



SBÍRKA ZÁKONŮ

ČESKÁ REPUBLIKA

Částka 172

Rozeslána dne 22. září 2004

Cena Kč 48,-

O B S A H:

497. Vyhláška, kterou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků
498. Sdělení Ministerstva vnitra o vyhlášení dodatečných voleb do zastupitelstva obce

497

VYHLÁŠKA

ze dne 10. září 2004,

**kteou se mění vyhláška Ministerstva zemědělství č. 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky
na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv,
doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků**

Ministerstvo zemědělství stanoví podle § 17 odst. 8 a 9 zákona č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění zákona č. 244/2000 Sb., zákona č. 147/2002 Sb., zákona č. 320/2002 Sb. a zákona č. 21/2004 Sb., (dále jen „zákon“):

Čl. I

Vyhláška č. 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků, se mění takto:

1. V § 1 odstavce 1 a 2 včetně poznámek pod čarou č. 1 a 1a znějí:

„(1) Tato vyhláška¹⁾ zapracovává příslušné předpisy Evropských společenství^{1a)} a upravuje požadavky na odběr vzorků, principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků.

(2) Při odběru vzorků krmiv, doplňkových látek a premixů prováděném v rámci odborného dozoru a zkoušení (§ 16 až 19 zákona) se používají postupy uvedené v této vyhlášce.

- ¹⁾ Je vydána na základě a v mezích zákona, jehož obsah umožňuje zpracovat příslušné předpisy Evropských společenství vyhláškou.
- ^{1a)} Směrnice Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Rady 72/275/EHS ze dne 20. července 1972, kterou se mění směrnice o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
První směrnice Komise 71/250/EHS ze dne 15. června 1971, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 81/680/EHS ze dne 30. července 1981, kterou se mění směrnice 71/250/EHS, 71/393/EHS, 72/199/EHS, 73/46/EHS, 74/203/EHS, 75/84/EHS, 76/372/EHS a 78/633/EHS týkající se stanovení analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 98/54/ES ze dne 16. července 1998, kterou se mění směrnice 71/250/EHS, 72/199/EHS, 73/46/EHS a zrušuje směrnice 75/84/EHS.
Směrnice Komise 1999/27/ES ze dne 20. dubna 1999, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro stanovení amprolia, diclazurilu a carbadoxu v krmivech, mění směrnice 71/250/EHS a 73/46/EHS a zrušuje směrnice 74/203/EHS.
Druhá směrnice Komise 71/393/EHS ze dne 18. listopadu 1971, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 73/47/EHS ze dne 5. prosince 1972, kterou se mění druhá směrnice Komise ze dne 18. listopadu 1971, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 81/680/EHS ze dne 30. července 1981, kterou se mění směrnice 71/250/EHS, 71/393/EHS, 72/199/EHS, 73/46/EHS, 74/203/EHS, 75/84/EHS, 76/372/EHS a 78/633/EHS týkající se stanovení analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 84/4/EHS ze dne 20. prosince 1983, kterou se mění směrnice 71/393/EHS, 72/199/EHS a 78/633/EHS týkající se stanovení analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 98/64/ES ze dne 3. září 1998, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro stanovení aminokyselin, tuků a olachindoxu v krmivech a kterou se mění směrnice 71/393/EHS.
Třetí směrnice Komise 72/199/EHS ze dne 27. dubna 1972, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 92/89/EHS ze dne 3. listopadu 1992, kterou se mění příloha I čtvrté směrnice 73/46/EHS, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 98/54/ES ze dne 16. července 1998, kterou se mění směrnice 71/250/EHS, 72/199/EHS, 73/46/EHS a zrušuje směrnice 75/84/EHS.
Směrnice Komise 1999/27/ES ze dne 20. dubna 1999, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro stanovení amprolia, diclazurilu a carbadoxu v krmivech, mění směrnice 71/250/EHS a 73/46/EHS a zrušuje směrnice 74/203/EHS.
Čtvrtá směrnice Komise 73/46/EHS ze dne 5. prosince 1972, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 92/89/EHS ze dne 3. listopadu 1992, kterou se mění příloha I čtvrté směrnice 73/46/EHS, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
První směrnice Komise 76/371/EHS ze dne 1. března 1976, kterou se stanoví metody odběru vzorků Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Sedmá směrnice Komise 76/372/EHS ze dne 1. března 1976, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 94/14/ES ze dne 29. března 1994, kterou se mění sedmá směrnice 76/372/EHS, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Osmá směrnice Komise 78/633/EHS ze dne 15. června 1978, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Devátá směrnice Komise 81/715/EHS ze dne 31. července 1981, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Desátá směrnice Komise 84/425/EHS ze dne 25. července 1984, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Jedenáctá směrnice Komise 93/70/ES ze dne 28. července 1993, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Dvanáctá směrnice Komise 93/117/ES ze dne 17. prosince 1993, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 2003/126/ES ze dne 23. prosince 2003, kterou se stanoví analytická metoda identifikace složek živočišného původu pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 1999/76/ES ze dne 23. července 1999, kterou se stanoví analytická metoda Společenství pro stanovení lasalocidu sodného v krmivech.
Směrnice Komise 1999/79/ES ze dne 27. července 1999, kterou se mění třetí směrnice Komise 72/199/EHS ze dne 27. dubna 1972, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 2000/45/ES ze dne 6. července 2000, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro stanovení vitamínu A, vitamínu E a tryptofanu v krmivech.
Směrnice Komise 2002/70/ES ze dne 26. července 2002, kterou se stanoví požadavky pro určení obsahu dioxinu a dioxinům podobných PCB v krmivech.
Směrnice Komise 93/28/EHS ze dne 4. června 1993, kterou se mění příloha I třetí směrnice 72/199/EHS, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.
Směrnice Komise 92/89/EHS ze dne 3. listopadu 1992, kterou se mění příloha I čtvrté směrnice 73/46/EHS, kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv.“

Dosavadní odstavec 2 se označuje jako odstavec 3.

2. V § 1 odst. 3 se slova „reziduí pesticidů a“ zrušují.

3. V § 3 odstavec 1 zní:

„(1) Celková hmotnost všech odebraných dílčích vzorků jedné partie krmiva, doplňkové látky nebo premixu tvoří souhrnný vzorek; jeho minimální hmotnost je stanovena v příloze č. 3 sloupci 2. Redukovaný vzorek je reprezentativní část souhrnného vzorku, ze kterého se získá dělením. Konečný vzorek je část redukovaného vzorku nebo homogenizovaný souhrnný vzorek.“.

4. V § 3 odst. 5 se za slova „a zakázaných látek a produktů v krmivech“ vkládají slova „s výjimkou stanovení obsahu dioxinů a dioxinům podobných polychlorovaných bifenyly“.

5. V § 3 se doplňují odstavce 6 a 7, které znějí:

„(6) Za vzorek, který reprezentuje vzorkovanou partii nebo subpartii, je považován souhrnný vzorek.

(7) Stanovení obsahu dioxinů, jakož i určení obsahu dioxinům podobných polychlorovaných bifenyly se provádí v laboratorním vzorku.“.

6. V § 4 odstavce 1 a 2 znějí:

„(1) Ze souhrnného nebo redukovaného vzorku se vyhotoví nejméně tři konečné vzorky, které tvoří množství souhrnného vzorku určené pro zkoušení; minimální hmotnost konečného vzorku je uvedena v příloze č. 5 sloupci 2.

(2) Ustanovení odstavce 1 se nevztahuje na souhrnné vzorky při odběru vzorků pro posouzení homogenity doplňkové látky v partii premixu nebo krmiva s použitím premixu a pro posouzení pracovní přesnosti míchacího zařízení, u nichž souhrnný vzorek tvoří současně konečný vzorek.“.

7. V § 7 odstavec 1 zní:

„(1) V rámci provádění odborného dozoru a zkoušení se používají metody laboratorního zkoušení stanovené předpisy Evropských společenství. Pokud předpisy metodou nestanoví, provádí se kontrola podle ostatních metod laboratorního zkoušení, jejichž principy jsou uvedeny v přílohách této vyhlášky.“.

8. V § 7 odstavec 2 včetně poznámky pod čarou č. 5 zní:

„(2) Seznam a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů jsou uvedeny v přílohách č. 9 až 14. Úplné postupy metod uvedených v přílohách č. 9 až 12 a vzorkovací pomůcky podle přílohy č. 1 se zveřejňují ve Věstníku Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského⁵⁾.

⁵⁾ § 10 zákona č. 147/2002 Sb., o Ústředním kontrolním a zkušebním ústavu zemědělském, ve znění pozdějších předpisů.“.

9. V § 7 odst. 3 se číslo „7“ nahrazuje číslem „9“.

10. V § 8 odstavec 2 zní:

„(2) Vzorek se upravuje tak, aby nedošlo k jeho kontaminaci nebo ke změně jeho složení. Mletí, promíchávání a prosévání se provádí co nejrychleji, aby byl vzorek co nejméně vystaven vlivu vzduchu a světla. Na úpravu vzorku nelze použít mlýnky ani jiné přístroje, které by mohly způsobit zahřátí vzorku nad 40 °C. Vzorek zvláště citlivý na zahřátí se rozdrtí ručně. Mimo to je třeba zajistit, aby zdrojem kontaminace stopovými prvky nebyly samotné přístroje.“.

11. V § 8 odstavec 3 zní:

„(3) Pokud vzorek nemůže být upraven, aniž by se podstatným způsobem změnil obsah jeho vlhkosti, stanovuje se obsah vlhkosti před úpravou a po úpravě v souladu s metodou uvedenou v příloze č. 7.“.

12. V § 11 odst. 5 se slova

„pro vyjádření obsahu v g/kg:

pro obsah do 9,99 g/kg	s přesností na 0,01 g/kg
pro obsah od 10 g/kg do 99,9 g/kg	s přesností na 0,1 g/kg
pro obsah nad 100 g/kg	s přesností na 1 g/kg“

nahrazují slovy

„pro vyjádření obsahu v %:

pro obsah do 0,999 %	s přesností na 0,001 %
pro obsah od 1,0 do 9,99 %	s přesností na 0,01 %
pro obsah nad 10,0 %	s přesností na 0,1 %

Pro vyjádření obsahu vitamínu A v m.j./kg

do 999 m.j./kg	s přesností na 1 m.j./kg
od 1 000 do 9 999 m.j./kg	s přesností na 10 m.j./kg
od 10 000 do 99 999 m.j./kg	s přesností na 100 m.j./kg
od 100 000 do 999 999 m.j./kg	s přesností na 1 000 m.j./kg
nad 1 000 000 m.j./kg	s přesností na 10 000 m.j./kg“.

13. V § 11 odst. 7 se slova „a 17“ zrušují a slova „č. 9, 10“ se nahrazují slovy „č. 9 a 10“.

14. V § 11 se doplňuje odstavec 8, který zní:

„(8) Mez stanovitelnosti je hodnota udávající nejmenší množství stanovované látky, které lze spolehlivě kvantifikovat.“.

15. V příloze č. 6 se doplňuje bod 7., který zní:
„7. Metody odběru vzorků k provádění odborného dozoru a zkoušení obsahu dioxinů (PCDD/PCDF) a určování dioxinům podobných PCB v některých krmivech jsou uvedeny v příloze č. 18 části 1.“.

16. V příloze č. 7 v bodě 2. první odstavec zní:
„Jestliže příprava vzorku nemůže být provedena bez významných změn obsahu vlhkosti vzorku, musí být provedeno stanovení obsahu vlhkosti před přípravou vzorku a po ní podle následující metody zkoušení.“.

17. V příloze č. 7 se doplňuje bod 3.7., který zní:

„3.7. Postupy přípravy vzorků a požadavky na analytické metody používané k provádění odborného dozoru a zkoušení obsahu dioxinů (PCDD/PCDF) a dioxinům podobných polychlorovaných bifenylů v některých krmivech jsou uvedeny v příloze č. 18 části 2“.

18. V příloze č. 8 bod 1.1. zní:

„1. 1. Vzorky, které jsou určeny pro laboratorní zkoušení obsahu vitaminů nebo na světlo citlivých substancí, musí být uchovány v obalech, které zabrání přístupu světla.“.

19. Příloha č. 9 zní:

„Příloha č. 9 k vyhlášce č. 124/2001 Sb.

Metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam chemických metod laboratorního zkoušení krmiv

1. Vlhkost, těkavé látky

- 1.1. Stanovení obsahu vlhkosti, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/393/EHS, doplněná směrnicí Komise 73/46/EHS
- 1.2. Stanovení obsahu vlhkosti v olejích a tucích, metoda převzatá ze směrnice Komise 73/46/EHS

2. Dusíkaté sloučeniny

- 2.1. Stanovení obsahu dusíkatých látek, metoda převzatá ze směrnice Komise 93/28/EHS
- 2.2. Stanovení obsahu bílkovin
- 2.3. Stanovení obsahu aminokyselin, metoda převzatá ze směrnice Komise 98/64/ES
- 2.4. Stanovení obsahu močoviny, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 2.5. Stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/393/EHS
- 2.6. Stanovení aktivity ureázy v sóji a jejích produktech, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 2.7. Ureázový test
- 2.8. Stanovení obsahu biuretu
- 2.9. Stanovení obsahu hydroxyanalogu methioninu
- 2.10. Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 72/199/EHS
- 2.11. Stanovení aktivity pepsinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 72/199/EHS
- 2.12. Stanovení obsahu methioninu v premixech
- 2.13. Stanovení obsahu tryptofanu, metoda převzatá ze směrnice Komise 2000/45/ES

3. Tuk

- 3.1. Stanovení obsahu oleje a tuku, metoda převzatá ze směrnice Komise 98/64/ES
- 3.2. Stanovení čísla kyselosti tuku
- 3.3. Stanovení obsahu nerozpustných nečistot v tucích a olejích
- 3.4. Stanovení obsahu nezmýdelnitelných látek v tucích a olejích
- 3.5. Stanovení peroxidového čísla
- 3.6. Stanovení obsahu lecitinu
- 3.7. Stanovení obsahu mastných kyselin

4. Polysacharidy

- 4.1. Stanovení obsahu vlákniny, metoda převzatá ze směrnice Komise 92/89/ES

5. Bezdušíkaté látky výtažkové

- 5.1. Stanovení obsahu škrobu, metoda převzatá ze směrnice Komise 99/79/ES
- 5.2. Stanovení obsahu cukrů, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 5.3. Stanovení obsahu laktosy, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 5.4. Stanovení obsahu bezdušíkatých látek výtažkových výpočtem

6. Popel

- 6.1. Stanovení obsahu popele, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 6.2. Stanovení obsahu popele nerozpustného v kyselině chlorovodíkové, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS

7. Makroprvky

- 7.1. Stanovení obsahu fosforu, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/393/EHS
- 7.2. Stanovení obsahu hořčíku, metoda převzatá ze směrnice Komise 73/46/EHS
- 7.3. Stanovení obsahu draslíku, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 7.4. Stanovení obsahu sodíku, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 7.5. Stanovení obsahu ve vodě rozpustných chloridů, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 7.6. Stanovení obsahu celkových uhličitánů, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 7.7. Stanovení celkového obsahu síry
- 7.8. Stanovení obsahu vápníku, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS

8. Mikroprvky

- 8.1. Stanovení obsahu mědi, železa, manganu a zinku, metoda převzatá ze směrnice Komise 78/633/EHS

9. Kyselost

- 9.1. Stanovení volné, vázané a celkové kyselosti vodního výluhu
- 9.2. Stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích

10. Nežádoucí látky

- 10.1. Stanovení obsahu kyanovodíku, metoda převzatá ze směrnice Komise 71/250/EHS
- 10.2. Stanovení obsahu glukosinolátů v řepce
- 10.3. Stanovení obsahu 5-vinyl-2-thioxazolidonu
- 10.4. Stanovení obsahu kyseliny erukové
- 10.5. Stanovení obsahu olova a kadmia
- 10.6. Stanovení obsahu ricinových slupek
- 10.7. Stanovení obsahu reziduí organochlorových pesticidů
- 10.8. Stanovení obsahu indikačních kongenerů polychlorovaných bifenyly (PCB)
- 10.9. Stanovení obsahu toxaphenu
- 10.10. Stanovení obsahu rtuti

- 10.11. Stanovení obsahu aflatoxinu B₁, metoda převzatá ze směrnice Komise 76/372/EHS, doplněná směrnicí Komise 92/95/EHS a 94/14/ES
- 10.12. Stanovení obsahu arsenu
- 10.13. Stanovení obsahu gossypolu, metoda převzatá ze směrnice Komise 72/199/EHS
- 10.14. Stanovení obsahu theobrominu

11. Zkoušení siláží

- 11.1. Zkoušení jakosti siláží

1. Vlhkost, těkavé látky

1.1. Stanovení obsahu vlhkosti

Účel, rozsah a princip

Metoda umožňuje stanovení obsahu vlhkosti v krmivech.

Metoda není vhodná pro stanovení obsahu vlhkosti v mléčných produktech pro přímé zkrmování, pro minerální látky a směsi, které jsou tvořeny převážně minerálními látkami, pro živočišné a rostlinné tuky a oleje nebo pro analýzy olejnatých semen a plodů.

Vzorky se suší za předepsaných podmínek, které závisí na původu krmiva. Obsah vlhkosti se stanoví vážkově jako úbytek hmotnosti. U pevných krmiv s vysokým obsahem vlhkosti je nutné provést předsoušení.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 0,2 %.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

1.2. Stanovení obsahu vlhkosti v olejích a tucích

Účel, rozsah a princip

Metoda umožňuje stanovení obsahu vody a těkavých látek v živočišných a rostlinných tucích a olejích.

Vzorek je sušen do konstantní hmotnosti při 103 °C. Úbytek hmotnosti je zjištěn vážením.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 0,05 %.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2. Dusíkaté sloučeniny

2.1. Stanovení obsahu dusíkatých látek

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dusíkatých látek v krmivech na základě stanovení obsahu dusíku metodou podle Kjeldahla.

Vzorek se mineralizuje horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru. Kyselý roztok se alkalizuje roztokem hydroxidu sodného. Amoniak se vydestiluje a jímá se do odměřeného množství kyseliny sírové a přebytek se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu dusíkatých látek:

do 20 %	0,2 %
od 20 do 40 %	1 % relat.
nad 40 %	0,4 %

Reprodukovatelnost

Nestanovena

2.2. Stanovení obsahu bílkovin

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu bílkovin v krmivech a je použitelný pro všechna krmiva organického původu.

Obsah bílkovin se stanoví metodou podle Barnsteina po jejich oddělení od dusíkatých látek nebílkovinného původu vysrážením mědnatou solí.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.3. Stanovení obsahu aminokyselin

Účel, rozsah a princip

Tato metoda slouží ke stanovení obsahu volných (syntetických a přirozených) a veškerých (vázaných peptidickou vazbou a volných) aminokyselin v krmivech za použití analyzátoru aminokyselin. Metoda je vhodná pro tyto aminokyseliny: cyst(e)in, methionin, lysin, threonin, alanin, arginin, kyselinu asparagovou, kyselinu glutamovou, glycin, histidin, isoleucin, leucin, feny alanin, prolin, serin, tyrosin a valin.

Tato metoda nerozlišuje mezi solemi aminokyselin a nemůže také u aminokyselin rozlišovat mezi formami D a L. Není vhodná pro stanovení tryptofanu nebo hydroxyanalogů aminokyselin.

Volné aminokyseliny

Volné aminokyseliny se extrahují zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Současně extrahované dusíkaté makromolekulární látky se srážejí kyselinou sulfosalicylovou a odstraňují se filtrací. Zfiltrovaný roztok se upraví na pH 2,20. Aminokyseliny se separují iontoměničovou chromatografií a stanoví se po reakci s ninhydrinem fotometrickou detekcí při 570 nm.

Veškeré aminokyseliny

Zvolený postup závisí na stanovovaných aminokyselinách. Cyst(e)in a methionin se musí před hydrolyzou oxidovat na kyselinu cysteovou a na methioninsulfon. Tyrosin se musí stanovovat v hydrolyzátech neoxidovaných vzorků. Ostatní aminokyseliny uvedené v bodě 1 se mohou stanovovat buď v oxidovaném nebo v neoxidovaném vzorku.

Oxidace se provádí při 0 °C směsí kyseliny permravnčí a fenolu. Nadbytečné oxidační činidlo se rozloží disiřičitanem sodným. Oxidovaný nebo neoxidovaný vzorek se hydrolyzuje kyselinou chlorovodíkovou ($c = 6 \text{ mol/l}$) po 23 hodin. Hydrolyzát se upraví na pH 2,20. Aminokyseliny se separují iontoměničovou chromatografií a stanovují se po reakci s ninhydrinem fotometrickou detekcí při 570 nm (440 nm pro prolin).

Opakovatelnost

Hodnoty opakovatelnosti pro různé aminokyseliny a různá krmiva jsou součástí úplného znění metody.

Reprodukovatelnost

Hodnoty reprodukovatelnosti pro různé aminokyseliny a různá krmiva jsou součástí úplného znění metody.

2.4. Stanovení obsahu močoviny

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu močoviny v krmivech s aditivním obsahem této látky.

Obsah močoviny se stanoví, po vyčerení vodního výluhu vzorku Carresovými činidly, reakcí s p-dimethylaminobenzaldehydem spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.5. Stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek

Účel, rozsah a princip

A. Mikrodifúze

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek vyjádřených jako amoniak v krmivech.

Vzorek se extrahuje vodou, roztok se vyčeří a zfiltruje se. Těkavé dusíkaté báze se po přidání roztoku uhličitanu draselného vytěsní a mikrodifúzí se zachycují v roztoku kyseliny borité a titrují se kyselinou sírovou.

B. Destilace

Účel, rozsah a princip

Metoda umožňuje stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek, vyjádřených jako amoniak, v rybí moučce, která neobsahuje prakticky žádnou močovinu. Metoda je použitelná pouze u obsahů nižších než 0,25 % amoniaku.

Vzorek se extrahuje vodou, roztok se vyčeří a zfiltruje se. Těkavé dusíkaté báze se vytěsní za varu po přidání oxidu hořečnatého a zachycují se v předepsaném množství kyseliny sírové. Přebytek kyseliny sírové se titruje roztokem hydroxidu sodného.

Opakovatelnost**Mikrodifúze**

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu těkavých dusíkatých látek:

do 1,0 %	10,0 % relat.
nad 1,0 %	0,1 %

Destilace

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit pro všechny obsahy těkavých dusíkatých látek 10,0 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.6. Stanovení aktivity ureázy v sóji a jejích produktech**Účel, rozsah a princip**

Postup specifikuje podmínky pro stanovení aktivity ureázy v sóji a jejích produktech pro ověření, zda tyto produkty byly tepelně upravovány po dostatečně dlouhou dobu. Aktivita ureázy se stanoví určením množství amoniakálního dusíku, uvolněného z roztoku močoviny jedním gramem zkoušeného vzorku za jednu minutu při teplotě 30 °C.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.7. Ureázový test**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení aktivity ureázy v soji a jejích produktech.

Aktivita ureázy se stanoví titračně alkalimetricky určením množství amoniaku, uvolněného z roztoku močoviny ureázou ze zkoušeného vzorku za 1 hodinu.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.8. Stanovení obsahu biuretu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu biuretu v močovině.

Metoda je založena na tvorbě barevného komplexu biuretu se síranem měďnatým a měření absorbance vybarveného roztoku při vlnové délce 540 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 0,03 %.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.9. Stanovení obsahu hydroxyanalogu methioninu**Účel, rozsah a princip**

Obsah hydroxyanalogu methioninu se stanoví po extrakci vzorku směsí voda-acetonitril a následné hydrolyze metodou HPLC na reverzní fázi s použitím UV detekce.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.10. Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda je použitelná pro stanovení podílu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu a kyseliny chlorovodíkové za definovaných podmínek.

Vzorek krmiva v roztoku zředěné kyseliny chlorovodíkové a pepsinu se zahřívá po dobu 48 hodin na teplotu 40 °C. Suspense se zfiltruje a ve filtrátu se stanoví obsah dusíkatých látek metodou 2.1.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu:

do 20 %	0,4 %
od 20 do 40 %	2 % relat.
nad 40 %	0,8 %

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.11. Stanovení aktivity pepsinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení aktivity pepsinu, který se používá k určení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové.

Na hemoglobin se působí roztokem zředěné kyseliny chlorovodíkové a pepsinu za definovaných podmínek. Nezhydrolyzovaný podíl dusíkatých látek se vysráží kyselinou trichloroctovou. K filtrátu se přidá hydroxid sodný a Folin-Ciocalteuovou činidlo. Zabarvení roztoku se proměří při 750 nm a odpovídající množství tyrosinu se odečte z kalibrační křivky.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.12. Stanovení obsahu methioninu v premixech**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu methioninu v premixech.

Obsah methioninu se stanoví po extrakci vzorku fosfátovým pufrům a následné reakci s jodem za vzniku komplexu methionin - jod při pH 6,5. Komplex se reverzibilně rozkládá při pH 1 zpět na jod a methionin. Uvolněný jod se stanoví titračně jodometricky.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

2.13. Stanovení obsahu tryptofanu**Účel, rozsah a princip**

Metoda určuje podmínky pro stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu v krmivech. Metoda nerozlišuje mezi D- a L-formou.

Pro stanovení obsahu celkového tryptofanu se vzorek hydrolyzuje za alkalických podmínek hydroxidem barnatým při 110 °C po dobu 20 hodin. Po hydrolyze se přidá interní standard.

Pro stanovení volného tryptofanu se vzorek extrahuje za mírně kyselých podmínek za přítomnosti vnitřního standardu.

Tryptofan v hydrolyzátu nebo extraktu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 10 % relat. z vyššího výsledku.

Reprodukovatelnost

Hodnoty reprodukovatelnosti pro a různá krmiva jsou součástí úplného znění metody.

