

2020

Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS) ČSN EN 17212

46 7062

Animal Feeding stuffs – Methods of sampling and analysis – Determination of melamine and cyanuric acid content by liquid chromatographic method with mass spectrometric detection (LC-MS/MS)

Aliments des animaux – Méthodes d'échantillonnage et d'analyse – Détermination des teneurs en mélanine et en acide cyanurique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Futtermittel – Probenahme- und Untersuchungsverfahren – Bestimmung des Gehaltes von Melamin und Cyanursäure mittels flüssigkeits chromatographischem Verfahren mit massenspektrometrischem Nachweis (LC-MS/MS)

Tato norma je českou verzí evropské normy EN 17212:2019. Překlad byl zajištěn Českou agenturou pro standardizaci. Má stejný status jako oficiální verze.

This standard is the Czech version of the European Standard EN 17212:2019. It was translated by the Czech Standardization Agency. It has the same status as the official version.

Národní předmluva

Informace o citovaných dokumentech

EN ISO 6497 zavedena v ČSN EN ISO 6497 (46 7003) Krmiva – Odběr vzorků

EN ISO 6498:2012 zavedena v ČSN EN ISO 6498:2013 (46 7004) Krmiva – Pokyny pro přípravu vzorku

EN ISO/IEC 17043:2010 zavedena v ČSN EN ISO/IEC 17043:2010 (01 5264) Posuzování shody – Všeobecné požadavky na zkoušení způsobilosti

ISO 3534-2:2006 zavedena v ČSN ISO 3534-2:2010 (01 0216) Statistika – Slovník a značky – Část 2: Aplikovaná statistika

ISO 16577:2016 nezavedena

EN ISO 24276:2006 zavedena v ČSN EN ISO 24276:2008 (56 9905) Potraviny – Metody pro detekci

geneticky modifikovaných organismů a odvozených produktů - Všeobecné požadavky a definice

ISO/IEC Guide 99:2007 zaveden v TNI 01 0115:2009 (01 0115) Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM)

Souvisící ČSN

ČSN ISO 5725-1 (01 0251) Přesnost (pravdivost a preciznost) metod a výsledků měření - Část 1: Obecné zásady a definice

ČSN ISO 5725-2:2018 (01 0251) Přesnost (pravdivost a preciznost) metod a výsledků měření - Část 2: Základní metoda pro stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované metody měření

ČSN ISO 11843-2 (01 0240) Detekční schopnost - Část 2: Metodologie v případě lineární kalibrace

Souvisící právní předpisy

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 767/2009 ze dne 13. července 2009 o uvádění na trh a používání krmiv, o změně nařízení (ES) č. 1831/2003 a o zrušení směrnice Rady 79/373/EHS, směrnice Komise 80/511/EHS, směrnic Rady 82/471/EHS, 83/228/EHS, 93/74/EHS, 93/113/ES a 96/25/ES a rozhodnutí Komise 2004/217/ES.

Vypracování normy

Zpracovatel: Kateřina Šléglová, IČO 76130509

Pracovník České agentury pro standardizaci: Ing. Radmila Foretová

Česká agentura pro standardizaci je státní příspěvková organizace zřízená Úřadem pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví na základě ustanovení § 5 odst. 2 zákona č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky a o změně a doplnění některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů.

EVROPSKÁ NORMA  
EUROPEAN STANDARD  
NORME EUROPÉENNE  
EUROPÄISCHE NORM

EN 17212

Září 2019

ICS 65.120

**Krmiva: Metody vzorkování a analýz - Stanovení obsahu melaminu a kyseliny kyanurové metodou kapalinové chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS)**

Animal Feeding stuffs - Methods of sampling and analysis - Determination of melamine and cyanuric acid content by liquid chromatographic method with mass spectrometric detection (LC-MS/MS)

Aliments des animaux - Méthodes  
d'échantillonnage et d'analyse - Détermination  
des teneurs en mélanine et en acide cyanurique  
par chromatographie liquide couplée à la  
spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

Futtermittel - Probenahme-  
und Untersuchungsverfahren - Bestimmung des  
Gehaltes von Melamin und Cyanursäure mittels  
flüssigkeits chromatographischem Verfahren  
mit massenspektrometrischem Nachweis (LC-  
MS/MS)

Tato evropská norma byla schválena CEN dne 2019-07-07.

Členové CEN jsou povinni splnit vnitřní předpisy CEN/CENELEC, v nichž jsou stanoveny podmínky, za kterých se této evropské normě bez jakýchkoliv modifikací uděluje status národní normy. Aktualizované seznamy a biblio-grafické citace týkající se těchto národních norem lze obdržet na vyžádání v Řídicím centru CEN-CENELEC nebo u kteréhokoliv člena CEN.

