



VĚSTNÍK

ÚSTŘEDNÍHO KONTROLNÍHO A ZKUŠEBNÍHO
ÚSTAVU ZEMĚDĚLSKÉHO

Řada: Národní referenční laboratoř
Ročník: III.

Číslo: 1

Vydáno: srpen 2004

Obsah:

1. Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů I - III

Příloha č. 9 vyhlášky 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

Příloha č. 10 vyhlášky 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

Příloha č. 11 až 13 vyhlášky 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

Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

I

Příloha č. 9 vyhlášky 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

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů chemického zkoušení krmiv

Název postupu postupu	Označení
1. Vlhkost, těkavé látky	
1.1. Stanovení obsahu vlhkosti v krmivech	-A-
1.2. Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v tucích	-A-
1.3. Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v olejnatých semenech	-A-
1.4. Stanovení obsahu vlhkosti	-B-
1.5. Stanovení obsahu vlhkosti v olejích a tucích	-B-
2. Dusíkaté sloučeniny	
2.1. Stanovení obsahu dusíkatých látek	-A,-B-
7.1. Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové	-A,-B-
2.3. Stanovení obsahu bílkovin	-A,-B-
2.4. Stanovení obsahu aminokyselin	-B-
2.5. Stanovení obsahu močoviny	-A,-B-
2.6. Stanovení obsahu amoniaku v rybích moučkách	-A,-B-
2.7. Stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek	-A,-B-
2.8. Stanovení aktivity ureázy v sóji a jejích produktech	-A,-B-
2.9. Ureázový test	-A-
2.10. Stanovení obsahu biuretu	-A-
2.11. Stanovení obsahu hydroxyanalogu methioninu	-A-
2.12. Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu	-B-
2.13. Stanovení aktivity pepsinu	-B-
2.14. Stanovení obsahu methioninu	-A-
2.15. Stanovení obsahu tryptofanu	-A-
2.16. Stanovení obsahu tryptofanu	-B-

2.17.	Stanovení obsahu aminokyselin	-A-
3.	Tuk	
3.1.	Stanovení obsahu tuku	-A-
3.2.	Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech	-A-
3.3.	Stanovení čísla kyselosti tuku	-A-
3.4.	Stanovení obsahu lecitinu	-A-
3.5.	Stanovení obsahu nerozpustných nečistot v tucích a olejích	-A-
3.6.	Stanovení obsahu nezmýdelnitelných látek v tucích a olejích	-A-
3.7.	Stanovení peroxidového čísla	-A-
3.8.	Stanovení obsahu oleje a tuku	-B-
4.	Polysacharidy	
4.1.	Stanovení obsahu vlákniny	-A,-B-
5.	Bezdušikaté látky výtažkové	
5.1.	Stanovení obsahu škrobu	-A,-B-
5.3.	Stanovení obsahu cukrů	-A,-B-
5.4.	Stanovení obsahu laktosy	-A,-B-
5.5.	Stanovení obsahu bezdušikatých látek výtažkových výpočtem	-A-
5.6.	Stanovení obsahu cukrů polarizací	-A,-B-
5.7.	Stanovení obsahu redukujících látek v cukru a melase	-A-
6.	Popel	
6.1.	Stanovení obsahu popele	-A,-B-
6.2.	Stanovení obsahu popele v tucích	-A-
6.3.	Stanovení obsahu nerozpustného podílu popele v kyselině chlorovodíkové	-A,-B-
6.4.	Stanovení obsahu popele nerozpustného v kyselině chlorovodíkové	-B-
7.	Makroprvky	
7.1.	Stanovení obsahu fosforu	-A,-B-
7.2.	Stanovení obsahu vápníku	-A,-B-
7.3.	Stanovení obsahu hořčíku	-A,-B-
7.4.	Stanovení obsahu draslíku	-A,-B-
7.5.	Stanovení obsahu sodíku	-A,-B-

- | | | |
|-------|---|---------|
| 7.6. | Stanovení obsahu ve vodě rozpustných chloridů | -A-,-B- |
| 7.7. | Stanovení obsahu celkových uhličitánů | -A-,-B- |
| 7.8. | Stanovení obsahu oxidů křemíku, hliníku, vápníku a hořčíku (ve vápencích) | -A- |
| 7.9. | Stanovení celkového obsahu síry | -A-,-B- |
| 7.10. | Stanovení obsahu vápníku | -B- |

8. Mikroprvky

- | | | |
|-------|--|-----|
| 8.1. | Stanovení obsahů mědi, železa, manganu a zinku | -A- |
| 8.2.1 | Stanovení obsahu vápníku, mědi, železa, hořčíku, manganu, draslíku, sodíku a zinku | -B- |
| 8.3. | Stanovení obsahu železa, mědi, manganu a zinku | -B- |

9. Kyselost

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

10. Nežádoucí látky

- | | | |
|--------|--|---------|
| 10.1. | Stanovení obsahu kyanovodíku | -B- |
| 10.4. | Stanovení obsahu glukosinolátů v řepce | -A-,-B- |
| 10.5. | Stanovení obsahu 5-vinyl-2-thiooxazolidonu | -A-,-B- |
| 10.6. | Stanovení obsahu kyseliny erukové | -A- |
| 10.7. | Stanovení obsahu olova a kadmia | -A- |
| 10.8. | Stanovení obsahu ricinových slupek | -A-,-B- |
| 10.9. | Stanovení obsahu fluoru | -B- |
| 10.10. | Stanovení obsahu rezidujících organochlorových a organofosfátových pesticidů | -B- |
| 10.11. | Stanovení obsahu hexachlorbenzenu | -B- |
| 10.12. | Stanovení obsahu dusitanů | -B- |
| 10.13. | Stanovení obsahu rtuti | -A- |
| 10.14. | Stanovení obsahu aflatoxinu B1 | -B- |
| 10.15. | Stanovení obsahu arsenu | -B- |
| 10.16. | Stanovení obsahu gossypolu | -B- |
| 10.17. | Stanovení obsahu theobrominu | -A- |

11. Zkoušení siláží

- | | | |
|-------|-------------------------|---------|
| 11.1. | Zkoušení jakosti siláží | -A-,-B- |
|-------|-------------------------|---------|

1.1 Stanovení obsahu vlhkosti v krmivech

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vlhkosti v krmivech a premixech.

Metoda je použitelná pro stanovení vlhkosti všech druhů krmiv s výjimkou mléka a mléčných výrobků, určených k přímému krmení a olejnatých semen. Obsahuje modifikace pro stanovení vlhkosti v krmivech s obsahem močoviny, tuků a olejů, jakož i směsí s obsahem většího podílu minerálních látek s obsahem krystalické vody.

2. Princip

Obsah vlhkosti se stanoví vázkově jako úbytek po vysušení vzorku při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$, u vlhkých nebo zvláště vyjmenovaných krmiv po předsušení při 50 až $60 ^\circ\text{C}$ za předepsaných podmínek.

Ve zvláštních případech při vysušení za sníženého tlaku při $80 ^\circ\text{C}$.

3. Chemikálie

3.1 Písek mořský

Úprava: Mořský písek se nejprve vyvaří v kyselině chlorovodíkové, zředěné (1 + 3), a potom se propere vodou do negativní reakce na chloridy. Vypraný písek se vysuší po dobu 6 až 8 hod při $103 ^\circ\text{C}$, potom přežihá 2 hod při $550 ^\circ\text{C}$ a po vychladnutí se uchovává ve vzorkovnici z neprodyšného materiálu.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Sušárna elektrická atmosférická s automatickou regulací teploty v mezích $\pm 2 ^\circ\text{C}$, s možností odvětrávání a teploměrem pro hodnoty teplot nejméně do $150 ^\circ\text{C}$
- 4.2 Sušárna elektrická vakuová, umožňující snížení tlaku na 13 kPa, opatřená termostatem, vakuovým čerpadlem, dále buď zařízením pro zavádění horkého vzduchu nebo vloženým desikantem (oxidem vápenatým - 300 g na 20 vzorků) a s teploměrem pro hodnoty teplot nejméně do $100 ^\circ\text{C}$
- 4.3 Vysoušečka zhotovená z nekorodujícího kovu nebo skla s dobře těsnícím víčkem a plochou, která umožňuje rozprostřít asi 0,3 g vzorku na 1 cm^2
- 4.4 Misky vysoušecí s plochým dnem, vhodných velikostí a z materiálů odolných vůči teplotám do $100 ^\circ\text{C}$ a inertním vůči vlhkosti

5. Postup zkoušky

5.1 Suchá či předsušená krmiva (poznámka 8.1)

5.1.1 Do vysoušečky (4.3), předem včetně víčka vysušené (při 103 °C po dobu 30 min) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g, se odváží asi 5 g (m_2) zkušebního vzorku se stejnou přesností a vzorek se ve vysoušečce rovnoměrně rozprostře.

5.1.2 Vysoušečka (4.3) se vzorkem se vloží do atmosférické sušárny (4.1), předem vyhřáté na teplotu $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$, odklopí se víčko a od okamžiku, kdy vnitřní prostor sušárny dosáhne opět výše uvedené teploty, se suší po dobu 4 hod.

Krmiva s aditivním obsahem močoviny (poznámka 8.2) se suší po dobu 6 hod. při teplotě $(75 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Vzorky obilovin, obilného šrotu, krupice a mouky se suší při teplotě $(130 \pm 2) ^\circ\text{C}$ po dobu 2 hod.

Vysoušečky (4.3) se vkládají do vyhřáté sušárny (4.1) dostatečně rychle, aby nedošlo k většímu poklesu teploty. Do sušárny se vkládá jen takový počet vysoušeček se vzorky, aby na jednu připadlo nejméně asi 1000 cm³ prostoru. Po uplynutí předepsané doby se vysoušečka (4.3) vyjme ze sušárny, přiklopí víčkem a po vychladnutí v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na

0,001 g (m_3). Po odvážení vysoušečky (4.3) se provede kontrolní test (poznámka 8.3) tak, že vysoušečka (4.3) se vzorkem se vloží opět do sušárny (4.1) vyhřáté na teplotu $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a suší odklopeným víčkem další 2 hod. Po vyjmutí ze sušárny (4.1) se okamžitě přiklopí víčkem, ochladí v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností.

Jestliže rozdíl mezi předešlým a tímto vážením nepředstavuje více než odpovídá obsahu vlhkosti 0,2 %, stanovení je ukončeno a jako konečná hmotnost se bere hmotnost v prvním vážení (m_3). Je-li rozdíl mezi oběma váženími vyšší než výše uvedená hodnota, provede se znovu stanovení za sníženého tlaku podle 5.2 (poznámka 8.4).

5.1.3 U krmiv tekutých, pastovitých nebo s vyšším obsahem tuku (nad 80 g/kg) se postupuje následovně: Do vysoušečky (4.3) se odváží nejdříve asi 5 až 10 g mořského písku (3.1) (podle míry mastného vzhledu vzorku), vloží krátká skleněná tyčinka, vysoušečka (4.3) se vysuší (30 min. při 130 °C) v sušárně (4.1) a po ochlazení v exsikátoru se včetně tyčinky zváží s přesností nejméně na 0,001 g.

Do takto připravené vysoušečky (4.3) se odváží asi 10 g (m_2) zkušebního vzorku, s výše uvedenou přesností, vzorek se důkladně promíchá s pískem tak, aby nedošlo ke ztrátám vzorku (ani písku) a předsuší se nejprve 30 minut při 60 °C. Dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2 Krmiva, jejichž vzorky nevyhověly kontrolnímu testu

Do vysoušečky (4.3), předem včetně víčka vysušené (při 130 °C po dobu 30 min) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g se odváží asi 5 g (m_2) zkušebního vzorku se stejnou přesností a vzorek se ve vysoušečce rovnoměrně rozprostře.

Vysoušečka se vzorkem se vloží do vakuové sušárny (4.2), vyhřáté na 80 °C až 85 °C, víčko se odklopí a po uzavření sušárny se sníží tlak na 13 kPa. Vysoušečky (4.3) se vkládají do sušárny (4.2) dostatečně rychle, aby nedošlo k podstatnému snížení teploty v sušárně.

Vzorek se suší buď za přívodu horkého, vysušeného vzduchu nebo za přítomnosti desikantu, v množství asi 300 g na 20 vzorků. V druhém z uvedených případů (desikant) se po dosažení

předepsaného tlaku odpojí čerpadlo. Od okamžiku, kdy teplota při předepsaném tlaku dosáhne 80 °C až 85 °C, se suší po dobu 4 hodiny. Po uplynutí této doby se snížený tlak vnitřního prostoru sušárny (4.2) pomalu vyrovnává s atmosférickým, po vyrovnání tlaků se sušárna (4.2) otevře, vysoušečka (4.3) se uzavře víčkem a vloží do exsikátoru, kde se ponechá asi 45 min. Potom se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_3) a opět vloží do vakuové sušárny (4.2), vyhřáté na výše uvedenou teplotu. Suší se dalších 30 minut a po ochlazení v exsikátoru se znovu zváží s výše uvedenou přesností. Dosoušení, ochlazování a vážení vysoušečky (4.3) se vzorkem se opakuje tolikrát, pokud dvě po sobě následující vážení nevykazují diferenci menší než odpovídá obsahu vlhkosti 0,2 %. Jako konečná hmotnost vysušeného vzorku (m_3) se bere poslední, po níž již nenastal výše uvedený úbytek hmotnosti.

5.3 Krmiva s obsahem vlhkosti nad 17,0 %, krmné směsi s obsahem nad 13,5 % a všechna lisovaná krmiva

Hermeticky uzavřená část konečného vzorku odebraná zvlášť pro stanovení původního obsahu vlhkosti, popř. přímo konečný vzorek zjevně zvlhlý, se upraví co nejrychleji na zkušební vzorek tak, aby nedošlo k podstatnému úbytku vlhkosti a okamžitě se odvažuje zkušební vzorek.

Z takto upraveného zkušební vzorku se odváží asi 10 až 100 g (poznámka 8.5) s přesností nejméně na 0,01 g až na 0,1 g (m_0) do misky s plochým dnem (4.4), předem vysušené (při 60 °C až 70 °C) a po ochlazení zvážené s výše uvedenou přesností. Zkušební vzorek se rovnoměrně rozprostře do vrstvy asi 10 mm a suší v atmosférické sušárně (4.1) při teplotě 60 °C až 70 °C do dosažení zdánlivě suché hmoty (obsah vlhkosti 8,0 až 12,0 %).

Potom se miska (4.4) se vzorkem vyjme, ponechá po dobu asi 12 hod volně na vzduchu při teplotě laboratoře za účelem vyrovnání vlhkosti s okolní atmosférou (kondicionace), přičemž se vzorek chrání před rozptýlením či zaprášením nebo přimísením cizích hmot a pak se zváží s přesností nejméně na 0,01 až 0,1 g (poznámka 8.5) (m_1). Po zvážení se ihned celý vzorek rozeleme a dále se postupuje podle 5.1 této metody.

Zrna obilovin s obsahem vlhkosti vyšším než 17,0 % se odvažují nesemleté, pouze hrubě rozmělněné v množství asi 50 g a s přesností nejméně na 0,01 g (m_0) na misku vhodné velikosti (4.4), předem vysušenou při 130 °C po dobu 30 min. a po ochlazení zváženou se stejnou přesností, suší se v sušárně (4.1) při 130 °C po dobu nejméně 5 až 6 min. ve vrstvě asi 0,5 cm, potom se ponechá při laboratorní teplotě 2 h a zváží se s přesností nejméně na 0,01 g (m_1). Po zvážení se celý vzorek rozeleme a dále se postupuje podle 5.1 pouze s tím rozdílem, že se vzorek suší při teplotě (130 ± 2) °C po dobu 2 hod.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vlhkosti v % (X) se vypočítá podle vzorce:

6.1 Bez předsoušení (viz 5.1 a 5.2)

$$X = (m_2 - m_3) \cdot \frac{100}{m_2}$$

6.2 S předsoušením (viz 5.3)

$$X = \left(1 - \frac{m_1 \cdot m_3}{m_0 \cdot m_2} \right) 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky vzorku k předsušení v g

m_1 hmotnost navážky předsušeného vzorku po vyrovnání vlhkosti (kondicionaci) v g

m_2 hmotnost navážky vzorku pro sušení podle 6.1 a 6.2 v g

m_3 hmotnost navážky vzorku po vysušení podle 6.1 a 6.2 v g

Obsah sušiny v % (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = 100 - X$$

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na desetiny %.

Pokud jsou ostatní složky krmiva stanoveny při rozdílném obsahu vlhkosti, je nutné je přepočítat na obsah vlhkosti v původním vzorku.

7. Opakovatelnost

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

8. Poznámky

8.1 Krmiva s vyšším obsahem vlhkosti než 17,0 % krmné směsi s vyšším obsahem vlhkosti než 13,5 % a všechna lisovaná krmiva se zkoušejí podle 5.3. Podle 5.1 se zkoušejí vzorky zdánlivě suché či předsušené.

8.2 Aditivním obsahem močoviny se rozumí obsah nad 5 g/kg.

8.3 Kontrolní test se provádí za účelem zjištění, zda během sušení vzorku nedochází k nepřiměřeným ztrátám hmoty navíc v důsledku případných chemických reakcí, např. Maillardovy apod.

Zjištění uvedené hodnoty úbytku je důkazem nežádoucích změn. Při kontrolním testu u tučných vzorků se doba sušení zkracuje na 30 min. a úbytek po sušení nemá být vyšší, než odpovídá obsahu vlhkosti 0,1 %.

8.4 Stanovení za sníženého tlaku přichází v úvahu zejména u krmiv, obsahující vyšší obsah sacharosy nebo laktosy než 40 g/kg, jako jsou hydrolyzovatelné produkty, sladové klíčky, sušené bramborové zdrtky, ryby, cukerné roztoky a krmné směsi, obsahující více než 250 g/kg minerálních solí, obsahujících krystalicky vázanou vodu.

8.5 Hmotnost vzorku se volí podle předpokládaného nebo odhadnutého obsahu vlhkosti tak, aby hmotnost předsušeného vzorku byla nejméně 15 g. Přesnost navážky vzorku se snižuje s rostoucí hmotností vzorku až na 0,1 g. Pokud se stanovení vlhkosti spojuje s předsušením

vzorku při jeho přípravě, pak se odvažuje takové množství vzorku, aby předsušený vzorek měl hmotnost alespoň 200 g.

1.2 Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v tucích

1. Účel a rozsah

Tato metoda určuje postup stanovení vlhkosti a těkavých látek v tucích.

2. Princip

Obsah vlhkosti a těkavých látek se odpaří sušením při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a úbytek hmotnosti se stanoví vážkově.

3. Chemikálie

3.1 Písek mořský, suchý, čistý a vyžíhaný nebo křemičitý písek vyvařený v kyselině chlorovodíkové, promytý, vysušený, prosátý a vyžíhaný.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Hliníková vysoušečka, příp. hliníková miska s víčkem

4.2 Sušárna atmosférická s termostatem

5. Postup

Hliníková vysoušečka (4.1) s 15 až 20 g písku (3.1) a krátkou skleněnou tyčinkou se suší při $130 ^\circ\text{C}$ (asi 30 minut), vloží se do exsikátoru (2.2) a po vychladnutí se přesně zváží. Potom se do ní přesně naváží asi 3 g zkušební vzorku s přesností na 0,001 g a suší se v sušárně (4.3) při $105 ^\circ\text{C}$. Během sušení se obsah misky několikrát promíchá skleněnou tyčinkou.

Úbytek hmotnosti se kontroluje poprvé za 1 h a dále v půlhodinových intervalech až do dosažení konstantní hmotnosti.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vlhkosti a těkavých látek v % (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{100 \cdot m_1}{m}$$

kde m_1 je úbytek hmotnosti v g
 m hmotnost navážky vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na desetiny %.

7. Opakovatelnost

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

do 2 %	10 % relativních
nad 2 %	0,2 % abs.

1.3 Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v olejnatých semenech

1. Účel a rozsah

Tato metoda určuje postup stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v olejnatých semenech.

2. Princip

Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek se provádí buď z materiálu tak, jak byl získán (čistá semena a nečistoty) nebo pokud je to požadováno ze samotných čistých semen, sušením při teplotě $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ v sušárně při atmosférickém tlaku do konstantní hmotnosti, vážkově.

3. Chemikálie

3.1 Písek mořský, suchý, čistý a vyžíhaný nebo křemičitý písek vyvařený v kyselině chlorovodíkové, promytý, vysušený, prosátý a vyžíhaný.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mlýnek mechanický, snadno čistitelný

4.2 Analytické váhy

4.3 Struhadlo mechanické nebo ruční

4.4 Hliníková vysoušečka, nebo hliníková miska s víčkem

4.5 Sušárna atmosférická s termostatem

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

5.1.1 Pro zkoušku se použije vzorek tak, jak byl získán nebo po odstranění nečistot. Pokud se pracuje se vzorkem, ze kterého byly předem odstraněny velké neolejnaté částice, je nutno to zohlednit při výpočtu (viz. 6.2).

V případě semene kopry se vzorek upravuje mechanickým struhadlem celý nebo ručním struhadlem (4.3) v takovém množství, aby byl co nejvíce reprezentativní. Délka částic může být větší než 2 mm, ale nemá být větší než 5 mm. Částice je nutno promíchat a zkoušku provést bez prodlení.

5.1.2 Semena střední velikosti (podzemnice, sója apod.), kromě semen saflóru (světlice barvířská), slunečnice a bavlníku a s přilehlými vlákny, se vzorek šrotuje v mechanickém mlýnku (4.1), který byl před použitím dobře vyčištěn, tak dlouho dokud hlavní rozměr částic neklesne pod 2 mm. Větší částice (přibližně jedna dvacetina vzorku) se vyřadí, zbytek se pečlivě promíchá a stanovení vlhkosti a těkavých látek se provede bez prodlení.

5.1.3 Malá semena (len, řepka, konopí apod.) stejně jako semena saflóru, slunečnice či bavlníku se zkouší bez předchozího mletí (v původním stavu).

5.2 Vlastní stanovení

Hliníková vysoušečka (4.4) se suší v sušárně (4.5) při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ (asi 1/2 h), vloží se do exsikátoru a po vychladnutí se přesně zváží. Potom se do ní přesně naváží buď:

a) asi 5 g nastrohaného vzorku (v případě kopry) nebo rozemletého vzorku (v případě semen střední velikosti s výjimkou semen saflóru, slunečnice či bavlníku s přilehlými vlákny

b) asi 5 až 10 g celých semen (v případě malých semen a semen saflóru, slunečnice či bavlníku s přilehlými vlákny).

Vzorek se rovnoměrně rozprostře po celém dně misky (4.4) suší se v sušárně (4.5) při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$. Po 3 hodinách sušení (s výjimkou semen bavlníku s přilehlými vlákny, která se suší 12 až 16 hodin) se sušárna otevře, miska (4.4) se vzorkem se ihned uzavře víčkem a vloží do exsikátoru. Jakmile miska (4.4) se vzorkem dosáhne laboratorní teploty, přesně se zváží. Miska bez víčka se znovu vloží do sušárny a celý postup s uzavřením misky (4.4), chlazením a vážením se opakuje po jedné hodině sušení za stejných podmínek. Pokud je rozdíl mezi dvěma váženími menší nebo roven 0,005 g (při navážce 5 g), považuje se stanovení za ukončené. Pokud je rozdíl větší, pokračuje se v sušení.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Obsah vlhkosti a těkavých látek v % (X) se vypočte podle vzorce :

$$X = - \frac{100.m_1}{m}$$

kde m je hmotnost navážky vzorku v g

m_1 úbytek na hmotnosti v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v % s přesností na jedno desetinné místo.

6.2 Pokud byly ze vzorku před zkouškou odstraněny velké neolejnaté částice (viz. 5.1.1) násobí se výsledek získaný podle 6.1 faktorem F

$$F = \frac{(100 - Y)}{100}$$

kde Y je obsah odstraněných velkých částic (nečistot) ze vzorku, tak jak byl získán v %.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v % s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí být větší než 0,2 %

2.1 Stanovení obsahu dusíkatých látek

Do této metody byla zpracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 123, 29/05/72 a L 179, 22/07/93

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dusíkatých látek v krmivech.

Metoda stanovení dusíkatých látek je použitelná pro všechny obsahy ve všech druzích krmiv a nerozlišuje proteinový a neproteinový dusík. Neproteinový dusík je nutno stanovit zvlášť příslušnými metodami. Uzanční faktor pro přepočet obsahu dusíku na dusíkaté látky je "6,25" (poznámka 8.1)

Za podmínek této metody se nestanoví dusík v dusičnanech, dusitanech, popř. azo- nebo hydrazosloučeninách.

2. Princip

Dusíkaté látky se stanoví titračně alkalimetry (acidimetry) po mineralizaci vzorku horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedením na síran amonný, vytěsněním amoniaku hydroxidem sodným a jeho předestilováním do kyseliny sírové (borité).

3. Chemikálie

3.1 Katalyzátory: Oxid měďnatý (CuO) nebo Síran měďnatý, pentahydrát ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

3.2 Indikátory

Směsný: 2,0 g methylové červení a 1,0 g metylénové modři se rozpustí v 1000 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

Methylová červen: 0,30 g methylové červení se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

3.3 Kyselina sírová, konc. ($\rho = 1,84 \text{ g/ml}$)

3.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ nebo $0,05 \text{ mol/l}$

3.5 Hydroxid sodný, roztok 400 g/l ($\rho = 1,36 \text{ g/ml}$)

3.6 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$ a $0,1 \text{ mol/l}$

3.7 Kyselina boritá, roztok 4 %

3.8 Síran draselný, pevný

3.9 Sacharosa

3.10 Acetanilid (bod tání 114°C) s obsahem 10,36 % dusíku, tj. 64,75% dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce.

3.11 Tryptofan (bod tání 282°C), s obsahem 13,72 % dusíku, tj. 85,75 % dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce.

