °C na 20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Rozcieńczyć do pełnej objętości zakwaszonym metanolem (pkt 3.8) i dokładnie wymieszać. Pozostawić kolbę na godzinę, dopóki zawiesina nie opadnie, następnie przefiltrować podwielokrotną część przez filtr membranowy 0,45 µm (pkt 4.2). Rozcieńczyć odpowiednią objętość klarownego filtratu przy użyciu zakwaszonego metanolu (pkt 3.8) w celu otrzymania finalnego roztworu do badań zawierającego około 4 µg/ml soli sodowej lasalocidu. Przystąpić do oznaczania HPLC (pkt 5.3).

5.3. Oznaczanie HPLC

5.3.1. Parametry

Poniższe parametry podano jako przykładowe; inne parametry mogą być zastosowane, o ile pozwalają uzyskać równoważne wyniki:

Kolumna do chromatografii cieczerwowej (pkt 4.3.1):	125 mm × 4 mm, w odwróconym układzie faz C ₁₈ , wypełnienie 5 µm lub równoważna
Faza ruchoma (pkt 3.9):	Mieszanina roztworu buforu fosforanowego (pkt 3.7) i metanolu (pkt 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 (pkt 3.10.3) zawierający 4,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) pików i czasów retencji.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych (pkt 3.10.3) i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Zadozować kilka razy ekstrakty próbki (pkt 5.2.1 lub 5.2.2), stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików dla pików soli sodowej lasalocidu.

6. Obliczanie wyników

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików otrzymanej po zadozowaniu roztworu próbki (pkt 5.3.3) określić stężenie soli sodowej lasalocidu (w µg/ml), odnosząc się do krzywej kalibracyjnej.

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 (pkt 5.2.1)
V ₁ =	objętość w ml ekstraktu próbki zgodnie z pkt 5.2.1 (tj. 100)
m =	masa naważki w g

6.2. Premiksy

Zawartość soli sodowej lasalocidu: w (mg/kg) w próbce oblicza się 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 (pkt 5.2.2)

V₂ = objętość w ml ekstraktu próbki zgodnie z pkt 5.2.2 (tj. 250)

f = współczynnik rozcieńczania zgodny z pkt 5.2.2

m = masa naważki w g

7. Sprawdzenie metody

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Metody bazujące na detekcji spektrofotometrycznej są mniej podatne na interferencje niż metody z zastosowaniem detekcji UV. Tożsamość analitu może być potwierdzona przez chromatografię równoległą.

7.1.1. Chromatografia równoległa

Ekstrakt próbki (pkt 5.2.1 lub 5.2.2) jest wzbogacany odpowiednią ilością roztworu kalibracyjnego (pkt 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 niewzbogaconego ekstraktu próbki.

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 wzbogaconej (ślepej) próbki paszy odzysk nie może być niższy niż 80 %. W przypadku wzbogaconych próbek premiksów odzysk nie może być niższy niż 90 %.

8. Wyniki porównania międzylaboratoryjnego

W ramach porównania międzylaboratoryjnego (*) laboratoriów przeprowadziło analizę 2 premiksów (próbki 1 i 2) oraz 5 pasz (próbki 3–7). Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. W poniższej tabeli podano 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 (†)

L= liczba laboratoriów

n= liczba poszczególnych wyników

s_r = odchylenie standardowe powtarzalności

s_R = odchylenie standardowe odtwarzalności

CV_r = współczynnik zmienności powtarzalności w %

CV_R = współczynnik zmienności odtwarzalności w %

(*) Analyst nr 120 z 1995 r., s. 2175–2180.

(**) Zawartość zadeklarowana przez producenta.

(†) Pasza przygotowana w laboratorium.

H) OZNACZANIE CHLOROWODORKU AMPROLIUM

monochlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylo-5-pirymidynylo)metylo]-2-metylopirydyny

1. Cel i zakres stosowania metody

Metoda służy do oznaczania zawartości amprolium w paszy. 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 kationowymiennej wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy wykorzystaniu detektora UV.

3. Odczynniki

3.1. Metanol

3.2. Acetonitryl do HPLC

3.3. Woda do HPLC

3.4. Roztwór diwodorofosforanu sodu, $c = 0,1$ mol/l

Rozpuścić 13,80 g monohydratu diwodorofosforanu sodu w wodzie (pkt 3.3) w kolbie miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą (pkt 3.3) i wymieszać.

3.5. Roztwór nadchloranu sodu, $c = 1,6$ mol/l

Rozpuścić 224,74 g monohydratu nadchloranu sodu w wodzie (pkt 3.3) w kolbie miarowej o pojemności 1 000 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą (pkt 3.3) i wymieszać.

3.6. Faza ruchoma do HPLC (zob. objaśnienia pkt 9.1)

Mieszanina acetonitrylu (pkt 3.2), roztworu diwodorofosforanu sodu (pkt 3.4) i roztworu nadchloranu sodu (pkt 3.5), 450 + 450 + 100 (v+v+v). Przed użyciem przefiltrować przez filtr membranowy 0,22 μ m (pkt 4.3) i odgazować roztwór (np. przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.4) co najmniej przez 15 minut).