Tato evropská norma existuje ve třech oficiálních verzích (anglické, francouzské, německé). Verze v každém jiném jazyce přeložená členem CEN do jeho vlastního jazyka, za kterou zodpovídá a kterou notifikuje Řídicímu centru CEN-CENELEC, má stejný status jako oficiální verze.

Členy CEN jsou národní normalizační orgány Belgie, Bulharska, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Malty, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Republiky Severní Makedonie, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarska a Turecka.



**Evropský výbor pro normalizaci**

**European Committee for Standardization**

**Comité Européen de Normalisation**

**Europäisches Komitee für Normung**

**Řídicí centrum CEN-CENELEC: Rue de la Science 23, B-1040 Brusel**

© 2019 CEN Veškerá práva pro využití v jakékoli formě a jakýmikoli prostředky

Ref. č. EN 17212:2019 E

jsou celosvětově vyhrazena národním členům CEN.

Evropská předmluva.....	6
.....	
Úvod.....	7
.....	
<b>1.....</b> Předmět normy.....	8
.....	
<b>2.....</b> Citované dokumenty.....	8
.....	
<b>3.....</b> Termíny a definice.....	8
.....	
<b>4.....</b> Princip.....	12
.....	
<b>5.....</b> Chemikálie.....	12
.....	
<b>5.1.....</b> Obecně.....	12
.....	
<b>5.2.....</b> Chemikálie.....	12
.....	
<b>5.3.....</b> Standardní roztoky.....	13
.....	
<b>6.....</b> Přístroje.....	15
.....	
<b>7.....</b> Příprava vzorku.....	16
.....	
<b>7.1.....</b> Obecně.....	

.....	16
<b>7.2.....</b> Laboratorní vzorek.....	16
.....	16
<b>7.3.....</b> Zkušební materiál.....	16
.....	16
<b>7.4.....</b> Vzorkovaný materiál.....	16
.....	16
<b>8.....</b> Postup.....	16
.....	16
<b>8.1.....</b> Obecně.....	16
.....	16
<b>8.2.....</b> Screeningová metoda.....	16
.....	16
<b>8.2.1...</b> Extrakce vzorku.....	16
.....	16
<b>8.2.2...</b> Ředění vzorku.....	17
.....	17
<b>8.2.3...</b> Nástřik roztoků do LC-MS/MS.....	17
.....	17
<b>8.3.....</b> Konfirmační metoda.....	17
.....	17
<b>8.3.1...</b> Přídavek interního standardu.....	17
.....	17
<b>8.3.2...</b> Extrakce vzorku.....	17
.....	17
<b>8.3.3...</b> Ředění vzorku a standardní přídavek.....	17

<b>8.3.4...</b> Nástrik roztoků do LC-MS/MS.....	18
<b>8.4.....</b> Opatření pro kontrolu kvality screeningové metody.....	19
<b>8.4.1...</b> Slepý extrakt.....	19
<b>8.4.2...</b> Kontrolní standardy.....	19
<b>8.5.....</b> Opatření pro kontrolu kvality konfirmační metody.....	19
<b>8.5.1...</b> Slepý extrakt.....	19
<b>8.5.2...</b> Vzorek kontrolní matrice.....	19
<b>8.5.3...</b> Kontrolní standardy.....	19
<b>9.....</b> HPLC-MS/MS analýza.....	20
<b>9.1.....</b> Obecně.....	20
<b>9.2.....</b> Operační podmínky HPLC.....	20
<b>9.3.....</b> Stanovení melaminu a kyseliny kyanurové v roztocích zkušebních vzorků.....	20
<b>9.3.1...</b> Příklad analytické sekvence pro screeningovou metodu.....	20
<b>9.3.2...</b> Screeningovou metodou pozitivně zkoušený vzorek.....	20
<b>9.3.3...</b> Příklad analytické sekvence pro konfirmační metodu.....	20