Všechny použité chemikálie (mimo acetanilid a tryptofan) i zkušební pomůcky musí být prosté dusíku.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1** Zařízení mineralizační vhodné konstrukce
- 4.2** Zařízení destilační vhodné konstrukce (poznámka 8.2)
- 4.3** Baňky nebo tuby mineralizační vhodné velikosti (baňky se doporučují podle Kjeldahla 500 až 750 ml)
- 4.4** Papírek pH
- 4.5** Varná tělíska (pemza granulovaná, střípky skleněné či porcelánové)
- 4.6** Odpěňovací prostředek (např. parafin či silikonový olej)

5. Postup

Do mineralizační baňky nebo tuby (4.3) se odváží asi 0,5 až 1 g (poznámka 8.3) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 10 g síranu draselného (3.8) a jako katalyzátor (3.1) přiměřeně navážce 0,3 až 0,4 g oxidu měďnatého nebo 0,9 až 1,2 g pentahydrátu síranu měďnatého. Potom se přidá konc. kyselina sírová (3.3) v množství 25 ml, zamíchá a umístí do mineralizačního zařízení (4.1). Baňka se umísťuje nakloněná od 30 do 45 °C, tuba do mineralizačních bloků, kde je zaručen konstantní ohřev, ve svislé poloze.

Potom se baňka (tuba) (4.3) mírně zahřívá tak, aby se zabránilo vzlínání pěny do hrdla baňky a případnému úniku vzorku z baňky (tuby). Doporučuje se před začátkem zahřívání přidat menší množství odpěňovacího prostředku (4.6). V mírném zahřívání s občasným promícháním se pokračuje tak dlouho, dokud zcela nevymizí pěna a veškerá hmota vzorku je zkarbonizovaná, až v podstatě do ustálení varu kapaliny. Potom se intenzita zahřívání zvýší a seřídí tak, aby výpary kyseliny sírové kondenzovaly poblíže středu hrdla baňky a aby nedocházelo k podstatným změnám v objemu kyseliny i ulpívání částic vzorku na stěnách baňky (tuby). Během mineralizace nesmí docházet k přehřívání stěn baňky, které nejsou ve styku s kapalinou. Provádí-li se zahřívání baňky plamenem, zabraňuje se přehřátí stěn baňky umístěním baňky na azbestovou síťku s otvorem, který odpovídá hladině kapaliny v baňce. Jakmile se kapalina stane zcela čirou (může být zabarvena barvou katalyzátoru), pokračuje se v ohřevu od tohoto okamžiku ještě 2 hod. Potom se kapalina ponechá téměř zchladnout a opatrně se zředí asi 75 až 100 ml vody (poznámka 8.4). V případě, že po zchladnutí roztok ztuhne, přidá se větší množství vody (250 až 300 ml), částečně zahřeje a promíchává do rozpuštění tuhého zbytku. Nerozpustí-li se ani potom, je nutno stanovení opakovat s větším objemem kyseliny sírové (3.3).

Obsah mineralizační baňky (tuby) (4.3) nebo jeho část, po převedení do odměrné baňky a doplnění na přesně definovaný objem, se kvantitativně převede do destilační baňky, přidá se pár varných tělísek a baňka se umístí do destilačního zařízení (4.2). Do dávkovacího zařízení destilačního přístroje (4.2) se odměří 100 ml vytěšňovacího roztoku (3.5) a nakonec k přestupníku destilačního přístroje (zařízení) se umístí předloha tak, aby konec přestupníku zasahoval asi 10 mm pod hladinu roztoku v předloze. Jako předloha se použije titrační baňka vhodného objemu, do které se přidá přesně 25 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.4) nebo roztoku kyseliny borité (3.7) (poznámka 8.5) a několik kapek indikátoru (3.2), není-li

v návodu případně použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Objem předlohy se vhodně zředí vodou a po plynotěsném uzavření destilačního přístroje se z dávkovacího zařízení vypustí opatrně po částech vytěšňovací roztok (3.5) do destilační baňky a její obsah se začne zahřívat. Destiluje se asi 30 minut, čímž objem v předloze dosáhne asi 150 ml, není-li návodem případně použitého destilačního zařízení uvedeno jinak.

Před ukončením destilace se sníží předloha tak, aby konec přestupníku byl nad hladinou kapaliny v předloze a další podíl destilátu se zkouší pH papírkem (4.4), zda ještě nevykazuje alkalickou reakci. Není-li tomu tak, destilace se ukončí a přestupník se i vně opláchne do předlohy.

V opačném případě (reakce je alkalická) se buď destilace (dělený mineralizát) nebo celé stanovení musí opakovat s prodloužením doby destilace. Stejně tak je nutno destilaci (celé stanovení) opakovat, dojde-li k zalkalizování roztoku v předloze (změna zabarvení indikátoru (3.1)), s přidáním většího objemu kyseliny (3.4 nebo 3.7) do předlohy či snížením navážky vzorku (podílu mineralizátu).

Obsah titrační baňky se titruje ihned po skončení destilace (pokud to dovolují podmínky instrumentace doporučuje se titrovat již během destilace) odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.6) nebo odměrným roztokem kyseliny sírové (3.4) (poznámka 8.6) téže koncentrace, která byla použita do předlohy, do právě vzniklé změny zabarvení roztoku.

Vedle toho se provede slepá zkouška se všemi použitými chemikáliemi ve stejném množství, jen namísto zkoušeného vzorku se přidá 1,0 g sacharosy (3.9). V případě nálezu dusíku ve slepé zkoušce je nutno jeho množství od zjištěného při analýze vzorku odečíst (viz výpočet). Slepá zkouška se provádí při každé sérii stanovení nebo při změně jakékoliv chemikálie.

Při každé změně chemikálií včetně odměrných roztoků se provádí kontrolní test: stanoví se obsah dusíku v přesně definované sloučenině acetanilidu (3.10) nebo tryptofanu (3.11) s přídavkem 1,0 g sacharosy (3.9) a při zachování stejného pracovního postupu jako u vzorků i za použití stejného množství a stejných chemikálií i pomůcek. Pro snadno mineralizovatelné materiály se volí acetanilid (3.10), pro obtížněji mineralizovatelné tryptofan (3.11). Stanovení probíhá v pořádku je-li shoda v mezích 95 až 105 relat. %

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah dusíkatých látek v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

6.1 při jímání destilátu do kyseliny sírové

$$X = \frac{6,25,28,014 \cdot (V_0 - V_1) \cdot C_1}{m} \quad (\text{poznámka 8.1})$$

6.2 při jímání destilátu do kyseliny borité

$$X = \frac{6,25,28,014 \cdot (V_3 - V_2) \cdot C_2}{m} \quad (\text{poznámka 8.1})$$

kde V_0 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku v ml

V_1	spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek v ml
V_2	spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku v ml
V_3	spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek v ml
C_1	přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l
C_2	přesná koncentrace použitého odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l
m	hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku v g
28,014	látkové množství dusíku, odpovídající použitému odměrnému roztoku kyseliny sírové

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g /kg.

7. Opakovatelnost

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

do 200 g/kg	2 g/kg
od 201 g/kg do 400 g/kg	1 %relat.
nad 400 g/kg	4 g/kg

8. Poznámky

8.1 Pro zvláštní případy hodnocení, nejde-li o stanovení výživné hodnoty, lze použít speciálních faktorů místo 6,25 a to:

5,75 pro obiloviny a mlýnská krmiva
6,37 pro mléko a mléčné výrobky
6,00 pro živočišné moučky
5,61 pro klij
5,55 pro želatinu

Přepočtový faktor je nutno vždy s výsledkem uvést.

8.2 Vhodným zařízením mohou být i automatické či poloautomatické destilační přístroje, pokud splňují podmínky kvantitativního předestilování amoniaku např. Kjeltec, Kjeltec-auto.

8.3 Hmotnost vzorku se volí podle očekávaného obsahu dusíkatých látek tak, aby obsah byl v rozmezí 0,125 až 1,25 g

8.4 Doporučuje se ředit ještě částečně teplý mineralizát, aby se zabránilo zpětnému vykrystalizování solí, které se hůře rozpouštějí. Zředování se musí provádět velmi opatrně, protože je proti pravidlům zředování roztoků kyselin.

8.5 Jímání destilátu do kyseliny borité je možné jen v případě, že teplota kondenzátu nepřesáhne 25 °C (chlazení) a při obsahu dusíkatých látek větším než 400 g/kg se volí poloviční hmotnost vzorku. Titrace se v tomto případě provádí odměrným roztokem kyseliny sírové.

8.6 Koncentrace kyseliny sírové se volí podle očekávaného obsahu dusíkatých látek ve zkoušeném vzorku a podle toho, zda mineralizát je destilován celý nebo pouze jeho podíl.

2.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 123, 29/05/72

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové v krmivech.

Metoda stanovení je použitelná pro všechny obsahy a všechny druhy krmiv, obsahující tuto složku s výjimkou krmiv s aditivním obsahem močoviny a krmiv minerálních. Metoda nerozlišuje formy proteinového a neproteinového dusíku a má-li být neproteinový dusík vyloučen z výsledku stanovení, musí být jeho obsah stanoven příslušnou metodou samostatně a od stanovení rozpustného dusíku odečten.

I když výsledek tohoto stanovení do jisté míry vyjadřuje míru stravitelnosti krmiva, nemá žádnou přímou spojitost se stravitelností dusíkatých látek "in vivo".

2. Princip

Dusíkaté látky rozpustné působením pepsinu v kyselině chlorovodíkové se stanoví titračně po 48 hod inkubaci vzorku s pepsinem při 40 °C, následné separaci od nerozpustné části a určením obsahu dusíkatých látek v rozpustné části metodou podle Kjeldahla.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 7 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,075 \text{ mol/l}$

3.3 Pepsin, s ověřenou aktivitou 2000 j./g (Merck, obj. č. 7190) (poznámka 8.6)

3.4 Pepsin, inkubační roztok 400 j./l

Příprava: 0,200 g pepsinu (3.3) se rozpustí ve 1000 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2),

předem zahřáté na teplotu 40 °C, a roztok se promíchá. Roztok se připravuje vždy čerstvý

3.5 Diethylether (poznámka 8.1) nebo petrolether (frakce 40 až 60 °C) (poznámka 8.1)

3.6 Chemikálie používané pro metodu 2.1 Stanovení obsahu dusíkatých látek

3.7 Odpěňovací prostředek (např. parafin či silikonový olej)

3.6 Katalyzátory: Oxid měďnatý (CuO) nebo síran měďnatý, pentahydrát ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

3.7 Indikátory:

Směsný: 2,0 g methylové červeni a 1,0 g methylenové modři se rozpustí v 1000 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

Methylová červeň: 0,30 g methylové červeni se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

- 3.8 Kyselina sírová, koncentrovaná ($\rho = 1.84 \text{ g/ml}$)
- 3.9 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ a $0,05 \text{ mol/l}$
- 3.10 Hydroxid sodný, roztok 400 g/l
- 3.11 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$ a $0,1 \text{ mol/l}$
- 3.12 Kyselina boritá, roztok 4%
- 3.13 Síran draselný, pevný
- 3.14 Sacharosa
- 3.15 Acetanilid (bod tání 114°C) s obsahem $10,36 \%$ dusíku, tj. $64,75 \%$ dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce
- 3.16 Tryptofan (bod tání 282°C) s obsahem $13,72 \%$ dusíku, tj. $85,75 \%$ dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Termostat s automaticky regulovatelnou teplotou $40 \pm 1^\circ\text{C}$ nebo lázeň vodní stejných parametrů
- 4.2 Odstředivka laboratorní s odstředivým zrychlením do 5000 G , vybavená kyvetami na 250 ml ,
nejvhodněji z plastické hmoty
- 4.3 Baňka odměrná na 500 ml se širokým hrdlem (podle Stohlmanna) a zátkou
- 4.4 Zařízení mineralizační vhodné konstrukce (poznámka 8.2)
- 4.5 Zařízení destilační vhodné konstrukce
- 4.6 Baňky nebo tuby mineralizační vhodné velikosti (baňky se doporučují podle Kjeldahla 500 až 750 ml)
- 4.7 Papírek pH nebo lakmusový

Všechny použité chemikálie (mimo acetanilid a tryptofan) i zkušební pomůcky musí být prosté dusíku.

5. Postup

5.1 Krmiva s obsahem tuku do 100 g/kg

Odváží se ($2 \pm 0,001$) g zkušební vzorku do odměrné baňky na 500 ml a přidá se 450 ml inkubačního roztoku pepsinu (3.4), předem zahřátého na teplotu 40°C (poznámka 8.2). Inkubační roztok pepsinu (3.4) se přidává po částech s průběžným promícháváním a před přidáním posledního přídatku se důkladně promíchá, aby se rozrušila aglomerace zkoušeného vzorku. Posledním přídatkem tohoto roztoku se opláchnou stěny baňky, pak se zkontroluje hodnota pH, která má být nejvýše $1,7$ (poznámka 8.3). Baňka se uzavře zátkou, vloží do termostatu nebo vodní lázně (4.1) vyhřáté na 40°C a při této teplotě nechá inkubovat po dobu 48 hod, přičemž se přibližně vždy po 6 , 24 a 32 hod promíchá. Během inkubace musí veškerá hmota zůstat ve styku s roztokem.

Po 48 hodinách inkubace se baňka z termostatu nebo vodní lázně vyjme, přidá se 15 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), obsah se promíchá, vytemperuje na teplotu laboratoře (omezení působení pepsinu), doplní vodou po rysku a promíchá. Potom se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky (poznámka 8.4), přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

V části filtrátu se stanoví dusíkaté látky podle Přílohy 9, část 2.1 Stanovení dusíkatých látek s touto úpravou:

Odpipetuje se 100 až 250 ml filtrátu (poznámka 8.5) do Kjeldahlovy baňky nebo mineralizační tuby, přidá se opatrně kyselina sírová (3.8) a katalyzátor (3.6) a po případě i odpěňovací prostředek (3.17) a promíchá se. Ponechá se při laboratorní teplotě přes noc. Poté se baňka vloží do mineralizačního zařízení (4.4), nejprve se intenzivnějším zahříváním odpaří nadbytečná voda a dále se postupuje stejně jako při mineralizaci vzorku podle Přílohy 9, část 2.1 Stanovení dusíkatých látek, přičemž doba mineralizace od vyčerpání kapaliny se zkracuje na 1 hod.

Další postup zkoušky (mineralizace, destilace, titrace, výpočet) se provádí stejně jako při stanovení dusíkatých látek podle Přílohy 9, část 2.1.

Vedle toho se provede slepá zkouška za použití stejného postupu s výjimkou přidání zkoušeného vzorku. Zjištěné množství dusíkatých látek touto zkouškou se od množství celkového zjištěného při stanovení zkoušeného vzorku odečte.

5.2 Krmiva s obsahem tuku nad 100 g/kg

Zkušební vzorek připravený podle 5.1 musí být před inkubací alespoň částečně odtučněn. Odtučnění se provede trojnásobnou dekantací vzorku diethyletherem nebo petroletherem (3.5) po dávkách 10 až 15 ml, přičemž je nutno dbát, aby nedošlo ke ztrátám vzorku. Po posledním odlití diethyletheru (petroletheru) se tento nechá ze vzorku volně odpařit.

Jiný způsob odtučnění lze provést tak, že zkoušený vzorek se odváží na středně hustý filtr a promývá diethyletherem (petroletherem) (3.5) po dávkách, jak výše uvedeno a po odpaření diethyletheru (petroletheru) z filtru se vzorek převede kvantitativně do odměrné baňky.

Dále se postupuje podle 5.1.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

6.1 při jímání destilátu do kyseliny sírové

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_o - V_1) \cdot C_1}{m}$$

V_o je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku v ml

V_1 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek v ml

C_1 přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l

6.2 při jímání destilátu do kyseliny borité

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_3 - V_2) \cdot C_1}{m}$$

kde	V_2	spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku v ml
	V_3	spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek v ml
	C_1	přesná koncentrace použitého odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l
	m	hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku v g
	28,014	látkové množství dusíku, odpovídající použitému odměrnému roztoku kyseliny sírové

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:	do 200 g/kg	4 g/kg
	od 201 do 400 g/kg	2 % relat.
	nad 400 g/kg	8 g/kg

8. Poznámky

8.1 Diethylether a petrolether jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Inkubační roztok pepsinu se nesmí zahřívat přímo, aby nedošlo k případné jeho inaktivaci.

8.3 V případě potřeby se upraví pH roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.1), což přichází v úvahu zejména u silně alkalických krmiv.

8.4 U krmiv, kde by filtrace probíhala s pravděpodobností obtížně nebo kde by nebylo možno získat zcela čirý roztok (nerozpustné částice procházející filtrem, např. některé druhy kvasnic), se oddělí nerozpustný podíl postupným odstředěním suspence. Pro stanovení dusíkatých látek se použije supernatant.

8.5 Alikvotní podíl filtrátu se volí s ohledem na předpokládaný obsah dusíkatých látek a koncentrace použitých odměrných roztoků.

8.6 Je možno použít pepsin s komerčně ověřenou aktivitou.

2.3 Stanovení obsahu bílkovin

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení bílkovin v krmivech.

Metoda je použitelná pro všechna krmiva organického původu.

2. Princip

Bílkoviny se stanoví titračně metodou podle Barnsteina po jejich oddělení od dusíkatých látek nebílkoviného původu vysrážením mědnatou solí.

3. Chemikálie

3.1 Síran mědnatý, roztok 60 g/l

3.2 Hydroxid sodný, roztok 12 g/l

3.3 Chlorid barnatý, roztok 10 g/l

3.4 Hexakynoželesnatan tetradrásečný $[K_4Fe(CN)_6]$, roztok 100 g/l

3.5 Katalyzátory: Oxid mědnatý (CuO) nebo
Síran mědnatý, pentahydrát ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)

3.6 Indikátory

Směsný: 2,0 g methylové červení a 1,0 g methylenové modři se rozpustí v 1000 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

Methylová červeň: 0,30 g methylové červení se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

3.7 Kyselina sírová, konc. ($\rho = 1,84 \text{ g/ml}$)

3.8 Kyselina sírová, roztok $c(H_2SO_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ a $0,05 \text{ mol/l}$

3.9 Hydroxid sodný, roztok 400 g/l ($\rho = 1,36 \text{ g/ml}$)

3.10 Hydroxid sodný, roztok $c(NaOH) = 0,2 \text{ mol/l}$ a $0,1 \text{ mol/l}$

3.11 Kyselina boritá, roztok 4 %

3.12 Síran draselný, pevný

3.13 Sacharosa

3.14 Acetanilid (bod tání $114^\circ C$) s obsahem 10,36 % dusíku, tj. 64,75% dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce

3.15 Tryptofan (bod tání $282^\circ C$) s obsahem 13,72 % dusíku, tj. 85,75% dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce

Všechny použité chemikálie (mimo acetanilid a tryptofan) i zkušební pomůcky musí být prosté dusíku.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Lázeň vodní s termostatem
- 4.2 Odstředivka laboratorní vhodné konstrukce
- 4.3 Zařízení mineralizační vhodné konstrukce
- 4.4 Zařízení destilační vhodné konstrukce
- 4.5 Baňky nebo tuby mineralizační vhodné velikosti (baňky se doporučují podle Kjeldahla 500 až 750 ml)
- 4.6 Papírek pH nebo lakmusový
- 4.7 Varná tělíska (pemza gran., střípky skleněné či porcelánové)
- 4.8 Odpeňovací prostředek (např. parafin či silikonový olej)

5. Postup

Asi 1 až 2 g zkušební vzorku se odváží s přesností nejméně na 0,001 g do kádinky na 400 ml, přidá 100 ml horké vody a zahřeje k varu. Potom se přidá 25 ml roztoku síranu mědnatého (3.1), přikryje hodinovým sklíčkem a vaří po dobu 2 min. Po skončení varu se za stálého míchání přidává po částech 25 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2), obsah kádinky se zředí 100 ml horké vody, promíchá a po usazení sraženiny se filtruje dekantací přes středně hustý filtr, prostý dusíku. Promývá se opět dekantací horkou vodou i po převedení sraženiny na filtr, až již další podíl filtrátu nedává reakci na měď (roztok 3.4), resp. na sírany (roztok 3.3). Filtrát se dále nepoužije.

U škrobnatých krmiv a krmiv, kde filtrace probíhá velmi obtížně, se pevný podíl odděluje odstředěním (4.2) a promývá opět dekantací horkou vodou do negativní reakce další promývací kapaliny na měď (roztok 3.4) resp. sírany (roztok 3.3). Jiným způsobem usnadnění filtrace je 30 min. zahřívání výluhu na vodní lázni (4.1) při teplotě 60 °C, namísto vaření po dobu 2 minut.

Filtr se sraženinou se převede do mineralizační baňky (4.5), resp. sraženina se převede pomocí dávky kyseliny sírové (3.7) z centrifugační kyvety do mineralizační baňky, při opatrném zředění vodou.

Dále se postupuje podle Přílohy 9, část 2.1 Stanovení dusíkatých látek.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah bílkovin v g/kg (X) se vypočítá jako obsah dusíkatých látek podle vzorce:

6.1 při jímání destilátu do kyseliny sírové

$$X = \frac{6,25.28,014.(V_0 - V_1)}{m}$$

6.2 při jímání destilátu do kyseliny borité

$$X = \frac{6,25.28,014.(V_3 - V_2).C_2}{m}$$

kde V_0 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku v ml

V_1 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku v ml

V_3 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek v ml

C_1 přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l

C_2 přesná koncentrace použitého odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l

m hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku v g

28,014 látkové množství dusíku, odpovídající použitému odměrnému roztoku kyseliny sírové

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

2.4 Stanovení obsahu aminokyselin

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 93/012.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu aminokyselin v krmivech.

2. Princip

Volné, nejčastěji přidané aminokyseliny se ze vzorku vyextrahují roztokem kyseliny chlorovodíkové, extrakt se zahustí a obsah aminokyselin se stanoví metodou kapalinové chromatografie.

Vázané aminokyseliny je nejprve nutno uvolnit z bílkovinného řetězce. Peptidová vazba mezi aminokyselinami řetězce bílkoviny se hydrolyzuje vhodným činidlem a jednotlivé aminokyseliny se uvolní do roztoku. Jako hydrolyzační činidlo se používá roztok kyseliny chlorovodíkové pro stanovení těchto aminokyselin: glycin, alanin, serin, threonin, valin, isoleucin, leucin, lysin, arginin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, fenyलalanin, tyrosin, histidin a prolin. Cystin (dvě molekuly cysteinu spojené S-S vazbou) a methionin se nejprve oxidují směsí kyseliny mravenčí a peroxidu vodíku za vzniku kyseliny cysteové a methioninsulfonu a teprve poté se řetězec bílkoviny hydrolyzuje. Vzhledem k nestálosti tryptofanu v kyselém prostředí je pro jeho stanovení nutno použít hydrolýzu v alkalickém prostředí hydroxidu barnatého.

Z hydrolyzátů vzorku se odstraní hydrolyzační činidlo, kyselina chlorovodíková odpařením resp. hydroxid barnatý vysrážením jako síran barnatý, a tyto se převedou na definovaný objem.

Obsah aminokyselin se stanoví metodou kapalinové chromatografie a vypočte porovnáním se standardem.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná. ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$, (možno přidat 0,1 % fenolu)

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ s 2 % thiodiglykolu

3.4 Hydroxid barnatý oktahydrát ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{ H}_2\text{O}$) s minimálním obsahem CO_2

3.5 Peroxid vodíku, roztok 30 %

3.6 Kyselina mravenčí, $99 \pm 1 \%$

3.7 Kyselina mravenčí, 85 %

3.8 Ethylalkohol čistý 96 % (poznámka 8.1)

3.9 Isopropylalkohol (poznámka 8.1)

- 3.10** Isopropylalkohol, roztok 12 %
- 3.11** Oktylalkohol čistý (poznámka 8.1)
- 3.12** Standardní směs aminokyselin (od výrobce deklarované jako standardy pro stanovení aminokyselin). Navažují-li se jednotlivé aminokyseliny, suší se v exsikátoru minimálně jeden týden nad oxidem fosforečným.
- 3.13** Kyselina 5-sulfosalicylová, roztok 60 g/l.
- 3.14** Dusík (méně než 10 mg kyslíku/kg) nebo jiný inertní plyn
- 3.15** Thiodiglykol, koncentrovaný.
- 3.16** Thiodiglykol, roztok 0,5 %
- 3.17** Citrát sodný, trihydrát
- 3.18** Fenol
- 3.19** Citronanový "rozpuštěcí" tlumivý roztok o pH = 2,2
Příprava: 19,61 g citronanu sodného (3.17), 5 ml thiodiglykolu (3.15), 1 g fenolu (3.18) a 16,5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) se rozpustí v 800 ml vody, pH se upraví na 2,2, doplní se do 1 litru a promíchá.
- 3.20** Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), roztok 91 g/l
- 3.21** Hydroxid sodný, roztok 100 g/l
Chemikálie předepsané k jednotlivým způsobům chromatografických stanovení aminokyselin v předepsané čistotě.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1** Kapalinový chromatograf vybavený tímto příslušenstvím:
 - 4.1.1** Pumpy dávkující jak eluční tlumivé roztoky, tak derivatizační činidlo s přesností $\pm 0,5$ %
 - 4.1.2** Dávkovací zařízení at' manuální či automatické s přesností 2 %
 - 4.1.3** Temperovaný kolonový systém
 - 4.1.4** Detekční systém, pracující s dostatečnou citlivostí a s lineární odezvou na změnu koncentrace aminokyselin v rozsahu běžně používaném
- 4.2** Termostat s automatickou regulací teploty a nucenou cirkulací vzduchu, nerezové těleso, nebo
- 4.3** Autokláv nebo
- 4.4** Topná plotna s automatickou regulací teploty (příkonu)
- 4.5** Odstředivka s rotorem na kyvety 100 a 200 ml
- 4.6** Odparka rotační vakuová
- 4.7** Vývěva olejová nebo vodní s pojistnou láhví
- 4.8** pH metr
- 4.9** Systém s inertním plynem s redukčním ventilem a trojcestným kohoutem na promývání hydrolyzátů plynem

4.10 Skleněné nádoby:

- 4.11** Ampule skleněná 150 ml s hrdlem pro zatavení nebo ampule skleněná s teflonovým uzávěrem.
- 4.12** Baňky varné s normalizovaným zábrusem (dále jen NZ) 29/32, 750 ml a 1000 ml s delším hrdlem
- 4.13** Baňky varné s NZ 29/32, 250, 500, 750 ml se zábrusovým uzávěrem s jednocestným kohoutem
- 4.14** Baňky s kulatým dnem NZ 29/32 250, 500, 750 ml
- 4.15** Kelímek teflonový uzavíratelný
- 4.16** Chladič zpětný vzdušný NZ 29/32 délky cca 75 cm
- 4.17** Filtrační nálevka se skleněnou fritou s velikostí pórů 15-40 μm
- 4.18** Filtr membránový
- 4.19** Vodní lázeň s termostatem

5. Postup

5.1 Úprava vzorků

Navazuje se vzorek, připravený s následující změnou: vzorek s obsahem vlhkosti vyšším než 10,0 % až 15,0 % (podle druhu materiálu) je nutno předsušit při teplotě, která nepřesáhne 50 °C.