3. Tuk**3.1. Stanovení obsahu oleje a tuku**

Účel, rozsah a princip

Touto metodou se stanoví obsah tuku v krmivech. Metoda se nevztahuje na analýzu olejnatých semen a plodin.

Podle druhu a složení krmiva se pro analýzu použije jeden ze dvou následujících postupů:

Postup A – přímo extrahovatelné tuky

Tato metoda je použitelná pro krmiva rostlinného původu, s výjimkou těch, které jsou uvedeny v postupu B.

Postup B – celkový obsah tuku

Tato metoda je použitelná pro krmiva živočišného původu a pro všechny krmné směsi. Používá se pro všechny materiály, z nichž není možno tuk úplně extrahovat bez předchozí hydrolýzy (např. lepky, kvasnice, bramborové proteiny a výrobky, které byly podrobeny zpracování, jako vytlačování, vločkování a zahřívání).

1.1. Interpretace výsledků

Ve všech případech, kdy se dosáhlo vyššího výsledku postupem B, než postupem A, je třeba považovat za platnou hodnotu podle postupu B.

Postup A

Vzorek se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se oddestiluje a zbytek se vysuší a zváží.

Postup B

Vzorek se zahřívá s kyselinou chlorovodíkovou. Směs se ochladí a zfiltruje. Promytý a usušený zbytek se pak zpracuje podle postupu A.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu tuku:

do 5 %	0,2 %
od 5 do 10 %	4 % relat. z vyššího výsledku
nad 10 %	0,4 %

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

3.2. Stanovení čísla kyselosti tuku

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení čísla kyselosti tuku v krmivech.

Číslo kyselosti tuku se stanoví titračně alkalimetricky, po rozpuštění tuku vyextrahovaného z krmiva směsí extrakčního činidla a ethanolu. Způsob extrakce tuku závisí na druhu zkoušeného krmiva.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku pro hodnoty větší než 4 mg KOH/g (resp. 0,07 mmol/g) nesmí překročit 5 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí při hodnotě nad 4 mg KOH/g tuku překročit hodnotu 15 % relat.

3.3. Stanovení obsahu nerozpustných nečistot v tucích a olejích

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu nerozpustných nečistot v živočišných a rostlinných tucích nebo olejích.

Obsah nerozpustných nečistot se stanoví rozpuštěním vzorku v přebytku n - hexanu nebo petroletheru nebo diethyletheru, filtrací získaného roztoku a zvážením vysušeného filtru s nerozpustnými nečistotami.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu nerozpustných nečistot:

do 0,3 %	0,02 %
nad 0,3 %	0,05 %

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

3.4. Stanovení obsahu nezmýdelnitelných látek v tucích a olejích

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení nezmýdelnitelného podílu v živočišných a rostlinných tucích a olejích. Metoda není použitelná pro vosky a dává přibližné výsledky u určitých tuků s vyšším obsahem nezmýdelnitelného podílu, např. u tuků pocházejících z mořských živočichů.

Tuk nebo olej se zmýdelní varem s ethanolickým roztokem hydroxidu draselného pod zpětným chladičem. Nezmýdelnitelný podíl se vyextrahuje z roztoku mýdla diethyletherem a po oddestilování rozpouštědla a vysušení se zváží.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu nezmýdelnitelných látek:

do 5 %	0,05 %
od 5 do 10 %	0,1 %

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

3.5. Stanovení peroxidového čísla

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení peroxidového čísla v živočišných a rostlinných tucích a olejích.

Peroxidové číslo se určí reakcí chloroformového extraktu vzorku s jodidem draselným v roztoku kyseliny octové a chloroformu a následnou titrací uvolněného jodu odměrným roztokem thiosíranu sodného.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při hodnotě peroxidového čísla:

méně než 0,5 mmol/kg	0,1 mmol/kg
od 0,5 do 3 mmol/kg	0,2 mmol/kg
od 3 do 6 mmol/kg	0,5 mmol/kg
větší než 6 mmol/kg	1,0 mmol/kg

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

3.6. Stanovení obsahu lecitinu

Účel, rozsah a princip

Metoda je určen ke stanovení obsahu lecitinu v technických a potravinářských produktech.

Stanoví se obsah látek rozpustných v acetonu, obsah látek nerozpustných v benzenu nebo toluenu a obsah vody s těkavými látkami a jejich součet se odečte od 100.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 1 %.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

3.7 Stanovení obsahu mastných kyselin

Účel, rozsah a princip

Metoda určuje podmínky pro stanovení obsahu jednotlivých mastných kyselin v krmivech.

Mastné kyseliny se stanovují ve formě svých methylesterů metodou plynové chromatografie.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 13 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit hodnotu 31 % relat.“

4. Polysacharidy

4.1. Stanovení obsahu vlákniny

Účel, rozsah a princip

Metoda umožňuje stanovit v krmivech organické látky, které neobsahují tuk a jsou nerozpustné v roztoku kyseliny a louhu a jsou nazývány vláknina.

Vzorek se, pokud je to nutné, odtuční a potom se na něj působí postupně vroucím roztokem kyseliny sírové a hydroxidu draselného o přesně stanovené koncentraci. Zbytek je oddělen filtrací přes skleněný filtrační kelímek, promyt, vysušen, zvážen a spálen při teplotě 475 –

500 °C. Úbytek váhy po spálení odpovídá obsahu vlákniny ve zkoušeném vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit pro obsah vlákniny:

do 10 %	0,3 %
nad 10 %	3 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

5. Bezdušikaté látky výťažkové

5.1. Stanovení obsahu škrobu

Účel, rozsah a princip

Tato metoda dává možnost stanovit hladiny škrobu a vysokomolekulárních degradačních produktů škrobu v krmivech za účelem kontroly obsahu metabolizovatelné energie podle přílohy č. 28 vyhlášky č. 451/2000 Sb., ve znění vyhlášky č. 184/2004 Sb. a kontrolu požadavků podle přílohy č. 11 téže vyhlášky.

Metoda zahrnuje dvě stanovení. Nejprve je vzorek podroben působení horké zředěné kyseliny chlorovodíkové. Po vyčeření a filtraci je optická rotace roztoku měřena polarimetricky.

Potom je vzorek extrahován 40 % ethanolem. Po okyselení filtrátu kyselinou chlorovodíkovou, vyčeření a filtraci je optická rotace roztoku měřena polarimetricky.

Rozdíl mezi těmito dvěma měřeními násobený známým faktorem udává obsah škrobu ve vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit pro obsahy škrobu:

do 40 %	0,4 %
nad 40 %	1 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

5.2. Stanovení obsahu cukrů

Účel, rozsah a princip

Tato metoda umožňuje stanovit množství redukujících cukrů a celkové cukry po inverzi vyjádřené jako glukosa nebo určené jako sacharosa použitím faktoru 0,95. Je použitelná pro krmné směsi. Pro ostatní krmiva jsou používány speciální metody. Je-li to nutné, může být zjištěn obsah laktosy zvlášť a potom zahrnut do celkového výsledku.

Cukry jsou extrahovány zředěným ethanolem. Roztok je vyčiřen Carrezovými činidly I a II. Odstraní se ethanol a množství cukru před a po inverzi se určí Luff-Schoorlovou metodou.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

5.3. Stanovení obsahu laktosy

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu laktosy v krmivech. Metoda je použitelná pro krmiva obsahující více než 0, 5 % laktosy.

Cukry se vyextrahují ze vzorku vodou, extrakt se vystaví fermentačnímu účinku kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které ponechají laktosu v nezměněném stavu. Po vyčiření Carrezovými činidly se laktosa stanoví titračně jodometricky podle Luff-Schoorla.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

5.4. Stanovení obsahu bezdusíkatých látek výťažkových výpočtem

Účel, rozsah a princip

Metoda uvádí způsob výpočtu obsahu bezdusíkatých látek výťažkových z výsledků stanovení základních složek krmiv, a to vlhkosti, dusíkatých látek ($N \times 6,25$), tuku, popele a vlákniny, případně močoviny a amoniaku.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

6. Popel

6.1. Stanovení obsahu popele

Účel, rozsah a princip

Tato metoda dává možnost stanovit obsah popela v krmivech.

Vzorek je zpopelněn při 550 °C a zbytek je zvážen.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

6.2. Stanovení obsahu popele nerozpustného v kyselině chlorovodíkové**Účel, rozsah a princip**

Metoda umožňuje stanovení obsahu minerálních látek, nerozpustných v kyselině chlorovodíkové v krmivech. Podle původu vzorku mohou být použity dvě různé metody.

Metoda A: použitelná pro organická krmiva a pro většinu krmných směsí. Vzorek se zpopelní, popel se povaří s kyselinou chlorovodíkovou a nerozpuštěný zbytek se zfiltruje a zváží.

Metoda B: použitelná pro minerální suroviny nebo minerální doplňková krmiva a krmné směsi s obsahem látek nerozpustných v kyselině chlorovodíkové, stanovených metodou A, vyšší než 1 %.

Vzorek se rozpouští v kyselině chlorovodíkové. Roztok se zfiltruje, zbytek na filtru se zpopelní a dále se postupuje podle metody A.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

7. Makroprvky**7.1. Stanovení obsahu fosforu****Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu fosforu v krmivech.

Je zvláště vhodná pro analýzu látek s nízkým obsahem fosforu. V určitých případech (produktech bohatých na fosfor) je vhodné použít vážkovou metodu.

Vzorek je mineralizován a převeden do kyselého roztoku, buď suchým spalováním (v případě organických krmiv), nebo kyselou digescí (v případě minerálních sloučenin a kapalných krmiv). Roztok je podroben působení molybdatovanadátového činidla. Absorbance takto vzniklého žlutého roztoku je měřena spektrofotometricky při 430 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními spektrofotometrickými stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu fosforu:

do 5 %

3 % relat.

nad 5 %

0,15 %

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

7.2. Stanovení obsahu hořčíku**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu hořčíku v krmivech. Metoda je vhodná zejména pro obsahy do 5 %.

Vzorek po zpopelnění je rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové. Jestliže nejsou přítomny organické látky, je vzorek rozpuštěn přímo v kyselině chlorovodíkové. Roztok je naředěn a obsah hořčíku je stanoven atomovou absorpční spektrofotometrií při 285,2 nm pomocí standardních roztoků.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 5 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

7.3. Stanovení obsahu draslíku**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu draslíku v krmivech .

Vzorek je zpopelněn, popel rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové. Obsah draslíku v roztoku je stanoven plamenovou fotometrií v přítomnosti chloridu cesného a dusičnanu hlinitého. Přídavek těchto látek z velké části odstraňuje interferenci rušivých prvků.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

7.4. Stanovení obsahu sodíku**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu sodíku v krmivech-

Vzorek je zpopelněn, popel rozpuštěn v kyselině chlorovodíkové. Obsah sodíku v roztoku je stanoven plamenovou fotometrií v přítomnosti chloridu cesného a dusičnanu hlinitého. Přídavek těchto látek z velké části odstraňuje interferenci rušivých prvků.

Opakovatelnost

Nestanovena

Reprodukovatelnost

Nestanovena

7.5. Stanovení obsahu ve vodě rozpustných chloridů

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení ve vodě rozpustných chloridů (vyjádřených jako chlorid sodný) v krmivech. Je vhodná pro všechna krmiva.

Chloridy jsou rozpuštěny ve vodě. Jestliže produkt obsahuje organické látky, je vyčeren. Roztok je slabě okyselen kyselinou dusičnou a chloridy jsou vysráženy jako chlorid stříbrný přidávkem roztoku dusičnanu stříbrného. Přebytek dusičnanu stříbrného je titrován roztokem thiokyanatanu amonného podle Volharda.

Opakovatelnost

Nestanovena

Reprodukovatelnost

Nestanovena

7.6. Stanovení obsahu celkových uhličitánů

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu uhličitánů (vyjádřeno jako uhličitan vápenatý) ve většině krmiv.

Obsah celkových uhličitánů se stanoví po rozkladu vzorku kyselinou chlorovodíkovou a vzniklý oxid uhličitý se změří v kalibrované trubici a jeho objem se porovná s objemem plynu uvolněného za stejných podmínek ze známého množství uhličitanu vápenatého.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

7.7. Stanovení celkového obsahu síry

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu síry v krmivech. Je vhodný pro všechny obsahy síry v krmivech.

Obsah síry se stanoví v chloridovém výluhu po zpopelnění vzorku vážkově jako síran barnatý.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

7.8. Stanovení obsahu vápníku

Účel, rozsah a princip

Metoda umožňuje stanovení obsahu vápníku v krmivech.

Vzorek se zpopelní, popel se rozpustí v kyselině chlorovodíkové a vápník se vysráží jako šťavelan vápenatý. Sraženina se rozpustí v kyselině sírové a uvolněná kyselina šťavelová se titruje manganistanem draselným.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

8. Mikroprvky

8.1. Stanovení obsahů železa, mědi, manganu a zinku

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu železa, mědi, manganu a zinku.