3.7. Substancja wzorcowa: czyste amprolium, chlorek 1-[(4-amino-2-propylo-5-pirymidynylo)metylo]-2-metylopirydyny, E 750 (zob. pkt 9.2)

- 3.7.1. Podstawowy roztwór wzorcowy amprolium, 500 µg/ml
Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg amprolium (pkt 3.7) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w 80 ml metanolu (pkt 3.1) i umieścić kolbę na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.4). Następnie doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Roztwór w temperaturze ≤ 4 °C zachowuje stabilność przez miesiąc.
- 3.7.2. Pośredni roztwór wzorcowy amprolium, 50 µg/ml
Przenieść pipetą 5,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (pkt 3.7.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby rozpuszczalnikiem ekstrakcyjnym (pkt 3.8) i wymieszać. Roztwór w temperaturze ≤ 4 °C zachowuje stabilność przez miesiąc.
- 3.7.3. Roztwory kalibracyjne
Przenieść 0,5, 1,0 i 2,0 ml pośredniego roztworu wzorcowego (pkt 3.7.2) do kolb miarowych o pojemności 50 ml. Uzupełnić do pełnej objętości fazą ruchomą (pkt 3.6) i wymieszać. Roztwory odpowiadają odpowiednio 0,5, 1,0 i 2,0 µg/ml amprolium. Roztwory sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

- 3.8. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny
Mieszanina metanolu (pkt 3.1) i wody, 2 + 1 (v + v)

4. Aparatura i sprzęt

- 4.1. Zestaw HPLC z systemem dozowania, umożliwiającym dozowanie 100 µl
- 4.1.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 125 mm × 4 mm, wymiennicz kationowy Nucleosil 10 SA, wypełnienie 5 lub 10 µm, lub równoważna
- 4.1.2. Detektor UV z regulacją długości fali lub detektor diodowy
- 4.2. Filtr membranowy, PTFE, 0,45 µm
- 4.3. Filtr membranowy, 0,22 µm
- 4.4. Łaźnia ultradźwiękowa
- 4.5. Wytrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne

5. Sposób postępowania

- 5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Ślepa próbka paszy

W celu przeprowadzenia testu odzysku (pkt 5.1.2) należy przeprowadzić analizę ślepej próbki paszy, aby sprawdzić, czy nie zawiera ona amprolium i substancji interferujących. Ślepa próbka paszy musi być podobnego rodzaju co próbka badana, a jej analiza nie może potwierdzać obecności amprolium lub substancji interferujących.

5.1.2. Test odzysku

Należy przeprowadzić test odzysku, analizując ślepą próbkę paszy wzbogaconą znaną ilością amprolium, zbliżoną do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby wzbogacić na poziomie 100 mg/kg, dodać 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (pkt 3.7.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do objętości około 0,5 ml. Dodać 50 g paszy przeznaczonej do ślepej próbki, dokładnie wymieszać i pozostawić na 10 minut, a następnie kilkakrotnie zamieszać i przejść do etapu ekstrakcji (pkt 5.2).

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próbki paszy podobnego rodzaju co próbka badana (zob. pkt 5.1.1), można przeprowadzić test odzysku, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest wzbogacana znaną ilością amprolium, zbliżoną do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niewzbogaconą próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od próbki wzbogaconej masy próbki niewzbogaconej.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Premiksy (zawartość amprolium < 1 %) i pasza

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 (pkt 3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.4) na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez godzinę na wstrząsarce lub mieszadle magnetycznym (pkt 4.5). Rozcieńczyć podwielokrotną część ekstraktu fazą ruchomą (pkt 3.6) do zawartości amprolium od 0,5 do 2 µg/ml i wymieszać (zob. objaśnienia pkt 9.3). Przefiltrować od 5 do 10 ml rozcieńczonego roztworu przez filtr membranowy (pkt 4.2). Przystąpić do oznaczania HPLC (pkt 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 i dodać 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (pkt 3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (pkt 4.4) na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez godzinę na wstrząsarce lub mieszadle magnetycznym (pkt 4.5). Rozcieńczyć podwielokrotną część ekstraktu fazą ruchomą (pkt 3.6) do zawartości amprolium od 0,5 do 2 µg/ml i wymieszać. Przefiltrować od 5 do 10 ml rozcieńczonego roztworu przez filtr membranowy (pkt 4.2). Przystąpić do oznaczania HPLC (pkt 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 (pkt 4.1.1):	125 mm × 4 mm, wymiennicz kationowy Nucleosil 10 SA, wypełnienie 5 lub 10 µm, lub równoważna
Faza ruchoma (pkt 3.6):	mieszanina acetonitrylu (pkt 3.2), roztworu diwodorofosforanu sodu (pkt 3.4) i roztworu nadchloranu sodu (pkt 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

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (pkt 3.7.3) zawierający 1,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości pików i czasów retencji.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna

Zadocować kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów (pkt 3.7.3) i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików 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

Zadocować kilka razy ekstrakt próbki (pkt 5.2), stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików 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 (pkt 5.3.2).

Zawartość amprolium: w (w mg/kg) próbki oblicza się według następującego wzoru:

$$w = \frac{V \times c \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

- V = objętość rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w ml (pkt 3.8) zgodnie z pkt 5.2 (tj. 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. Sprawdzenie metody

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez chromatografię równoległą lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki (pkt 5.2) i roztworu kalibracyjnego (pkt 3.7.3) zawierającego 2,0 µg/ml.

7.1.1. Chromatografia równoległa

Ekstrakt próbki (pkt 5.2) wzbogaca się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (pkt 3.7.3). Ilość dodanego amprolium musi odpowiadać ilości amprolium znajdującej 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 $\pm 10\%$ pierwotnej szerokości piku amprolium niewzbogaconego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

- długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji widm próbki i wzorca zapisana w maksimum piku na chromatogramie musi być taka sama, w granicach marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ± 2 nm;
- w zakresie od 210 do 320 nm widma próbki i wzorca zapisane w maksimum piku na chromatogramie nie mogą się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorca analitycznego;
- w zakresie od 210 do 320 nm widma strony wstępującej, maksimum i strony zstępującej piku ekstraktu próbki nie mogą różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej. Kryterium jest spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji widma maksimum piku.

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 do 1 000 mg/kg,
- 7,5 % względem wyższej wartości dla zawartości amprolium powyżej 1 000 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku wzbogaconej (ślepej) próbki odzysk musi wynosić co najmniej 90 %.