<b>10.....</b>	
Výpočet.....	21
.....	21
<b>10.1... Identifikace</b>	
píku.....	21
.....	21
<b>10.2... Kvantifikace (konfirmační</b>	
metoda).....	21
<b>11.....</b>	
Preciznost.....	22
.....	22
<b>11.1... Společná</b>	
zkouška.....	22
.....	22
<b>11.2... Mez</b>	
opakovatelnosti.....	22
.....	22
<b>11.3... Mez</b>	
reprodukovatelnosti.....	22
.....	22
<b>12..... Protokol</b>	
o zkoušce.....	22
.....	22
<b>Příloha A (informativní) Příklady pro vhodné podmínky HPLC-</b>	
<b>MS/MS.....</b>	<b>23</b>
<b>A.1..... Příklad vhodných podmínek</b>	
<b>HPLC.....</b>	<b>23</b>
<b>A.2..... Příklad vhodný pro SCIEX API 4000 Q-Trap nebo API</b>	
<b>4000.....</b>	<b>23</b>
<b>Příloha B (informativní) Výsledky mezinárodní společné</b>	
<b>zkoušky.....</b>	<b>25</b>
<b>Příloha C (informativní) Výsledky vnitřní (in-house) validace</b>	
<b>metody.....</b>	<b>28</b>
<b>Příloha D (informativní) Typické</b>	
<b>chromatogramy.....</b>	<b>30</b>
<b>Bibliografie.....</b>	
.....	32

# Evropská předmluva

Tento dokument (EN 17212:2019) vypracovala technická komise CEN/TC 327 *Krmiva - Metody vzorkování a analýz*, jejíž sekretariát zajišťuje NEN.

Této evropské normě je nutno nejpozději do března 2020 udělit status národní normy, a to buď vydáním identického textu, nebo schválením k přímému používání, a národní normy, které jsou s ní v rozporu, je nutno zrušit nejpozději do března 2020.

Upozorňuje se na možnost, že některé prvky tohoto dokumentu mohou být předmětem patentových práv. CEN nelze činit odpovědným za identifikaci jakéhokoliv nebo všech patentových práv.

Tento dokument byl vypracován na základě normalizačního požadavku uděleného CEN Evropskou komisí a Evropským sdružením volného obchodu.

Podle vnitřních předpisů CEN-CENELEC jsou tuto evropskou normu povinny zavést národní normalizační organizace následujících zemí: Belgie, Bulharska, České republiky, Dánska, Estonska, Finska, Francie, Chorvatska, Irska, Islandu, Itálie, Kypru, Litvy, Lotyšska, Lucemburska, Maďarska, Maly, Německa, Nizozemska, Norska, Polska, Portugalska, Rakouska, Republiky Severní Makedonie, Rumunska, Řecka, Slovenska, Slovinska, Spojeného království, Srbska, Španělska, Švédsko, Švýcarsko a Turecko.



# Úvod

Tento dokument byl vytvořen jako odpověď na potřebu spolehlivé metody pro detekci a kvantifikaci melaminu a kyseliny kyanurové v krmivech. Obě látky byly do krmiv přidávány nelegálně.

**UPOZORNĚNÍ** Součástí metody popsané v této normě je použití chemikálií, které představují zdravotní nebezpečí. Norma nemá za cíl řešit veškeré související bezpečnostní problémy. Je odpovědností uživatele této normy přijmout před použitím této normy příslušná opatření pro ochranu zdraví a bezpečnosti personálu tak, aby byly naplněny regulatorní a zákonné požadavky.

# 1 Předmět normy

Tento dokument specifikuje metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií (MS) pro screening a kvantifikaci melaminu a kyseliny kyanurové v koncentračním rozsahu mezi 1 mg/kg a 100 mg/kg krmiva.

Tato metoda je validována v mezinárodní společné zkoušce pro melamin v kompletním krmivu, doplňkovém krmivu, krmné surovině, mléčné krmné směsi a krmivu pro zvířata v zájmovém chovu včetně krmiva v plechovce v rozsahu mezi 1 mg/kg a 80 mg/kg se specifickým ohledem na maximální hodnotu 2,5 mg/kg, stanovenou Evropskou komisí.

Laboratorní zkušenosti ukázaly, že metoda je také použitelná pro kyselinu kyanurovou ve stejném koncentračním rozsahu v kompletním krmivu ( $n = 7$ ), doplňkovém krmivu ( $n = 6$ ), krmné surovině ( $n = 7$ , resp. 9), mléčné krmné směsi ( $n = 7$ ) a krmivu pro zvířata v zájmovém chovu ( $n = 7$ ) včetně krmiva v plechovkách.

S ohledem na to, že citlivost LC-MS/MS pro kyselinu kyanurovou je nižší než pro melamin, musí se zajistit, že systém LC-MS/MS je ve vynikajícím pracovním stavu. Metoda je použitelná pro krmiva, ale nebyla zkoušena pro premixy a doplňkové látky.

Kvantifikace koncentrací nad 100 mg/kg je možná, ale metoda musí být validována operátorem.

**Konec náhledu - text dále pokračuje v placené verzi ČSN.**