Vzorek se rozpustí v kyselině chlorovodíkové, nebo se jinak odstraní organická matrice. Železo, měď, mangan a zinek se po vhodném naředění stanoví atomovou absorpční spektrofotometrií.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu mědi, železa, manganu a zinku:

do 50 mg/kg	5 mg/kg
od 50 do 100 mg/kg	10 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	10 mg/kg
nad 200 mg/kg	5 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti pro stanovení železa je 20 mg/kg, pro stanovení mědi je 10 mg/kg, pro stanovení manganu je 20 mg/kg, pro stanovení zinku je 20 mg/kg.

9. Kyselost

9.1. Stanovení volné, vázané a celkové kyselosti vodního výluhu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení volné, vázané i celkové kyselosti vodního výluhu. Je použitelný pro všechna krmiva.

Volná kyselost vodního výluhu se stanoví přímo alkalimetrickou titrací vodního výluhu vzorku do hodnoty pH = 8,5 nebo na indikátor fenolftalein.

Vázaná kyselost vodního výluhu se stanoví po uvolnění vazeb vnitřní neutralizace

formaldehydem alkalimetrickou titrací do hodnoty pH = 8,5 nebo na indikátor fenolftalein.

Celková kyselost vodního výluhu se určí součtem výsledků volné a vázané kyselosti vodního výluhu.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 15 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

9.2. Stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích. Je použitelný pro všechny druhy mléčných krmných směsí a všechny obsahy kyselosti.

Kyselost vodního výluhu se stanoví ve vodním výluhu vzorku přímo alkalimetrickou titrací na indikátor fenolftalein pomocí určení bodu ekvivalence srovnávacím roztokem kobaltnaté soli.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10. Nežádoucí látky

10.1. Stanovení obsahu kyanovodíku

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu kyanovodíku volného i vázaného v glukosinolátech v krmivech, zejména v lněném semeni, maniokové mouce a v některých druzích bobů.

Vzorek se rozmíchá ve vodě, kyanovodík se uvolní enzymaticky a vodní parou se predestiluje do okyseleného roztoku dusičnanu stříbrného. Kyanid stříbrný se oddělí filtrací a zbylý dusičnan stříbrný se stanoví titračně thiokyanatanem amonným.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.2. Stanovení obsahu glukosinolátů v řepce

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení nejdůležitějších glukosinolátů v řepce a jejích

produktech.

Glukosinoláty se extrahují horkým methanolem a po přečištění a enzymatické desulfataci na ionexové pryskyřici se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elučním gradientem a UV detekcí.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.3. Stanovení obsahu 5-vinyl-2-thiooxazolidonu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vinylthiooxazolidonu (VOT) v krmivech a je použitelný pro obsahy od 200 mg/kg.

Ze vzorku krmiva je enzymaticky uvolněn 2-hydroxy-3-butenyl-isothiokyanát, ze kterého vzniká VOT a jeho obsah se stanoví metodou plynové chromatografie (GC) nebo vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu vinylthiooxazolidonu .

do 1000 mg/kg	24 mg/kg
od 1 000 do 1 500 mg/kg	36 mg/kg
nad 1 500 mg/kg	45 mg/kg

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí pro všechny obsahy 5-vinyl-2-thiooxazolidonu překročit 20 % relat.

10.4. Stanovení obsahu kyseliny erukové

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny erukové ve všech druzích rostlinných tuků a olejů různého stupně čištění. Obsah kyseliny erukové (kyselin cis, trans-11 dokosenové a cis, trans 13-dokosenové) je vyjádřen jako hmotnostní podíl mastných kyselin C 22 : 1 z celého spektra mastných kyselin ve vzorku.

Obsah kyseliny erukové se stanoví po esterifikaci mastných kyselin metodou plynové chromatografie.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.5. Stanovení obsahu olova a kadmia

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu olova a kadmia v krmivech. Metoda není vhodná pro premixy.

Obsah olova a kadmia se stanoví po mineralizaci vzorku metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS).

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými metodou AAS na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu olova .

od 1 do 3 mg/kg	25 % relat.
od 3 do 10 mg/kg	0,75 mg/kg
nad 10 mg/kg	7,5 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými metodou AAS ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu olova:

od 1 do 3 mg/kg	50 % relat.
od 3 do 5 mg/kg	1,5 mg/kg
od 5 do 10 mg/kg	30 % relat.
od 10 do 20 mg/kg	3 mg/kg
od 20 do 40 mg/kg	15 % relat.
od 40 do 60 mg/kg	6 mg/kg
nad 60 mg/kg	10 % relat.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými metodou AAS na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu kadmia .

od 0,1 do 0,5 mg/kg	30 % relat.
od 0,5 do 1 mg/kg	0,15 mg/kg
nad 1 mg/kg	15 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými metodou AAS ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu kadmia:

od 0,1 do 0,2 mg/kg	50 % relat.
od 0,2 do 0,4 mg/kg	0,1 mg/kg
od 0,4 do 1 mg/kg	25 % relat.
od 1 do 2,5 mg/kg	0,25 mg/kg
nad 2,5 mg /kg	10 % relat.

10.6. Stanovení obsahu ricinových slupek

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu ricinových slupek v krmivech a zejména v olejnatých semenech.

Ricinové slupky se uvolní vyvařením zkušebního vzorku v kyselém a alkalickém prostředí a jejich obsah se stanoví vážkově.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.7. Stanovení obsahu reziduí organochlorových pesticidů

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu DDT, DDE, DDD, HCB, alfa, beta, gamma, delta izomerů HCH, aldrinu, dieldrinu, endrinu, isodrinu, heptachloru, endosulfanu a chlordanu v krmivech.

Residua organochlorových pesticidů se extrahují z krmiv vhodným rozpouštědlem a přečištěný extrakt se analyzuje metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.8. Stanovení obsahu indikačních kongenerů polychlorovaných bifenyků (PCB)

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu sedmi indikačních kongenerů PCB (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) v krmivech.

Residua indikačních kongenerů PCB se extrahují z krmiv vhodným rozpouštědlem a přečištěný extrakt se analyzuje metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10. 9. Stanovení obsahu toxaphenu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu persistentních kongenerů toxaphenu (P 26, 50, 62) v krmivech.

Rezidua toxaphenu se extrahují z krmiv nepolárním rozpouštědlem, vícestupnovým čištěním na sloupci vhodných sorbentů se odstraní nečistoty a přebytek ostatních chlorovaných látek a obsah persistentních kongenerů toxaphenu se stanoví metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.10. Stanovení obsahu rtuti

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení rtuti v krmivech.

Rtuť v krmivech se stanoví metodou studených par na rtuťovém analyzátoru TMA (AMA).

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit pro všechny obsahy rtuti 10,9 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.11. Stanovení obsahu aflatoxinu B₁

Účel, rozsah a princip

Pro stanovení aflatoxinu B₁ jsou popsány Metoda A a Metoda B :

Metoda A

Metoda dává možnost stanovit obsah aflatoxinu B₁ v surovinách a v jednosložkových krmivech. Metoda nemůže být použita za přítomnosti slupek citrusu. Mez stanovitelnosti je 0,01 mg/kg. Za přítomnosti interferujících látek je nutné opakovat analýzu Metodou B (vysokoúčinná kapalinová chromatografie).

Vzorek se extrahuje chloroformem. Extrakt se zfiltruje a alikvotní díl se přečistí na chromatografické koloně se silikagelem. Eluát se odpaří a zbytek se rozpustí v definovaném objemu chloroformu nebo ve směsi benzenu a acetonitrilu. Alikvotní podíl roztoku se analyzuje metodou tenkovrstvé chromatografie. Množství aflatoxinu B₁ se určí po ozáření UV lampou, buď vizuálně, nebo fluorometricky porovnáním se známým množstvím aflatoxinu B₁. Totožnost aflatoxinu B₁ extrahovaného z krmiva musí být potvrzena určeným postupem

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu aflatoxinu B₁

od 10 do 20 µg/kg

25 % relat. z nejvyššího výsledku

od 20 do 50 µg/kg	5 µg/kg
nad 50 µg/kg	10 % relat. z nejvyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu aflatoxinu

od 10 do 20 µg/kg	50 % relat.
od 20 do 50 µg/kg	10 µg/kg
nad 50 µg/kg	20 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 10 µg/kg.

Metoda B

Metoda se používá pro stanovení aflatoxinu B₁ v živočišných krmivech včetně krmiv obsahujících citrusovou slupku. Mez stanovitelnosti je 0,001 mg/kg.

Vzorek se extrahuje chloroformem. Extrakt se zfiltruje a alikvotní podíl se přečistí na florisilové kolonce a potom na kolonce C₁₈. Konečná separace a stanovení se provede vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi C₁₈, následné postkolonové derivatizaci vodným roztokem jodu a fluorescenční detekci.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 11 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu aflatoxinu B₁:

do 10 µg/kg	50 % relat.
od 20 µg/kg do 50 µg/kg	10 µg/kg
nad 50 µg/kg	20 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 1 µg/kg.

10.12. Stanovení obsahu arsenu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení arsenu v krmivech.

Ve vzorku se po rozkladu kyselinou dusičnou v uzavřeném systému stanoví obsah arsenu metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) s hydridovou technikou.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu arsenu nad 1 mg/kg hodnotu 6 % relativních.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.13. Stanovení obsahu gossypolu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu volného a celkového gossypolu a chemicky příbuzných látek v koncentraci nad 20 mg/kg v bavlníku a krmných směsích, které bavlník obsahují.

Gossypol se extrahuje buď za přítomnosti 3-amino-1-propanolu (při stanovení volného gossypolu) nebo dimethylformamidu (při stanovení celkového gossypolu). Gossypol je reakcí s anilinem převeden na gossypol-dianilid a absorbance roztoku je měřena při 440 nm.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

10.14. Stanovení obsahu theobrominu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení theobrominu v krmivech.

Obsah theobrominu se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem chloroform-amoniak metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

11. Zkoušení siláží**11.1. Zkoušení jakosti siláží****Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro zkoušení jakosti konzervace silážovaných krmiv. Uvedené postupy zkoušení jsou použitelné pro všechny druhy silážovaných krmiv.

Ze vzorku siláže se připraví vodní výluh. Ve výluhu se určí hodnota pH elektrometricky, obsah amoniaku se stanoví difusní Conwayovou metodou, obsah alkoholu se stanoví metodou plynové chromatografie a obsah silážních kyselin metodou kapilární izotachoforézy.

Stanovení stlačitelnosti u řízkových siláží se provádí z upraveného vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit

u stanovení	pH	0,05
	formolové titrace	0,1 g/kg
	obsahu amoniaku jako NH ₃	0,1 g/kg
	obsahu silážních kyselin	1,0 g/kg

U stanovení obsahu alkoholu a stlačitelnosti siláží opakovatelnost nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.“

20. Příloha č. 10 zní:

„Příloha č. 10 k vyhlášce č. 124/2001 Sb.

Metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam chemických metod laboratorního zkoušení doplňkových látek, premixů a krmných směsí s doplňkovými látkami a premixy

1. Stimulátory růstu

- 1.1. Stanovení obsahu avilamycinu
- 1.2. Stanovení obsahu olachindoxu, metoda převzatá ze směrnice Komise 98/64/ES
- 1.3. Stanovení obsahu monensinu
- 1.4. Stanovení obsahu salinomycinu
- 1.5. Stanovení obsahu tylosinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 72/199/EHS
- 1.6. Stanovení obsahu zinkbacitracinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 84/4/EHS
- 1.7. Stanovení obsahu flavofosfolipolu, metoda převzatá ze směrnice Komise 78/633/EHS
- 1.8. Stanovení obsahu avoparcinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 81/715/EHS
- 1.9. Stanovení obsahu monensinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 81/715/EHS
- 1.10. Stanovení obsahu spiramycinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 84/425/EHS
- 1.11. Stanovení obsahu virginiamycinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 84/4/EHS

2. Antikokcidika

- 2.1. Stanovení obsahu amprolia, metoda převzatá ze směrnice Komise 99/27/ES
- 2.2. Stanovení obsahu maduramicinu
- 2.3. Stanovení obsahu methylbenzochátu, metoda převzatá ze směrnice Komise 93/117/ES

- 2.4. Stanovení obsahu narasinu
- 2.5. Stanovení obsahu nikarbazinu
- 2.6. Stanovení obsahu robenidinu, metoda převzatá ze směrnice Komise 93/117/ES
- 2.7. Stanovení obsahu meticlorpindolu
- 2.8. Stanovení obsahu salinomycinu - je uvedeno v Příloze 10, část 1
- 2.9. Stanovení obsahu monensinu - je uvedeno v Příloze 10, část 1
- 2.10. Stanovení obsahu halofuginonu, metoda převzatá ze směrnice Komise 93/70/EHS
- 2.11. Stanovení obsahu ethopabátu
- 2.12. Stanovení obsahu semduramicinu
- 2.13. Stanovení obsahu diclazurilu, metoda převzatá ze směrnice Komise 99/27/ES
- 2.14. Stanovení obsahu carbadoxu, metoda převzatá ze směrnice Komise 99/27/ES
- 2.15. Stanovení obsahu olachindoxu je uvedeno v Příloze 10, část 1
- 2.16. Stanovení obsahu lasalocidu, metoda převzatá ze směrnice Komise 99/76/ES

3. Chemoterapeutika

- 3.1. Stanovení obsahu dimetridazolu

4. Vitaminy

- 4.1. Stanovení obsahu cholinu
- 4.2. Stanovení obsahu pantothenanu vápenatého
- 4.3. Stanovení obsahu vitaminu B1, B2, B6
- 4.4. Stanovení obsahu vitaminu B2
- 4.5. Stanovení obsahu vitaminu B6
- 4.6. Stanovení obsahu vitaminu A, metoda převzatá ze směrnice Komise 2000/45/ES
- 4.7. Stanovení obsahu vitaminu E, metoda převzatá ze směrnice Komise 2000/45/ES
- 4.8. Stanovení obsahu vitaminu D

5. Mikroprvky

- 5.1. Stanovení obsahu mědi, železa, manganu a zinku - je uvedeno v příloze 9, část 8
- 5.2. Stanovení obsahu kobaltu
- 5.3. Stanovení obsahu selenu

6. Výpočty

- 6.1. Vyhodnocování a výpočet výsledků stanovení obsahu doplňkových látek pro difúzní plotnové postupy

7. Barviva

- 7.1. Stanovení obsahu β -karotenu spektrofotometrickou metodou

8. Mikrobiotika

- 8.1. Stanovení počtu zárodků bakterií rodu *Streptococcus*
- 8.2. Stanovení počtu zárodků bakterií rodu *Bacillus*

1. Stimulátory růstu

1.1. Stanovení obsahu avilamycinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu avilamycinu v krmivech a premixech.