8. Wyniki porównania międzylaboratoryjnego

W ramach porównania międzylaboratoryjnego przeprowadzono analizę trzech pasz dla drobiu (próbki 1–3), mieszanki paszowej mineralnej (próbka 4) i premiksu (próbka 5). W poniższej tabeli podano wyniki przeprowadzonych badań.

	Próbka 1 (ślepa próbka paszy)	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
CV _r [%]	–	4,95	1,90	3,46	2,20
s _R [mg/kg]	–	2,95	11,8	266	760
CV _R [%]	–	6,47	6,27	5,19	3,00
Zawartość nominalna [mg/kg]	–	50	200	5 000	25 000

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

9. objaśnienia

- 9.1. Jeżeli próbka zawiera tiaminę, pik tiaminy na chromatogramie ukazuje się na krótko przed pikiem amprolium. W tej metodzie amprolium i tiaminę należy rozdzielić. Jeżeli amprolium i tiamina nie zostaną rozdzielone w kolumnie (pkt 4.1.1) użytej w tej metodzie, zastąpić do 50 % acetonitrylu fazy ruchomej (pkt 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 rozcieńcza się fazą ruchomą, gdyż w przeciwnym razie czas retencji pików amprolium może się znacznie przesunąć z uwagi na zmiany siły jonowej.

I) OZNACZANIE NARAZYNY

Zawartość narazyny ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- metody określonej w normie EN ISO 14183 Pasze – Oznaczanie zawartości monenzyny, narazyny i salinomycyny – Metoda chromatografii cieczowej z derywatyzacją pokolumnową.

J) OZNACZANIE NIKARBAZYNY

Zawartość nikarbazyny ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub

- metody określonej w normie EN 15782 Pasze – Oznaczanie nikarbazyny – Metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

K) OZNACZANIE DEKOKWINATU

Zawartość dekokwinatu ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- metody określonej w normie EN 16162 Pasze – Oznaczanie dekokwinatu metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną.

L) OZNACZANIE MONENZYNY

Zawartość monenzyny ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- metody określonej w normie EN ISO 14183 Pasze – Oznaczanie zawartości monenzyny, narazyny i salinomycyny – Metoda chromatografii cieczowej z derywatyzacją pokolumnową.

M) OZNACZANIE SALINOMYCYN

Zawartość salinomycyny ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- metody określonej w normie EN ISO 14183 Pasze – Oznaczanie zawartości monenzyny, narazyny i salinomycyny – Metoda chromatografii cieczowej z derywatyzacją pokolumnową.

N) OZNACZANIE SEMDURAMYCYN

Zawartość semduramycyny ma być oznaczana z wykorzystaniem:

- metody analizy przewidzianej w normie EN 17299 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Badania przesiewowe i oznaczanie zautoryzowanych kokcydiostatyków na poziomie dodatków i 1 % oraz 3 % zanieczyszczeń krzyżowych a także niezarejestrowanych kokcydiostatyków oraz jednego antybiotyku na poziomie pozostałości w mieszankach paszowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS) lub
- metody określonej w normie EN 16158 Pasze – Oznaczanie zawartości semduramycyny – Metoda chromatografii cieczowej z zastosowaniem »rozgałęzionego« podejścia analitycznego.

O) NORMY EN

Do celów stosowania art. 34 ust. 2 lit. a) rozporządzenia (UE) 2017/625 istotne są następujące normy EN:

EN ISO 30024 Pasze – Oznaczanie aktywności fitazy

EN 17050 Pasze – Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie jodu w paszach metodą ICP-MS

EN 17550 Pasze: Oznaczanie karotenoidów w mieszankach paszowych dla zwierząt i w premiksach metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej – Detekcja UV (HPLC-UV)

EN 15784 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Wykrywanie i oznaczanie liczby *Bacillus* spp.

EN 15785 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Wykrywanie i oznaczanie liczby *Bifidobacterium* spp.

EN 15786 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Wykrywanie i oznaczanie liczby *Pediococcus* spp.

EN 15787 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Wykrywanie i oznaczanie liczby *Lactobacillus* spp. stosowanych jako dodatek do pasz

EN 15788 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Wykrywanie i oznaczanie liczby *Enterococcus* (*E. faecium*) spp. stosowanych jako dodatek do pasz

EN 15789 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Wykrywanie i oznaczanie liczby *Saccharomyces cerevisiae* stosowanych jako dodatek do pasz

EN 15510 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie wapnia, sodu, fosforu, magnezu, potasu, żelaza, cynku, miedzi, manganu, kobaltu, molibdenu i ołowiu z zastosowaniem ICP-AES (do celów analizy dodatków paszowych kobalt i molibden)

EN 15621 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie wapnia, sodu, fosforu, magnezu, potasu, siarki, żelaza, cynku, miedzi, manganu i kobaltu po mineralizacji ciśnieniowej metodą ICP-AES (do celów analizy kobaltu jako dodatku paszowego)

EN 16159 Pasze – Oznaczanie selenu metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z generowaniem wodorków (HGAAS) po trawieniu z zastosowaniem mikrofal (trawienie 65 % kwasem azotowym(V) i 30 % nadtlakiem wodoru) (do analizy selenu jako dodatku paszowego)

EN 17053: Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczanie pierwiastków śladowych, metali ciężkich i innych pierwiastków w paszy metodą ICP-MS (metoda wielopierwiastkowa) (do analizy kobaltu, molibdenu i selenu jako dodatków paszowych)”

—

ZAŁĄCZNIK V

„ZAŁĄCZNIK V

METODY ANALIZY DO CELÓW KONTROLI NIEPOŻĄDANYCH SUBSTANCJI W PASZACH

A) 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 zastosowanie mają definicje określone w załączniku I do rozporządzenia wykonawczego Komisji (UE) 2021/808 ⁽²⁾.