U vzorků s obsahem tuku vyšším než 100 g/kg se provede odtučnění.

5.2 Příprava hydrolyzátů

5.2.1 Hydrolyza v kyselém prostředí

5.2.1.1 Odváží se takové množství vzorku s přesností nejméně na 0,0001 g, aby obsahovalo alespoň 25 mg dusíku.

5.2.1.2 Kyselou hydrolyzu je možno provádět buď v uzavřených skleněných ampulích (4.11) nebo ve varných baňkách s uzávěry s jednocestným kohoutem (4.13) nebo ve varných baňkách bez uzavření (4.12) pod zpětným chladičem (4.16).

5.2.1.3 Navážka vzorku se kvantitativně převede do hydrolyzační baňky nebo ampule (4.11), přidá se dostatečný objem kyseliny chlorovodíkové (3.2), cca 150 až 250 ml na jeden gram navážky vzorku a kroužením se obsah promísí. Přes trojcestný kohout (4.9), který má na jednu cestu přivedeno vakuum a na druhou inertní plyn (3.14), se suspence vzorku zbaví střídavým přepínáním vakua a inertního plynu rozpuštěného vzduchu. Při hydrolyze pod zpětným chladičem (4.16) není nutno rozpuštěný vzduch ze vzorku odstraňovat. Varnou baňku (4.14) a skleněnou ampuli s teflonovým uzávěrem (4.11) je možno uzavřít vakuovanou; zatavitelná ampule se na vodní lázni zahřeje na cca 100 °C a hrdlo se zataví. Opatrným kroužením se opláchnou vnitřní stěny nádoby tak, aby na nich neulpěly částice vzorku.

5.2.1.4 Hydrolyzační nádoby se umístí např. do termostatu s nucenou cirkulací vzduchu (4.2) a po dosažení teploty 110 °C - 115 °C probíhá hydrolyza 23 hodin. Při použití varných baňek,

uzavřených kohoutem (4.13) se doporučuje uzávěr připevnit "klipsnou" a v počátečních stadiích, cca 1 hod., přetlak par kyseliny chlorovodíkové opatrně odpouštět.

5.2.1.5 Hydrolýza pod zpětným chladičem (4.16) probíhá na topné plotně (4.4) s takovým příkonem, aby se obsah baňky živě vařil, což odpovídá bodu varu azeotropické směsi voda - kyselina chlorovodíková, cca 110 °C.

5.2.1.6 Adekvátní výtěžky aminokyselin poskytuje také hydrolýza při 145°C po dobu 4 hod. Tento způsob je vhodné provádět v ampulích (4.11) v autoklávu, z důvodu přetlaku.

5.2.1.7 Po ukončení hydrolýzy se obsah hydrolyzační baňky nebo ampule kvantitativně vodou převede přes filtrační nálevku s fritou S3 (4.17) do odpařovací baňky (4.14) s kulatým dnem. Jemný sediment zanáší fritu a významně se podílí na zpomalení filtrace, s výhodou je možno použít filtraci se sníženým tlakem či filtrovat nejprve čirý supernatant po přirozené sedimentaci a sediment přenést na fritu až při promývání vodou.

5.2.1.8 Filtrát se odpaří na rotační vakuové odparce (4.6) za použití olejové či vodní vývěvy (4.7), (nutno používat promývací láhev s hydroxidem sodným pro olejovou vývěvu a pojistnou láhev pro obě vývěvy) do sirupovité konzistence při teplotě max. 50 °C. Při odpaření do sucha vznikají ztráty jednak rozstříkem až do trubice odparky a jednak degradací samotných aminokyselin. Sirupovitý odparek se rozmíchá v několika ml isopropanolu (3.10) a znovu odpaří. Toto se opakuje ještě jednou.

5.2.1.9 Odparek se kvantitativně převede do definovaného objemu tlumivým roztokem o pH 2,2 (3.19). Další možná úprava vzorku závisí na použitém chromatografickém postupu.

5.2.2 Oxidativní hydrolýza

5.2.2.1 Sirné aminokyseliny se oxidují směsí peroxidu vodíku (3.5) a kyseliny mravenčí (3.6) (1 + 19) nebo peroxidu vodíku (3.5) a kyseliny mravenčí (3.7) (1 + 9). Směs se po smísení nechá stát při pokojové teplotě 2 hodiny a poté se umístí do chladničky při teplotě 0 °C na dobu 15 minut.

5.2.2.2 Vzorek navážený s přesností 0,0001 g, který obsahuje alespoň 25 mg dusíku, se kvantitativně převede do varné baňky (4.12), přidá se 15 ml oxidační směsi (viz 5.2.2.1) a po opatrném rozmíchání se umístí do chladničky při teplotě 0 °C až 4 °C na dobu 16 hod. Po této době se buď

a) přidá přebytek kyseliny chlorovodíkové nebo

b) se přebytek oxidační směsi odstraní buď za vakua nebo lyofilizací.

5.2.2.3 K oxidovanému vzorku se přidá nejprve opatrně 1 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a po vyšumění dalších 100-150 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Hydrolýza probíhá pod zpětným chladičem (4.16) při teplotě 110 °C po dobu 23 hodin. Dále se postupuje podle 5.2.1.7.

5.2.2.4 K oxidovanému vzorku se přidá 60 ml ledové deionisované vody. Na rotační vakuové odparce se obsah zahustí do sirupovité konzistence při teplotě max. 30 °C. Baňka se propláchne cca 30 minut inertním plynem (3.14), přidá se 20 ml vody a znovu se odpaří do sirupovité konzistence. Odparek se za tepla rozpustí ve 100-150 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a kvantitativně se dalším podílem této kyseliny převede do hydrolyzační nádoby tak, aby objem kyseliny odpovídal obsahu uvedenému v 5.2.1.7. K odstranění pění možno přidat oktylalkohol (3.11). Další postup hydrolýzy je totožný s postupem popsaným v 5.2.1.7.

5.2.2.5 K oxidovanému vzorku se přidá 60 ml ledové deionisované vody. Suspense se namrazí na stěny baňky a vysuší mrazovou sublimací. Lyofilisát se rozpustí v malém objemu kyseliny chlorovodíkové (5.2) a kvantitativně převede do hydrolyzační nádoby tak, aby objem kyseliny (5.2) odpovídal uvedenému v 5.2.1.7. Další postup kyselé hydrolyzy je totožný s postupem uvedeným v 5.2.1.7.

5.2.3 Hydrolyza v alkalickém prostředí

Hydrolyza v alkalickém prostředí pro stanovení tryptofanu se provádí v uzavíratelných nádobách, jejichž konstrukce umožňuje zvýšení vnitřního tlaku při zahřevu. S výhodou se používají teflonové kelímky (4.15) opatřené perforovatelným septem.

Do nádoby se odváží 0,2 až 0,4 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,0001 g a smíchá se 4 g hydroxidu barnatého (3.4), přidají se 4 ml vody a po uzavření se umístí do vroucí vodní lázně (4.19) na 10 minut. Poté se obsah nádoby 2 až 3krát promyje inertním plynem (3.14) (pomocí připojeného vakua, pozor na pění, nutno používat pomalé změny tlaku) a hydrolyzuje se při teplotě 110 °C po dobu 17 hodin. Po ukončení hydrolyzy se nádoby umístí do teplé vody, aby obsah zůstal stále tekutý, při chladnutí rychle tuhne. Před otevřením je nezbytné opatrně perforovat septum injekční jehlou nebo pootevřít kohout, aby došlo k vyrovnání přetlaku. Po otevření se ke vzorku přidají 2 ml thiodiglykolu (3.15) a přibližně 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2), aby pH dosáhlo hodnoty cca 2. Celý obsah hydrolyzační nádoby se kvantitativně převede horkým roztokem thiodiglykolu (3.16), (max. 15 ml), do 50 ml odměrné baňky, přidá se 25 ml roztoku síranu sodného (3.20). Po vychladnutí na teplotu 20 °C se objem doplní vodou po rysku, promíchá a sraženina síranu barnatého se nechá sedimentovat, poté se odstředí při 1 000 G po dobu 30 minut. Čirý supernatant je možno použít přímo k dávkování pro vlastní chromatografické stanovení.

5.2.4 Extrakce volných aminokyselin

Do kuželové baňky se odváží 1 až 3 gramy zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,0001 g a extrahuje se 100,0 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) třepáním nebo mícháním po dobu 1 hod. Poté se suspension nechá sedimentovat nebo se pevný podíl odfiltruje.

K 10 ml čirého supernatantu nebo filtrátu se ve 100 ml baňce za stálého míchání přidá 5 ml roztoku kyseliny sulfosalicylové (3.13) a po 5 minutách se sraženina bílkovin odstraní centrifugací při 15 000 G po dobu 15 minut nebo odfiltruje membránovým filtrem (4.18).

Supernatant nebo filtrát se kvantitativně převede do odměrné baňky definovaného objemu, pH se upraví roztokem hydroxidu sodného (3.21) na hodnotu 2.2 a doplní po rysku a promíchá.

Obsah aminokyselin se stanoví chromatograficky.

5.3 Chromatografické stanovení aminokyselin

Obsah jednotlivých aminokyselin se stanoví metodou kapalinové chromatografie podle návodu ke konkrétnímu kapalinovému chromatografu (4.1) a za podmínek, odpovídajícím použité koloně (4.1.3). Každý vzorek se analyzuje dvakrát a v případě relativní odchylky větší než 5 % se stanovení opakuje.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Výpočet obsahu jednotlivých aminokyselin se provede z poměru ploch píků vzorku a standardu o známé koncentraci při zohlednění ředění vzorku při přípravě. Při používání vnitřního standardu, např. norleucinu nebo methioninsulfoxidu či další ninhydrinpozitivní látky v přírodním materiálu se nevyskytující a s retenčním časem odlišným od stanovovaných aminokyselin, se nejprve plochy píků korigují na plochu píku vnitřního standardu. Plocha píku se vypočte jako násobek výšky a šířky v polovině výšky nebo se určí planimetrickou metodou nebo integrací pomocí integrátoru.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se jako:

g aminokyseliny/ 16 g dusíku s přesností na 0,1 g/16 g N

g aminokyseliny/ 100 g aminokyselin s přesností na 0,1 g/100 aminokyselin

g aminokyseliny na 1 000 g (1 kg) sušiny vzorku s přesností na celé jednotky

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními, prováděnými na stejném vzorku musí být maximálně 5 % relat.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol, propylalkohol a oktylalkohol nebezpečnými hořlavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s koncentrovanými roztoky je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

2.5 Stanovení obsahu močoviny

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení močoviny v krmivech s aditivním obsahem této látky.

2. Princip

Močovina se stanoví po vyčechení vodního výluhu vzorku Carresovými činidly a odfiltrování nerozpustného zbytku, reakcí s p-dimethylaminobenzaldehydem spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm.

3. Chemikálie

3.1 p-Dimethylaminobenzaldehyd (dále jen DMAB), roztok

Příprava: 1,6 g DMAB se rozpustí v 100 ml ethylalkoholu, přidá se 10 ml konc. kyseliny chlorovodíkové a promíchá

Skladovatelnost tohoto roztoku je nejvýše 15 dní

3.2 Carresovo činidlo I, roztok

Příprava: 21,90 g dihydrátu octanu zinečnatého $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí asi ve 30 až 50 ml vody, přidají se 3 ml ledové kyseliny octové (CH_3COOH), doplní vodou na objem 100 ml a promíchá

3.3 Carresovo činidlo II, roztok

Příprava: 10,60 g trihydrátu hexakynoželeznatanu tetradraselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v 50 ml vody, doplní vodou na 100 ml a promíchá

3.4 Močovina, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,100 g močoviny, rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 1 mg močoviny.

3.5 Uhlí aktivní, které neabsorbuje močovinu (musí být ověřeno)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 420 nm a kyvetou o optické délce 10 mm

4.2 Míchací zařízení s frekvencí otáčení asi 35 až 40 otáček za minutu

4.3 Lázeň vodní s automatickou regulací teploty při 20 °C

4.4 Zkumavky o rozměrech 160 mm x 16 mm se zabroušenou zátkou.

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady nejméně 6 odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; (4,0 ;) 5,0 ; 7,0 ; 9,0 a 10,0 ml základního standardního roztoku močoviny (3.4), každá z baněk se doplní vodou po rysku a promíchá. Tyto zředěnější standardní roztoky odpovídají obsahům 10,0; 20,0; 30,0; (40,0); 50,0; 70,0; (90,0) a 100,0 µg močoviny v 1 ml.

5.1.2 Do sady nejméně 6 zkumavek se odpipetuje z každého zředěnějšího standardního roztoku po 5 ml, dále se do každé zkumavky odpipetuje 5 ml DMAB (3.1), promíchá a ponechá na vodní lázni (4.3) 15 minut při teplotě 20 °C.

Koncentrace v jednotlivých zkumavkách je 5 až 50 µg močoviny v 1 ml.

5.1.3 U takto připravených roztoků se změří absorbance v 10 mm kyvetě na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 420 nm proti kompenzačnímu roztoku (u vzorků proti slepému roztoku), který obsahuje 5 ml DMAB + 5 ml vody.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf v µg močoviny/ml.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Odváží se asi 2 g zkušebního vzorku (poznámka 8.1) s přesností nejméně na 0,001 g do odměrné baňky na 500 ml, přidá se 400 ml vody a 1 g aktivního uhlí (3.5). Po promíchání se dále přidá 5 ml Carresova činidla I (3.2) a po opětovém promíchání 5 ml Carresova činidla II (3.3). Potom se odměrná baňka s roztokem umístí na míchací zařízení (4.2) a míchá po dobu 30 minut. Pak se doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Není-li roztok zcela čirý a bezbarvý, stanovení se opakuje s přidáním většího množství aktivního uhlí (3.5) (poznámka 8.2).

Do zkumavky se odpipetuje 5 ml čirého filtrátu, přidá pipetou 5 ml roztoku DMAB (3.1), promíchá a ponechá na vodní lázni (4.3) při teplotě 20 °C po dobu 15 minut.

5.2.2 Souběžně se vzorkem se připraví slepý roztok (blank) stejným způsobem, jak výše uvedeno, s výjimkou přidání roztoku zkoušeného vzorku, místo něhož se přidá stejné množství vody.

5.2.3 Roztok vzorku se po vyjmutí z vodní lázně (4.3) měří, jak je uvedeno v 5.1.3 proti slepému roztoku.

Z kalibračního grafu se zjistí koncentrace močoviny v µg/ml.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah močoviny v g /kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C.F}{100.m}$$

kde C je koncentrace močoviny zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

m navážka zkušebního vzorku v g

F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují požadavky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Při obsahu močoviny ve vzorku větším než 30 g/kg se navážka zkušebního vzorku snižuje na 1 g nebo se zkoušený vzorek redukuje ředěním tak, aby koncentrace močoviny ve zkušebním vzorku nebyla vyšší než 50 mg/500 ml.

Při značně nižším obsahu močoviny ve zkoušeném vzorku se hmotnost zkušebního vzorku zvýší, ale tak, aby filtrát roztoku vzorku byl čirý a bezbarvý. Výpočet nutno upravit.

8.2 Přídavek aktivního uhlí by neměl přesáhnout 3 g.

2.6 Stanovení obsahu amoniaku v rybích moučkách

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení amoniaku v rybích moučkách. Je použitelná pro obsahy amoniaku, vyjádřené jako NH_3 do 2 500 mg/kg.

2. Princip

Amoniak se stanoví titračně alkalimetry ve vodním výluhu vzorku po vyčerpání kyselinou trichloroctovou, vytěsnění oxidem hořečnatým a předestilováním do kyseliny sírové.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina trichloroctová, roztok 200 g/l

3.2 Oxid hořečnatý, pevný

3.3 Odpěňovací prostředek (silikonový olej a pod.)

3.4 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$

3.5 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.6 Indikátor methylová červen

Příprava: 0,30 g methylové červeně se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96 %

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mixér nebo míchačka vhodné konstrukce o 35 až 40 ot/min

4.2 Přístroj destilační (pro přehánění vodní parou)

5. Postup

Odváží se asi 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do baňky mixéru nebo kádinky vhodného objemu, přidá se 100 ml vody a mixuje (míchá) po dobu 30 minut. Potom se obsah převede vodou do odměrné baňky na 250 ml, přidá se 50 ml roztoku kyseliny trichloroctové (3.1), doplní vodou po rysku a intenzívně promíchá. Obsah se filtruje suchým skládaným filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Do destilační baňky přístroje (4.2) se odpipetuje alikvotní podíl, podle očekávaného obsahu amoniaku (obvykle 100 ml), zředí vodou asi na 200 ml a těsně před destilací se přidají 2 g oxidu hořečnatého (3.2), pár kapek odpěňovacího prostředku (3.3) (roztok musí být alkalický - zkouška např. pH papírkem) a destilační baňka se připojí k destilačnímu přístroji (4.2). Přestupník přístroje se ponoří do titrační baňky, do které bylo přidáno pipetou přesně 25,0

nebo 50,0 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.4), a to asi 0,5 cm pod hladinu. Pak se zapne destilace a destiluje se tak dlouho, až nadeštiluje asi 150 ml destilátu. Během destilace se dbá, aby se nepřehřívaly stěny baňky. Před skončením destilace se předloha sníží tak, aby přestupník vyčníval nad hladinu a zkouší se reakce dalšího destilátu např. pH papírkem. Není-li alkalická, destilace se ukončí, přestupník se opláchne do předlohy a obsah předlohy se asi 2 minuty povaří (poznámka 8.1). Po ochlazení se do předlohy přidá pár kapek indikátoru methylové červeně (3.6) a titruje se odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.5) do právě vymizelého červeného zabarvení roztoku.

Je-li reakce dalšího destilátu ještě alkalická, je nutno destilaci opakovat s menším alikvotním podílem nebo prodloužit dobu destilace. Vedle toho se provede slepá zkouška se stejným postupem s výjimkou přidání alikvotního podílu filtrátu vzorku, místo kterého se přidá stejný objem vody.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah amoniaku, vyjádřeného jako NH_3 v mg/kg (X), se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{17 \cdot 10^3 \cdot C \cdot V}{m}$$

kde V je rozdíl spotřeb odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku a vzorek v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l

m hmotnost alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

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

8. Poznámky

8.1 Povaření obsahu předlohy před titrací je nutné k rozložení event. zbytku kyseliny trichloroctové na chloroform a oxid uhličitý, které se varem vypudí z roztoku.

2.7 Stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu těkavých dusíkatých bází, vyjádřených jako amoniak, v krmivech.

2. Princip

Vzorek se extrahuje vodou a roztok se vyčeří a filtruje. Těkavé dusíkaté báze jsou uvolněny uhličitánem draselným a pomocí mikrodifuze jímány do roztoku kyseliny borité a stanoveny kyselinou sírovou titračně.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina trichloroctová, roztok 20%

3.2 Směsný indikátor: 33 mg bromkresolové zeleně a 65 mg methylové červeně se rozpustí ve 100 ml 95 - 96% ethylalkoholu

3.3 Kyselina boritá, roztok

Příprava: 10 g kyseliny borité se rozpustí v 900 ml vody, přidá se 10 ml indikátoru (3.2) a 0,5 ml 4% roztoku hydroxidu sodného a promíchá se. Doplní se vodou na 1 litr.

3.4 Uhličitán draselný, nasycený roztok

Příprava: 100 g uhličitanu draselného se rozpustí ve 100 ml horké vody, nechá se vychladnout a zfiltruje se.

3.5 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,01 \text{ mol/l}$

3.6 Glycerín

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Míchačka s cca 35 - 40 ot/min

4.2 Skleněná nebo plastová Conwayova miska o vnitřním průměru 10 cm

4.3 Mikrobureta s dělením 1/100 ml

5. Postup

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 10 g zkušební vzorku s přesností na 0,001 g, přidá se 100 ml vody a míchá se 30 minut. Přidá se 50 ml kyseliny trichloroctové (3.1), objem se upraví vodou na 200 ml, důkladně se protřepe a filtruje se přes skládaný filtr. Do střední části Conwayovy misky se napipetuje 1 ml kyseliny borité (3.3) a do okolního prstence se napipetuje 1 ml filtrátu (poznámka 8.1).

Rychle se přikápně do prstence s filtrátem roztok uhličitanu draselného (3.4) a okamžitě se víčko zcela vzduchotěsně uzavře, přičemž k utěsnění se použije malé množství glycerínu (3.7). Opatrným otáčením v horizontální rovině se roztok promíchá. Nechá se inkubovat nejméně 4 hodiny při laboratorní teplotě nebo 1 hodinu při 40 °C. Těkavé dusíkaté báze v kyselině borité se ztitrují odměrným roztokem kyseliny sírové (3.5).

Zároveň se provádí slepý pokus za použití stejného postupu bez přidání filtrátu zkoušeného vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah těkavých dusíkatých látek, vyjádřených jako amoniak v g/kg (X), se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{34,06 \cdot V \cdot C \cdot F}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (3.5) v ml

F zředovací faktor

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

C přesná koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g /kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí přesáhnout při obsahu amoniaku: do 10 g/kg 10% relat.

rovném nebo vyšším než 10 g/kg 1,0 g/kg

8. Poznámky

8.1 Pokud obsah amoniaku přesáhne 60 g/kg, je nutno filtrát ředit.

2.8 Stanovení aktivity ureázy v produktech s obsahem sóji

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení aktivity ureázy v produktech, ve kterých je obsažena sója.

Metoda je použitelná pro všechny druhy produktů s obsahem sóji a do hodnoty aktivity ureázy 1 mgN/g.min při 30 °C. Pro vyšší obsahy se navážka vzorku redukuje až na 0,05 g.

2. Princip

Aktivita ureázy se stanoví titračně alkalimetricky určením množství amoniakálního dusíku, uvolněného z roztoku močoviny 1 g zkoušeného vzorku za 1 minutu při teplotě 30 °C.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, odměrný roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.2 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.3 Tlumivý roztok fosforečnanový

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 4,45 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), 3,40 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.4 Močovina, roztok 30 g/l v tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH = 6,9 až 7,0 (vždy čerstvě připraveném)

4. Přístroje

4.1 pH metr vysoké citlivosti na 0,02 pH s příslušenstvím

4.2 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.3 Lázeň vodní s termostatem, umožňujícím regulaci teploty na 30 °C přesně

4.4 Zkumavky rozměrů 150 mm x 18 mm se zábrusem a zátkou

5. Postup

Do zkumavky se zábrusem (4.4) se odváží asi 0,2 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (poznámka 8.1), přidá se přesně 10 ml roztoku močoviny (3.4), ihned zazátkuje a intenzívně protřepává. Potom se vloží na vodní lázeň (4.3) vytemperovanou přesně na 30 °C a ponechá na lázni 30 minut. Pak se ihned přidá přesně 10 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), ochladí rychle na 20 °C, obsah zkumavky se kvantitativně převede do

kádinky tak, že se zkumavka vždy vypláchne dvakrát 5 ml vody. Kádinka se umístí na elektromagnetickou míchačku (4.2), připojí elektrody pH-metru (4.1) a titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.2) do hodnoty pH = 4,7 (V_1).

Vedle toho se provede slepá zkouška tak, že do zkumavky se odváží 0,2 g vzorku s přesností na 0,001 g (zcela shodně jako u stanovení ve vzorku), přidá se přesně 10 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a 10 ml roztoku močoviny (3.4) a směs se rychle ochladí v ledové vodě, kde se ponechá po dobu 30 minut. Při dodržení těchto podmínek se převede obsah kvantitativně do kádinky a titruje za výše uvedených podmínek odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.2) do hodnoty pH = 4,7 (V_2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Aktivita ureázy v jednotkách aktivity (tj. mg amoniakálního dusíku uvolněného 1 g zkoušeného vzorku za 1 minutu při teplotě 30 °C) (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{14 \cdot C \cdot (V_2 - V_1)}{30 \cdot m}$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného při titraci zkoušeného vzorku v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného při titraci slepé zkoušky v ml

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Materiály, obsahující více než 100 g/kg tuku, musí být nejdříve odtučněny za studena (např. diethyletherem či hexanem).

2.9 Ureázový test

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro zjištění stupně odhořčení sójových výrobků.

2. Princip

Aktivita ureázy se stanoví titračně alkalimetricky určením množství amoniakálního dusíku, uvolněného z roztoku močoviny ureázou z 1 g zkoušeného vzorku za 1 minutu.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,01 \text{ mol/l}$

3.2 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,02 \text{ mol/l}$

3.3 Močovina, roztok 30 g/l

3.4 Indikátor: methylová červen, ethanolický roztok 0.02 % nebo methylová oranž (sodná sůl), roztok 0.02 %

3.5 Glycerín

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Skleněné nebo plastové Conwayovy misky, o vnitřním průměru 10 cm

4.2 Mikrobyreta s dělením 1/100 ml

4.3 Termostat s automaticky regulovatelnou teplotou 30 °C

5. Postup

Do mezikruží Conwayovy misky (4.1) se naváží 0,65 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,001 g. Vzorek se přelije 7 ml roztoku močoviny (3.3) a opatrným kroužením se promíchá. Do střední části Conwayovy misky (4.1) se napipetuje 5 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.1) a přidá se 1 až 2 kapky indikátoru (3.4). Miska se okamžitě vzduchotěsně uzavře pomocí víčkem, přičemž k utěsnění se použije malé množství glycerínu (3.5) a ponechá se 1 hodinu v klidu stát při teplotě 30 °C.

Po uplynutí této doby se miska otevře a titrací odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.2) se stanoví množství nezreagované kyseliny sírové (3.1).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Aktivita ureázy vyjádřená v množství amoniaku v mg (X) uvolněného z roztoku močoviny za 1 minutu působením 1 g zkoušeného vzorku při teplotě 30 °C se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{34,06 \cdot C \cdot (V_2 - V_1)}{60 \cdot m}$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného (3.2) v ml

V_2 objem odměrného roztoku kyseliny sírové (3.1), pipetovaný do Conwayovy misky v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

1 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.1) odpovídá 0,3406 mg amoniaku.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na dvě desetinná místa.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

2.10 Stanovení obsahu biuretu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení biuretu v močovině

2. Princip

Metoda je založená na tvorbě barevného komplexu se síranem měďnatým v přítomnosti roztoku vínanu sodno-draselného v zásaditém prostředí a spektrofotometrickém měření absorpance vybarveného roztoku při vlnové délce 540 nm.