Obsah avilamycinu se stanoví po extrakci ze zkušebního vzorku chloroformem a přečištění extraktu na pevné fázi Silica, vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi C18 s gradientovou elucí a UV detekcí při $\lambda = 295 \text{ nm.}$).

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

1.2. Stanovení obsahu olachindoxu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu olachindoxu v krmivech. Obsah olachindoxu se stanoví po extrakci směsí methanol – voda vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s UV-detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu olachindoxu 10 až 20 mg/kg 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 5 mg/kg.

1.3. Stanovení obsahu monensinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu monensinu v krmivech a premixech.

Obsah monensinu se stanoví po extrakci směsným rozpouštědlem, extrakt je přečištěn na pevné fázi a takto přečištěný extrakt je rozpuštěn v definovaném objemu mobilní fáze. Monensin se stanovuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi a po postkolonové derivatizaci s p-dimethylaminobenzaldehydem při 90 °C je detekován UV-detektorem při vlnové délce 600 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit

při obsahu monensinu:

do 25 mg/kg	20 % relat.
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
od 50 do 100 mg/kg	10 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	10 mg/kg
nad 200 mg/kg	5 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu monensinu :

do 25 mg/kg	40 % relat.
od 25 do 50 mg/kg	10 mg/kg
od 50 do 100 mg/kg	20 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	20 mg/kg
nad 200 mg/kg	10 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,2 mg/kg.

1.4. Stanovení obsahu salinomycinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu salinomycinu v krmivech a premixech.

Obsah salinomycinu se stanoví po extrakci směsným rozpouštědlem, extrakt je přečištěn na pevné fázi a takto přečištěný extrakt je rozpuštěn v definovaném objemu mobilní fáze. Salinomycin se stanovuje vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi a po postkolonové derivatizaci s p-dimethylaminobenzaldehydem při 90 °C je detekován UV-detektorem při vlnové délce 600 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu salinomycinu:

do 25 mg/kg	20 % relat.
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
od 50 do 100 mg/kg	10 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	10 mg/kg
nad 200 mg/kg	5 % relat

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu salinomycinu :

do 25 mg/kg	40 % relat.
-------------	-------------

od 25 do 50 mg/kg	10 mg/kg
od 50 do 100 mg/kg	20 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	20 mg/kg
nad 200 mg/kg	10 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 1,4 mg/kg.

1.5. Stanovení obsahu tylosinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení tylosinu v krmivech, koncentrátech a premixech od obsahu 2 mg/kg.

Vzorek se podrobí působení fosfátového pufru pH 8 zahřátého na 80 °C, potom se extrahuje methanolem. Po odstředění se extrakt naředí a jeho antibiotická aktivita se stanoví změřením difúze tylosinu na agaru s *Kocuria rhizophila* (CCM 552). V přítomnosti mikroorganismu se difúze projevuje tvorbou inhibičních zón. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 10 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 2 mg/kg.

1.6. Stanovení obsahu zinkbacitracinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení zinkbacitracinu v krmivech a premixech.

Vzorek se extrahuje při pH 2 směsí methanol-voda-kyselina chlorovodíková a roztokem síranu sodného. Přidání síranu sodného slouží k vysrážení rozpustných solí mědi, které mohou při stanovení rušit. Extrakt se upraví na pH 6,5, zakoncentruje se (je-li to nezbytné) a naředí. Jeho antibiotická aktivita se stanovuje měřením difúze zinkbacitracinu v agaru, do něhož byl naočkován mikroorganismus *Micrococcus luteus* (CCM 732). Difúze se projevuje vytvořením inhibičních zón. Průměr těchto zón se považuje za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika v rozsahu použitých koncentrací.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu zinkbacitracinu:

od 5 do 10 mg/kg	2 mg/kg
od 10 mg/kg do 25 mg/kg	20 % relat. z vyššího výsledku

od 25 mg/kg do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 5 mg/kg.

1.7. Stanovení obsahu flavofosfolipolu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení flavofosfolipolu v krmivech, koncentrátech a premixech.

Vzorek se extrahuje zředěným methanolem za varu pod zpětným chladičem. Po odstředění se extrakt přečistí (pokud je to třeba) na ionexu a naředí. Antibiotická aktivita vzorku se stanoví měřením difúze flavofosfolipolu do agarové půdy, zaočkované mikroorganismem *Staphylococcus aureus* (CCM 2022). Difúze se projeví tvorbou inhibičních zón. Průměr těchto zón se považuje za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika v rozsahu použitých koncentrací.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí při obsahu flavofosfolipolu překročit

od 1 do 2 mg/kg	0,5 mg/kg
od 2 do 10 mg/kg	25 % relat. z vyššího výsledku
od 10 do 25 mg/kg	20 % relat. z vyššího výsledku
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg.

1.8. Stanovení obsahu avoparcinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení avoparcinu v krmivech a premixech.

Přítomnost polyetherických antibiotik může na stanovení působit rušivě.

Vzorek se extrahuje směsí aceton-voda-kyselina chlorovodíková. Antibiotická aktivita extraktu se stanoví měřením difúze avoparcinu v živném agaru zaočkovaném mikroorganismem *Bacillus subtilis* (CCM 1999). Difúze se dokáže vznikem inhibičních zón

mikroorganismu. Průměr těchto zón se považuje za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika v rozsahu použitých koncentrací.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu avoparcinu:

do 10 mg/kg	2 mg/kg
od 10 do 25 mg/kg	20 % relat. z vyššího výsledku
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat. z vyššího výsledku

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 2 mg/kg.

1.9. Stanovení obsahu monensinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu monensinu v krmivech a premixech.

Vzorek se extrahuje 90 % methanolem. Extrakt se podrobí vhodnému postupu podle obsahu monensinátu sodného ve vzorku. Jeho antibiotická aktivita se stanoví měřením difúze monensinátu sodného v agarové živné půdě zaočkované mikroorganismem *Bacillus subtilis* (CCM 1999). Difúze se projeví vznikem inhibičních zón testovacího organismu. Průměr těchto inhibičních zón je v rozsahu použitých koncentrací považován za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika. Citlivost Metodau je snížena přítomností sodných iontů.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu monensinu:

do 25 mg/kg	20 % relat. z vyššího výsledku
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Nestanovena

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 10 mg/kg.

1.10. Stanovení obsahu spiramycinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu spiramycinu v krmivech a premixech.

Vzorek se extrahuje směsným roztokem methanol-fosfátouhličitanovým tlumivým roztokem pH 8,0. Extrakt se dekantuje nebo odstředí a naředí. Antibiotická aktivita se stanoví měřením difúze spiramycinu v agarové půdě zaočkované mikroorganismem *Bacillus subtilis* (CCM

1999). Difúze se projeví tvorbou inhibičních zón mikroorganismu. Průměr zón se považuje za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika v rozsahu použitých koncentrací.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu spiramycinu:

do 10 mg/kg	2 mg/kg
od 10 do 25 mg/kg	20 % relat. z vyššího výsledku
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg.

1.11. Stanovení obsahu virginiamycinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu virginiamycinu v krmivech a premixech.

Vzorek je extrahován methanolickým roztokem Tween 80. Extrakt se dekantuje nebo odstředí a potom vhodně naředí. Jeho antibiotická aktivita se stanovuje měřením difúze virginiamycinu v agaru, do něhož byl naočkován mikroorganismus *Kocuria rhizophila* (CCM 552). Difúze se projevuje vytvořením inhibičních zón. Průměr těchto zón se považuje za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotika v rozsahu použitých koncentrací.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu virginiamycinu:

do 10 mg/kg	2 mg/kg
od 10 do 25 mg/kg	20 % relat. z vyššího výsledku
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti 2 mg/kg.

2. Antikokcidika

2.1. Stanovení obsahu amprolia

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu amprolia v krmivech a premixech. Mez detekce je 1 mg/kg.

Vzorek se extrahuje směsí methanol - voda. Po zředění extraktu mobilní fází a membránové filtraci se obsah amprolia stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s výměnou kationtů a s UV detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu amprolia :

od 25 do 500 mg/kg	15 % relat. z vyššího výsledku
od 500 do 1000 mg/kg	75 mg/kg
nad 1 000 mg/kg	7,5 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 25 mg/kg.

2.2. Stanovení obsahu maduramicinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu maduramicinu v premixech.

Obsah maduramicinu se stanoví po extrakci vzorku extrakční směsí, následném přečištění na pevné fázi a postkolonové derivatizaci vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce při vlnové délce 598 nm

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu maduramicinu :

do 5 mg/kg	10 % relat.
od 800 do 1200 mg/kg	5 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu maduramicinu:

do 10 mg/kg	30 % relat.
od 10 do 30 mg/kg	3 mg/kg.
nad 30 mg/kg	10 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,9 mg/kg.

2.3. Stanovení obsahu methylbenzochátu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu methylbenzochátu v krmivech a premixech.

Obsah methylbenzochátu se stanoví po extrakci vzorku methanolem roztokem methansulfonové kyseliny, po přečištění extrakcí dichlormethanem je izolován na chromatografickém ionexovém sloupci a znovu extrahován dichlormethanem, nakonec stanoven vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu methylbenzochátu od 4,0 do 20 mg/kg hodnotu 10 % relat. z vyššího výsledku.

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg.

2.4. Stanovení obsahu narasinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu narasinu v krmivech a premixech.

Obsah narasinu se stanoví po extrakci směsným rozpouštědlem, extrakt je přečištěn na pevné fázi a takto přečištěný extrakt je rozpuštěn v definovaném objemu mobilní fáze. Narasin se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi a po postkolonové derivatizaci s p-dimethylaminobenzaldehydem při 90 °C je detekován UV-detektorem při vlnové délce 600 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu narasinu :

do 25 mg/kg	20 % relat.
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
od 50 do 100 mg/kg	10 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	10 mg/kg
nad 200 mg/kg	5 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu narasinu

do 25 mg/kg	40 % relat.
od 25 do 50 mg/kg	10 mg/kg
od 50 do 100 mg/kg	20 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	20 mg/kg

nad 200 mg/kg

10 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 1,4 mg/kg.

2.5. Stanovení obsahu nikarbazuinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení nikarbazuinu v krmivech a premixech.

Nikarbazin se stanoví po extrakci ze vzorku extrakčním roztokem acetonitril – voda naředěním mobilní fází vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) s isokratickou elucí na koloně C18 s UV detekcí při vlnové délce 351 nm.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

2.6. Stanovení obsahu robenidinu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení robenidinu v krmivech.

Vzorek se extrahuje okyseleným methanolem. Extrakt se vysuší a jeho alikvotní část se přechistí na koloně s oxidem hlinitým. Robenidin se eluuje z kolony methanolem, koncentruje se a na vhodný objem se upraví pomocí mobilní fáze. Obsah robenidinu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi pomocí UV detektoru.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí při obsahu robenidinu nad 15 mg/kg překročit 10 % relat. vyššího výsledku.

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 5 mg/kg.

2.7. Stanovení obsahu meticlorpindolu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu meticlorpindolu v krmivech a premixech.

Obsah meticlorpindolu se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem methanol-amoniak a po jeho převedení do mobilní fáze vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí při 265 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu meticlorpindolu .

do 100 mg/kg	5 % relat.
od 100 do 200 mg/kg	5 mg/kg

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu meticlorpindolu :

od 50 do 200 mg/kg	15 % relat.
--------------------	-------------

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 3,6 mg/kg.