Oprócz tych definicji do celów niniejszej części stosuje się następujące definicje:

- ⁽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	Non-orto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0003
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,03
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01	Mono-orto PCB	
OCDD	0,0003	PCB 105	0,00003
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,00003
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03	PCB 118	0,00003
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3	PCB 123	0,00003
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,00003
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,00003
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00003
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 189	0,00003
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01		
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0003		

Zastosowane skróty: »T« = tetra (cztero); »P« = penta (pięć); »Hx« = heksa (sześć); »Hp« = hepta (siedmio); »O« = okta (ośmio); »CDD« = chlorodibenzodioxyna; »CDF« = chlorodibenzofuran; »CB« = chlorobifenyl.

- ⁽²⁾ Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2021/808 z dnia 22 marca 2021 r. w sprawie wydajności metod analitycznych w odniesieniu do pozostałości substancji farmakologicznie czynnych stosowanych u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, oraz interpretacji wyników, jak również w sprawie metod stosowanych do pobierania próbek oraz uchylające decyzje 2002/657/WE i 98/179/WE (Dz.U. L 180 z 21.5.2021, s. 84).

»Metody przesiewowe« oznaczają 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 uzyskane z próbek, które przekraczają wartość graniczną zastosowaną na potrzeby kontroli zgodności z najwyższym dopuszczalnym poziomem, należy zweryfikować, wykonując ponownie pełną analizę oryginalnej próbki laboratoryjnej z wykorzystaniem metody potwierdzającej.

»Metody potwierdzające« oznaczają 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 wynik analizy sumy PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153 i PCB 180 (zwanymi dalej niedioksynopodobnymi PCB) nie przekracza, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru, najwyższego dopuszczalnego poziomu ustanowionego w dyrektywie 2002/32/WE⁽³⁾. Partia lub podpartia nie są zgodne z najwyższym dopuszczalnym poziomem ustanowionym w dyrektywie 2002/32/WE, jeżeli średnia dwóch wyników uzyskanych metodą granicy oznaczalności⁽⁴⁾ z zastosowaniem analizy powtórnej⁽⁵⁾, 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 pomiaru 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.

Zasady wymienione w powyższych akapitach niniejszego punktu mają zastosowanie do wyniku analizy otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów drugiej ekspertyzy lub do celów referencyjnych 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 negatywnych 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.

⁽³⁾ 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) (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf).

⁽⁴⁾ 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 »metody połowy granicy oznaczalności« (ang. *medium-bound*) zakłada przyjęcie wartości równej połowie granicy oznaczalności dla wszystkich nieoznaczonych ilościowo kongenerów.

⁽⁵⁾ Analiza powtórna: odrębna analiza danych analitów przy użyciu drugiej podwielokrotnej części tej samej zhomogenizowanej próbki. Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące analizy powtórnej określone w załączniku II rozdział C pkt 3. Jednak w przypadku metod przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla ¹³C dla odpowiednich analitów analiza powtórna jest konieczna jedynie wówczas, gdy w pierwszym oznaczeniu uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Analiza powtórna jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Jeżeli analiza przeprowadzana jest w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia, można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze analizy powtórnej, 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.

Dla badań przesiewowych należy ustalić wartość graniczną na potrzeby 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 ⁽⁶⁾ z wykorzystaniem analizy powtórnej ⁽⁷⁾ 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 pomiaru 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 powyższych akapitach niniejszego punktu mają zastosowanie do wyniku analizy otrzymanego z próbki pobranej do celów kontroli urzędowej. W przypadku analizy do celów obrony praw lub do celów referencyjnych zastosowanie mają przepisy krajowe.

3. Wyniki przekraczające poziomy reagowania ustanowione w załączniku II do dyrektywy 2002/32/WE

Poziomy reagowania są narzędziem wyboru próbek w przypadkach wymagających zidentyfikowania źródła zanieczyszczeń i podjęcia działań, aby je zredukować lub zlikwidować. W metodach przesiewowych określa się odpowiednie wartości graniczne dla wyboru tych próbek. Jeśli zidentyfikowanie źródła i zredukowanie lub usunięcie zanieczyszczenia wymaga znacznego wysiłku, należy potwierdzić przekroczenie poziomu reagowania analizą powtórnią przy zastosowaniu metody potwierdzającej i przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru ⁽⁸⁾.

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 stosuje się 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 ⁽⁹⁾.

Monitorowanie obecności PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w paszy można przeprowadzać przy wykorzystaniu dwóch różnych typów metod analitycznych:

- ⁽⁶⁾ 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.
- ⁽⁷⁾ Generalnie zastosowanie mają wymagania dotyczące analizy powtórnej określone w załączniku II rozdział C pkt 3. Jednak w przypadku metod potwierdzających przy użyciu wzorca wewnętrznego znakowanego izotopem węgla ¹³C dla odpowiednich analitów powtórna analiza jest konieczna jedynie wówczas, gdy w pierwszym oznaczeniu uzyskano wynik niezgodny z wymogami. Analiza powtórna jest konieczna do wykluczenia możliwości wewnętrznego zanieczyszczenia krzyżowego lub przypadkowego wymieszania się próbek. Jeżeli analiza przeprowadzana jest w ramach przypadku wystąpienia zanieczyszczenia, można zrezygnować z potwierdzenia wyników w drodze analizy powtórnej, 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.
- ⁽⁸⁾ Identyczne wyjaśnienie i wymagania dla analizy powtórnej na potrzeby kontroli poziomów reagowania jak w przypisie 33 powyżej w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów.
- ⁽⁹⁾ 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).

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 negatywnych. Mogą obejmować metody bioanalityczne i metody GC-MS.

Metody przesiewowe porównują wynik analizy z wartością graniczną, dając odpowiedź tak/nie odnośnie do ewentualnego przekroczenia najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Stężenie PCDD/F oraz sumy 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 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 poziomów w czasie oraz ponowna ocena poziomów reagowania i najwyższych dopuszczalnych poziomów.

b) *Metody potwierdzające*

Metody potwierdzające pozwalają na jednoznaczną identyfikację i kwantyfikację PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbce i dostarczają pełnych informacji na temat ilości poszczególnych 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 27), a następnie zsumować je, co da łączne stężenie związków dioksynopodobnych wyrażone jako TEQ.