3. Chemikálie

3.1 Síran měďnatý pentahydrát, roztok

Příprava: 15,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v odměrné baňce o objemu 1000 ml a doplní se po rysku.

3.2 Vínan sodno-draselný, roztok

Příprava: 50,8 g pentahydrátu vínanu sodno-draselného a 40,0 g hydroxidu sodného se rozpustí v odměrné baňce o objemu 1000 ml, doplní se po rysku a promíchá.

3.3 Biuret, standardní roztok

Příprava: 2,000 g biuretu, vysušeného 3 hodiny při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$, se rozpustí v odměrné baňce objemu 1000 ml, doplní se po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 540 nm a kyvetou o optické délce 10 mm.

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 0; 1,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 ; 25,0 ; 30,0 ; 35,0 a 40,0 ml standardního roztoku biuretu (3.3), což odpovídá 0; 2,0 ; 10,0 ; 20,0 ; 40,0 ; 50,0 ; 60,0 ; 70,0 a 80,0 mg biuretu. Potom se do každé baňky přidá 10 ml roztoku vínanu sodno-draselného (3.2) a 10 ml roztoku síranu měďnatého (3.1) a směs se nechá 15 minut stát při teplotě $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$. Po této době se roztoky v baňkách doplní po rysku, promíchají a změří se jejich absorpance proti roztoku s nulovou koncentrací močoviny.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentrací se sestrojí kalibrační graf v mg biuretu/ml.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do odměrné baňky na 200 ml se naváží asi 16 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,0002 g (poznámka 8.1), rozpustí se 50 ml vody, doplní se po rysku, promíchá a zfiltruje přes dvojitý skládaný filtr střední hustoty, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Potom se čtyři odměrné baňky s objemem 100 ml označí číslicemi I, II, III, a IV. Do odměrné baňky I se odpipetuje 10 ml roztoku vínanu sodno-draselného (3.2), doplní se vodou po rysku a promíchá. Do odměrné baňky II se odpipetuje 10 ml roztoku vínanu sodno-draselného (3.2) a 10 ml roztoku síranu mědnatého (3.1), doplní se vodou po rysku a promíchá. Do odměrné baňky III se odpipetuje 50 ml roztoku zkoušeného roztoku, 10 ml roztoku vínanu sodno-draselného (3.2), doplní se vodou po rysku a promíchá. Do odměrné baňky IV se odpipetuje 50 ml roztoku zkoušeného roztoku, 10 ml roztoku vínanu sodno-draselného (3.2) a 10 ml roztoku síranu mědnatého (3.1), doplní se vodou po rysku a promíchá.

Odměrné baňky se nechají stát 15 minut při teplotě $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Po této době se změří absorbance roztoku II proti roztoku I (A_1) a absorbance roztoku IV proti roztoku III (A_2).

Hodnota A_1 se odečte od A_2 a podle vypočteného rozdílu se určí podle kalibračního grafu množství biuretu v mg.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah biuretu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{200 \cdot m_2}{50 \cdot m}$$

kde m_2 je hmotnost biuretu odečtená z kalibračního grafu v mg

m hmotnost zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují požadavky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 0,3 g/kg.

8. Poznámky

8.1 Při obsahu biuretu vzorku větším než 15 g/kg se hmotnost zkušebního vzorku snižuje na 8 g.

2.11 Stanovení obsahu alimetu (hydroxyanalogu D,L-methioninu)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení alimetu v krmivech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Alimet je hydroxyanalogem esenciální aminokyseliny D,L-methioninu. Chemicky se jedná o 2-hydroxy-4-(methylthio) máselnou kyselinu.

2. Princip

Alimet se po extrakci vzorku směsí (voda + acetonitril) a následné hydrolýze stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce.

Alimet se dodává jako 88 %, vztaženo na obsah celkové kyseliny, ovšem prakticky jde o směs mono, di, tri a oligomerů. Přípravou vzorku před nástřikem do HPLC se kvantitativně hydrolýzou oligomery převedou na monomer (dále jen MHA), jehož obsah se stanovuje.

3. Chemikálie

3.1 Methylalkohol čistoty HPLC (poznámka 8.1)

3.2 Acetonitril čistoty HPLC

3.3 Hydroxid draselný, roztok 500 g/l

3.4 Kyselina fosforečná, koncentrovaná ($\rho = 1,69$ g/ml)

3.5 Kyselina fosforečná, roztok $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,03$ mol/l

3.6 Voda destilovaná či deionisovaná, čistoty HPLC

3.7 Hydroxid sodný, roztok 500 g/l

3.8 Extrakční směs: Acetonitril-voda, (10 + 90)

3.9 Mobilní fáze

Příprava: 90 obj. dílů roztoku kyseliny fosforečné (3.5) se smíchá s 10 obj. díly methylalkoholu (3.1) a případně se upraví pH roztokem hydroxidu sodného (3.7) na hodnotu 2,5.

3.10 Alimet, standardní substance (jedná se o tutéž látku používanou pro výrobu krmných směsí)

3.11 Alimet, standardní roztok

Příprava: Do kádinky na 100 ml se odměří asi 30 ml extrakční směsi (3.8) a opatrně přidá takové množství standardní substance alimetu (3.10), aby po kvantitativním převedení do odměrné baňky na 100 ml, doplnění extrakční směsí (3.8) po rysku a promíchání, bylo dosaženo stejné koncentrace MHA jako je předpokládáno (deklarované) množství ve zkoušeném vzorku. Z tohoto standardního roztoku se pipetuje na přípravu kalibračních roztoků.

4 Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň ultrazvuková nebo třepačka laboratorní

4.2 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.3 Přístroj pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolona - reverzní fáze C18, 250 x 4,5 - 10 μm , injekční dávkovací zařízení - Rheodyne, UV detektor, popř. i databáze s integračním softwarem, tiskárna či jiné registrační zařízení.

5 Postup

5.1 Kalibrace a měření

5.1.1 Příprava kalibračního roztoku

Do zkumavky se odpipetuje 3 ml standardního roztoku alimetu (3.11), přidá se 86 μl roztoku hydroxidu draselného (3.3) a protřepe. Potom se přidá 86 μl roztoku kyseliny fosforečné (3.5) a znovu protřepe. Pokud je třeba, roztok se odstředí (4.2) při 2 000 otáček/minutu po dobu asi 5 minut a supernatant se filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se nastříkuje do přístroje HPLC (4.3).

5.1.2 Měření

Pracovní podmínky:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min.
Detekce	UV, vlnová délka 214 nm
Injektovaný objem	20 μl
Retenční čas	16 min. (při použití popsané kolony)

Po ekvilibraci kolony přístroje HPLC (4.3) se nastříkuje kalibrační roztok i roztok zkoušeného vzorku dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástřiků musí být v toleranci nejvýše 2 % a bázi odezvy je plocha píku. Z každého nástřiku se pořídí chromatografický záznam.

Porovnáním odezev kalibračního roztoku, jeho koncentrace a roztoku zkoušeného vzorku se zjistí koncentrace monoméru hydroxyanalogu alimetu (MHA) (poznámka 8.2).

5.2 Vlastní provedení (poznámka 8.3)

Odváží se takové množství dobře zhomogenizovaného zkušební vzorku, aby po extrakci ve 100 ml extrakční směsi (3.8) bylo dosaženo koncentrace mezi 30 až 50 μg MHA v 1 ml. Navážka zkušební vzorku by neměla poklesnout pod 1 g u premixů a pod 10 g u krvných směsí. Proto je nutno potřebné extrakty na požadovanou koncentraci případně naředit. Navážka vzorku se převede do kuželové baňky, přidá 100 ml extrakční směsi (3.8) a vytřepává v ultrazvukové lázni nebo na mechanické třepačce (4.1) asi 10 minut, nechá se usadit a do zkumavky se pipetuje 3 ml čirého roztoku.

Dále se postupuje podle 5.1.1 s výjimkou přidání standardního roztoku alimetu a 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah alimetu vyjádřeného jako monomér hydroxyanalogu (MHA) v mg/g (X) se vypočítá podle vzorce (poznámka 8.2):

$$X = \frac{C.F}{10^3.m}$$

kde C je koncentrace MHA zjištěná porovnáním odezev kalibračního roztoku a roztoku zkoušeného vzorku v µg/ml

F faktor ředění

m navážka zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/g.

7 Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8 Poznámky

8.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy a nebezpečným jedem, proto je nutné při jakékoli manipulaci s ním zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítá se výsledek přímo z naměřených koncentrací.

8.3 Při zkoušení krmných směsí je nutno před každým dalším nástřikem zajistit, aby z kolony dále nevycházely složky, jejichž retenční časy jsou někdy dvoj až trojnásobně vyšší než retenční čas MHA. Zmíněné složky mohou zapříčinit distorzi následného chromatogramu. Vyčistění kolony lze zajistit buď dostatečně časovým odstupem mezi jednotlivými nástřiky, nebo propláchnutím kolony směsí acetonitril-voda (3.8).

3.1 Stanovení obsahu tuku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení tuku (hexanového, petroletherového a diethyletherového extraktu) v krmivech, není vhodná pro stanovení tuku v olejninách.

2. Princip

Tuk se stanoví vážkově buď přímou extrakcí vzorku příslušným extrakčním činidlem, nebo po předběžné hydrolýze ve vzorku kyselinou chlorovodíkovou, následným oddestilováním extrakčního činidla a vysušením vyextrahovaného tuku.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční činidla (poznámka 8.1)

3.1.1 n-Hexan nebo petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml

3.1.2 Diethylether bez obsahu peroxidů, zbytkem po odpaření nejvýše 1 mg/100 ml

3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$

3.5 Dusičnan stříbrný, roztok 10 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Přístroj extrakční podle Soxhleta, nejméně s 10 refluxními cykly za 1 hod nebo podle Twisselmannova s průtokem nejméně 10 ml za min. (poznámka 8.2)

4.2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení

4.3 Patrony nebo tuby extrakční, tukuprosté, velikosti podle použitého extrakčního přístroje

4.4 Sušárna elektrická s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou

4.5 Baňka extrakční se zábrusem, obsahu 250 ml

4.6 Filtrační drť (např. Hydro-supercel)

4.7 Pemza zrnitá, tukuprostá

4.8 Vata obvazová, odtučněná

4.9 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Přímá extrakce

5.1.1 Do extrakční patrony (tuby) (4.3) se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (poznámka 8.3) a shora utěsní obvazovou vatou (4.8). Patrona (tuba) (4.3) se vzorkem se vloží do sušárny (4.4) a předsuší po dobu 2 hod. při teplotě 95 °C až 98 °C.

5.1.2 Extrakční patrona (tuba) (4.3) vloží do střední části extrakčního přístroje (4.1), tato část se nasadí na extrakční baňku (4.5), předem vysušenou (30 min. při 95 °C až 98 °C) a po ochlazení v exsikátoru zváženou s výše uvedenou přesností. Do baňky (4.5) se přidá potřebné množství extrakčního činidla (poznámka 8.4), baňka (4.5) se umístí na vyhřívací zařízení (4.2), napojí se na extraktor (4.1) a extrahuje se po dobu 6 hodin. Rychlost extrakce se upraví tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně k 10 přetokům extrakčního činidla (3.1), je-li použit diskontinuální extraktor (Soxhlet), nebo minimálně 3 až 5 kapek kondenzujícího extrakčního činidla za sekundu, byl-li použit kontinuální průtokový extraktor (Twiselmann). Po této době se extrakce přeruší, oddestiluje se převážná část extrakčního činidla, zbytek se nechá volně nebo na vodní lázni (4.9) odpařit, baňka s extraktem se vysuší v sušárně (4.4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu 1, 5 hod. a po ochlazení v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g. Potom se baňka s extraktem vloží zpět do sušárny (4.4) a při výše uvedené teplotě se suší ještě 30 minut, ochladí se v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností. Rozdíly mezi prvním a následujícím vážením by neměly být větší než 1 mg. V negativním případě (rozdíl je vyšší) je nutné sušení a vážení opakovat až bude docíleno výše uvedeného rozdílu.

5.1.3 U krmiv s obsahem močoviny nebo cukrů se odvážený vzorek převede na tukuprostý nebo odtučněný filtr, umístěný ve filtrační nálevce a vzorek se postupně promyje asi 100 ml vody, teplé asi 50 °C. Filtr s promytým vzorkem se vysuší v sušárně (4.4) při 95 °C až 98 °C za nejméně 3 hod, potom se vloží do extrakční tuby (patrony) (4.3), utěsní smotkem obvazové vaty (4.8) a dále se postupuje podle 5.1.2 .

5.2 Extrakce po hydrolýze (poznámka 8.5)

Odváží se asi 2,5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g nejlépe do kádinky na 400 ml, přidá se 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.4), několik zrněk pemzy (4.7), kádinka se přikryje hodinovým sklíčkem a zahřeje k mírnému varu. Při tomto mírném varu se vaří asi 1 hod. za občasného zamíchání (asi celkem 6x), zejména se dbá na to, aby částčky vzorku neulpívaly na stěnách kádinky a byly ve styku s roztokem. Potom se obsah zředí vodou, ochladí a filtruje přes navlhčený dvojitý středně hustý filtr (tukuprostý). Doporučuje se před filtrací přidat drť (4.6). Pevná část vzorku na filtru se promývá vodou až do negativní reakce dalšího filtrátu na chloridy (s roztokem dusičnanu stříbrného (3.5) již netvoří zákal). Filtr s pevným zbytkem se vysuší např. na hodinovém sklíčku v sušárně (4.4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu nejméně 3 hod., po vysušení se převede do extrakční patrony (tuby) (4.3) a dále se postupuje podle 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah tuku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 10^3 \cdot \frac{m_2 - m_1}{m_o}$$

kde m_0 je hmotnost zkušební vzorku v g

m_1 hmotnost prázdné extrakční baňky v g

m_2 hmotnost extrakční baňky s extraktem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

V protokolu musí být uvedeno použité extrakční činidlo.

7. Opakovatelnost

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

do 50 g/kg	2 g/kg
od 51 do 100 g/kg	4 % relat.
nad 100 g/kg	4 g/kg

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Pro stanovení tuku je možno použít i extrakčních poloautomatických přístrojů, pokud poskytují výsledky zcela srovnatelné v mezích opakovatelnosti s uvedenou metodou.

8.3 Pro velmi nízké obsahy tuku v krmivu se navažuje úměrně více, např. 10 g.

8.4 Množství extrakčního činidla se volí takové, aby u přístroje diskontinuálně průtokového Soxhlet) docházelo ke spolehlivému přetékání kondenzátu extrakčního činidla.

U kontinuálně průtokového přístroje (Twisselmann) se volí přibližně 50 až 100 ml.

Při stanovení tuku ve vzorku úsušku nebo s vyšším obsahem podílem úsušků, se nedoporučuje používat jako extrakční činidlo diethylether, protože vykazuje vyšší výsledky než hexan či petrolether vlivem současné extrakce rostlinných pigmentů (chlorofyl aj).

8.5 Předběžná hydrolýza musí být provedena u živočišných krmiv, glutenu, sušených brambor, kvasnic nebo výpalků, odpadu z výroby sušenek, chleba, kuchyňských odpadků, mléčných krmiv (minimálně s obsahem 40% mléka) a krmných směsí obohacených tukem. U saponifikovaných (stabilizovaných) tuků se k hydrolýze použije 6 mol/l kyselina chlorovodíková a roztok po hydrolýze se před filtrací vychladí v ledničce asi na 4 °C.

3.2 Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech

Do této metody byla zpracována doporučení ISO TC34 569/1979

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení tuku (hexanového nebo petroletherového extraktu) v olejnatých semenech.

2. Princip

Tuk ("olej") se stanoví vázkově po extrakci vzorku hexanem nebo petroletherem na vhodném zařízení, oddestilování rozpouštědla, vysušení vyextrahovaného tuku vzorku.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční činidlo n-hexan nebo petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)

3.2 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná

3.3 Plyn inertní (dusík, oxid uhličitý)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Extrakční zařízení, vhodné konstrukce, s extrakčními baňkami o objemu 200 až 500 ml

4.2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení

4.3 Patrony nebo trubky extrakční, tukuprosté, velikosti podle použitého extrakčního přístroje

4.4 Sušárna elektrická vakuová s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou

4.5 Vata obvazová, odtučněná

4.6 Pro bavlníková semena s přilehlými vlákny je požadováno další zařízení:

4.6.1 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automatickou regulací teploty (130 ± 2) °C

4.6.2 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou, schopná vyhřát vzorek na teplotu 115 °C během 30 minut

4.6.3 Miska kovová s plochým dnem o průměru 100 mm a výšce přibližně 40 mm (tzv. vysoušečka)

4.6.4 Keramická porézní nádoba, cylindrická o vnitřním průměru 68 mm, vnějším průměru 80 mm, výškou 85 mm a tloušťkou stěn i základny 6 mm

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

5.1.1 Pro zkoušku se použije vzorek tak, jak byl získán nebo po odstranění nečistot (poznámka 8.4). Pokud se pracuje se vzorkem, ze kterého byly předem odstraněny velké neolejnaté částice, je nutno to zohlednit při výpočtu (viz. 6.4).

5.1.2 V případě semene kopry se vzorek upravuje mechanickým struhadlem celý nebo ručním struhadlem v takovém množství, aby byl co nejvíce reprezentativní. Délka částic může být větší než 2 mm, ale nemá být větší než 5 mm. Částice je nutno promíchat a zkoušku provést bez prodlení.

5.1.3 Semena střední velikosti (podzemnice, sója apod.), kromě bavlníku a s přilehlými vlákny, se vzorek šrotuje v mechanickém mlýnku, který byl před použitím dobře vyčištěn, tak dlouho, dokud hlavní rozměr částic neklesne pod 2 mm. Větší částice (přibližně jedna dvacetina vzorku) se vyřadí, zbytek se pečlivě promíchá a stanovení se provede bez prodlení.

5.1.4 Bavlníková semena s přilehlými vlákny

Do vysoušecí misky (4.6.3) se naváží přibližně 60 g vzorku s přesností 1 mg tak, jak byl získán. Miska se semeny se vloží do sušárny (4.6.1), předem vyhřáté na $(130 \pm 2)^\circ\text{C}$ a vzorek se nechá při této teplotě sušit 2 hodiny. Poté se miska vyjme ze sušárny a nechá se vychladnout na vzduchu asi 30 minut. Vysušená semena se přemístí do porézní keramické nádoby (4.6.4), jejíž vnitřní stěny byly předem pomocí pipety zvlhčeny 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Je třeba dbát na to, aby se kyselina úplně vstřebala a nevytvořila na stěnách ulpívající kapky. Potom se nádoba přikryje hodinovým sklem a vloží do sušárny (4.6.2) a zahřeje se během 30 minut na teplotu 115°C a při této se udržuje dalších 30 minut. Poté se keramická nádoba (4.6.4) vyjme ze sušárny a nechá zchladit na vzduchu 1 hodinu.

Semena se zváží s přesností 1 mg, rozemelou se na mechanickém mlýnku jako v odstavci 5.1.3.

5.1.5 Malá semena (len, řepka, konopí, čočka apod.) se zkouší bez předchozího mletí (v původním stavu).

5.2 Vlastní stanovení přímou extrakcí

5.2.1 U materiálů uvedených v 5.1.2, 5.1.3 a 5.1.4 se do extrakční patrony (tuby) (4.3) odváží asi 10 g vzorku s přesností 1 mg a shora se utěsní obvazovou vatou (poznámka 8.2). Navážka malých semen se nejprve rozdrtí v mechanickém mikrodrtiči nebo v mlýnku, přičemž je třeba dát pozor, aby byla rozdrčena všechna semena. Rozdrčená semena se přenesou kvantitativně do extrakční patrony (tuby) (4.3), nejlépe pomocí špachtle a vatového tamponu, namočeného do použitého extrakčního činidla (3.1). Tímto tamponem se také vytře miska mikrodrtiče nebo mlýnku a shora se s ním utěsní extrakční patrona (tuba) (poznámka 8.2).

Pokud obsah těkavých látek (vlhkost) přesahuje 10 %, vloží se patrona (tuba) se vzorkem do sušárny (4.4) a předsuší se při teplotě 80°C tak, aby se obsah těkavých látek snížil pod 10%.

5.2.2 První extrakce

Extrakční patrona (tuba) (4.3) se vzorkem se vloží do střední části extrakčního přístroje (4.1), tato část se nasadí na extrakční baňku A, předem vysušenou (30 min. při 80 °C) a po ochlazení v exsikátoru zváženou s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky A se přidá potřebné množství extrakčního činidla (3.1), baňka se umístí na vyhřívací zařízení (4.2), napojí se na extraktor (4.1) a extrahuje se po dobu 4 hodin. Rychlost extrakce se upraví tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně k 10 přetokům extrakčního činidla, je-li použit diskontinuální extraktor nebo minimálně 3 až 5 kapek kondenzujícího extrakčního činidla za sekundu, byl-li použit kontinuální průtokový extraktor. Po této době se extrakce přeruší, extrakční zařízení se nechá vychladnout, vyjme se patrona (tuba) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla.

5.2.3 Druhá extrakce

Druhá a další extrakce se provádí se vzorkem po první extrakci.

Vzorek se z patrony (tuby) (4.3) vysype do mikrodrtiče a rozdrtí se co možná nejjemněji (poznámka 8.3). Takto upravený vzorek se kvantitativně vsype zpět do patrony (tuby) (4.3) a ta se opět vloží do extrakčního zařízení (4.1) a extrahuje další dvě hodiny. K tomu účelu se použije stejná extrakční baňka A, obsahující první část extraktu. Po dvou hodinách se extrakce přeruší, extrakční zařízení (4.1) se nechá vychladnout, opět se vyjme patrona (tuba) (4.3) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla. Opakuje se drcení jako po první extrakci.

5.2.4 Třetí extrakce

Vzorek se po druhé extrakci a následném drcení vloží zpět do extrakční patrony (tuby) (4.3) a tato se vloží zpět do extrakčního zařízení (4.1). K zařízení se připojí extrakční baňka B, předem vysušená (30 min. při 80 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážená s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky B se přidá potřebné množství extrakčního činidla, baňka se umístí na vyhřívací zařízení (4.2), napojí se na extraktor a extrahuje po dobu 2 hodin.

5.2.5 Odstranění extrakčního činidla a vážení tuku

Větší část rozpouštědla z extrakčních baněk A a B se odpaří na vyhřívacím zařízení (4.2), poslední stopy extrakčního činidla se odstraní v sušárně (4.4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu 1, 5 hod. Extrakční činidlo je možno odstranit také proudem vzduchu nebo lépe inertního plynu (3.3), zaváděného do baněk po krátkých intervalech anebo snížením tlaku v bančkách.

Baňky s vyextrahovaným tukem ("olejem") se nechají vychladnout v exsikátoru po dobu nejméně 1 hodinu a potom se zváží s přesností nejméně na 0,001 g. Potom se baňky s extraktem vloží zpět do sušárny (4.4) a při výše uvedené teplotě se suší ještě 10 minut, ochladí se v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností. Pro obě baňky platí, že rozdíl mezi dvěma váženími by neměl být větší než 10 mg. V negativním případě (rozdíl je vyšší) je nutné sušení a vážení opakovat až bude docíleno výše uvedeného rozdílu.

Pokud hmotnost výtěžku v baňce B nepřekročí 10 mg, extrakce je dokončena. V opačném případě je nutno provést další extrakci po dobu dvě hodiny za stejných podmínek je v předchozích extrakcích s novou extrakční baňkou, dokud množství výtěžku z poslední extrakce není nižší nebo rovno 10 mg.

5.2.6 Stanovení obsahu nečistot

Vyextrahovaný olej má být čistý. Pokud není, je nutno určit obsah nečistot. K tomuto účelu se rozpustí olej v rozpouštědle použitém k extrakci, zfiltruje se přes filtrační papír, předem vysušený při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ do konstantní hmotnosti a zvážený s přesností 1 mg. Filtr se ještě několikrát promyje čistým rozpouštědlem (3.1), aby se zcela odstranil vyextrahovaný tuk ("olej"). Filtr se vysuší při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ do konstantní hmotnosti a zváží s přesností 1 mg. K chlazení a vážení se použije vhodná nádobka opatřená víčkem.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v semeni tak, jak bylo zkoušeno

Obsah oleje (tuku) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 10^3 \cdot \frac{m_1}{m_0}$$

kde m_0 je hmotnost zkušební vzorku v g

m_1 součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg. Pokud není splněna podmínka opakovatelnosti, opakuje se zkouška ve dvou jiných navážkách vzorku. Pokud i v tomto případě přesáhne rozdíl 0.4 g na 100 g vzorku, bere se za výsledek aritmetický průměr všech čtyř uskutečněných zkoušek.

V protokolu musí být uvedeno použité extrakční činidlo.

6.2 Stanovení oleje při odděleném rozboru čistých semen a nečistot

Vzorec uvedený v 6.1 lze použít také pro výpočet obsahu oleje jak čistých semen tak i nečistot, tzn. když byla čistá semena a nečistoty zkoušena odděleně. V tomto případě se obsah oleje v g/kg (Y) vypočte podle vzorce:

$$Y = H_1 - \frac{P \cdot (H_1 - H_2)}{10^3}$$

kde P je obsah nečistot ve zkoušených semenech v g/kg

H_1 obsah oleje v čistých semenech v g/kg

H_2 obsah oleje v nečistotách v g/kg

6.3 Stanovení obsahu oleje v bavlníkových semenech s přilehlými vlákny

Obsah oleje (tuku) v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = 10^3 \cdot \frac{m_1 \cdot m_3}{m_0 \cdot m_2}$$

kde m_0 je hmotnost zkušební vzorku v g

m_1 součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g

m_2 hmotnost zkušební vzorku (asi 60 g) před přípravou podle 5.1.4 v g

m_3 hmotnost stejného zkušební vzorku po provedené přípravě podle 5.1.4 a před drcením v g

6.4 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v případech, kdy byly velké neolejnaté částice odděleny před zkouškou

Obsah oleje (tuku) v g/kg (U) se vypočítá podle vzorce:

$$U = X \cdot \frac{10^3 - N}{10^3}$$

kde X je obsah tuku v semeni podle 6.1

N obsah velkých neolejnatých nečistot předem oddělených ze zkoušeného semene v g/kg

6.5 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v podzemnici olejné

Obsah oleje (tuku) v g/kg (V) se vypočítá podle vzorce:

$$V = (H_1 - H_2) \cdot \frac{J + I_0 + I_1}{10^3}$$

kde J je obsah jemných částic zkušební vzorku v g/kg

I_0 obsah olejnatých nečistot v g/kg

I_1 obsah neolejnatých nečistot v g/kg

H_1 obsah oleje v čistých semenech v g/kg

H_2 obsah oleje v nečistotách v g/kg

6.6 Stanovení obsahu oleje, korigovaného na sušinu

Obsah oleje (tuku) korigovaný na sušinu v g/kg (W) se vypočítá podle vzorce:

$$W = X \cdot \frac{100}{100 - S}$$

kde X je obsah oleje (tuku) v g/kg v semenech, tak jak byl získán podle 6.1

S obsah vlhkosti a těkavých látek v %

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu 4 g/kg.