2.8. Stanovení obsahu salinomycinu

Metoda stanovení obsahu salinomycinu je uveden v příloze č. 10, část 1.

2.9. Stanovení obsahu monensinu

Metoda stanovení obsahu monensinu je uveden v příloze č. 10, část 1.

2.10. Stanovení obsahu halofuginonu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu halofuginonu v krmivech a premixech.

Obsah halofuginonu se stanoví jako volná base po extrakci horkou vodou do ethylacetátu a následně se rozdělí jako hydrochlorid do vodného kyselého roztoku. Extrakt se přečistí na ionexové chromatografické koloně. Obsah halofuginonu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s UV-detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu halofuginonu do 3 mg/kg hodnotu 0,5 mg/kg.

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg.

2.11. Stanovení obsahu ethopabátu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu ethopabátu v krmivech a premixech.

Obsah ethopabátu se stanoví po extrakci vzorku methanolem a přečištění chromatografií na

pevné fázi vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s fluorescenční detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu ethopabátu:

do 1 mg/kg	40 % relat.
od 1 do 4 mg/kg	0,4 mg/kg
od 4 do 20 mg/kg	10 % relat.
od 20 do 1 000 mg/kg	nestanovena
nad 1 000 mg/kg	5 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu ethopabátu:

do 1 mg/kg	nestanovena
od 1 do 20 mg/kg	20 % relat.
od 20 do 1000 mg/kg	nestanovena
nad 1 000 mg/kg	15 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,03 mg/kg.

2.12. Stanovení obsahu semduramicinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu semduramicinu v krmivech a premixech.

Obsah semduramicinu se stanoví po extrakci vzorku extrakční směsí, následném přečištění na pevné fázi a postkolonové derivatizaci vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce při vlnové délce 598 nm.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

2.13. Stanovení obsahu diclazurilu

Účel, rozsah a princip

Metoda určuje podmínky pro stanovení obsahu diclazurilu v krmivech a premixech. Mez detekce je 0,1 mg/kg.

Vzorek se po přidání interního standardu extrahuje okyseleným methanolem. U krmiv se alikvotní část extraktu přečistí na SPE patroně C18. Diclazuril se z patronky eluuje směsí okyseleného methanolu a vody. Po odpaření se zbytek rozpustí ve směsi dimethylformamidu a vody. U premixů se extrakt odpaří a zbytek se rozpustí ve směsi dimethylformamidu a vody. Obsah diclazurilu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s ternárním gradientem a UV-detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu diclazurilu :

do 2,5 mg/kg	30 % relat. z vyššího výsledku
od 2,5 do 5 mg/kg	0,75 mg/kg
nad 5 mg/kg	15 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,5 mg/kg.

2.14 Stanovení obsahu carbadoxu

Účel, rozsah a princip

Metoda určuje podmínky pro stanovení obsahu carbadoxu v krmivech, premixech a doplňkových látkách. Mez detekce je 1 mg/kg.

Vzorek se zvlhčí vodou a extrahuje směsí methanol - acetonitril. Alikvotní podíl extraktu krmiva se po filtraci přečistí na koloně s oxidem hlinitým. Extrakt z premixů a doplňkových látek se přímo ředí na vhodnou koncentraci směsí voda - methanol - acetonitril. Obsah carbadoxu se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi s UV detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu carbadoxu 10 mg/kg a vyšším 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 10 mg/kg.

2.15. Stanovení obsahu olachindoxu

Metoda stanovení obsahu olachindoxu je uveden v příloze č. 10, část 1.

2.16. Stanovení obsahu lasalocidu

Účel, rozsah a princip

Metoda určuje podmínky pro stanovení obsahu sodné soli lasalocidu v krmivech, premixech a doplňkových látkách. Mez detekce je 5 mg/kg.

Lasalocid sodný se extrahuje ze vzorku okyseleným methanolem a stanoví se vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s fluorescenční detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu lasalocidu :

do 100 mg/kg	15 % relat. z vyššího výsledku
od 100 do 200 mg/kg	15 mg/kg
nad 200 mg/kg	7,5 % relat. z vyššího výsledku

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 30 mg/kg.

3. Chemoterapeutika

3.1. Stanovení obsahu dimetridazolu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dimetridazolu v krmivech a premixech.

Obsah dimetridazolu se stanoví po extrakci vzorku 90 % methanolem. Následně se přečistí na pevné fázi a stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí při 309 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu dimetridazolu:

od 3 do 30 mg/kg	15 % relat.
od 30 do 100 mg/kg	5 mg/kg
nad 100 mg/kg	5 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit při obsahu dimetridazolu:

od 3 do 25 mg/kg	20 % relat.
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 3 mg/kg.

4. Vitaminy

4.1. Stanovení obsahu cholinu

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu cholinu v krmivech a premixech.

Obsah cholinu se stanoví po hydrolýze vzorku hydroxidem barnatým a přečištění hydrolyzátu na ionexu na základě vzniku komplexu s reineckátem amonným v prostředí roztoku fosforečnanu sodného spektrofotometricky po rozpuštění komplexu v acetonu při vlnové délce 525 nm. Alternativně je možno provádět stanovení cholinu metodou ITP.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratorích nesmí překročit 10 % relat.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 20 mg/kg.

4.2. Stanovení obsahu pantothenanu vápenatého

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu pantothenanu vápenatého v premixech.

Obsah pantothenanu vápenatého se stanoví na základě stimulačního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Saccharomyces carlsbergensis* CCM 4288 (ATCC 9080) difúzním plotnovým Metodaem.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

4.3. Stanovení vitaminů B1, B2, B6

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vitaminů B1, B2, B6 v krmných směsích.

Vitaminy B1 (thiamin), B2 (riboflavin) a B6 (pyridoxin) se extrahují ze vzorku krmiva vodou a po hydrolýze kyselinou chloristou se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s využitím iontových párů na reverzní fázi. Detekce vitaminu B2, a B6 se provádí přímo fluorescenční detekcí, zatímco vitamin B1 se před detekcí nejprve oxiduje derivatizačním činidlem v reakční smyčce postkolonové derivatizace.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

4.4. Stanovení obsahu vitamínu B2**Účel, rozsah a princip**

Používají se dvě metody stanovení obsahu vitamínu B2 v premixech - metoda fluorometrická a metoda difúzně plotnová.

Obsah vitamínu B2 se stanoví fluorometricky v mírně okyseleném prostředí na základě fluorescence při vlnové délce 440 nm nebo difúzně plotnovou metodou na základě stimulačního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Lactobacillus rhamnosus* CCM 1825 (ATCC 7469).

Opakovatelnost

Pro metodu fluorometrickou nestanovena.

Pro metodu difúzní plotnovou:

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí při obsahu vitamínu B2 500 000 mg/kg překročit hodnotu 40 500 mg/kg.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

4.5. Stanovení obsahu vitamínu B6**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vitamínu B6 v premixech.

Vitamin B6 ve všech jeho formách se stanoví na základě stimulačního účinku na růst testovacího mikroorganismu kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* CCM 4228 (ATCC 9080) difúzním plotnovým způsobem.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

4.6. Stanovení obsahu vitaminu A

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vitaminu A v krmivech a premixech. Vitamin A zahrnuje all-trans retinol a jeho cis izomery, které se touto metodou stanoví. Obsah vitaminu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (IU) na kg. Mezinárodní jednotka odpovídá aktivitě 0,3 µg all-trans vitaminu A (alkohol) nebo 0,344 µg all-trans vitaminu A (acetát) nebo 0,550 µg all-trans vitaminu A (palmitát).

Vzorek se hydrolyzuje ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a vitamin A se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v methanolu a pokud je to nutné, naředí se na vhodnou koncentraci. Obsah vitaminu A se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí. Chromatografické parametry jsou vybrány tak, aby nedocházelo k separaci all-trans vitaminu A (alkohol) a jeho cis izomerů.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 2000 m.j./kg

4.7. Stanovení obsahu vitaminu E

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vitaminu E v krmivech a premixech. Obsah vitaminu E se vyjadřuje jako mg DL- α -tokoferol acetátu na kg. 1 mg DL- α -tokoferol acetátu odpovídá 0,91 mg DL- α -tokoferolu (vitamin E).

Vzorek se hydrolyzuje ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a vitamin E se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v methanolu a pokud je to nutné, naředí se na vhodnou koncentraci. Obsah vitaminu E se stanoví vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 15 % relat. z vyššího výsledku.

Reprodukovatelnost

Je uvedena u metody.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 2 mg/kg.

4.8. Stanovení obsahu vitaminu D

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vitamínu D v krmivech.

Vitamin D se stanoví po alkalické hydrolýze vzorku hydroxidem draselným za studena, následné extrakci do hexanu, přečištění na semipreparativní koloně Silica metodou HPLC. Frakce vitamínu D se zachytí, odpaří se k suchu a odparek se rozpustí v methanolu. V extraktu se stanoví obsah vitamínu D vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na analytické koloně s reverzní fází C18 s UV detekcí při 265 nm.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 20 % relat.

Reprodukovatelnost

Rozdíl mezi dvěma výsledky zkoušek stejného vzorku prováděnými ve dvou laboratořích nesmí překročit 30 % relat.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

5. Mikroprvky**5.1. Stanovení obsahu mědi, železa, manganu a zinku**

Metoda stanovení obsahu mědi, železa, manganu a zinku je uveden v příloze č. 9, část 8.

5.2. Stanovení obsahu kobaltu**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu kobaltu v krmivech.

Obsah kobaltu se stanoví po mineralizaci vzorku v chloridovém výluhu metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS).

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

5.3. Stanovení obsahu selenu.**Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení selenu v krmivech.

Ve vzorku se po rozkladu kyselinou dusičnou v uzavřeném systému stanoví obsah selenu metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS).

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

6. Výpočty**6.1. Vyhodnocování a výpočet výsledků stanovení obsahu doplňkových látek pro difúzně plotnové metody****Účel, rozsah a princip**

Metoda uvádí a specifikuje uzančně závazný způsob pro vyhodnocování a výpočet výsledků při stanovení obsahu doplňkových látek v krmivech a premixech pro difúzně plotnové metody.

Průměry inhibičních resp. stimulačních zón, vzniklých při stanovení doplňkových látek difusně plotnovou metodou, se měří s přesností nejméně na 0,1 mm. Ze souboru takto získaných hodnot se vypočítá aritmetický průměr pro každou koncentraci zkoušeného vzorku i standardu.

7. Barviva**7.1. Stanovení β -karotenu spektrofotometrickou metodou****Účel, rozsah a princip**

β -karoten je přírodní barvivo chemicky patřící do skupiny tetraterpenoidů a je provitaminem vitamínu A.

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu β -karotenu v krmivech.

Stanoví se po enzymatické hydrolýze směsí enzymů pepsin - trypsin (1:1) v alkalickém prostředí, rozpuštěním v acetonu a následnou extrakcí do hexanu, spektrofotometricky při vlnové délce 451 nm.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

Mez stanovitelnosti

Nestanovena.

8. Mikrobiotika**8.1. Stanovení počtu zárodků bakterií rodu *Enterococcus*****Účel, rozsah a princip**

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení počtu zárodků rodu *Streptococcus* skupiny D

(Enterococcus) v krmivech a premixech.

Stanovení počtu zárodků bakterií rodu Enterococcus se provádí na selektivních půdách podle Slanetze a Bartleye. Jako referenční půda se při stanovení používá další selektivní půda (např. KF agar) nebo u premixů vhodná neselektivní půda. Naočkované půdy jsou kultivovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Růst a počty kolonií se vyhodnocují po dvou a čtyřdenní kultivaci.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.

8.2. Stanovení počtu zárodků bakterií rodu Bacillus

Účel, rozsah a princip

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení počtu zárodků rodu Bacillus v krmivech.

Stanovení počtu zárodků bakterií rodu Bacillus se provádí anaerobní kultivací na krevním agaru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Počty kolonií, charakteristické pro dané mikroorganismy, se vyhodnocují po 18 - 24 hodinách.

Opakovatelnost

Nestanovena.

Reprodukovatelnost

Nestanovena.“.

21. V příloze č. 11 se pod nadpisem „Seznam postupů fyzikálního zkoušení krmiv“ slova „Název postupu“, „Označení postupu“ a písmeno „A“ zrušují.

22. V příloze č. 12 se pod nadpisem „Seznam postupů smyslového zkoušení krmiv“ slova „Název postupu“, „Označení postupu“ a písmeno „A“ zrušují.

23. V příloze č. 13 se pod nadpisem „Seznam postupů speciálního zkoušení krmiv“ slova „Název postupu“, „Označení postupu“ a písmeno „A“ zrušují.

24. V příloze č. 13 body 5 a 6 znějí:

„5. Stanovení botanické čistoty, nečistot a škodlivých nečistot u krmných surovin.

Princip

Mechanicky nebo ručně se z poměrné části konečného vzorku oddělí botanické nečistoty (přirozené neškodné nečistoty a škodlivé nečistoty a škodlivá olejnatá semena, tj. semena a plody plevelů uvedené v příloze č. 3 vyhlášky č. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění zákona č. 244/2000 Sb., ve znění pozdějších předpisů) a cizí předměty a vyjadřují se jako procentní podíl.