Do celów niniejszej części A przyjęta swoista granica oznaczalności danego kongeneru jest to najniższa zawartość analitu, którą można zmierzyć z należyłą pewnością statystyczną przy spełnieniu kryteriów identyfikacji opisanych w normach uznanych międzynarodowo, na przykład w normie EN 16215:2012 (Pasze – Oznaczanie zawartości dioksyn i dioksynopodobnych PCB metodą GC-HRMS oraz wskaźnikowych PCB metodą GC-HRMS) lub w najnowszych wersjach metod EPA 1613 i 1668.

Granice 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 ($\leq 30\%$) 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 z uwzględnieniem odzysku wzorców wewnętrznych i wielkości próbki.

Bioanalityczne metody przesiewowe nie dają wyników na poziomie kongenerów, a jedynie wskazanie⁽¹⁰⁾ 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 zapewnienia jakości

- 3.1. Należy wprowadzić niezbędne środki w celu uniknięcia zanieczyszczenia krzyżowego na każdym etapie pobierania i analizy próbek.
- 3.2. Próbkę przechowuje się i transportuje w pojemnikach szklanych, aluminiowych, polipropylenowych lub polietylenowych nadających się do tego celu i niemających wpływu na poziomy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w próbkach. Pojemnik na próbki należy oczyścić z pyłu papierowego.
- 3.3. Przechowywanie i przewożenie odbywa się 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 przeprowadzić próbę ślepą, 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 interferujących.
- 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. Konkretnie procedury przygotowania próbki stosowane do badanych produktów muszą być zgodne z międzynarodowymi wytycznymi, tj. EN ISO 6498.

4. Wymagania dotyczące laboratoriów

- 4.1. Zgodnie z przepisami rozporządzenia (UE) 2017/625 laboratoria muszą być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z wytyczną ISO/IEC 58, aby zapewnić, że przy przeprowadzaniu analiz stosują system zapewnienia jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025. Należy stosować zasady opisane w wytycznych technicznych dotyczących szacowania niepewności pomiaru i granic oznaczalności w odniesieniu do analizy PCDD/F i PCB.⁽¹¹⁾
- 4.2. Biegłość laboratoriów należy udowadniać stałym udanym uczestnictwem w międzylaboratoryjnych badaniach oznaczania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB w odpowiednich matrycach paszy i zakresach stężeń.

⁽¹⁰⁾ Metody bioanalityczne nie są swoiste dla kongenerów objętych schematem TEF. W ekstrakcie próbki mogą być obecne inne związki strukturalnie powiązane ze związkami aktywującymi receptor AhR, które przyczyniają się do ogólnej odpowiedzi. Dlatego wyniki uzyskane metodami bioanalitycznymi nie mogą być traktowane jako szacunki, ale raczej jako wskazanie poziomu TEQ w próbce.

⁽¹¹⁾ «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) (https://food.ec.europa.eu/system/files/2017-05/animal-feed-guidance_document_pcdd-f_pcb_en.pdf), «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) (https://food.ec.europa.eu/system/files/2016-10/cs_contaminants_sampling_analysis-report_2004_en.pdf).

4.3. Laboratoria stosujące metody przesiewowe do rutynowej kontroli próbek muszą 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 oznaczalności 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 badanych 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 pozytywne lub związków, które mogą zmniejszać odpowiedź, powodując wyniki fałszywie negatywne.

5.3. *Wysoka dokładność (poprawność 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 *poprawność* (różnica między średnią wartością mierzoną 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 odpowiednich próbek referencyjnych zawierających reprezentatywny profil kongenerów na poziomie udziału.

5.4. *Walidacja w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu oraz środki ogólnej kontroli jakości*

5.4.1. Laboratoria muszą wykazać wydajność metody w zakresie najwyższego dopuszczalnego poziomu, np. 0,5-, 1- i 2-krotność najwyższego dopuszczalnego poziomu wraz z akceptowalną wartością współczynnika zmienności 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 odniesienia, jeżeli materiały takie są dostępne). Wykresy kontroli jakości dla ślepych prób, prób wzbogaconych lub analiz próbek kontrolnych należy rejestrować i kontrolować, aby upewnić się, że wydajność 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 graniczną. 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:

	Bioanalityczna lub fizykochemiczna metoda przesiewowa	Metody potwierdzające
Wskaźnik ilości wyników fałszywie negatywnych (*)	< 5 %	
Poprawność		- 20 % do + 20 %
Powtarzalność (RSD _r)	< 20 %	
Precyzja pośrednia (RSD _R)	< 25 %	< 15 %

(*) 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 wymagania 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 wydajności metody przesiewowej jest wymagana podczas rutynowej analizy w drodze kontroli jakości analizy i walidacji metody podczas analizy. Należy prowadzić ciągły program kontroli wyników negatywnych.

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, zgodnie z najwyższym dopuszczalnym poziomem lub poziomem reagowania, aby sprawdzić, czy odpowiedź jest ewentualnie tłumiona przez substancje interferujące 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 negatywnych

Okolo 2–10 % próbek negatywnych, zależnie od matrycy próbki i doświadczenia laboratorium, należy potwierdzić metodą GC/HRMS.

5.7.6. Oznaczenie wskaźnika ilości wyników fałszywie negatywnych z danych kontroli jakości

Należy oznaczyć wskaźnik ilości wyników fałszywie negatywnych z badań przesiewowych próbek poniżej i powyżej najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania. Wskaźnik rzeczywistej ilości wyników fałszywie negatywnych nie może przekraczać 5 %. Po uzyskaniu co najmniej 20 potwierdzonych wyników na matrycę/grupę matryc z kontroli jakości próbek negatywnych należy z tej bazy danych wyciągnąć wnioski dotyczące wskaźnika ilości wyników fałszywie negatywnych. Do tych 20 wyników, w celu oceny wskaźnika ilości wyników fałszywie negatywnych, można także włączyć wyniki uzyskane na próbkach analizowanych w badaniach biegułości lub podczas przypadków wystąpienia zanieczyszczenia, obejmujące zakres stężeń do np. 2-krotności najwyższego dopuszczalnego poziomu. Próbkę muszą 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 negatywnych jest najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru metody potwierdzającej.