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Olejnatá semena mohou být zkoušena odděleně takto: a) čistá semena a nečistoty
b) u podzemnice olejné čistá semena, celkové množství jemných částic, neolejnaté nečistoty a olejnaté nečistoty.

8.3 V laboratořích, které neprovádí pravidelně rozborů olejnatých semen a kde není mikrodrtič dostupný, může být mikrodrcení nahrazeno rozetřením na prášek tloučkem v třecí misce.

Po čtyřech hodinách extrakce podle 5.1.2 se vyprázdní obsah tuby do třecí misky a přidá se přibližně 10 g písku, který byl předem promytý kyselinou chlorovodíkovou (3.2) a následně vysušen. Vzorek semene spolu s pískem se potom roztírá tloučkem co nejjemněji a dále se pokračuje ve zkoušce podle odstavce 5.1.3. Protože je ruční drcení méně účinné než mechanické v mikrodrtiči, je množství oleje získané v baňce B, která obsahuje výsledek třetí extrakce, téměř vždy vyšší než 10 mg (zejména v případě semen, která se těžko extrahují, jako např. kopra). Proto je důležité provádět za sebou následující extrakce, dokud množství extrahovaného oleje z poslední extrakce není nižší než 10 mg, což může být více než 5 extrakcí.

Drcení v třecí misce nemůže být většinou použito v případě vícenásobného rozboru, protože únava pracovníka laboratoře brání uspokojivému rozdrcení více vzorků a extrakce oleje z hrubě rozdrceného vzorku nemůže být dokonalá.

8.4 Pokud je požadováno určení obsahu oleje z čistých semen, zkouší se tato semena odděleně od nečistot a postupuje se přitom jako u semen tak, jak byla získána. Pro určení obsahu oleje v nečistotách se provede zkouška stejným způsobem jako pro čistá semena. Avšak v tomto případě: a) zkušební navážka má být použita v množství 2 - 10 g
b) provádí se pouze jedna extrakce a to po dobu 4 hodin, kdy eventuelní chyba vzniklá při stanovení obsahu oleje v původním olejnatém semeni je zanedbatelná.

8.5 Slupky slunečnicových semen obsahují určité množství vosků, které jsou také vyextrahovány hexanem podle shora uvedených postupů, pokud je zkouška provedena na neopracovaných semenech. Zkoušení semen slunečnice beze slupky nemůže být brán v úvahu zejména pro změny v hmotnosti, způsobené různým obsahem vlhkosti v jádře slunečnice během odstraňování slupky.

Průmyslově je olej častěji získáván ze slunečnicových semen, z nichž byly slupky odstraněny, buďto částečně nebo úplně. Proto je běžné nebrat v úvahu vosky ze slupek extrahované hexanem.

8.6 Pro stanovení tuku je možno použít i extrakčních poloautomatických přístrojů, pokud poskytují výsledky zcela srovnatelné v mezích opakovatelnosti s uvedenou metodou.

8.7 Množství extrakčního činidla se volí takové, aby u přístroje diskontinuálně průtokového docházelo ke spolehlivému přetékání kondenzátu extrakčního činidla.

U kontinuálně průtokového přístroje se volí přibližně 50 až 100 ml.

3.3 Stanovení čísla kyselosti tuku

1. Účel a rozsah

S ohledem na původ krmiva a podle způsobu, jakým byl tuk z krmiva vyextrahován, jsou uvedeny dvě základní metody stanovení.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení čísla kyselosti tuku v krmivech.

. Princip

Číslo kyselosti tuku se stanoví titračně alkalimetry, po rozpuštění tukového extraktu získaného bez hydrolýzy vzorku resp. tuku samotného ve směsi extrakční činidlo - ethylalkohol.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční činidlo (poznámka 8.1)

3.1.1 n-Hexan nebo petrolether, obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml nebo

3.1.2 Diethylether bez obsahu peroxidů a zbytkem po odpaření nejvýše 1 mg/100 ml

3.2 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ nebo $0,05 \text{ mol/l}$

3.3 Směs ethylalkohol - extrakční činidlo (poznámka 8.1)

Příprava : Smísením obou látek v poměru 1 + 1 a zneutralizováním směsi odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) na indikátor fenolftalein (3.4). Neutralizace se provádí těsně před použitím.

3.4 Indikátor acidobazický, fenolftalein

Příprava: 1,0 g fenolftaleinu se rozpustí v odměrné baňce na 100 ml v 80 ml 96 % ethylalkoholu, doplní vodou po rysku a promíchá. 10 ml tohoto roztoku se odpipetuje do 100 ml odměrné baňky, doplní 96 % ethylalkoholem po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Přístroj extrakční Soxhlet nebo Twisselmann (poznámka 8.2)

4.2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení

4.2 Patrony nebo trubky extrakční

4.3 Sušárna elektrická s automaticky regulovatelnou teplotou a s odvětráváním a teploměrem
nejméně do 150 °C.

4.4 Baňka extrakční se zábrusem

4.5 Miska třecí porcelánová

4.6 Písek křemičitý, tukuprostý

4.7 Vata obvazová, odtučněná

4.8 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Tuk vyextrahovaný podle Přílohy 9, část 3.1 Stanovení obsahu tuku (poznámka 8.3 a 8.4) po vychladnutí a zvážení (m), s přesností nejméně na 0,001 g, resp. tuk jako takový odvážený se stejnou přesností (m), se v extrakční baňce (4.4) mírně zahřeje a obsah se rozpustí v 25 ml směsi ethylalkohol-extrakční činidlo (3.3). Po přidání pár kapek indikátoru fenolftaleinu (3.4) se titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) do právě vzniklého růžového zabarvení roztoku, které vydrží alespoň 1 minutu.

Při vyšší spotřebě odměrného roztoku hydroxidu draselného (3.2) než 15 ml (o koncentraci 0,1 mol/l) je nutno na každý další spotřebovaný ml odměrného roztoku (3.2) přidat pětinasobné množství směsi ethylalkohol-extrakční činidlo (3.3), aby se zabránilo hydrolýze vznikajícího mýdla.

5.2 U vzorků mléčných krmných směsí se postupuje následovně:

Asi 10 g zkušební vzorku se odváží s přesností nejméně na 0,001 g do třecí misky (4.5), obsah se mírně zvlhčí vodou a s postupně přidávanými přípravky vody po 1 až 10 ml se rozetře na hustou kaši. Potom se přidá asi 10 g jemného křemičitého písku (4.6) a obsah třecí misky (4.5) se kvantitativně vytírá s postupnými přídávky extrakčního činidla (3.1) (3 x 50 ml), přičemž po každém přídávku se obsah vytírá po dobu asi dvou minut. Po důkladném rozetření se extrakt filtruje řídkým filtrem do předem vysušené (1 hod při 95 °C až 98 °C), v exsikátoru ochlazené a s přesností nejméně na 0,001 g zvážené extrakční baňky (4.4). Suspense se promyje několikrát použitým extrakčním činidlem (3.1) do téže extrakční baňky (4.4) a nakonec se převážná část extrakčního činidla (3.1) opatrně oddestiluje, zbytek se nechá odpařit buď volně nebo na vroucí lázni (4.8). Baňka se extraktem se vysuší při teplotě 95 °C až 98 °C v sušárně (4.3) do konstantní hmotnosti (jednu až dvě hod) ochladí v exsikátoru a zváží s přesností nejméně na 0,001 g.

Dále se postupuje podle odstavce 5.1 .

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Číslo kyselosti tuku v mg KOH na 1 g tuku (X) nebo v mmol na 1 g tuku (Y) se vypočítá podle vzorců:

$$X = \frac{V \cdot C \cdot 56,11}{m}$$

$$Y = \frac{V \cdot C}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu draselného v ml

C přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu draselného v mol/l

m hmotnost vyextrahovaného tuku v g nebo při navážce vzorku tuku hmotnost zkušebního vzorku v g (poznámka 8.4)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností do hodnoty 10 mg KOH/1 g na celá čísla, resp. do hodnoty 0,2 mmol/g na dvě desetinná místa a nad tuto hodnotu na jedno desetinné místo.

7. 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 15% relativních.

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, petrolether, diethylether i ethylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné přísně dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Pro stanovení (extrakci) tuku je možné použít extrakčního poloautomatického přístroje, pokud poskytuje zcela srovnatelné výsledky stanovení tuku v mezích opakovatelnosti (tuku) s postupem uvedeným v Příloze 9, část 3.1 Stanovení obsahu tuku.

8.3 Tuk vyextrahovaný po předběžné hydrolýze nelze ke stanovení čísla kyselosti tuku použít, je nutné provést přímou extrakci vzorku i za cenu, že nebude kvantitativní - výsledek se vyjadřuje bez ohledu na hmotnost zkušebního vzorku jen na hmotnost vyextrahovaného tuku. S ohledem na nižší výtěžnost vyextrahovaného tuku přímou extrakcí je vhodnější volit vyšší navážku vzorku (bez vážení).

8.4 Při stanovení čísla kyselosti tuku v samotném (např. krmném) tuku se vzorek přímo odvažuje do vhodné baňky v množství asi 0,2 až 0,5 g s přesností nejméně na 0,001 g a dále se postupuje jak uvedeno v této metodě.

3.4 Stanovení obsahu lecithinu

1. Účel a rozsah

Metoda je určena na stanovení obsahu lecithinu v technických a potravinářských produktech.

2. Princip

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.

3. Chemikálie

3.1 Petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)

3.2 Aceton

3.3 Benzen nebo toluen (poznámka 8.1 a 8.2)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Odstředivka (elektrická nebo ruční) s nádobkami se značkou objemu 50 ml

4.2 Skleněný filtrační kelímek

4.3 Sušárna elektrická s termostatem

4.4 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Stanovení látek rozpustných v acetonu

Vzorek se zahřeje na 60 °C a důkladně se promíchá. Naváží se přesně asi 2 g do vytárované odstředivkové nádoby se značkou 50 ml (4.1) a s tyčinkou (poznámka 8.3).

Po přidavku 3 ml petroletheru (3.1) se směs dobře promíchá (míchá se asi 15 min), přidá se 15 ml acetonu (3.2), znovu se promíchá a vloží se do misky s ledovou vodou. Přidává se aceton (3.2), ochlazený na 0 - 5 °C, za důkladného míchání až ke značce 50 ml. Po vyjmutí tyčinky se nádoba vloží na 15 min do ledové vodní lázně a potom se její obsah odstředí 10 min dostatečnou rychlostí, až se roztok zcela vyjasní. Acetonový roztok se dekantuje do vysušené a zvážené kádinky na 250 ml.

Odstředivková nádoba (4.1) se znovu doplní acetonem (3.2) ke značce 50 ml za důkladného míchání a znovu se opakuje chlazení, odstředování a dekantace. Potom se aceton (3.2) na vodní lázni odpaří a zbytek rozpouštědla (3.2) se odstraní proudem čistého horkého vzduchu. Sušení se provádí při 105 °C a po vychladnutí v exsikátoru se váží. Vážení se opakuje, dokud se nedosáhne konstantní hmotnosti.

5.2 Stanovení látek nerozpustných v benzenu nebo toluenu

Navází se 10 g dobře promíchaného vzorku do kuželovité baňky na 250 ml, přidá se 100 ml benzenu nebo toluenu (3.3) a protřepává se do rozpuštění. Potom se filtruje skleněným filtračním kelímkem (4.2), předem vysušeným 1 hodinu při 105 °C a zváženým s přesností 1 mg. Je-li filtrace obtížná, zmenší se navážka vzorku. Místo skleněného kelímku (4.2) lze použít papírového filtru, také předem vysušeného při uvedené teplotě a zváženého s přesností 1 mg.

Kuželovitá baňka se 2krát vypláchne vždy 25 ml benzenu (3.3) a zbytek v kelímku (4.2) se zároveň promyje. Kelímkem (4.2) se vloží do sušárny (4.3) a suší se 1 hodinu při 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímkem zváží s uvedenou přesností.

5.3 Stanovení vody a těkavých látek

Provádí se podle Přílohy 9, metoda 3.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Obsah látek rozpustných v acetonu v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot a}{m}$$

kde a je hmotnost extraktu v g

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.2 Obsah látek nerozpustných v benzenu v g/kg (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = \frac{10^3 \cdot b}{m}$$

kde b je hmotnost nerozpustného zbytku v g,

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g.

6.3 Obsah lecithinu v g/kg (A) se vypočte podle vzorce:

$$A = 1000 - \{X + Y + (10 \cdot Z)\}$$

kde X je množství látek rozpustných v acetonu v g/kg

Y množství látek nerozpustných v benzenu v g/kg

Z množství vody a těkavých látek v %

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 10 g/kg

8. Poznámky

8.1 Aceton, benzen, petrolether a toluen jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Doporučuje se používat méně toxický toluen, s ohledem na karcinogenní účinky benzenu.

8.3 U většiny lecithinů lze místo odstředivkové nádoby použít kádinky a vyluhovat i dekantovat bez odstřeďování za použití filtrace.

3.5 Stanovení obsahu nerozpustných nečistot

1. Účel a rozsah

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

Nerozpustné nečistoty a cizí látky, stanovené za podmínek specifikovaných v této metodě, zahrnují mechanické nečistoty, minerální látky, cukry, dusíkaté látky, různé pryskyřice, vápenatá mýdla, oxidované mastné kyseliny, laktony mastných kyselin a (částečně) alkalická mýdla, mastné kyseliny obsahující hydroxylovou skupinu a jejich glyceridy (poznámka 8.1).

2. Princip

Nerozpustné nečistoty se stanoví rozpuštěním vzorku v přebytku n-hexanu nebo petroletheru nebo diethyletheru filtrací získaného roztoku a zvážením vysušeného filtru s nerozpustnými nečistotami.

3. Chemikálie

- 3.1 Petrolether nebo n-hexan, destilující v rozsahu 30 až 60 °C, s bromovým číslem menším než 1. Pro obě rozpouštědla by odparek neměl přesáhnout 0,002 g na 100 ml (poznámka 8.2).
- 3.2 Diethylether bez obsahu peroxidů, zbytkem po odpaření nejvýše 1 mg/100 ml
- 3.3 Křemelina čištěná, vyžíhaná; ztráta při 900 °C (červený žár) 0,2 %

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Elektrická sušárna s možností nastavení (103 ± 2) °C
- 4.2 Kónická baňka na 250 ml se skleněnou zabroušenou zátkou
- 4.3 Filtrační papír neobsahující popel, (maximální obsah popela 0,01 %), zadržovací schopnost 98 % pro částice velikosti větší než 2,5 mm nebo ekvivalentní skleněný filtr o průměru 120 mm a kovová (nejlépe hliníková) nebo skleněná nádoba s dobře těsnícím víkem. (Alternativa k 4.5 pro všechny produkty kromě kyselých olejů.)
- 4.4 Skleněný filtrační kelímek P16 (velikost pórů 10 až 16 μm), průměr 40 mm, objem 50 ml a odsávačka. (Alternativa k 4.3 pro všechny produkty včetně kyselých olejů.)
- 4.5 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

5. Postup

Do kónické baňky (4.2) se naváží, s přesností 0,01 g, přibližně 20 g zkušební vzorku.

Vysuší se filtrační papír (4.3) a nádoba s víčkem nebo filtrační kelímek (4.4) v sušárně (4.1) nastavené na 103 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží s přesností na 0,001 g.

Do baňky obsahující navážený vzorek se přidá 200 ml n-hexanu nebo petroletheru (3.1) nebo diethyletheru (3.2), baňka se zazátkuje a protřepe. Pro ricinový olej může být množství rozpouštědla zvýšeno, aby bylo usnadněno stanovení. Baňka se nechá stát při 20 °C po dobu 30 min.

Obsah baňky se zfiltruje přes vysušený a zvážený filtrační papír (4.3) ve vhodné nálevce, nebo přes filtrační kelímek (4.4). Je-li to nutné, lze použít vakua (4.5). Filtrační papír (4.3) nebo kelímek (4.4) se promyje malým množstvím stejného rozpouštědla, jaké bylo použito na rozpouštění vzorku, ale ve větším množství než je nutné, aby konečný filtrát neobsahoval tuk nebo olej. V případě, že jsou na filtru zachyceny nerozpouštěné tuky, ohřeje se rozpouštědlo na teplotu max. 60 °C.

Jestliže byl použit filtrační papír (4.3), nechá se po jeho vyjmutí z nálevky odpařit na vzduchu ve vhodné nádobě většina rozpouštědla, a potom se dokonale odstraní v sušárně (4.1) při 103 °C. Po vyjmutí ze sušárny (4.1) se nádoba uzavře víkem, nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se s přesností na 0,001 g.

Jestliže je k filtraci použit kelímek (4.4), nechá se většina zbývajících rozpouštědla odpařit na vzduchu a odstranění rozpouštědla se dokončí v sušárně (4.1) při 103 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek zváží s přesností na 0,001 g.

Jestliže je požadováno stanovení obsahu organických nečistot, je nutné použít předem vysušený a zvážený filtrační papír (4.3), který neobsahuje popel. V tomto případě by měl být filtrační papír (4.3) obsahující nerozpustné nečistoty spálen a vypočtená hmotnost popela by měla být odečtena od nerozpustných nečistot.

Jestliže se analyzují kyselé oleje, pokryje se skleněný kelímek křemelinou (3.3) podle následujícího postupu. Ve 100 ml skleněné kádince se připraví suspence obsahující 2 g křemeliny (3.2) a přibližně 30 ml petroletheru (3.1). Směs se nalije do filtračního kelímku (4.4) při odsávání (4.5), aby vznikla vrstva křemeliny na skleněném filtru. Připravený suchý skleněný filtrační kelímek se vloží na 1 h do sušárny (4.1) při teplotě 103 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek zváží s přesností na 0,001 g.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Obsah nerozpustných nečistot vyjádřený v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_2 - m_1)}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušební vzorku v g

m_1 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a filtračním papírem nebo filtračního kelímku v g

m_2 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a filtračním papírem, obsahujícím vysušené nečistoty nebo filtračního kelímku s vysušenými nečistotami v g.

6.2 Obsah organických nečistot vyjádřený v g/kg (Y) se vypočte podle vzorce

$$Y = \frac{10^3 \cdot (m_2 - m_3)}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušební vzorku v g

m_2 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a filtračním papírem, obsahujícím vysušené nečistoty nebo filtračního kelímku s vysušenými nečistotami v g.

m_3 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a spáleným filtračním papírem s nečistotami nebo filtračního kelímku s spálenými nečistotami v g.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

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

do 3,0 g/kg	0,2 g/kg nerozpustných nečistot
nad 3,0 g/kg	0,5 g/kg nerozpustných nečistot

8. Poznámky

8.1 V případě, že není žádoucí zahrnout mýdla (zejména vápenatá mýdla) do nerozpustných nečistot, je nezbytné použít jiné rozpouštědlo a postup. V tomto případě by měla být metoda odsouhlasena smluvními stranami.

8.2 n-Hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

3.6 Stanovení obsahu nezmýdelnitelných látek

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje postup pro stanovení nezmýdelnitelného podílu v živočišných a rostlinných tucích a olejích extrakcí diethyletherem.

Metoda není použitelná pro vosky a dává přibližné výsledky pro určité tuky s vyšším obsahem nezmýdelnitelného podílu, např. pro tuky pocházející z mořských živočichů.

2. Princip

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 zbytek (poznámka 8.6).

3. Chemikálie

3.1 Diethylether, čerstvě predestilovaný, bez peroxidů a odparku (poznámka 8.1)

3.2 Aceton (poznámka 8.1)

3.3 Hydroxid draselný, ethanolický roztok KOH

Příprava: 60 g hydroxidu draselného se rozpustí v 50 ml vody a doplní se do 1000 ml 96 % ethylalkoholem. Roztok by měl být bezbarvý nebo slámově žlutý.

3.4 Hydroxid draselný, vodný roztok $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.5 Fenolftalein: ethanolický (96%) roztok, $c = 10 \text{ g/l}$

3.6 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.7 Ethylalkohol, roztok 65%, předem zneutralizovaný do slabě růžového zabarvení v přítomnosti fenolftaleinu (3.5) jako indikátoru (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Baňka s kulatým dnem se zábrusem na 250 ml nebo

Baňka s rovným dnem na 500 ml

4.2 Zpětný chladič se zábrusem vhodným k připojení k baňce (4.1)

4.3 Dělicí nálevky na 500 ml s kohoutem s polytetrafluorethylenovou (teflonovou) zátkou

4.4 Vodní lázeň s termostatem

4.5 Sušárna s termostatem

5. Postup

5.1 Asi 5 g zkušebního vzorku se naváží s přesností nejméně 0,01 g do baňky (4.1), přidá se 50 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3) a několik varných kamínků. Zpětný chladič (4.2) se připojí k baňce a obsah se vaří mírně 1 hodinu. Po přerušení ohřevu se horní částí chladiče přidá 100 ml vody a obsah baňky se promíchá krouživým pohybem (poznámka 8.2).

Roztok se po ochlazení převede do 500 ml dělicí nálevky (4.3). Baňka a varné kamínky se několikrát propláchnou diethyletherem (3.1). Celkem se použije 100 ml diethyletheru a tento roztok se přeleje do dělicí nálevky. Po zazátkování se důkladně protřepe po dobu 1 min za občasného uvolnění tlaku obrácením dělicí nálevky a opatrným otevřením kohoutu. Obsah se nechá stát, dokud nedojde k úplnému rozdělení na dvě vrstvy. Potom se spodní vrstva kvantitativně převede do druhé dělicí nálevky. Jestliže dojde k vytvoření emulze, rozrazí se přidavkem malého množství ethylalkoholu, koncentrovaného hydroxidu draselného nebo roztoku chloridu sodného.

Vodně ethanolický roztok mýdla se extrahuje ještě dvakrát, pokaždé stejným způsobem 100 ml diethyletheru (poznámka 8.3). Všechny tři extrakty se spojí do jedné dělicí nálevky, obsahující 40 ml vody. Etherové extrakty se promyjí mírným kroužením dělicí nálevkou (poznámka 8.4).

Po úplném oddělení se spodní vodná vrstva vypustí. Etherový roztok se promyje ještě dvakrát 40 ml vody pomocí silného třepání a vodná vrstva se po každém promytí odpustí. Při každém odpouštění promývací vodné vrstvy se nechají v dělicí nálevce 2 ml a obsah nálevky se promíchá kroužením kolem osy. Potom se vyčká několik minut, dokud se zbylá vodná vrstva nespojí. Po jejím vypuštění se uzavře kohout, jakmile se etherový roztok dotkne otvoru v kohoutu. Následně se etherový roztok promyje 40 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4), 40 ml vody, znovu 40 ml roztoku hydroxidu draselného a potom nejméně dvakrát 40 ml vody.

V promývání se pokračuje dokud promývací voda již nedává růžové zabarvení po přidání kapky roztoku fenolftaleinu (3.5). Potom se etherový roztok kvantitativně převede co nejrychleji horním otvorem dělicí nálevky do 250 ml baňky (4.3), předem vysušené při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ v sušárně (4.5), ochlazené a zvážené s přesností na 0,1 mg. Rozpouštědlo se odpaří na vroucí vodní lázni (4.4) (poznámka 8.5). Po přidavku 5 ml acetonu (3.2) se dokonale odpaří těkavé rozpouštědlo v mírném proudu vzduchu, při otáčení baňky šikmo ponořené do vroucí vodní lázně.

Zbytek se suší v sušárně (4.5) při $(103 \pm 2) ^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut v baňce umístěné v téměř vodorovné poloze. Po ochlazení v exsikátoru se baňka zváží s přesností na 0,1 mg. Sušení se opakuje dokud ztráta hmotnosti mezi dvěma následnými váženími není menší než 1,5 mg.

Jestliže není dosaženo konstantní hmotnosti po třech opakovaných sušeních, je nezmýdelnitelný podíl pravděpodobně znečištěn a stanovení by se mělo opakovat.

Jestliže je požadována korekce na obsah volných mastných kyselin, rozpustí se zbytek po zvážení ve 4 ml diethyletheru (3.1), přidá se 20 ml ethylalkoholu (3.7). Roztok se ztitruje standardním odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.6) do stejného konečného zabarvení. Hmotnost volných mastných kyselin se vypočte jako kyselina olejová a hmotnost zbytku se upraví o tuto hodnotu.

5.2 Slepý pokus

Slepý pokus se provede za stejných podmínek, se stejným množstvím všech činidel, ale vynechá se navážka vzorku. Jestliže zbytek je větší než 1,5 mg, je třeba ověřit postup a použítá činidla.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah nezmýdelnitelného podílu, vyjádřený v g/kg (X), se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_1 - m_2 - m_3)}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g,

m_1 hmotnost zbytku v g,

m_2 hmotnost zbytku získaného při slepém pokusu v g,

m_3 případně hmotnost volných mastných kyselin v g (K), která se rovná:

$$K = 2,8 \cdot C \cdot V$$

kde V je objem odměrného roztoku hydroxidu draselného (3.6) použitého při titraci v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného (3.6) v mol/l.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na celé jednotky

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu nezmýdelnitelného podílu do:

50 g/kg	0,5 g/kg
100 g/kg	1 g/kg

8. Poznámky

8.1 Aceton, diethylether a ethylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Jestliže extrakce nezmýdelnitelných látek je prováděna s ohledem na další stanovení tokoferolů, je nezbytný přídavek pyrogalolu a extrakce by měla být rychle ukončena (asi během 30 min).