6. Podmínky pro mikroskopické stanovení, identifikaci nebo určování složek živočišného původu v krmivech.

Účel, rozsah a princip

Tato metoda je určena pro stanovení složek živočišného původu (definovaných jako produkty zpracování těl nebo částí těl savců, ptáků a ryb) v krmivech, prováděné pomocí mikroskopického zkoušení v rámci systému koordinovaného inspekčního programu v oblasti výživy zvířat v souladu s § 16 zákona č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.

Stanovení prováděná podle této metody jsou používána k provádění odborného dozoru a zkoušení krmiv. Ke zlepšení určování určitých typů živočišných konstituentů nebo určení původu živočišné složky mohou být použity v další zkoušce upravené nebo alternativní metody. Při zkoušení určitých specifických živočišných konstituentů jako např. plasma nebo kosti v tuku (viz také bod 9) mohou být také použity další metody za předpokladu, že tyto zkoušky budou provedeny jako doplněk ke zkouškám uváděným v koordinačním inspekčním programu.

Citlivost stanovení v krmivech může být v závislosti na původu složek živočišného původu velmi nízká – 0,01 %.

K identifikaci se použije vhodně upravený reprezentativní vzorek, odebraný podle postupu uvedeného v § 1 až 6. Dále uvedená metoda je vhodná pro krmiva s nízkým obsahem vlhkosti. Krmiva s vyšším obsahem vlhkosti než 14 % musí být předem předsušena. Zejména některá krmiva a krmné suroviny (např. tuky a oleje) vyžadují uvedenou úpravu. Složky živočišného původu jsou identifikovány na základě typických, mikroskopicky identifikovatelných charakteristik (např. svalových vláken nebo jiných částí masa, chrupavek, kostí, rohů, chlupů, štetin, krve, peří, vaječných skořápek, rybích kostí, šupin).

Identifikace musí být provedena jak v sítové frakci, tak v koncentrovaném sedimentu vzorku.“.

25. V příloze č. 16 se v bodu 2. slova „dimetridazol nebo“ zrušují.

26. V příloze č. 16 se v bodu 8. slova „a pro lasalocid pod bodem 2.16. a pro dimetridazol pod bodem 3.1.“ nahrazují slovy „pro lasalocid pod bodem 2.16.“.

27. V příloze č. 16 se v bodu 8. slova „Pro doplňkové látky dimetridazol a lasalocid, které jsou ustanoveny“ nahrazují slovy „Pro doplňkovou látku lasalocid, která je ustanovena“.

28. V příloze č. 16 tabulka zní:

„Doplňková látka	Obsah mg/kg	Opakovatelnost
Lasalocid	od 0,5 do 15	10 % relat.
	od 50 do 150	5 % relat.“.

29. V příloze č. 16 se v bodu 11. slovo „ $F_{0,05}$ “ nahrazuje slovem „ $F_{0,1}$ “.

30. Příloha č. 17 zní:

„Příloha č. 17 k vyhlášce č. 124/2001 Sb.

Způsob hodnocení krmiv a premixů při křížové kontaminaci doplňkovými látkami

1. Při ověřování křížové kontaminace premixů doplňkovými látkami se údaje zjištěných hodnot považují za ještě vyhovující, pokud nepřekračují toleranci desetinásobku hodnoty meze stanovitelnosti uvedené v příloze č. 9 a 10.
2. Při ověřování křížové kontaminace krmiv doplňkovými látkami se údaje zjištěných hodnot považují za ještě vyhovující, pokud nepřekračují toleranci ve výši meze stanovitelnosti uvedené v příloze č. 9 a 10.“

31. Příloha č. 18 zní:

„Příloha č. 18 k vyhlášce č. 124/2001 Sb.

Část 1 : Metody odběru vzorků pro odborný dozor a zkoušení obsahu dioxinů (PCDD/PCDF) a určování dioxinům podobných PCB v některých krmivech

1. Účel a oblast působnosti

Vzorky určené k provádění odborného dozoru a zkoušení obsahu dioxinů (PCDD/PCDF), jakož i obsahu dioxinům podobných polychlorovaných bifenyly (Tabulka Světové zdravotnické organizace) v krmivech se odebírají v souladu s § 1 až 6 vyhlášky č. 124/2001 Sb. Takto získané souhrnné vzorky se považují za reprezentativní pro vzorkovanou partii a subpartii, z nichž byly odebrány. Dodržení maximálních povolených hodnot se posuzuje na základě obsahů stanovených v laboratorních vzorcích.

2. Shoda partie nebo subpartie s povolenými hodnotami

Pokud je výsledek prvního stanovení o méně než 20 % vyšší nebo nižší než je povolená maximální hodnota, musí kontrolní laboratoř pro potvrzení výsledku provést v laboratorním vzorku opakované stanovení a vypočítat průměr z obou výsledků. Partie se uznává, jestliže je výsledek prvního stanovení o více než 20 % nižší než maximální povolená hodnota a nebo pokud bylo nutno provést opakované stanovení, jestliže průměr vypočtený z obou stanovení odpovídá maximální povolené hodnotě stanovené v příloze č. 3 vyhlášky č. 451/2000 Sb.

Tabulka Světové zdravotnické organizace (WHO) pro hodnocení nebezpečnosti dioxinů a dioxinům podobných polychlorovaných bifenyly pro člověka vyjádřených pomocí TEF (Toxic Equivalency Factors), vycházející ze závěrů kongresu WHO ve Stockholmu, Švédsko, 15. až 18. června 1997 (Van den Berg a jiní, (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 106(12), 775).

Kongener	Hodnota TEF	Kongener	Hodnota TEF
Dibenzo-p-dioxiny (PCDD)		„Dioxinům podobné“ PCB: non-ortho PCB + mono-ortho PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-ortho PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001

1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		
Dibenzofurany (PCDF)		Mono-ortho PCB	
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 105	0,0001
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 114	0,0005
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 118	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Použité zkratky: T = tetra; Pe = penta; Hx = hexa; Hp = hepta; O = okta;
CDD = chlorodibenzo-p-dioxin; CDF = chlorodibenzofuran; CB = chlorobifenyl.

Část 2 : Příprava vzorků a požadavky na metody analytického zkoušení používané při provádění odborného dozoru a zkoušení obsahu dioxinů (pcdd/pcdf) a stanovení dioxinům podobných pcb v některých krmivech

1. Cíl a oblast použití

Tyto požadavky na metody analytického zkoušení se používají pro stanovení dioxinů (polychlorovaných dibenzo-p-dioxinů (PCDD) a polychlorovaných dibenzofuranů (PCDF)) a dioxinům podobných polychlorovaných bifenylů (PCB) v krmných surovinách a krmivech.

Sledování přítomnosti dioxinů v krmivech se provádí pomocí strategie zahrnující vyhledávací metodu pro výběr vzorků s obsahem dioxinů a dioxinům podobných PCB o méně než 30 až 40 % nižším nebo vyšším než je množství, které je předmětem zájmu. Koncentrace dioxinů ve vzorcích s významným obsahem se stanoví/potvrdí ověřovací metodou.

Vyhledávací metody jsou metody, které se používají ke zjišťování přítomnosti dioxinů a dioxinům podobných PCB v množství, které je předmětem zájmu. Tyto metody jsou schopné rychle zpracovat velký objem vzorků a používají se k prověření velkého množství vzorků z hlediska možných pozitivních výsledků. Jsou speciálně navrženy tak, aby vyloučily falešně negativní výsledky.

Ověřovací metody jsou metody, které poskytují úplné nebo doplňkové informace umožňující jednoznačnou identifikaci a kvantifikaci dioxinů a dioxinům podobných PCB na uvažované úrovni, která je předmětem zájmu.

2. Obecně

Protože vzorky z životního prostředí a biologické vzorky (včetně vzorků krmných surovin/krmiv) obvykle obsahují složité směsi různých dioxinových kongenerů, byla pro usnadnění hodnocení jejich nebezpečnosti vyvinuta koncepce koeficientů toxické ekvivalence

(TEF). Tyto TEF byly stanoveny, aby vyjádřily koncentraci směsí 2,3,7,8-substituovaných PCDD a PCDF, a později také u některých non-ortho a mono-ortho-chlór substituovaných PCB, které vykazují aktivitu podobnou dioxinům, v toxických ekvivalentech (TEQ) 2,3,7,8-TCDD (viz. Tabulka Světové zdravotnické organizace)

Koncentrace jednotlivých látek v daném vzorku se násobí jejich příslušným TEF a tyto násobky se následně sčítají, aby se dospělo k celkové koncentraci dioxinům podobných sloučenin, vyjádřených v TEQ.

Koncepce „horní hranice“ vyžaduje, aby se do celkové hodnoty TEQ započítaly mezní hodnoty kvantifikace každého nekvantifikovaného kongeneru.

Koncepce „dolní hranice“ vyžaduje, aby se do celkové hodnoty TEQ započítala za každý nekvantifikovaný kongener nulová hodnota.

Koncepce „střední hodnoty“ vyžaduje, aby se do celkové hodnoty TEQ započítala polovina mezní hodnoty kvantifikace pro každý nekvantifikovaný kongener.

3. Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků k laboratornímu zkoušení jsou použitelné postupy uvedené v příloze č. 7 této vyhlášky. Kromě toho musí být splněny tyto požadavky :

- vzorky musí být skladovány a přepravovány ve skleněných, hliníkových, polypropylénových nebo polyethylenových nádobách. Z nádoby na vzorky musí být odstraněny stopy papírového prachu. Skleněné nádoby musí být vypláchnuto rozpouštědly předem zkontrolovanými z hlediska přítomnosti dioxinů,
- musí být provedena slepá zkouška, která spočívá v provedení celého analytického postupu s vynecháním vzorku,
- hmotnost vzorku použitá k extrakci musí být dostatečná vzhledem k citlivosti.

4. Požadavky kladené na laboratoře

- laboratoře musí prokázat účinnost metody v rozsahu koncentrace, která je předmětem zájmu, například polovina, jedno a dvojnásobek koncentrace, která je předmětem zájmu, s přijatelným variačním koeficientem výsledků opakované analýzy. Podrobnosti kritérií přijatelnosti viz bod 5;
- mezní hodnota stanovitelnosti pro ověřovací metodu musí být v rozsahu asi jedné pětiny úrovně, která je předmětem zájmu, aby byla jistota, že v rozsahu úrovně, která je předmětem zájmu, se dosahuje přijatelných variačních koeficientů;
- jako opatření v rámci vnitřní kontroly jakosti se provádějí pravidelné slepé zkoušky, stanovení se standardním přídatkem nebo stanovení kontrolních vzorků (nejlépe certifikovaného referenčního materiálu, je-li k dispozici);
- úspěšná účast v mezilaboratorních studiích, které hodnotí způsobilost laboratoře, je nejlepším způsobem, jak prokázat schopnost provádět určitá stanovení. Avšak úspěšná účast v mezilaboratorních studiích, například pro půdní vzorky nebo vzorky odpadních vod, nezbytně neproказuje též schopnost v oblasti vzorků potravin nebo krmiv, kde jde o nižší úroveň znečištění. Proto je povinná trvalá účast v mezilaboratorních studiích stanovení dioxinů a dioxinům podobných PCB v příslušných maticích krmiv /potravin;
- laboratoře musí být akreditovány uznávaným subjektem působícím v souladu s ISO Guide 58, aby bylo zajištěno, že uplatňují zabezpečování jakosti při analýzách. Laboratoře by měly být akreditovány podle normy ISO/IEC 17025:1999.

5. Požadavky kladené na analytické metody zkoušení dioxinů a dioxinům podobných PCB

Základní požadavky pro uznání analytických metod :

- *vysoká citlivost a nízké mezní hodnoty detekce.* Pro PCDD a PCDF musí být detekovatelná množství v řádu pikogramů TEQ (10^{-12} g), kvůli mimořádné toxicitě některých z těchto sloučenin. Je známo, že PCB se vyskytují ve vyšších koncentracích než PCDD a PCDF. Pro většinu kongenerů PCB již postačuje citlivost v řádu nanogramů (10^{-9} g). Avšak pro měření jedovatějších dioxinům podobných kongenerů PCB (zejména non-ortho substituovaných forem) musí být dosaženo stejné citlivosti jako pro PCDD a PCDF;
- *vysoká selektivita.* Je nutné rozlišovat PCDD, PCDF a dioxinům podobné PCB od velkého množství jiných, společně extrahovaných a eventuálně rušivých sloučenin přítomných v koncentracích až o několik řádů vyšších než koncentrace látek, které jsou předmětem zájmu. Pro plynovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) je nezbytné rozlišení mezi různými kongenery, tj. mezi toxickými (např. sedmnáct 2,3,7,8-substituovaných PCDD a PCDF a dioxinům podobných PCB) a ostatními kongenery. Biologické zkoušky sloučenin musí být schopny selektivně určit hodnoty TEQ jako součet PCDD, PCDF a dioxinům podobných PCB;
- *vysoká přesnost (správnost a shodnost).* Stanovení musí poskytnovat platný a spolehlivý odhad skutečné koncentrace ve vzorku. Je nezbytná vysoká přesnost (přesnost měření: velká shoda výsledku měření a skutečné nebo přisuzované hodnoty měření), aby se předešlo zamítnutí analýzy vzorku na základě špatné spolehlivosti odhadu TEQ. Přesnost se vyjadřuje jako správnost (rozdíl mezi střední naměřenou hodnotou analytu v certifikovaném referenčním materiálu a jeho certifikovanou hodnotou, vyjádřený jako procento této hodnoty) a shodnost (shodnost se obvykle počítá jako standardní odchylka zahrnující opakovatelnost a reprodukovatelnost a označuje míru shody mezi výsledky získanými několikanásobným použitím experimentálního postupu za předepsaných podmínek).