5.7.7. Ewentualne pozytywne wyniki próbek z badania przesiewowego muszą zawsze zostać zweryfikowane za pomocą pełnej ponownej analizy oryginalnej próbki laboratoryjnej z zastosowaniem metody potwierdzającej. Próbkę te mogą być też zastosowane do oceny wskaźnika wyników fałszywie pozytywnych. W przypadku metod przesiewowych wskaźnik wyników fałszywie pozytywnych to odsetek wyników potwierdzonych jako negatywne metodą potwierdzającą, które we wcześniejszych badaniach przesiewowych były uznane za potencjalnie pozytywne. Ocena korzyści metody przesiewowej opiera się na porównaniu próbek fałszywie pozytywnych z całkowitą liczbą sprawdzonych próbek. Wskaźnik ten musi być na tyle niski, 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 może 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 jeden kongener dla każdej funkcji monitorowania wybranego jonu w spektrometrii mas, służącej do monitorowania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod potwierdzających należy zastosować wszystkie 17 wzorców wewnętrznych PCDD/F z atomami chloru w pozycjach 2,3,7,8 i znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie 12 wzorców wewnętrznych dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C .

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 zawierającej mniej niż 10 % tłuszczu dodawanie wzorców wewnętrznych przed ekstrakcją jest obowiązkowe. W przypadku paszy pochodzenia zwierzęcego zawierającej więcej niż 10 % tłuszczu wzorce wewnętrzne należy dodać przed ekstrakcją tłuszczu albo po niej. 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 (surogaty).

6.2.5. Konieczna jest kontrola odzysku. Jeśli chodzi o metody potwierdzające, 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 sumy PCDD/F oraz dioksynopodobnych PCB). W przypadku metod przesiewowych GC-MS odzysk powinien mieścić się w zakresie od 30 do 140 %.

6.3. *Usuwanie substancji interferujących*

— Rozdzielenie PCDD/F od interferujących związków chlorowanych, takich jak niedioksynopodobne PCB czy polichlorowane difenyletery, należy przeprowadzić przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych (najlepiej stosując kolumnę z florisilem, tlenkiem glinu lub węglem).

— 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 $\pm 15\%$ dla wybranych przejściowych jonów potomnych w porównaniu z wartościami obliczonymi lub zmierzonymi (średnia z wzorców kalibracji), z zastosowaniem identycznych warunków MS/MS – w szczególności energii zderzenia i ciśnienia gazu przy zderzeniu – dla każdego przejścia analitu.

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 danych analitów.

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. testy komórkowe, receptorowe lub immunologiczne. W niniejszym punkcie ustanowiono wymagania dla metod bioanalitycznych.

Metoda przesiewowa zasadniczo pozwala zaklasyfikować próbkę jako negatywną lub podejrzaną o bycie pozytywną. W tym celu obliczony poziom BEQ jest porównywany z wartością graniczną (zob. pkt 7.3). Próbki poniżej wartości granicznej są uznawane za negatywne, a próbki równe wartości granicznej lub ją przekraczające – za podejrzone o bycie pozytywnymi i wymagające analizy metodą potwierdzającą. W praktyce poziom BEQ odpowiadający 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu może posłużyć jako wartość graniczna, pod warunkiem że zapewnione są: wskaźnik liczby wyników fałszywie negatywnych poniżej 5 % i dopuszczalny wskaźnik wyników fałszywie pozytywnych. Przy odrębnych najwyższych dopuszczalnych poziomach dla PCDD/F i dla sumy PCDD/F i dioksynopodobnych PCB sprawdzanie zgodności próbek bez frakcjonowania wymaga odpowiednich wartości granicznych testu biologicznego dla PCDD/F. Jako wartość graniczna 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 odpowiedzi

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 graniczne (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 wzorcowy 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 %.

7.1.2. Kalibracja

7.1.2.1. Kalibracja przy zastosowaniu krzywej wzorcowej

- Poziomy w próbkach należy oszacować przez porównanie odpowiedzi 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 liczbą 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 osiągnięte 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 obliczony dla ślepej próbki matrycowej lub odczynnikowej (aby uwzględnić zanieczyszczenia z zastosowanych rozpuszczalników i chemikaliów) oraz odzysk (obliczony 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). Próbkę referencyjną stosowaną 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 czterech próbkach referencyjnych (zob. pkt 7.2.4): można wykorzystać jedną ślepa próbkę matrycową plus trzy próbki referencyjne o wartości 0,5-, 1- i 2-krotnego najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania, eliminując potrzebę korekty o próbkę ślepa i odzysk, jeżeli właściwości matrycy próbek referencyjnych odpowiadają właściwościom nieznanym próbek. W takim przypadku odpowiedź badania stanowiąca 2/3 najwyższego dopuszczalnego poziomu (zob. pkt 7.3) można obliczyć bezpośrednio z tych próbek i zastosować jako wartość graniczną. Dla sprawdzenia próbek przekraczających poziomy reagowania jako wartość graniczna 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 dla odpowiednich próbkach referencyjnych z reprezentatywnymi profilami kongenerów w granicach najwyższego dopuszczalnego poziomu lub poziomu reagowania i wyrazić jako odsetek poziomu BEQ w porównaniu z poziomem TEQ. Zależnie od typu badania i zastosowanych TEF⁽¹²⁾ różnice między czynnikami TEF i REP dla dioksynopodobnych PCB mogą spowodować 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 próbkę matrycową lub, jeżeli to niemożliwe, ślepą próbkę 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 z próbką ślepą, 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 wydajność 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).