8.3 Pro dokonalejší extrakci se extrahuje třikrát a všechny čtyři extrakty se spojí.

8.4 Prudké třepání v tomto stadiu může způsobit vznik emulze.

8.5 Jestliže je k dispozici rotační vakuová odparka, lze ji použít, zvláště jestliže bude nezmýdelnitelný podíl dále analyzován.

8.6 Nezmýdelnitelný podíl zahrnuje přírodní lipidy, jako jsou steroly, vyšší uhlovodíky a alkoholy, alifatické a terpenické alkoholy, ale také cizí organické látky extrahované rozpouštědlem a netěkavé při 103 °C (např. minerální oleje).

3.7 Stanovení peroxidového čísla

Do této metody byla zapracována doporučení ISO TC34 3968-1977

1. Účel a rozsah

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

Peroxidové číslo je definováno jako množství látek ve vzorku, vyjádřené v milimolech aktivního kyslíku na kg, které oxidují jodid draselný za předepsaných podmínek.

2. Princip

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

3. Chemikálie

- 3.1 Chloroform, zbavený kyslíku proudem čistého a suchého inertního plynu
- 3.2 Kyselina octová ledová, zbavená kyslíku proudem čistého a suchého inertního plynu.
- 3.3 Jodid draselný, čerstvě připravený nasycený vodný roztok neobsahující jód a jodičnany (poznámka 8.1)
- 3.4 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,005 \text{ mol/l}$ nebo $0,001 \text{ mol/l}$, standardizovaný těsně před použitím.
- 3.5 Roztok škrobu: 5 g rozpustného škrobu se promíchá ve 30 ml vody, tato směs se přidá do 1000 ml vařící vody a vaří se 3 min.

Žádné činidlo (ani voda), použité ke stanovení, by nemělo obsahovat rozpuštěný kyslík.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Baňka na 250 ml se zábrusem, opatřená zátkou, předem vysušená a naplněná čistým, suchým inertním plynem (dusík, nebo lépe oxid uhličitý)
- 4.2 Skleněná váženka vhodné velikosti podle množství vzorku
- 4.3 Byreta na 10 ml, dělená po 0,02 ml

Všechna pomůcky musí být zbaveny redukčních a oxidačních látek, zábrusy nesmí být mazány tukem.

5. Postup

Stanovení by mělo být prováděno v rozptýleném denním světle nebo při umělém osvětlení.

5.1 Zkušební vzorek

Do baňky (4.1) se naváží vzorek s přesností na 0,001g podle předpokládaných hodnot peroxidového čísla uvedených v následující tabulce. Vzorek může být navážen ve skleněné váženke (4.2), jestliže baňka nemůže být zvážena přímo.

Předpokládané peroxidové číslo v mmol/kg	Navážka vzorku v g
0 - 6	5,0 - 2,0
6 - 10	2,0 - 1,2
10 - 15	1,2 - 0,8
15 - 25	0,8 - 0,5
25 - 45	0,5 - 0,3

5.2 Vlastní stanovení

V případě, že byl vzorek navážen do váženky (4.2), vloží se váženka obsahující vzorek do baňky (4.1). Přidá se 10 ml chloroformu (5.1) a vzorek se rychle rozpustí zamícháním. Pak se přidá 15 ml kyseliny octové (3.2), potom 1 ml roztoku jodidu draselného (3.3), baňka (4.1) se ihned uzavře, 1 min míchá a ponechá stát přesně 5 min ve tmě při teplotě 15 až 25 °C. Přidá se přibližně 75 ml vody, baňkou se prudce zamíchá a po přidavku několika kapek škrobového roztoku (3.5), jako indikátoru, se titruje uvolněný jód odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.4) při použití koncentrace 0.001 mol/l roztoku pro předpokládané peroxidové číslo do 12, nebo roztokem koncentrace 0.005 mol/l pro předpokládané peroxidové číslo větší než 12.

5.3 Slepý pokus

Spolu s vlastním stanovením se provádí slepý pokus. Jestliže výsledky slepého pokusu přesáhnou 0,1 ml roztoku thiosíranu sodného o koncentraci 0.005 mol/l (3.4), je třeba stanovení opakovat s jinými chemikáliemi.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Peroxidové číslo, vyjádřené v milimolech aktivního kyslíku ($1/2 \text{ O}_2$) na 1 kg vzorku (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot C \cdot (V_2 - V_1)}{m}$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku thiosíranu sodného, použitého při titraci slepého pokusu v ml

V_2 spotřeba roztoku thiosíranu sodného, použitého při titraci vzorku

C koncentrace použitého roztoku thiosíranu sodného v mol/l

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednu desetinu mmol/kg

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí přesáhnout při hodnotě

do 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

8. Poznámky

8.1 Je nutno se přesvědčit, že roztok je nasycený podle přítomnosti nerozpuštěných krystalů. Roztok je nutno skladovat ve tmě. Před použitím je nutno ověřit účinnost přidáním 2 kapek škrobového roztoku (3:5) k 0,5 ml roztoku jodidu draselného ve 30 ml roztoku kyselina octová - chloroform (3:2). Jestliže k vymizení modrého zabarvení je třeba více než jedné kapky roztoku thiosíranu sodného o koncentraci 5 mmol/l, je nutno připravit čerstvý roztok.

8.2 Peroxidové číslo může být také vyjádřeno v mikrogramech aktivního kyslíku na g pomocí přepočítávacího faktoru: 1 milimol/kg = 16 mikrogramů/g

3.8 Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech

Do této metody byla zapracována doporučení ISO TC34 569/1979

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení tuku (hexanového nebo petroletherového extraktu) v olejnatých semenech.

2. Princip

Tuk ("olej") se stanoví vázkově po extrakci vzorku hexanem nebo petroletherem na vhodném zařízení, oddestilování rozpouštědla a vysušení vyextrahovaného tuku vzorku.

3. Chemikálie

- 3.1 Extrakční činidlo n-hexan nebo petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a se zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 9.1)
- 3.2 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná
- 3.3 Plyn inertní (dusík, oxid uhličitý)

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Extrakční zařízení, vhodné konstrukce, s extrakčními baňkami o objemu 200 až 500 ml
- 4.2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení
- 4.3 Patrony nebo trubky extrakční, tukuprosté, velikosti podle použitého extrakčního přístroje
- 4.4 Sušárna elektrická vakuová s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou
- 4.5 Vata obvazová, odtučněná
- 4.6 Pro bavlníková semena s přilehlými vlákny je požadováno další zařízení:
 - 4.6.1 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automatickou regulací teploty (130 ± 2) °C
 - 4.6.2 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou, schopná vyhřát vzorek na teplotu 115 °C během 30 minut
 - 4.6.3 Miska kovová s plochým dnem o průměru 100 mm a výšce přibližně 40 mm (tzv. vysoušečka)
 - 4.6.4 Keramická porézní nádoba, cylindrická o vnitřním průměru 68 mm, vnějším průměru 80 mm, výškou 85 mm a tloušťkou stěn i základny 6 mm

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

5.1.1 Pro zkoušku se použije vzorek tak, jak byl získán nebo po odstranění nečistot (poznámka 9.4). Pokud se pracuje se vzorkem, ze kterého byly předem odstraněny velké neolejnaté částice, je nutno to zohlednit při výpočtu (viz. 6.4).

5.1.2 V případě semene kopry se vzorek upravuje mechanickým struhadlem celý nebo ručním struhadlem v takovém množství, aby byl co nejvíce reprezentativní. Délka částic může být větší než 2 mm, ale nemá být větší než 5 mm. Částice je nutno promíchat a zkoušku provést bez prodlení.

5.1.3 Semena střední velikosti (podzemnice, sója apod.), kromě bavlníku a s přilehlými vlákny, se vzorek šrotuje v mechanickém mlýnku, který byl před použitím dobře vyčištěn, tak dlouho, dokud hlavní rozměr částic neklesne pod 2 mm. Větší částice (přibližně jedna dvacatina vzorku) se vyřadí, zbytek se pečlivě promíchá a stanovení se provede bez prodlení.

5.1.4 Bavlníková semena s přilehlými vlákny

Do vysoušecí misky (4.6.3) se naváží přibližně 60 g vzorku s přesností 1 mg tak, jak byl získán. Miska se semeny se vloží do sušárny (4.6.1), předem vyhřáté na $(130 \pm 2)^\circ\text{C}$ a vzorek se nechá při této teplotě sušit 2 hodiny. Poté se miska vyjme ze sušárny a nechá se vychladnout na vzduchu asi 30 minut. Vysušená semena se přemístí do porézní keramické nádoby (4.6.4), jejíž vnitřní stěny byly předem pomocí pipety zvlhčeny 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Je třeba dbát na to, aby se kyselina úplně vstřebala a nevytvořila na stěnách ulpívající kapky. Potom se nádoba přikryje hodinovým sklem a vloží do sušárny (4.6.2) a zahřeje se během 30 minut na teplotu 115°C a při této se udržuje dalších 30 minut. Poté se keramická nádoba (4.6.4) vyjme ze sušárny a nechá zchladit na vzduchu 1 hodinu.

Semena se zváží s přesností 1 mg, rozemelou se na mechanickém mlýnku jako v odstavci 5.1.3.

5.1.5 Malá semena (len, řepka, konopí, čočka apod.) se zkouší bez předchozího mletí (v původním stavu).

5.2 Vlastní stanovení přímou extrakcí

5.2.1 U materiálů uvedených v 5.1.2, 5.1.3 a 5.1.4 se do extrakční patrony (tuby) (4.3) odváží asi 10 g vzorku s přesností 1 mg a shora se utěsní obvazovou vatou (poznámka 9.2). Navážka malých semen se nejprve rozdrtí v mechanickém mikrodrtiči nebo v mlýnku, přičemž je třeba dát pozor, aby byla rozdrčena všechna semena. Rozdrčená semena se přenesou kvantitativně do extrakční patrony (tuby) (4.3), nejlépe pomocí špachtle a vatového tamponu, namočeného do použitého extrakčního činidla (3.1). Tímto tamponem se také vytře miska mikrodrtiče nebo mlýnku a shora se s ním utěsní extrakční patrona (tuba) (poznámka 9.2).

Pokud obsah těkavých látek (vlhkost) přesahuje 10 %, vloží se patrona (tuba) se vzorkem do sušárny (4.4) a předsuší se při teplotě 80°C tak, aby se obsah těkavých látek snížil pod 10%.

5.2.2 První extrakce

Extrakční patrona (tuba) (4.3) se vzorkem se vloží do střední části extrakčního přístroje (4.1), tato část se nasadí na extrakční baňku A, předem vysušenou (30 minut při 80°C) a po ochlazení v exsikátoru zváženou s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky A se přidá potřebné množství extrakčního činidla (3.1), baňka se umístí na vyhřívací zařízení (4.2),

napojí se na extraktor (4.1) a extrahuje se po dobu 4 hodin. Rychlost extrakce se upraví tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně k 10 přetokům extrakčního činidla, je-li použit diskontinuální extraktor nebo minimálně 3 až 5 kapek kondenzujícího extrakčního činidla za sekundu, byl-li použit kontinuální průtokový extraktor. Po této době se extrakce přeruší, extrakční zařízení se nechá vychladnout, vyjme se patrona (tuba) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla.

5.2.3 Druhá extrakce

Druhá a další extrakce se provádí se vzorkem po první extrakci.

Vzorek se z patrony (tuby) (4.3) vysype do mikrodrtiče a rozdrtí se co možná nejjemněji (poznámka 9.3). Takto upravený vzorek se kvantitativně vsype zpět do patrony (tuby) (4.3) a ta se opět vloží do extrakčního zařízení (4.1) a extrahuje další dvě hodiny. K tomu účelu se použije stejná extrakční baňka A, obsahující první část extraktu. Po dvou hodinách se extrakce přeruší, extrakční zařízení (4.1) se nechá vychladnout, opět se vyjme patrona (tuba) (4.3) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla. Opakuje se drcení jako po první extrakci.

5.2.4 Třetí extrakce

Vzorek se po druhé extrakci a následném drcení vloží zpět do extrakční patrony (tuby) (4.3) a tato se vloží zpět do extrakčního zařízení (4.1). K zařízení se připojí extrakční baňka B, předem vysušená (30 min. při 80 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážená s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky B se přidá potřebné množství extrakčního činidla, baňka se umístí na vyhřívací zařízení (4.2), napojí se na extraktor a extrahuje po dobu 2 hodin.

5.2.5 Odstranění extrakčního činidla a vážení tuku

Větší část rozpouštědla z extrakčních baněk A a B se odpaří na vyhřívacím zařízení (4.2), poslední stopy extrakčního činidla se odstraní v sušárně (4.4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu 1, 5 hodiny. Extrakční činidlo je možno odstranit také proudem vzduchu nebo lépe inertního plynu (3.3), zaváděného do baněk po krátkých intervalech anebo snížením tlaku v baňkách.

Baňky s vyextrahovaným tukem ("olejem") se nechají vychladnout v exsikátoru po dobu nejméně 1 hodinu a potom se zváží s přesností nejméně na 0,001 g. Potom se baňky s extraktem vloží zpět do sušárny (4.4) a při výše uvedené teplotě se suší ještě 10 minut, ochladí se v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností. Pro obě baňky platí, že rozdíl mezi dvěma váženími by neměl být větší než 10 mg. V negativním případě (rozdíl je vyšší) je nutné sušení a vážení opakovat až bude docíleno výše uvedeného rozdílu.

Pokud hmotnost výtěžku v baňce B nepřekročí 10 mg, extrakce je dokončena. V opačném případě je nutno provést další extrakci po dobu dvě hodiny za stejných podmínek je v předchozích extrakcích s novou extrakční baňkou, dokud množství výtěžku z poslední extrakce není nižší nebo rovno 10 mg.

5.2.6 Stanovení obsahu nečistot

Vyextrahovaný olej má být čistý. Pokud není, je nutno určit obsah nečistot. K tomuto účelu se rozpustí olej v rozpouštědle použitým k extrakci, zfiltruje se přes filtrační papír, předem vysušený při (103 ± 2) °C do konstantní hmotnosti a zvážený s přesností 1 mg. Filtr se ještě několikrát promyje čistým rozpouštědlem (3.1), aby se zcela odstranil vyextrahovaný tuk ("olej"). Filtr se vysuší při (103 ± 2) °C do konstantní hmotnosti a zváží s přesností 1 mg. K chlazení a vážení se použije vhodná nádobka opatřená víčkem.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v semeni tak, jak bylo zkoušeno

Obsah oleje (tuku) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 10^3 \times \frac{m_1}{m_0}$$

kde m_0 je hmotnost zkušební vzorku v g

m_1 součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti. Pokud není splněna podmínka opakovatelnosti, opakuje se zkouška ve dvou jiných navážkách vzorku. Pokud i v tomto případě přesáhne rozdíl 0,4 g na 100 g vzorku, bere se za výsledek aritmetický průměr všech čtyř uskutečněných zkoušek.

V protokolu musí být uvedeno použité extrakční činidlo.

6.2 Stanovení oleje při odděleném rozboru čistých semen a nečistot

Vzorec uvedený v 6.1 lze použít také pro výpočet obsahu oleje jak čistých semen tak i nečistot, tzn. když byla čistá semena a nečistoty zkoušeny odděleně. V tomto případě se obsah oleje v g/kg (Y) vypočte podle vzorce:

$$Y = H_1 - \frac{P \times (H_1 - H_2)}{10^3}$$

kde P je obsah nečistot ve zkoušených semenech v g/kg

H_1 obsah oleje v čistých semenech v g/kg

H_2 obsah oleje v nečistotách v g/kg

6.3 Stanovení obsahu oleje v bavlníkových semenech s přilehlými vlákny

Obsah oleje (tuku) v g /kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = 10^3 \times \frac{m_1 \times m_3}{m_0 \times m_2}$$

kde m_0 je hmotnost zkušební vzorku v g

m_1 součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g

m_2 hmotnost zkušební vzorku (asi 60 g) před přípravou podle 5.1.4 v g

m_3 hmotnost stejného zkušební vzorku po provedené přípravě podle 5.1.4 a před drcením v g

6.4 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v případech, kdy byly velké neolejnaté částice odděleny před zkouškou.

Obsah oleje (tuku) v g /kg (U) se vypočítá podle vzorce:

$$U = X \times \frac{10^3 - N}{10^3}$$

kde X je obsah tuku v semeni podle 6.1

N obsah velkých neolejnatých nečistot předem oddělených ze zkoušeného semene v g/kg

6.5 Stanovení obsahu tuku ("oleje") v podzemnici olejné.

Obsah oleje (tuku) v g /kg (V) se vypočítá podle vzorce:

$$V = (H_1 - H_2) \times \frac{J + I_o + I_1}{10^3}$$

kde J je obsah jemných částic zkušebního vzorku v g/kg

I_o obsah olejnatých nečistot v g/kg

I_1 obsah neolejnatých nečistot v g/kg

H_1 obsah oleje v čistých semenech v g/kg

H_2 obsah oleje v nečistotách v g/kg

6.6 Stanovení obsahu oleje, korigovaného na sušinu.

Obsah oleje (tuku) korigovaný na sušinu v g /kg (W) se vypočítá podle vzorce:

$$W = X \times \frac{100}{100 - S}$$

kde X je obsah oleje (tuku) v g/kg v semenech, tak jak byl získán podle 6.1

S obsah vlhkosti a těkavých látek v %

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu 4 g/kg.

8. Reprodukovatelnost

Nestanovena.

9. Poznámky

9.1 n-hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

9.2 Olejnatá semena mohou být zkoušena odděleně takto :

a) čistá semena a nečistoty

b) u podzemnice olejné čistá semena, celkové množství jemných částic, neolejnaté nečistoty a olejnaté nečistoty.

9.3 V laboratořích, které neprovádí pravidelně rozborů olejnatých semen a kde není mikrodrtič dostupný, může být mikrodrcení nahrazeno rozetřením na prášek tloučkem v třecí misce.

Po čtyřech hodinách extrakce podle 5.1.2 se vyprázdní obsah tuby do třecí misky a přidá se přibližně 10 g písku, který byl předem promytý kyselinou chlorovodíkovou (3.2) a následně vysušen. Vzorek semen spolu s pískem se potom roztírá tloučkem co nejjemněji a dále se pokračuje ve zkoušce podle odstavce 5.1.3. Protože je ruční drcení méně účinné než mechanické v mikrodrtiči, je množství oleje získané v baňce B, která obsahuje výsledek třetí extrakce, téměř vždy vyšší než 10 mg (zejména v případě semen, která se těžko extrahují, jako např. kopra). Proto je důležité provádět za sebou následující extrakce, dokud množství extrahovaného oleje z poslední extrakce není nižší než 10 mg, což může být více než 5 extrakcí.

Drcení v třecí misce nemůže být většinou použito v případě vícenásobného rozboru, protože únava pracovníka laboratoře brání uspokojivému rozdrcení více vzorků a extrakce oleje z hrubě rozdrceného vzorku nemůže být dokonalá.

9.4 Pokud je požadováno určení obsahu oleje z čistých semen, zkouší se tato semena odděleně od nečistot a postupuje se přitom jako u semen tak, jak byla získána. Pro určení obsahu oleje v nečistotách se provede zkouška stejným způsobem jako pročistá semena. Avšak v tomto případě: a) zkušební navážka má být použita v množství 2 - 10 g

b) provádí se pouze jedna extrakce a to po dobu 4 hodin, kdy eventuelní chyba vzniklá při stanovení obsahu oleje v původním olejnatém semeni je zanedbatelná.

9.5 Slupky slunečnicových semen obsahují určité množství vosků, které jsou také vyextrahovány hexanem podle shora uvedených postupů, pokud je zkouška provedena na neopracovaných semenech. Zkoušení semen slunečnice beze slupky nemůže být bráno v úvahu zejména pro změny v hmotnosti, způsobené různým obsahem vlhkosti v jádře slunečnice během odstraňování slupky.

Průmyslově je olej častěji získáván ze slunečnicových semen, z nichž byly slupky odstraněny, buďto částečně nebo úplně. Proto je běžné nebrat v úvahu vosky ze slupek extrahované hexanem.

9.6 Pro stanovení tuku je možno použít i extrakčních poloautomatických přístrojů, pokud poskytují výsledky zcela srovnatelné v mezích opakovatelnosti s uvedenou metodou.

9.7 Množství extrakčního činidla se volí takové, aby u přístroje diskontinuálně průtokového docházelo ke spolehlivému přetékání kondenzátu extrakčního činidla.

U kontinuálně průtokového přístroje se volí přibližně 50 až 100 ml.

4.1 Stanovení obsahu vlákniny

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 83, 30/07/73 a L 344, 26/11/92

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě modifikace metody, pro manuální provedení a pro instrumentální pomocí hydrolyzačních automatických zařízení. Metody jsou použitelné pro všechna krmiva, kde obsah vlákniny je vyšší než 10 g/kg.

2. Princip

Vláknina se stanoví vážkově jako nezhydrolyzovatelný zbytek vzorku po 30 minutové hydrolýze v roztoku kyseliny sírové, separaci pevného zbytku, následující hydrolýze roztokem hydroxidu draselného a po odečtení popela tohoto zbytku.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = (0,128 \pm 0,05) \text{ mol/l}$

3.2 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = 0,23 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.4 Aceton nebo ethylalkohol (poznámka 8.1)

3.5 Odpeňovací činidlo: např. oktylalkohol (poznámka 8.1)

3.6 Extrakční činidlo: n-Hexan, diethylether či petrolether s bodem varu 40°C až 60°C (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Sušárna laboratorní s regulovatelnou teplotou, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsahy teplot nejméně do 150°C

4.2 Pec muflová s automatickou regulací teploty s možností odvětrávání a teploměrem pro rozsahy teplot nejméně do 650°C

4.3 Nádobka hydrolyzační obsahu asi 600 ml s možností připojení na vhodné refluxní zařízení (vodný zpětný chladič) (poznámka 8.2) nebo nádobka hydrolyzační obsahu asi 600 ml (kádinka) s vyznačeným objemem na 200 ml

4.4 Varič elektrický nebo topná deska s možností regulace zahřívání

4.5 Kelímek filtrační křemenný či skleněný s porézní vložkou (fritou) hustoty S_1 nebo kelímek filtrační porcelánový

4.6 Miska spalovací, platinová (Pt-Ir), porcelánová nebo křemenná

4.7 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.8 Nálevka filtrační podle Büchnera

4.9 Síta mlynářské (UHELON)

4.10 Papírky indikátorové

4.11 Pro instrumentální modifikaci navíc

4.11.1 Přístroj hydrolyzační pro digesci vzorků kyselinou sírovou a hydroxidem draselným, opatřenou zařízením pro filtraci křemennými či skleněnými filtračními kelímky za sníženého tlaku a vyhřívacím zařízením (horká jednotka) a příslušenstvím (filtrační kelímky a pod.)

4.11.2 Přístroj extrakční s filtračním zařízením (studená jednotka)

5. Postup

5.1 Manuální metoda

5.1.1 Do hydrolyzační nádoby (4.3) se odváží přesně 3,000 g zkušební vzorku (m_0).

5.1.2 Obsahuje-li vzorek více než 10 g/kg tuku, odtuční se přímo v hydrolyzační nádobce dekantací několikanásobným přidavkem extrakčního činidla (3.6) (poznámka 8.3).

5.1.3 Obsahuje-li krmivo více než 20 g/kg vápníku, přidá se opatrně za účelem odstranění případných uhličitů 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) a odstaví se asi na 5 minut. Potom se obsah promyje studenou vodou dekantací tak, aby pevná část vzorku zůstala beze ztrát v původní nádobce. Promývací kapalina se dále nepoužije; jen v případě, že obsahuje zbytky pevného podílu, filtruje se přes porcelánový kelímek (4.5), který se potom kvantitativně vypláchne do původní kádinky.

5.1.4 Pokud se odtučňování nebo odstraňování uhličitů neprovádí nebo po jejich provedení (v tom případě se zkušební vzorek vysuší) se přidá 200 ml roztoku kyseliny sírové (3.1), nasadí refluxní zařízení (poznámka 8.2) a obsah nádoby se dostatečně rychle zahřeje k varu (poznámka 8.4). Je-li třeba zabránit nežádoucímu pění a utajenému varu, přidá se pár kapek odpěňovacího činidla (3.5) a varné kuličky či střípky. Od okamžiku, kdy se začne obsah hydrolyzační nádoby vařit, se vaří za konstantního objemu přesně 30 minut. Potom se vhodným způsobem, např. přes chladič, přidá 50 ml studené vody, chladič se sejme a obsah hydrolyzační nádoby se filtruje za sníženého tlaku přes Büchnerovu nálevku (4.8) s vloženým středně hustým filtrem podloženým mlynářským sítem (4.9). Vlastní filtrace se provede tak, že nejprve se filtrační nálevka naplní vodou, filtr se upraví tak, aby zakrýval otvory nálevky, asi po jedné minutě se voda odsaje a obsah hydrolyzační nádoby (4.3) se promývá dekantací horkou vodou a dekantační kapalina se vždy po usazení pevného podílu slévá na filtrační nálevku. Promývání a filtrace se provádí tak, aby co nejméně pevného podílu přišlo na filtr v nálevce. Promývá se do negativní reakce dalšího podílu filtrátu na kyselinu indikátorovým papírkem (4.10). Případný pevný podíl na filtru se vysuší acetonem (3.4) nebo ethylalkoholem (3.4) a kvantitativně převede do původní hydrolyzační nádoby (4.3) pomocí horkého roztoku hydroxidu draselného (3.2) (poznámka 8.5) v množství 200 ml. Potom se přidá odpěňovací činidlo (3.5), nádoba se opatří refluxním zařízením (poznámka 8.2) a opět zahřeje dostatečně rychle k varu. Od okamžiku počátku varu se vaří opět přesně 30 minut, potom se var přeruší přidáním 50 ml studené vody, např. opatrně přes chladič, chladič zařízení se odpojí a obsah hydrolyzační nádoby se filtruje za sníženého tlaku přes filtrační kelímek (4.5) (poznámka 8.6). Nezhydrolyzovaný podíl se promyje nejprve 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.1), potom malým množstvím horkého roztoku kyseliny sírové (3.1) a nakonec horkou vodou do neutrální reakce dalšího podílu filtrátu na kyselinu. Po promytí

nehydrolyzovaného podílu acetonem (3.4) nebo ethylalkoholem (3.4) a následujícím volným vysušením se filtrační kelímek (4.5) vysuší v sušárně (4.1) při teplotě 130 °C po dobu 2 hod. Po ochlazení v exsikátoru se kelímek zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_1). Pak se kelímek vloží do muflové pece (4.2), vyhřáté na teplotu (550 ± 20) °C a spaluje 2 hod (poznámka 8.7), ochladí se v exsikátoru a opět zváží se stejnou přesností (m_2).