Vyhledávací metody mohou zahrnovat metody biologických zkoušek a metody GC/MS; ověřovací metody jsou metody plynové chromatografie s vysokým rozlišením/ hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRGC/HRMS). Celková hodnota TEQ musí vyhovovat těmto kritériím

	Vyhledávací metody	Ověřovací metody
Falešně negativní koncentrace	< 1 %	
Správnost		-20 až +20 %
Variační koeficient	< 30 %	< 15 %

6. Zvláštní požadavky, které musí splňovat metody GC/MS, aby vyhovovaly pro účely vyhledávání nebo ověřování

- při validaci metody musí být hned na počátku analytické metody, například před extrakcí, provedeno přidání vnitřních standardů 2,3,7,8-chlór substituovaných PCDD/F značených pomocí ^{13}C (a vnitřních standardů dioxinům podobných PCB značených pomocí ^{13}C , pokud musí být určeny dioxinům podobné PCB). Alespoň jeden kongener musí být přidán pro každou z tetra nebo okta-chlorovaných homologických skupin PCDD/F (a alespoň

jeden kongener pro každou z homologických skupin dioxinů podobných PCB, pokud musí být určeny dioxinů podobné PCB) (nebo alespoň jeden kongener pro každou skupinu vybraných iontů při použití hmotnostní spektrometrie v režimu registrace vybraných iontů, použitou pro sledování PCDD/F a dioxinů podobných PCB). Jednoznačně se dává přednost, zejména v případě ověřovacích metod, použití všech 17 vnitřních standardů 2,3,7,8-substituovaných PCDD/F značených pomocí ^{13}C a všech 12 vnitřních standardů dioxinů podobných PCB značených pomocí ^{13}C (pokud musí být určeny dioxinů podobné PCB).

Pro ty kongenery, k nimž není přidán žádný analog značený pomocí ^{13}C , se určí relativní koeficienty odezvy při použití vhodných kalibračních roztoků.

- Pro krmiva rostlinného původu a krmiva živočišného původu obsahující méně než 10 % tuku je přidání vnitřních standardů před extrakcí povinné. Pro krmiva živočišného původu obsahující více než 10 % tuku se vnitřní standardy přidávají buď před, nebo po extrakci tuku. Vhodná validace účinnosti extrakce se provádí v závislosti na tom, kdy je vnitřní standard přidáván a na tom, zda jsou výsledky uváděny v produktu nebo v tuku.
- Před analýzou GC/MS musí být přidán jeden nebo dva standardy pro stanovení výtěžnosti.
- Kontrola výtěžnosti je nezbytná. U ověřovacích metod se výtěžnost jednotlivých vnitřních standardů pohybuje v rozsahu 60 až 120 %. Nižší nebo vyšší hodnota výtěžnosti jednotlivých kongenerů zejména některých hepta- a okta-chlorovaných dibenzodioxinů a dibenzofuranů, je přípustná pod podmínkou, že jejich příspěvek k hodnotě TEQ nepřesáhne 10 % celkové hodnoty TEQ (jen na základě PCDD/F). Hodnota výtěžnosti u vyhledávacích metod se pohybuje mezi 30 a 140 %.
- Oddělení dioxinů od rušivých chlorovaných sloučenin, jako jsou PCB a chlorované difenylethery, se provádí vhodnými chromatografickými technikami (nejlépe na florisilové, aluminové a/nebo uhlíkové koloně).
- Oddělení isomerů pomocí plynové chromatografie musí být dostatečné (< 25 % mezi píky 1,2,3,4,7,8-HxCDF a 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Stanovení se provádí podle metody EPA 1613 revize B: tetra- až okta-chlorované dioxiny a furany pomocí izotopického zředování HRGC/HRMS nebo jinou metodou se shodnými pracovními charakteristikami (performance criteria).
- u krmiv kontaminovaných dioxiny v rozsahu maximální úrovně nebo nad ní by rozdíl mezi horní a dolní mezní úrovní neměl překročit 20 %. U krmiv s úrovní kontaminace výrazně pod maximální úrovní se může rozdíl pohybovat v rozmezí 25 a 40 %.

7. Vyhledávací analytické metody

7.1 Úvod

Vyhledávací metody mohou být použity k různým přístupům : čistě vyhledávací přístup a nebo kvantitativní přístup.

Vyhledávací přístup

Odezva vzorků se porovnává s odezvou srovnávacího vzorku na úrovni, která je předmětem zájmu. Vzorky s odezvou nižší než srovnávací vzorek se považují za negativní, vzorky s vyšší odezvou se považují za pozitivní. Požadavky:

- do každé zkušební série se zařazují alespoň jeden slepý a jeden srovnávací vzorek, které se extrahují a zkouší současně za shodných podmínek. Odezva srovnávacího vzorku musí být zřetelně vyšší ve srovnání se slepým vzorkem,
- zařazují se další srovnávací vzorky s poloviční a dvojnásobnou koncentrací, která je předmětem zájmu, aby se prokázala řádná účinnost zkoušky pro kontrolu koncentrace, která je předmětem zájmu,
- při zkoušení jiných matric se musí prokázat vhodnost referenčního vzorku(ů), nejlépe zařazením vzorků, u nichž bylo pomocí HRGC/HRMS zjištěno, že obsahují množství TEQ přibližně odpovídající referenčnímu vzorku nebo jinému slepému vzorku obohacenému na tuto úroveň,
- protože při biologických zkouškách sloučenin nemohou být použity žádné vnitřní standardy, jsou pro získání informací o standardní odchylce v rámci jedné zkušební série velmi důležité testy opakovatelnosti. Variační koeficient musí být nižší než 30 %,
- pro biologické zkoušky jsou definovány cílové (stanovované) sloučeniny, možné rušivé vlivy a maximální přípustné slepé hodnoty.

Kvantitativní přístup

Kvantitativní přístup vyžaduje standardní sérii ředění, dvojnásobné nebo trojnásobné čištění a měření, jakož i slepé stanovení a kontrolu výtěžnosti. Výsledek se vyjadřuje jako TEQ, čímž se předpokládá, že sloučeniny odpovědné za signál odpovídají principu TEQ. Toto může být provedeno pomocí TCDD (nebo standardní dioxin/furanové směsi) za účelem vytvoření kalibrační křivky pro výpočet hodnoty TEQ v extraktu a tedy i vzorku. Tato hodnota se následně koriguje podle hodnoty TEQ vypočtené pro slepý vzorek (aby se zohlednily nečistoty z použitých rozpouštědel a chemikálií) a výtěžnost (vypočtená z hodnoty TEQ ve vzorku pro kontrolu jakosti v blízkosti mezní koncentrace, která je předmětem zájmu). Je nezbytné poznamenat, že část zřejmě ztráty výtěžnosti může být způsobena matricovými jevy a/nebo rozdíly mezi hodnotami TEF v biologických zkouškách sloučenin a úředními hodnotami TEF stanovenými WHO.

7.2. Požadavky kladené na analytické metody používané pro vyhledávání

- pro vyhledávání se používají analytické metody GC/MS a biologické metody zkoušení. Pro metody GC/MS se uplatňují požadavky stanovené v bodu 6. Pro buněčné biologické zkoušky sloučenin platí zvláštní požadavky stanovené v bodu 7.3 a pro biologické zkoušky sloučenin prováděné pomocí setů platí zvláštní požadavky stanovené v bodu 7.4;
- jsou nezbytné informace o počtu falešně pozitivních a falešně negativních výsledků velkého souboru vzorků pod a nad maximální úrovní nebo účinnou úrovní ve srovnání s obsahem TEQ určeným ověřovací analytickou metodou. Skutečný podíl falešně negativních výsledků musí být nižší než 1 %. Podíl falešných pozitivních výsledků musí být natolik nízký, aby se použití vyhledávacího nástroje stalo výhodným;
- pozitivní výsledky musí být vždy potvrzeny ověřovací analytickou metodou (HRGC/HRMS). Kromě toho se pomocí HRGC/HRMS potvrzují vzorky z širokého rozmezí hodnot TEQ (přibližně 2 až 10 % negativních vzorků) a předkládají se informace o souladu výsledků biologické zkoušky a HRGC/HRMS.

7.3. Zvláštní požadavky kladené na biologické zkoušky sloučenin

- při biologickém zkoušení vyžaduje každá zkouška řadu srovnávacích koncentrací TCDD nebo dioxin/furanových směsí (úplná křivka dávka/odezva s $R^2 > 0,95$). Avšak pro účely

vyhledávání se používá rozšířená nízkourovňová křivka pro analyzování vzorků s nízkým obsahem;

- aby bylo výsledku biologické zkoušky sloučenin dosaženo během konstantní doby, používá se srovnávací koncentrace TCDD (asi trojnásobek meze detekce) uvedená na listu kontroly jakosti. Jinou možností je relativní odezva srovnávacího vzorku vztažená ke kalibrační křivce TCDD, protože odezva buněk může záviset na mnoha faktorech;
- pro každý srovnávací materiál se zaznamenávají a kontrolují grafy kontroly jakosti, aby byl zajištěn soulad výsledku se směrnici;
- zejména v případě kvantitativního vyhodnocování musí být výsledek ředění vzorků uvnitř lineárního části úseku křivky odezvy. Vzorky nad lineární částí křivky odezvy musí být znovu zředěny a přezkoušeny. Proto se doporučuje zkoušet alespoň tři nebo více různých ředěných vzorků najednou;
- variační koeficient nesmí být vyšší než 15 % při trojnásobném stanovení pro každé ředění vzorku a pro tři nezávislé pokusy by neměl přesáhnout 30 %;
- mezní hodnota detekce se stanovuje jako trojnásobek směrodatné odchylky slepého pokusu s rozpouštědlem nebo z odezvy pozadí. Dalším přístupem je použití odezvy, která je nad pozadím (indukční koeficient rovnající se pětinasobku slepého pokusu s rozpouštědlem) vypočteným z kalibrační křivky dne. Mez stanovitelnosti se stanovuje jako pětinasobek standardní odchylky odezvy slepého pokusu s rozpouštědlem nebo pozadí nebo pomocí odezvy, která je jasně nad pozadím (indukční koeficient rovnající se desetinásobku odezvy slepého rozpouštědla) vypočteným z kalibrační křivky dne.

7.4. Zvláštní požadavky kladené na biologické zkoušky sloučenin prováděné pomocí souprav (kitů)

Poznámka : Dosud nebyly předloženy žádné důkazy o tom, že komerčně dostupné biologické zkoušky sloučenin prováděné pomocí souprav jsou dostatečně citlivé a spolehlivé na to, aby mohly být používány k vyhledávacímu zjišťování přítomnosti dioxinů v požadovaných koncentracích ve vzorcích potravin a krmiv.

- musí být dodržovány pokyny výrobce pro přípravu vzorků,
- nepoužívají se zkušební soupravy po uplynutí doby použitelnosti,
- nepoužívají materiály a součásti navržené pro použití s jinými soupravami,
- zkušební soupravy se uchovávají v předepsaném rozsahu skladovacích teplot a používají se při předepsané provozní teplotě,
- mezní hodnota detekce pro imunologickou zkoušku se určuje jako součet střední hodnoty a trojnásobku standardní odchylky, vycházejících z deseti opakovaných analýz slepého vzorku, jenž se dělí směrnici přímkou, získané lineární regresí;
- pro zkoušky v laboratořích se doporučuje používat srovnávací standardy, aby byla jistota, že citlivost standardu je v přijatelném rozsahu.

8. Oznamování výsledků

Pokud to používaný analytický postup umožňuje, analytické výsledky uvádí množství jednotlivých kongenerů PCDD/F a PCB jako dolní, horní a střední odhady, aby oznamované výsledky obsahovaly maximum informací. Dále se uvádí také obsah lipidů ve vzorku a metoda použitá pro extrakci lipidů.

Výtěžnost vnitřních standardů se uvádí, pokud jsou výsledky mimo povolený rozsah maximálních hodnot uvedených v bodu 6 a v ostatních případech na vyžádání.“

Čl. II
Účinnost

Tato vyhláška nabývá účinnosti dnem 1. října 2004.

Ministr:
Ing. **Palas** v. r.