7.3. Oznaczenie wartości granicznej

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 korekty (ślepa próba i odzysk), jednak należy je sprawdzić zgodnie z pkt 7.2.2.

⁽¹²⁾ Aktualne wymogi są oparte na TEF opublikowanych w: M. Van den Berg et al, *Toxicol Sci* 93 (2), 223–241 (2006).

Należy ustalić wartości graniczne 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 negatywnych na poziomie < 5 % oraz $RSD_R < 25$ %. Decyzyjna wartość graniczna metody potwierdzającej to najwyższy dopuszczalny poziom, przy uwzględnieniu niepewności rozszerzonej pomiaru.

Wartość graniczną (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

$$\text{Wartość graniczna} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - s_{y,x} \times t_{\alpha,f=m-2} \sqrt{1/n + 1/m + (x_i - \bar{x})^2 / Q_{xx}}$$

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 ($\alpha = 5$ %, $f =$ 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
	średnia stężeń (w TEQ) wszystkich próbek kalibracji

$$Q_{xx} = \sum_{j=1}^m (x_j - \bar{x})^2 \quad \text{parametr sumy kwadratów, } i = \text{indeks punktu kalibracji}$$

7.3.2. Obliczenie z wyników bioanalitycznych (skorygowanych o próbę ślepą i odzysk) wielokrotnych analiz próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych przy odpowiadającej średniej wartości BEQ:

$$\text{Wartość graniczna} = \text{BEQ}_{\text{DL}} - 1,64 \times \text{SD}_R$$

gdzie:

SD_R	odchylenie standardowe wyników testu biologicznego przy BEQ_{DL} , mierzone w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej
---------------	---

7.3.3. Obliczenie jako średniej wartości wyników bioanalitycznych (w BEQ, skorygowanych o próbę ślepą i odzysk) z wielokrotnej analizy próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych (reprezentowana na rysunku przez krzywą dzwonową) przy odpowiadającej średniej wartości BEQ.

Obliczenie wartości granicznych w oparciu o 95 % poziom ufności przy założeniu wskaźnika ilości wyników fałszywie negatywnych na poziomie < 5 % oraz $RSD_R < 25$ %:

- z *dolnego* pasma 95 % przedziału predykcji przy poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej;
- z wielokrotnych analiz próbek ($n \geq 6$) zanieczyszczonych na poziomie decyzyjnej wartości granicznej metody potwierdzającej, jako *dolna* granica dystrybucji danych (reprezentowana na rysunku przez krzywą dzwonową) przy odpowiadającej średniej wartości BEQ.

- 7.4.6. Wykresy kontroli jakości dla ślepej próbki proceduralnej i każdego typu próbki referencyjnej należy zarejestrować i sprawdzić, aby upewnić się, że wydajność analityczna jest zgodna z wymogami, w szczególności dla ślepych próbek proceduralnych pod względem wymaganej minimalnej różnicy w dolnej granicy zakresu roboczego oraz dla próbek referencyjnych w odniesieniu do odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej. Ślepe próbki proceduralne muszą być dobrze kontrolowane, aby uniknąć wyników fałszywie negatywnych podczas odejmowania.
- 7.4.7. Należy zgromadzić wyniki z analizy metodami potwierdzającymi podejrzanych próbek oraz 2–10 % próbek negatywnych (co najmniej 20 próbek na matrycę) i zastosować je do oceny wydajności metody przesiewowej oraz związku między BEQ i TEQ. Tę bazę danych można zastosować do ponownej oceny wartości granicznych stosowanej do rutynowych próbek dla zwalidowanych matryc.
- 7.4.8. Wydajność 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 negatywnych, jeżeli laboratorium jest w stanie wykazać wydajność metody. Próbki muszą obejmować najczęstsze profile kongenerów, reprezentujące różne źródła.
- 7.4.9. Podczas incydentów można ponownie ocenić wartości graniczne 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.
- 8.1.3. Należy udostępnić dane na temat poziomów 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 analizy należy podawać jako $x \pm U$, 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 negatywny lub podejrzany o bycie pozytywnym («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 pozytywnymi 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 pozytywne zgłasza się wyłącznie w wyniku analizy potwierdzającej.
- 8.3. *Fizykochemiczne metody przesiewowe*
- 8.3.1. Wynik badań przesiewowych wyrażany jest jako negatywny lub podejrzany o bycie pozytywnym («podejrzany»).
- 8.3.2. W sprawozdaniu, dla każdego typu matrycy próbki, należy podać najwyższy dopuszczalny poziom lub poziom reagowania, na którym opiera się ocena.
- 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 dane na temat poziomów 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 pozytywnymi 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**

Wymagania ustanowione w niniejszym rozdziale stosuje się 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 wychwyty 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 odchylenie +/- 0,25 %)

3.2. Rozdzielenie metodą chromatografii gazowej niedioksynopodobnych PCB od substancji interferujących, przede wszystkim współwymywiających PCB, w szczególności jeżeli poziomy próbek mieszczą się w zakresie granic ustanowionych w przepisach i jeżeli należy potwierdzić niezgodność ⁽¹³⁾.

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;
- 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 stosunku abundancji dla wybranych fragmentów mas:

Względne odchylenie stosunku abundancji wybranych fragmentów mas od teoretycznej abundancji lub wzorca kalibracji dla jonu docelowego (monitorowany jon o największej abundancji) i jonów pomocniczych: $\pm 15\%$.

3.4. Wymagania dla technik GC-ECD

Wymagane jest potwierdzenie wyników przekraczających najwyższy dopuszczalny poziom przy pomocy dwóch kolumn GC z fazami stacjonarnymi o różnej polarności.