5.2 Instrumentální metoda

Do filtračního kelímku (4.5) hydrolyzačního přístroje (4.11.1) se odváží přesně 1,000 g zkušební vzorku (m_0) a je-li třeba odtučnit se na extrakčním přístroji (studené jednotce) (4.11.2) tak, jak uvedeno v 5.1.2. (poznámka 8.3). Je-li třeba odstranění uhličitánů (viz 5.1.3) odstraní se v tomto odstavci popsaným způsobem.

Pokud se odtučňování nebo odstraňování uhličitánů neprovádí nebo po jejich provedení (v tomto případě se zkušební vzorek vysuší) se kelímek (4.5) se zkušebním vzorkem vloží do hydrolyzačního přístroje (4.11.1) a přiklopí se k těsnicímu válci s chladičem. Přidá se 150 ml horkého roztoku kyseliny sírové (3.1) a pár kapek odpěňovacího činidla (3.5), obsah se dostatečně rychle zahřeje k varu a intenzívně se vaří po dobu 30 minut. Potom se otevře odpouštěcí ventil, obsah kapaliny se za použití sníženého tlaku (4.7) přes filtrační kelímek (4.5) odpustí a pevný podíl se promyje asi třikrát 30 ml horké vody, vždy po úplném odpuštění kapaliny z kelímku. Po uzavření a utěsnění se přidá 150 ml horkého roztoku hydroxidu draselného (3.2), dostatečně rychle se obsah zahřeje k varu (je-li třeba přidá se ještě odpěňovací činidlo (3.5)) a vaří se intenzívně po dobu 30 minut. Potom se opět otevře odpouštěcí ventil, kapalina se přes filtrační kelímek (4.5) odpustí a pevný podíl se promývá, jak je uvedeno výše po kyselé hydrolýze. Po vyjmutí kelímku se tento umístí do extrakčního přístroje (studené jednotky) (4.11.2) se promyje třikrát 25 ml acetonu (3.4) tak, že další dávka se vždy přidá až po odečtení předešlé.

Potom se kelímek vyjme, vysuší nejdříve volně a pak v sušárně (4.1) při teplotě 130 °C do konstantní hmotnosti. Po každém vysušení a ochlazení v exsikátoru se vždy rychle zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_1). Pokud se hmotnost filtračního kelímku (4.5) se zbytkem již podstatně nemění kelímek (4.5) se vloží do muflové pece (4.2), vyhřáté na teplotu 475 °C až 500 °C a spaluje po dobu nejméně 30 minut (poznámka 8.7). Potom se filtrační kelímek (4.5) ochladí v exsikátoru a opět odváží se stejnou přesností (m_2).

Vedle toho se provede slepá zkouška se stejným množstvím přidávaných chemikálií jako u zkoušeného vzorku, mimo tento zkoušený vzorek. Případný pozitivní nález (větší než 4 mg) se od výsledku obsahu vlákniny odečte.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vlákniny v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_1 - m_2)}{m_0}$$

kde m_1 je hmotnost filtračního kelímku nebo filtru s vysušeným hydrolyzovatelným zbytkem v g

m_2 hmotnost filtračního kelímku s popelem nehydrolyzovatelného zbytku nebo hmotnost popele nehydrolyzovatelného zbytku ve spalovací misce v g

m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

U výsledku stanovení je nutno uvést, zda byl získán metodou manuální a nebo instrumentální.

7. Opakovatelnost

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

do 100 g/kg	4 g/kg
nad 100 g/kg	4 % rel.

8. Poznámky

8.1 Aceton, n-hexan, diethylether, petrolether a oktylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, je nezbytné při jakékoli manipulaci s nimi dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Jako refluxní zařízení se použije např. i baňka vhodné velikosti s kulatým dnem, naplněná asi 450 ml ledové vody popř. i kouskem ledu, umístěná při vaření na vrcholu nádoby ve které je prováděna hydrolýza.

8.3 Uvedeným způsobem se sice nemusí odstranit veškerý tuk, ale jeho obsah se sníží na takovou hranici, která již při stanovení nevádí.

Je-li obsah tuku ve vzorku příliš vysoký nebo je-li obsažen v krmivech, které přímou extrakcí nelze odtučnit (mléčné krmné směsi, kvasnice apod.), je nutno provést buď předběžnou extrakci resp. odtučnění po kyselé hydrolýze.

8.4 Je možné přidat přímo i horký roztok kyseliny sírové (3.1) avšak v případě, že jsou přítomny ve vzorku uhličitany a nebylo provedeno jejich předběžné odstranění (viz 5.1.3), nastane vzkypění roztoku a možné ztráty vzorku. Nejvhodnějším způsobem je volit kompromis, tj. přidávat poněkud teplejší roztok kyseliny po částech a roztok dostatečně rychle zahřát k varu.

8.5 Uvedený způsob je vhodný pro hydrolyzační přístroje, kde roztok hydroxidu draselného se pouze přidává; pro manuální manipulaci je dost nebezpečný. V tomto případě je výhodnější převedení pevného podílu vzorku z filtru pomocí přesně 100 ml horké vody a po jeho převedení se k obsahu v hydrolyzační nádobce přidá přesně 100 ml horkého roztoku hydroxidu draselného dvojnásobné koncentrace (0,46 mol/l).

8.6 Filtraci je možno provést i přes analytický filtr prostou filtrací; filtr však musí být předem vysušen, ochlazen v exsikátoru a zvážen s přesností nejméně na 0,001 g a jeho hmotnost se musí od hmotnosti vysušeného nezhydrolyzovatelného zbytku (m_1) odečíst. Spalování filtru s nezhydrolyzovaným zbytkem se provede v předem vysušené (1 hod při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené spalovací misky s přesností nejméně na 0,001 g, jejíž hmotnost je nutné rovněž po spalování nezhydrolyzovaného zbytku odečíst.

8.7 Skleněné filtrační kelímky je nutné při spalování nezhydrolyzovaného zbytku vkládat i vyjmát z muflové pece alespoň částečně vychladlé, jinak kelímek praskne. Pro křemenné a porcelánové kelímky toto omezení neplatí.

5.1 Stanovení obsahu škrobu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 123, 29/05/72

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu škrobu v krmivech včetně krmných směsí.

Pro stanovení obsahu škrobu v bramborách, výrobcích z brambor a krmiv s vysokým obsahem laktosy jsou uvedeny příslušné modifikace.

Metody nelze použít pro krmiva s relativně vysokým obsahem polymerů fruktosy, konkrétně pro krmiva, obsahující řepné řízky a bulvy, skrojky, jakož i zdrtky těchto plodin, kvasnice a krmiva bohatá na inulin.

2. Princip

Škrob se stanoví polarimetricky po hydrolýze vzorku kyselinou chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Carresovými činidly, změřením optické otáčivosti a provedením korekce na opticky aktivní látky rozpustné ve směsi ethylalkohol - voda.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková roztok (HCl) = 7 mol/l

3.2 Kyselina chlorovodíková 0,4215 % (c = 0,116 mol/l)

3.3 Kyselina chlorovodíková 1,128 % (c = 0,312 mol/l) (koncentrace musí být stanovena titačně 0,1 mol/l odměrným roztokem hydroxidu sodného na indikátor 0,1 % roztok methylové oranže v 96 % ethylalkoholu - na 10 ml spotřeba 30,94 ml přesně 0,1 mol/l odměrného roztoku hydroxidu sodného)

3.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 5 \text{ mol/l}$

3.5 Carresovo činidlo I

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}]$, přidá 3 ml ledové kyseliny octové ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), asi 50 ml vody, rozpustí, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Carresovo činidlo II

Příprava: 10,6 g trihydrátu hexakynoželeznanu draselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}]$ se odváží do odměrné baňky na 100 ml, po rozpuštění ve vodě se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 Ethylalkohol, roztok 40 % (objemově) a zneutralizovaný na indikátor fenolftalein

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Polarimetr vhodné konstrukce, s trubicí o délce 200 mm

4.2 Lázeň vodní s termostatem

4.3 Baňka varná se zábrusem, na 250 ml

4.4 Baňka odměrná Kohlrauschova, na 100 ml

4.5 Chladič vodní zpětný, se zábrusem

5. Pracovní postup

5.1 Stanovení celkové optické otáčivosti

5.1.1 Do (Kohlrauschovy) odměrné baňky se zábrusem (4.4) objemu 100 ml se odváží přesně 2,500 g zkušebního vzorku, přidá 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) (poznámka 8.1 a 8.2), obsah se promíchá, dalšími 25 ml téže kyseliny (3.3) se opláchnou případně ulpěné zbytky vzorku na stěnách baňky, baňka se promíchá a vloží do vroucí vodní lázně (4.2). Během prvních 3 minut se baňkou ve vroucí vodní lázni krouží (poznámka 8.3), aniž by se z lázně vyjmula a po 15 minutách se baňka z vroucí vodní lázně (4.2) vyjme. Přidá se asi 30 ml vody, obsah baňky se rychle ochladí na laboratorní teplotu.

5.1.2 K obsahu odměrné baňky se přidá 5 ml Carresova činidla I (3.5), obsah baňky se po dobu 1 minut promíchává, dále se přidá 5 ml Carresova činidla II (3.6) a znovu se 1 minutu promíchává. Potom se baňka vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Obsah se filtruje suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Jestliže filtrát není zcela čirý, opakuje se přidání Carresových činidel I (3.5) a II (3.6) v dvojnásobném množství.

Čirý filtrát se převede do polarizační trubice a na polarimetru (4.1) se změří optická otáčivost.

5.2 Stanovení optické otáčivosti frakce rozpustné v 40 % ethylalkoholu (korekce na obsah opticky aktivních látek)

5.2.1 Do (Kohlrauschovy) odměrné baňky se zábrusem (4.4) objemu 100 ml se odváží přesně 5,000 g zkušebního vzorku, přidá se 80 ml roztoku ethylalkoholu (3.7) baňka se uzátkuje a obsah se nechá vyluhovat po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě za občasného intenzivního promíchávání a to vždy po 10 min., aby vzorek byl dostatečně prosycen ethylalkoholem (poznámka 8.4). Po uplynutí této doby se obsah baňky doplní roztokem ethylalkoholu (3.7) po rysku a promíchá co nejdůkladněji. Filtruje se suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.2.2 Do varné baňky (4.3) se odpipetuje 50 ml tohoto filtrátu, přidá se přesně 2,1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) (poznámka 8.2), obsah baňky se promíchá, na baňku se nasadí zpětný chladič (4.5) a baňka se vloží do vroucí lázně (4.2) na 15 minut (poznámka 8.3). Po této době se baňka vyjme, sejme se zpětný chladič, který se vypláchne vodou do baňky, baňka s roztokem se vytemperuje, obsah převede do odměrné baňky na 100 ml a dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2.3 Při zkoušení brambor nebo produktů z brambor se při stanovení korekce na obsah opticky aktivních látek postupuje následovně:

Do odměrné baňky na 250 ml se odváží přesně 12,500 g zkušebního vzorku, obsah baňky se doplní po rysku a promíchá. Baňka se ponechá stát při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. za občasného promíchání. Potom se obsah baňky filtruje suchým skládaným řídkým filtrem do

suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Přesně 50 ml tohoto filtrátu se odpipetuje do varné baňky na 250 ml a dále se postupuje podle 5.2.2 .

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah škrobu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot 10^4 \cdot (P - P_0)}{P_m}$$

kde P je úhel otáčení, zjištěný postupem podle 5.1;

P₀ úhel otáčení, zjištěný postupem podle 5.2

P_m měrná otáčivost čistého škrobu ve [° . dm²/kg]

Pro jednotlivé druhy škrobu platí následující číselné hodnoty P_m :

185,9 pro rýžový;

195,4 pro bramborový;

84,6 pro kukuřičný;

182,7 pro pšeničný;

181,5 pro ječný;

181,3 pro ovesný;

184,0 pro ostatní, výše neuvedené, nebo složená krmiva;

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně uvedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

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

nižším než 400 g/kg

4 g/kg

vyšším než 400 g/kg

1 % relat.

8. Poznámky:

8.1 Jestliže vzorek obsahuje více než 60 g/kg uhličitánů, vyjádřených jako CaCO₃, musí být předem rozrušen přibližně ekvivalentním množstvím (přídavkem) roztoku kyseliny sírové (3.4).

8.2 Pro stanovení optické otáčivosti v bramborách nebo výrobcích z brambor se použije roztok kyseliny chlorovodíkové (3.2), ostatní postup je stejný.

8.3 Množství vody ve vodní lázni musí být dostatečně velké, aby voda zůstala vroucí i při manipulaci (míchání) s baňkou.

8.4 Obsahuje-li vzorek vysoký obsah laktosy, jako např. práškové nebo sbírané mléko, spojí se Kohlrauschova baňka (4.4) po přidání ethylalkoholu (3.7) se zpětným vodním chladičem (4.5) nebo vhodným refluxním zařízením a obsah baňky se nejprve vyluhuje po dobu 30 minut na vodní lázni při teplotě 50 °C a teprve potom se po vytemperování doplní roztokem ethylalkoholu (3.7) po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Dále se postupuje podle 5.2.2 .

5.1 Stanovení obsahu škrobu

Do této metody byla zpracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 123, 29/05/72

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu škrobu v krmivech včetně krmných směsí.

Pro stanovení obsahu škrobu v bramborách, výrobcích z brambor a krmiv s vysokým obsahem laktosy jsou uvedeny příslušné modifikace.

Metody nelze použít pro krmiva s relativně vysokým obsahem polymerů fruktosy, konkrétně pro krmiva, obsahující řepné řízky a bulvy, skrojky, jakož i zdrtky těchto plodin, kvasnice a krmiva bohatá na inulin.

2. Princip

Škrob se stanoví polarimetricky po hydrolýze vzorku kyselinou chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Carresovými činidly, změřením optické otáčivosti a provedením korekce na opticky aktivní látky rozpustné ve směsi ethylalkohol - voda.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková roztok (HCl) = 7 mol/l

3.2 Kyselina chlorovodíková 0,4215 % ($c = 0,116$ mol/l)

3.3 Kyselina chlorovodíková 1,128 % ($c = 0,312$ mol/l) (koncentrace musí být stanovena titačně 0,1 mol/l odměrným roztokem hydroxidu sodného na indikátor 0,1 % roztok methylové oranže v 96 % ethylalkoholu - na 10 ml spotřeba 30,94 ml přesně 0,1 mol/l odměrného roztoku hydroxidu sodného)

3.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 5$ mol/l

3.5 Carresovo činidlo I

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}]$, přidá 3 ml ledové kyseliny octové ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), asi 50 ml vody, rozpustí, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Carresovo činidlo II

Příprava: 10,6 g trihydrátu hexakynoželeznatanu draselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}]$ se odváží do odměrné baňky na 100 ml, po rozpuštění ve vodě se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 Ethylalkohol, roztok 40 % (objemově) a zneutralizovaný na indikátor fenolftalein

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Polarimetr vhodné konstrukce, s trubicí o délce 200 mm

4.2 Lázeň vodní s termostatem

4.3 Baňka varná se zábrusem, na 250 ml

4.4 Baňka odměrná Kohlrauschova, na 100 ml

4.5 Chladič vodní zpětný, se zábrusem

5. Pracovní postup

5.1 Stanovení celkové optické otáčivosti

5.1.1 Do (Kohlrauschovy) odměrné baňky se zábrusem (4.4) objemu 100 ml se odváží přesně 2,500 g zkušebního vzorku, přidá 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) (poznámka 8.1 a 8.2), obsah se promíchá, dalšími 25 ml téže kyseliny (3.3) se opláchnou případně ulpěné zbytky vzorku na stěnách baňky, baňka se promíchá a vloží do vroucí vodní lázně (4.2). Během prvních 3 minut se baňkou ve vroucí vodní lázni krouží (poznámka 8.3), aniž by se z lázně vyjmula a po 15 minutách se baňka z vroucí vodní lázně (4.2) vyjme. Přidá se asi 30 ml vody, obsah baňky se rychle ochladí na laboratorní teplotu.

5.1.2 K obsahu odměrné baňky se přidá 5 ml Carresova činidla I (3.5), obsah baňky se po dobu 1 minut promíchává, dále se přidá 5 ml Carresova činidla II (3.6) a znovu se 1 minutu promíchává. Potom se baňka vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Obsah se filtruje suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Jestliže filtrát není zcela čirý, opakuje se přidání Carresových činidel I (3.5) a II (3.6) v dvojnásobném množství.

Čirý filtrát se převede do polarizační trubice a na polarimetru (4.1) se změří optická otáčivost.

5.2 Stanovení optické otáčivosti frakce rozpustné v 40 % ethylalkoholu (korekce na obsah opticky aktivních látek)

5.2.1 Do (Kohlrauschovy) odměrné baňky se zábrusem (4.4) objemu 100 ml se odváží přesně 5,000 g zkušebního vzorku, přidá se 80 ml roztoku ethylalkoholu (3.7) baňka se uzátkuje a obsah se nechá vyluhovat po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě za občasného intenzivního promíchávání a to vždy po 10 min., aby vzorek byl dostatečně prosycen ethylalkoholem (poznámka 8.4). Po uplynutí této doby se obsah baňky doplní roztokem ethylalkoholu (3.7) po rysku a promíchá co nejdůkladněji. Filtruje se suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.2.2 Do varné baňky (4.3) se odpipetuje 50 ml tohoto filtrátu, přidá se přesně 2,1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) (poznámka 8.2), obsah baňky se promíchá, na baňku se nasadí zpětný chladič (4.5) a baňka se vloží do vroucí lázně (4.2) na 15 minut (poznámka 8.3). Po této době se baňka vyjme, sejme se zpětný chladič, který se vypláchne vodou do baňky, baňka s roztokem se vytemperuje, obsah převede do odměrné baňky na 100 ml a dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2.3 Při zkoušení brambor nebo produktů z brambor se při stanovení korekce na obsah opticky aktivních látek postupuje následovně:

Do odměrné baňky na 250 ml se odváží přesně 12,500 g zkušebního vzorku, obsah baňky se doplní po rysku a promíchá. Baňka se ponechá stát při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. za

občasněho promíchání. Potom se obsah baňky filtruje suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Přesně 50 ml tohoto filtrátu se odpipetuje do varné baňky na 250 ml a dále se postupuje podle 5.2.2 .

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah škrobu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot 10^4 \cdot (P - P_0)}{P_m}$$

kde P je úhel otáčení, zjištěný postupem podle 5.1;

P₀ úhel otáčení, zjištěný postupem podle 5.2

P_m měrná otáčivost čistého škrobu ve [° . dm²/kg]

Pro jednotlivé druhy škrobu platí následující číselné hodnoty P_m :

185,9 pro rýžový;

195,4 pro bramborový;

84,6 pro kukuřičný;

182,7 pro pšeničný;

181,5 pro ječný;

181,3 pro ovesný;

184,0 pro ostatní, výše neuvedené, nebo složená krmiva;

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně uvedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

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

nižším než 400 g/kg

4 g/kg

vyšším než 400 g/kg

1 % relat.

8. Poznámky:

8.1 Jestliže vzorek obsahuje více než 60 g/kg uhličitánů, vyjádřených jako CaCO₃, musí být předem rozrušen přibližně ekvivalentním množstvím (přídatkem) roztoku kyseliny sírové (3.4).

8.2 Pro stanovení optické otáčivosti v bramborách nebo výrobcích z brambor se použije roztok kyseliny chlorovodíkové (3.2), ostatní postup je stejný.

8.3 Množství vody ve vodní lázni musí být dostatečně velké, aby voda zůstala vroucí i při manipulaci (míchání) s baňkou.

8.4 Obsahuje-li vzorek vysoký obsah laktosy, jako např. práškové nebo sbírané mléko, spojí se Kohlrauschova baňka (4.4) po přidání ethylalkoholu (3.7) se zpětným vodním chladičem (4.5) nebo vhodným refluxním zařízením a obsah baňky se nejprve vyluhuje po dobu 30 minut na vodní lázni při teplotě 50 °C a teprve potom se po vytemperování doplní roztokem ethylalkoholu (3.7) po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Dále se postupuje podle 5.2.2 .

5.3 Stanovení obsahu cukrů

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení cukrů v krmivech a je použitelná pro všechna krmiva, včetně krmných směsí a pro všechny obsahy cukrů.

2. Princip

Cukry se stanoví titračně jodometricky postupem podle Luff-Schoorla po jejich extrakci 40 % ethylalkoholem, vyčerení Carresovými činidly a po odpaření ethylalkoholu. Přímou redukující cukry se stanoví přímo, směs přímo redukujících a neredukujících po hydrolýze a obsah neredukujících cukrů se určí z jejich rozdílu, výpočtem.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 40 % (objemově), zneutralizovaný na indikátor fenolftalein

3.2 Ethylalkohol 80 % (objemově), zneutralizovaný na indikátor fenolftalein

3.3 Carresovo činidlo I

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, přidá 3 ml ledové kyseliny octové, asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.4 Carresovo činidlo II.

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexakyanoželeznatanu draselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}]$, přidá se asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.5 Indikátor methylová oranž, roztok 1 g/l

3.6 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 4 \text{ mol/l}$

3.7 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.8 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 \text{ mol/l}$

3.9 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.10 Luff-Schoorlovo činidlo

Příprava: 25,0 g pentahydrátu síranu měďnatého $(\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O})$ se rozpustí ve 100 ml vody a promíchá (roztok a).

50,0 g monohydrátu kyseliny citrónové $(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O})$ se rozpustí v 50 ml vody a promíchá (roztok b).

143,8 g bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) se rozpustí ve 300 ml horké vody, ochladí a promíchá (roztok c).

Do roztoku c) se za neustálého míchání přidá roztok b) potom roztok a). Vzniklá směs se vytemperuje, doplní vodou na objem 1 000 ml a je-li třeba filtruje suchým řídkým filtrem do suché nádoby.

Koncentrace mědi v tomto roztoku je přibližně 0,1 mol/l, uhličitanu sodného cca 2 mol/l a pH roztoku by mělo být přibližně 9,4.

3.11 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.12 Škrob, roztok 5 g/l

Příprava: Směs 5 g rozpustného škrobu v 30 ml vody se přidá do 970 ml horké vody, zahřeje k varu a vaří se 3 minuty. Po ochlazení se přidá asi 10 mg jodidu rtuťnatého (Hg I_2), jako stabilizátoru.

3.13 Jodid draselný, roztok 300 g/l (vždy čerstvý)

3.14 Isopentylalkohol (3-methylbutan-1-ol)

3.15 Pemza granulovaná (vyvařená v kyselině chlorovodíkové, promytá vodou a vysušená)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Třepačka (rotační) s 35 až 40 ot/min

4.2 Lázeň vodní s termostatem

4.3 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.4 Baňka varná se zábrusem a kulatým dnem na 250 ml

5. Postup

Do odměrné baňky na 250 ml se odváží asi 2,5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 200 ml ethylalkoholu (3.1), baňka se uzavře zátkou a extrahuje na třepačce (4.1) při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. Potom se k obsahu v baňce přidá 5 ml Carresova činidla I (3.3), promíchá se asi 1 min, dále se přidá 5 ml Carresova činidla II. (3.4) a opět promíchá 1 min. Po vytemperování se doplní ethylalkoholem (3.1) po rysku, promíchá a filtruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do kádinky na 600 ml se odpipetuje 200 ml, kádinka se umístí na vroucí vodní lázeň (4.2) a obsah se odpaří asi na poloviční objem za účelem odstranění většiny ethylalkoholu. Obsah kádinky se pak převede horkou vodou do odměrné baňky na 200 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Je-li třeba, přefiltruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok).

Tento roztok se použije jak pro stanovení přímo redukujících cukrů, tak i cukrů po hydrolýze.

5.1 Stanovení přímo redukujících cukrů

Ze zásobního roztoku vzorku se odpipetuje do varné baňky (4.4) 25 ml (poznámka 8.1), dále se připipetuje přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.10), přidá se pár granulí pemzy (3.15), varná baňka (4.4) se spojí se zpětným chladičem (4.3), obsah se během 2 minut uvede do

mírného varu a vaří se po dobu 10 minut. Potom se var přeruší, zpětný chladič (4.3) se sejme z baňky (4.4) a opláchne do baňky. Obsah baňky se rychle ochladí tekoucí studenou obyčejnou vodou, přidá se 10 ml roztoku jodidu draselného (3.13) a okamžitě nato po kapkách (poznámka 8.2) 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.8) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.11) až do právě vzniklého matně žlutého zabarvení roztoku. Potom se přidají asi 3 ml škrobového roztoku (3.12), čímž se roztok zbarví modře a dotitruje se do vymizení tohoto zabarvení, které se již neobjeví po dobu 1 minuty.

Se stanovením ve vzorku se provede současně slepá zkouška: Do titrační baňky na 250 ml se odpipetuje přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.10) a 25 ml vody, přidá se 10 ml roztoku jodidu draselného (3.13), 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.8) a titruje se jak uvedeno výše. Slepá zkouška se provede dvojmo a vypočte se aritmetický průměr.

5.2 Stanovení redukujících cukrů po hydrolýze

Ze zásobního roztoku, připraveného podle odstavce 5, se do odměrné baňky na 100 ml odpipetuje 50 ml tohoto roztoku, přidá se pár kapek indikátoru methylové oranže (3.5), potom opatrně po částech a za neustálého míchání, jako při titraci, roztok kyseliny chlorovodíkové (3.6) do právě vzniklého trvale červeného zabarvení.

Pak se k obsahu baňky přidá 15 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.7), baňka se vloží do vroucí vodní lázně (4.2) a ponechá tam přesně 30 minut. Potom se rychle ochladí pod proudem tekoucí studené vody na 20 °C, přidá se 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.9), doplní vodou po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 25 ml do varné baňky (4.4) na 250 ml a dále se postupuje podle 5.1 .

U krmiv bohatých na melasu nebo takových, která nejsou zcela homogenní se odvažuje vzorek o hmotnosti 20 g s přesností nejméně na 0,001 g do odměrné baňky na 1 000 ml, přidá se asi 500 ml vody a nechá promíchávat na třepačce po dobu 1 hod. Carresova činidla se přidávají, jak je uvedeno v odstavci 5, ale ve čtyřnásobném množství (po 20 ml), baňka se doplní po rysku ethylalkoholem (3.2) a promíchá.