4. **Wykazanie wydajności metody**

Walidacja wydajności metody odbywa się 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 ⁽¹⁴⁾ niedioksynopodobnych PCB nie może być wyższa niż jedna trzecia najwyższego dopuszczalnego poziomu ⁽¹⁵⁾.

6. **Kontrola jakości**

Regularne analizy próbek ślepych, analiza próbek wzbogaconych, próbek 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 względem 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 %.

⁽¹³⁾ Kongenery, które są często współwymywane, 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.

⁽¹⁴⁾ 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« [<https://data.europa.eu/doi/10.2787/8931>].

⁽¹⁵⁾ 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.

- 7.4. Wymagania dla metod niewykorzystujących wszystkich sześciu wzorców wewnętrznych znakowanych lub wykorzystujących inne wzorce wewnętrzne:
- kontrola odzysku wzorców wewnętrznych dla każdej próbki;
 - poziomy odzysku wzorców wewnętrznych między 60 a 120 %;
 - korekta wyników względem poziomów odzysku wzorców wewnętrznych.
- 7.5. Poziomy odzysku kongenerów nieznakowanych należy sprawdzić przez próbki wzbogacone lub próbki do kontroli jakości 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 (UE) 2017/625 laboratoria muszą być akredytowane przez uznany organ działający zgodnie z wytyczną ISO/IEC 58, aby zapewnić, że przy przeprowadzaniu analiz stosują system zapewnienia jakości. Laboratoria muszą posiadać akredytację zgodną z normą EN ISO/IEC 17025. Ponadto należy stosować zasady opisane w wytycznych technicznych dotyczących szacowania niepewności pomiaru i granic oznaczalności w odniesieniu do analizy PCB ⁽¹⁶⁾.

9. Parametry wydajności: kryteria dla sumy niedioksynopodobnych PCB na najwyższym dopuszczalnym poziomie

	Spektrometria mas z rozcieńczeniem izotopowym (*)	Inne techniki
Poprawność	- 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 %

(*) Wymagane wykorzystanie wszystkich sześciu analogów znakowanych izotopem węgla ¹³C 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 przekroczone 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 analizy należy podawać jako $x \pm U$, 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.

⁽¹⁶⁾ Zob. przypis 37.

B) NORMY EN

Do celów stosowania art. 34 ust. 2 lit. a) rozporządzenia (UE) 2017/625 istotne są następujące normy EN:

EN 17194: Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie deoksyniwalenolu, aflatoksyny B1, fumonizyn B1 i B2, toksyn T-2 i HT-2, zearalenonu i ochratoksyny A w materiałach i mieszankach paszowych metodą LC-MS/MS

EN 17270: Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie teobrominy w materiałach paszowych i mieszankach paszowych, włącznie ze składnikami pochodzącymi z kakao, metodą chromatografii cieczowej

EN 17504 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz. Oznaczenie gossypolu w nasionach bawełny i paszach metodą LC-MS/MS

EN 17362 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie pentachlorofenolu (PCP) w materiałach paszowych i mieszankach paszowych metodą LC-MS/MS

EN 16279: Pasze – Oznaczenie zawartości fluorku metodą elektrody jonoselektywnej (ISE) po wcześniejszym traktowaniu kwasem chlorowodorowym

EN 17053: Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie pierwiastków śladowych, metali ciężkich i innych pierwiastków w paszy metodą ICP-MS (metoda wielopierwiastkowa)

EN 15550 Pasze – Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie kadmu i ołowiu metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z zastosowaniem kuwety grafitowej (GF-AAS) po mineralizacji ciśnieniowej

EN 16206 Pasze – Oznaczenie arsenu metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z generowaniem wodorków (HGAAS) po trawieniu ciśnieniowym z zastosowaniem mikrofal (trawienie 65 % kwasem azotowym(V) i 30 % nadtlakiem wodoru)

EN 16277 Pasze – Oznaczenie rtęci metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z wykorzystaniem zimnych par (CVAAS) po trawieniu ciśnieniowym z zastosowaniem mikrofal (ekstrakcja z użyciem 65 % kwasu azotowego(V) i 30 % nadtlaku wodoru)

EN 16278 Pasze – Oznaczenie nieorganicznego arsenu metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej z generowaniem wodorków (HG-AAS) po trawieniu z wykorzystaniem mikrofal i rozdziale przez ekstrakcję do fazy stałej (SPE)

EN 17374 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Oznaczenie nieorganicznego arsenu w paszach z zastosowaniem anionowymiennej wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z plazmą indukcyjnie sprzężoną HPLC-ICP-MS”

—

ZAŁĄCZNIK VI

„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), skorygowana względem azotu, na kilogram mieszanki paszowej:

$MJ/kg\ EM = 0,1551 \times \% \text{ białka surowego} + 0,3431 \times \% \text{ tłuszczu surowego} + 0,1669 \times \% \text{ skrobi} + 0,1301 \times \% \text{ całkowitej zawartości cukru (wyrażonego jako sacharoza)}$.

2. Tolerancje mające zastosowanie do wartości deklarowanych

Jeżeli kontrola urzędowa wykaże rozbieżność (wyższą lub niższą wartość energetyczną paszy) między wynikiem kontroli a deklarowaną wartością energetyczną, dopuszczalna jest tolerancja 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 z unijnymi 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 G,
- do oznaczania zawartości skrobi: metoda polarymetryczna, określona w załączniku III część K.

METODA OBLICZANIA WARTOŚCI ENERGETYCZNEJ W MATERIAŁACH PASZOWYCH I MIESZANKACH PASZOWYCH DLA KOTÓW I PSÓW

Wartość energetyczną w materiałach paszowych i mieszankach paszowych dla kotów i psów oblicza się zgodnie z normą EN 16967 Pasze: Metody pobierania próbek i analiz – Równania do przewidywania energii metabolicznej w materiałach paszowych i mieszankach paszowych (karma) dla kotów i psów łącznie z karmą dietetyczną”