Dále se postupuje podle odstavce 5, počínaje odpipetováním části a odpařením ethylalkoholu.

U melasy přímo a krmiv bohatých na cukry, ale většinou bez obsahu škrobu (např. sušené nevyslazené řepné řízky a pod.) se odvažuje asi 5 g vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do 250 ml odměrné baňky, přidá se 200 ml vody a promíchává se na třepačce (4.1) po dobu 1 hod, je-li třeba, i déle. Přidají se Carresova činidla, jak uvedeno v odstavci 5, doplní se po rysku vodou a promíchá.

Dále se postupuje podle odstavce 5 , počínaje odpipetováním části a odpařením (je-li třeba s ohledem na objem, ethylalkohol tam není).

Při stanovení včetně neredukujících cukrů se postupuje podle odstavce 5.2 .

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah přímo redukujících cukrů (X) nebo redukujících cukrů po hydrolýze (Y) v g/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X(Y) = \frac{m_1}{m_2}$$

Obsah neredukujících cukrů, vyjádřený jako obsah sacharosy v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = (Y - X) \cdot 0,95 \text{ (poznámka 8.3)}$$

kde m_1 je množství příslušného přímo redukujícího (redukujícího cukru po hydrolyze) v mg, zjištěného z tabulky 1 na základě rozdílu spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného v ml při titraci zkoušeného vzorku a slepé zkoušky;
 m_2 hmotnost alikvotního podílu navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Obsah redukujících cukrů v alikvotním podílu nesmí být vyšší než 60 mg. Roztok musí zůstat po 10 minutách varu s Luff-Schoorlovým činidlem jasně modrý. V opačném případě je nutno odpipetovat menší alikvotní podíl zásobního roztoku, který se upraví na objem 25 ml vodou nebo se přizpůsobí navážka zkušební vzorku.

8.2 Při prvních přídavcích kyseliny roztok silně pění. Doporučuje se přidat 1 ml isopentylalkoholu (3.14), již před vařením s Luff-Schoorlovým činidlem. Kyselinu je nutno přidávat po kapkách do té doby, dokud roztok nenabude světle hnědé barvy, pak je možné přidat zbývající objem.

8.3 Za předpokladu vyjádření X a Y jako glukosa (fruktosa).

Tabulka 1 Množství jednotlivých cukrů odpovídajících spotřebě odměrného roztoku

Platí pro přídavky 25 ml Luff-Schoorlova činidla, odměrný roztok thiosíranu sodného přesně 0,1 mol/l, dvouminutové zahřívání a 10 minutové vaření)

Objem odměr.roztoku spotřeba (ml)	Glukosa Fruktosa Invert (mg)		Laktosa (mg)		Maltosa (mg)	
1	2,4	diference	3,6	diference	3,9	diference
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	3,9
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	4,0
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	3,9
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2
19	50,0	2,9	71,7	4,0	76,5	4,3
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6

5.4 Stanovení obsahu laktosy

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení laktosy v krmivech. Metoda je použitelná pro krmiva, obsahující více než 5 g laktosy v 1 kg.

2. Princip

Laktosa spolu s ostatními cukry se vyextrahuje ze vzorku vodou, extrakt se vystaví fermentačnímu účinku kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které ponechají laktosu v nezměněném stavu. Po vyčechení Carresovými činidly se laktosa stanoví titračně jodometricky podle Luff-Schoorla.

3. Chemikálie

3.1 Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, suspense

Příprava: 25 g čerstvého droždí se dokonale rozmíchá ve 100 ml vody. Připravenou suspensi je možné uchovávat nejvýše po dobu 1 týdne v chladničce.

3.2 Luff-Schoorlovo činidlo

Příprava: 25,0 g pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) se rozpustí ve 100 ml vody a promíchá (roztok a)

50,0 g monohydrátu kyseliny citrónové ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) se rozpustí v 50 ml vody a promíchá (roztok b)

143,8 g bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) se rozpustí v asi 300 ml horké vody, ochladí a promíchá (roztok c)

Do roztoku c) se za neustálého míchání přidá roztok b) a potom roztok a). Vzniklá směs se vytemperuje, doplní vodou na objem 1 000 ml, promíchá a filtruje řídkým filtrem do suché kádinky.

Koncentrace mědi je přibližně 0,1 mol/l, uhličitanu sodného asi 2 mol/l a pH roztoku by mělo být přibližně 9,4.

3.3 Carresovo činidlo I

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$], přidá 3 ml ledové kyseliny octové ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.4 Carresovo činidlo II

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexanokyanoželeznatanu draselného $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O]$, přidá se asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.5 Pemza granulovaná (vyvařená v HCl, promytá vodou a vysušená)

3.6 Jodid draselný nebo jodid sodný, roztok 300 g/l

3.7 Kyselina sírová, roztok $c(H_2SO_4) = 3 \text{ mol/l}$

3.8 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(Na_2S_2O_3) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.9 Škrob, roztok 5 g/l

Příprava: Ke směsi 5 g škrobu rozpustného ve vodě se 30 ml vody se přidá do 970 ml horké vody, zahřeje k varu a vaří 3 min. Po ochlazení se přidá asi 10 mg jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň vodní s termostatem

4.2 Termostat s regulací teploty pro 38 °C až 40 °C

5. Postup

Do odměrné baňky na 100 ml se odváží asi 1 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 25 ml až 30 ml vody, baňka se vloží na 30 minut do vroucí vodní lázně (4.1). Potom se ochladí na teplotu přibližně 35 °C, přidá 5 ml suspence kvasinek (3.1) (poznámka 8.1), obsah baňky se promíchá a vloží do termostatu (4.2) o teplotě 38 °C až 40 °C na 2 hod. Pak se ochladí na teplotu 20 °C, přidá 2,5 ml Carresova činidla I (3.3), asi 30 sekund se promíchává, dále se přidá 2,5 ml Carresova činidla II (3.4), opět se promíchává 30 sekund, obsah baňky se doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Do varné baňky s kulatým dnem a zábrusem obsahu 250 ml, se odpipetuje přesně 25 ml filtrátu (poznámka 8.2), přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.2), přidá se pár zrněk pemzy (3.5), varná baňka se spojí se zpětným chladičem, obsah se uvede za 2 minuty do mírného varu a za občasného promíchá se při tomto mírném varu zahřívá 10 minut. Po přerušení varu se zpětný chladič sejme, opláchne do baňky a obsah baňky se okamžitě a rychle ochladí pod tekoucí studenou vodou. Titruje se nejdéle po 5 minutách. Těsně před titrací se přidá 10 ml roztoku jodidu draselného (sodného) (3.6) a okamžitě nato po kapkách (poznámka 8.3) 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.7) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.8) do právě vzniklého matně žlutého zabarvení, přidá se 3 ml roztoku škrobu (3.9), čímž se roztok zbarví modře, a dotitruje se do právě vymizení modrého zabarvení roztoku, které se již znovu neobjeví po dobu 1 minuty.

Současně se provede slepý pokus. Do titrační baňky na 250 ml se odpipetuje postupně přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.2), 5 ml suspence kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (3.1), 25 ml vody, 10 ml roztoku jodidu draselného (sodného) (3.6) a 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.7) (bez zahřívání a vaření). Titruje se, jak uvedeno výše. Slepý pokus se provede nejméně dvojmo a k výpočtu se bere průměr těchto spotřeb.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah laktosy v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_2}{m_1}$$

kde m_1 je hmotnost alikvotního podílu navážky zkušební vzorku v g

m_2 množství laktosy odpovídající rozdílu spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného na vzorek a slepý pokus v mg (viz tabulka 1);

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Obsahuje-li vzorek více než 400 g/kg zkvasitelných cukrů, v 1 kg krmiva, přidá se 10 ml kvasničné suspense (3.1) (i v případě slepého pokusu)

8.2 Odpipetovaný podíl by měl být max. 25 ml a obsahovat max. 80 mg laktosy, nejlépe v rozmezí 40 až 80 mg. Je-li toto množství menší, je třeba upravit navážku zkušební vzorku, při menším odpipetovaném podílu se objem doplní na 25 ml vodou.

8.3 Při prvních přidávcích kyseliny roztok silně pění. K jeho vyloučení nebo omezení je proto možné již před zahříváním s Luff-Schoorlovým činidlem přidat k roztoku 1 ml izopentanolu. Kyselinu je nutno přidávat po kapkách do té doby, dokud roztok nenabude světle hnědé barvy, pak teprve je možné přidat zbývající podíl kyseliny.

Tabulka 1 **Množství laktosy odpovídající spotřebě odměrného roztoku**

Platí pro přidavek 25 ml Luff-Schoorlova činidla, odměrný roztok thiosíranu sodného přesně 0,1 mol/l, dvouminutové zahřívání a 10 min. vaření.

Objem odměrného roztoku (spotřeba)	Odpovídající množství laktosy v mg	Diference
1	3,6	
2	7,3	3,7
3	11,0	3,7
4	14,7	3,7
5	18,4	3,7
6	22,1	3,7
7	25,8	3,7
8	29,5	3,7
9	33,2	3,7
10	37,0	3,8
11	40,8	3,8
12	44,6	3,8
13	48,4	3,8
14	52,2	3,8
15	56,0	3,8
16	59,9	3,9
17	63,8	3,9
18	67,7	3,9
19	71,7	4,0
20	75,7	4,0
21	79,8	4,1
22	83,9	4,1
23	88,0	4,1

5.6 Stanovení obsahu cukrů polarimetricky

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu cukrů polarimetricky v krmném cukru, melase a mléce.

2. Princip

Pro stanovení cukrů se využívá jejich schopnosti otáčet rovinu polarizovaného světla úměrně druhu a obsahu cukru v roztoku.

3. Chemikálie

3.1 Suché čiridlo na vyslazené řízky

Příprava: Promíchá se jeden díl jemně třeného vápna s 25 díly rozetřeného neutrálního octanu olovnatého

3.2 Herlesovo činidlo I

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 340 g dusičnanu olovnatého $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, rozpustí ve vodě, doplní po rysku a promíchá

3.3 Herlesovo činidlo II

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 32 g hydroxidu draselného (KOH), rozpustí, doplní po rysku a promíchá.

3.4 Zásaditý octan olovnatý, pevný

3.5 Křemelina

3.7 Kyselina octová, ledová

3.8 Fenolftalein, roztok indikátoru

3.9 Zásaditý octan olovnatý, základní roztok

Příprava: Naváží se 600 g octanu olovnatého (3.4) a 200 g oxidu olovnatého, rozetře se ve 100 ml vody, zakryje hodinovým sklem a na vodní lázni se za občasného zamíchání zahřívá tak dlouho, až zmizí barva oxidu. Přidá se asi 1 900 ml horké vody tak, aby hustota roztoku byla 1,235 - 1,240 g.cm^{-3} . Roztok se promíchá a nechá ustát.

3.10 Zásaditý octan olovnatý, zředěný roztok

Příprava: Na 10 l vody se přidá 150 ml základního roztoku (3.9)

3.11 Kyselina chlorovodíková, roztok

Příprava: 170 ml 37% kyseliny chlorovodíkové se zředí vodou na 1 l.

3.12 Hexakynoželeznatan draselný trihydrát, roztok

Příprava: Naváží se 15 g hexakynoželeznatanu draselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}]$, rozpustí se ve vodě, doplní v odměrné baňce na 100 ml po rysku a promíchá.

3.13 Síran zinečnatý heptahydrát, roztok

Příprava: Naváží se 30 g síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), rozpustí se ve vodě, doplní v odměrné baňce na 100 ml po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Cukrovarnický polarimetr vhodné konstrukce, s trubicí o délce 200 mm

4.2 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Rafinovaný cukr

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 2n množství zkušební vzorku (poznámka 8.1) s přesností nejméně 0,002 g, rozpustí se ve vodě a doplní po rysku. Není-li roztok zcela čistý, filtruje se papírovým filtrem. První podíl filtrátu se odlije a další se polarizuje při 20 °C v polarizační trubicí délky 200 mm. Hodnota odečtená na polarimetru udává přímo obsah sacharosy v %.

5.2 Surový a afinovaný cukr

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 2n množství zkušební vzorku (poznámka 8.1) s přesností nejméně 0,002 g, rozpustí se ve vodě, doplní po rysku a promíchá. K roztoku se přidá 0,1 - 0,7 g zásaditého octanu olovnatého (3.4) a 0,5 g křemeliny (3.5). Po promíchání se filtruje zakrytým filtrem. První podíl filtrátu se odlije a další se polarizuje při 20 °C v polarizační trubicí délky 200 mm. Hodnota odečtená na polarimetru (4.1) udává přímo obsah sacharosy v %.

5.3 Melasa - přímá polarizace

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 4n množství melasy 1:1 (poznámka 8.1) s přesností nejméně 0,002 g, zneutralizuje se kyselinou octovou (3.7) na fenolftalein (3.8) a případná pěna se odstraní diethyletherem. Potom se k roztoku přidá 40 ml Herlesova roztoku I (3.2), promíchá se mírným kroužením, přidá se dalších 40 ml Herlesova roztoku II (3.3) a znovu se promíchá. Vyčerený roztok se doplní vodou téměř po rysku a ponechá se nejméně 30 minut stát. Potom se doplní po rysku, promíchá a filtruje. První podíl filtrátu se odlije a další se polarizuje při 20 °C v polarizační trubicí délky 200 mm. Hodnota odečtená na polarimetru (4.1) udává přímo obsah sacharosy v % (poznámka 8.2).

5.3.1 Melasa - polarizace po inverzi (hydrolyze)

Z filtrátu, získaného při stanovení přímé polarizace se odpipetuje 50 ml do 100 ml baňky, doplní vodou po rysku a polarizuje. Výsledek se vynásobí dvěma.

Do další 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml filtrátu, připraveného podle 5.3, přidá se 30 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.11) a vloží se do vodní lázně 70 °C teplé. Teplota uvnitř baňky (kontrola teploměrem) se udržuje přesně 5 minut na hodnotě 67 - 69 °C. Potom se baňka rychle ochladí na 20 °C, teploměr se vyjme a opláchne vodou do baňky a obsah se doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Je-li roztok příliš tmavý, odbarví se před doplněním po rysku přídatkem 0,2 g aktivního uhlí. Polarizuje se až po 20 minutách od doplnění roztoku (poznámka 8.3).

5.4 Cukrovarské řízky čerstvé

Asi 0,5 kg cukrovarnických řízků se protlačí lisem (poznámka 8.5). Prvních 50 ml šťávy se odlije a dalších 100 ml se čeří v misce asi 0,7 g zásaditého octanu olovnatého (3.4) případně suchým práškovým čiřidlem (3.1). Po promíchání se zfiltruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se polarizuje v polarizační trubici 400 mm dlouhé.

5.5 Mléko

Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 50 g zkušebního vzorku mléka s přesností nejméně 0,005 g, přidá se 5 ml roztoku hexakvanoželeznatan draselného (3.12), promíchá, přidá 5 ml roztoku síranu zinečnatého a opět důkladně promíchá. Baňka se doplní vodou po rysku a po promíchání filtruje suchým skládaným filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se polarizuje po vytemperování na 20 °C v polarizační trubici délky 200 mm při 20 °C.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Stanovení cukru v rafinovaném cukru

Obsah sacharosy v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 10.S$$

kde S je přímý polarimetrický nález podle odstavce 5.1

6.2 Stanovení cukru v surovém a afinovaném cukru

Obsah sacharosy v g/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = 10.S$$

kde S je přímý polarimetrický nález podle odstavce 5.2

6.3 Stanovení cukru v melase přímo

Obsah sacharosy v g/kg (Z_1) se vypočítá podle vzorce:

$$Z_1 = 10.S$$

kde S je přímý polarimetrický nález podle odstavce 5.3

6.3.1 Stanovení cukru v melase po inverzi

Obsah sacharosy v g/kg (Z_2) se vypočítá podle vzorce:

$$Z_2 = \frac{100.(P - I)}{143,5 - 0,5.t} . 10$$

kde P je zdvojnásobený přímý polarimetrický nález (podle odstavce 5.3.1)

I zdvojnásobený polarimetrický nález po inverzi (podle odstavce 5.3.1) (poznámka 8.4)

t teplota zinvertovaného roztoku při polarizaci ve °C

6.4 Stanovení cukru v čerstvých cukrovarnických řízcích

Obsah sacharosy v g/kg (Q) se vypočítá podle vzorce:

$$Q = 0,13.10.S$$

kde S je přímý polarimetrický nález podle odstavce 5.4

6.5 Stanovení cukru v mléce

Obsah laktosy v g/kg (W_1) nebo bezvodé laktosy (W_2) se vypočítá podle vzorce:

$$W_1 = \frac{100.K_1.p.F}{m}$$

nebo

$$W_2 = \frac{100.K_2.p.F}{m}$$

kde K_1 je přepočtový koeficient: 0,9518 pro polarimetrický nález ve stupních kruhových

0,32299 pro polarimetrický nález ve stupních Ventzkeho

0,3295 pro polarimetrický nález v mezinárod. stupních

K_2 přepočtový koeficient: 0,9042 pro polarimetrický nález ve stupních kruhových

0,3134 pro polarimetrický nález ve stupních Ventzkeho

0,3130 pro polarimetrický nález v mezinárod. stupních

p hodnota odečtená na polarimetru

m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

F faktor pro objemovou korekci na sraženinu (poznámka 8.6)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně uvedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku pro všechny obsahy nesmí překročit 1 g/kg.

8. Poznámky:

8.1 Normálním množstvím (1n) při navažování cukrovarnických produktů pro zkoušky se rozumí 26,026 g produktu, pokud se pracuje s polarimetrem se stupnicí Ventzkeho nebo 26,000 g, pokud se pracuje s polarimetrem se mezinárodní stupnicí sacharimetrickou.

8.2 Na výskyt a množství rafinosy v melase je možno usuzovat dle výsledků mezi přímou polarizací a stanovením dle Clergeta.

8.3 Používá se trubice opatřená teploměrem, aby bylo možno odečíst teplotu.

8.4 Protože hodnota I je vždy záporná, přičítá se absolutní hodnota I k P

8.5 Při sušině řízku nad 10% je třeba cukr stanovit buď horkou nebo studenou digescí.

Horká digesce: Do baňky se odváží 4n množství rozsekaných a promíchaných řízku s přesností nejméně 1 g, přidá se přesně 300 ml zásaditého octanu olovnatého (3.10). Baňka se uzavře a digeruje 30 minut ve vodní lázni při 80 - 85 °C pod zpětným chladičem. Poté se baňka ochladí, obsah se protřepe a filtruje suchým skládaným filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.. Filtrát se polarizuje v trubici 400 mm dlouhé. Polarimetrický nález vydělený dvěma udává přímo množství cukru ve vyslazených řízciích v %.

Studená digesce: Odvážené, s přesností nejméně 1 g, 4n množství rozsekaných a promíchaných řízku se vloží do nádoby mixéru, přidá se přesně 300 ml zásaditého octanu olovnatého (3.10) a mixuje se 3 minuty. Poté se obsah zfiltruje suchým skládaným filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se polarizuje v trubici 400 mm dlouhé. Polarimetrický nález vydělený dvěma udává přímo množství cukru ve vyslazených řízciích v %.

8.6 Vzorce jsou stanoveny podle specifické otáčivosti monohydrátu laktosy 52,53 kruhových stupňů při 20°C.

Při stanovení laktosy v mléce jiného složení (ovčí, buvolí apod.) nebo v mléčných výrobcích se zjistí objem sraženiny a faktor F se vypočte podle vzorce:

$$F = \frac{V - v}{V}$$

kde V je objem, na který bylo navážené množství zředěno

v se vypočte podle vzorce:

$$v = \frac{\text{navá zka} \cdot (1,08.\% \text{tuku} + 1,55.\% \text{bílkovin})}{100}$$

5.5 Stanovení obsahu bezdusíkatých látek výtažkových

1. Účel a rozsah

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

2. Princip

Obsah bezdusíkatých látek výtažkových se stanoví nepřímým výpočtem, pomocí zjištěných obsahů základních složek krmiv stanovených objektivními zkušebními metodami podle Přílohy 9 jako zbytek do 1 000 g/kg.

Obsahuje-li zkoušené krmivo nezanedbatelný obsah močoviny nebo amoniakálního dusíku je výpočet obsahu bezdusíkatých látek výtažkových zvlášť modifikovaný.

3. Postup

Ve vzorku krmiva se stanoví obsahy vlhkosti, dusíkatých látek, tuku, popele a vlákniny (popřípadě i močoviny a amoniakálního dusíku, jsou-li přítomny) podle dílčích metod uvedených v Příloze 9.

4. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah bezdusíkatých látek výtažkových v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

4.1 U krmiv bez obsahu močoviny a amoniakálního dusíku (poznámka 6.1)

$$X = 1000 - (A + B + C + D + E)$$

4.2 U krmiv s nezanedbatelným obsahem močoviny a amoniakálního dusíku (poznámka 6.1)

$$X = 1000 - (A + B_1 + C + D + E + F + G)$$

kde A je obsah vlhkosti v g/kg;

B obsah dusíkatých látek v g/kg;

B_1 obsah dusíkatých látek nativního původu v g/kg (viz 4.3);

C obsah tuku v g/kg;

D obsah popele v g/kg;

E obsah vlákniny v g/kg;

F obsah močoviny v g/kg;

G obsah amoniakálního dusíku, vyjádřeného jako NH_3 v g/kg (poznámka 6.2);

4.3 Výpočet obsahu dusíkatých látek nativního původu

Obsah dusíkatých látek nativního (přírozeného) původu v g/kg (B_1) se vypočítá podle vzorce:

$$B_1 = B - 2,9125.F - 5,1406.G$$

5. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

6. Poznámky

6.1 Nezanedbatelný obsah močoviny se rozumí nad 5 g/kg; obdobně i amoniakálního dusíku jako NH_3 .

6.2 Vyjádření amoniakálního dusíku jako NH_3 není zcela správné, protože dusík jako NH_3 se jako stálá složka v tomto obsahu nevyskytuje; toto vyjádření je aproximací. Se stoupajícím obsahem amoniakálního dusíku roste i chyba stanovení bezdusíkatých látek výťažkových, proto při známém složení sloučeniny, v níž je amoniakální dusík přítomen je správnější jej vyjadřovat v této formě (NH_4^+ apod.).

5.7 Stanovení redukujících látek v cukru a melase

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení redukujících látek v cukru a melase a je použitelná pro surový cukr, rafinovaný cukr a řepnou melasu.

2. Princip

Cukerný roztok se povaří s Ofnerovým roztokem a vyloučený oxid měďný se stanoví jodometrickou titrací.

3. Chemikálie

3.1 Octan olovnatý zásaditý

3.2 Ofnerovo činidlo Příprava: Naváží se 5,0 g pentahydrátu síranu měďnatého, 10 g uhličitanu sodného, 300 g vinanu sodnodraselného a 50 g hydrogenfosforečnanu sodného do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí se ve vodě a potom se vloží na 2 hodiny do vroucí vodní lázně. Po uplynutí této doby se roztok ochladí, doplní vodou po rysku a promíchá. Přidá se trochu aktivního uhlí, promíchá a filtruje (4.5) přes filtrační kelímek (4.6).

Roztok se uchovává ve tmavé láhvi se skleněnou nebo gumovou zátkou ve tmě (poznámka 8.1).

3.3 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01615 \text{ mol/l}$

Příprava: Naváží se 4,0 g pentahydrátu thiosíranu sodného, rozpustí ve vodě, doplní na 500 ml a promíchá.

Přesná koncentrace odměrného roztoku se stanoví na dvojchroman draselný.

3.4 Jód, odměrný roztok $c(\text{I}) = 0,01615 \text{ mol/l}$

Příprava: Naváží se 2,05 g jódu a 10 g jodidu draselného, rozpustí ve vodě a doplní na 500 ml a promíchá.

1 ml tohoto roztoku odpovídá teoreticky 1 mg invertního cukru. Přesná koncentrace odměrného roztoku se kontroluje odměrným roztokem thiosíranu o známé koncentraci.

Roztok se uchovává ve tmavé láhvi se skleněnou zátkou.

3.5 Škrob, roztok 5 g/l

Příprava: Směs 5 g rozpustného škrobu v 30 ml vody se přidá do 970 ml horké vody, zahřeje k varu a vaří se 3 minuty. Po ochlazení se přidá asi 10 mg jodidu rtuťnatého (HgI_2), jako stabilizátoru.

3.6 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = \text{asi } 1 \text{ mol/l}$

3.7 Hydrogenfosforečnan sodný, roztok

Příprava: Naváží se 100 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného, rozpustí, doplní na 1 000 ml a promíchá.

3.8 Aktivní uhlí

3.9 Octan olovnatý neutrální, roztok

Příprava: Naváží se 350 g octanu olovnatého, rozpustí ve vodě, doplní na 1 000 ml a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.2 Lázeň vodní

4.3 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.4 Baňka varná se zábrusem a kulatým dnem na 250 ml

4.5 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.6 Filtrační kelímek skleněný s fritou S₂

5. Postup

5.1 Surový a afinovaný cukr

Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 50 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,1 g, rozpustí ve vodě, vyčeří se přidáním asi 0,7 - 1,4 g zásaditého octanu olovnatého (3.1), doplní po rysku a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Z filtrátu se odměří 160 ml do odměrné baňky na 200 ml, přidá se 15 - 20 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (3.7) a 1 g aktivního uhlí (3.8), důkladně promíchá, doplní se vodou po rysku, opět promíchá a po 15 minutách stání se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Z filtrátu se odpipetuje 50 ml do 300 ml kuželové baňky, přidá se 50 ml Ofnerova činidla (3.2) a varné kamínky a zahřívá se tak, aby kapalina začala vřít za 4 - 5 minut. Roztok se udržuje v mírném varu přesně 5 minut. Po této době se var přeruší, obsah baňky se rychle ochladí tekoucí studenou obyčejnou vodou. Po několika minutách se do ochlazené tekutiny přidá 15 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.6) a ihned potom se přidá přebytek (5 - 20 ml) roztoku jódu (3.4) a baňka se uzavře zátkou. Obsah baňky se občas zamíchá, po dvou minutách se přidá 5 ml škrobového roztoku (3.5) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.3) do právě vzniklého odbarvení roztoku (poznámka 8.2).

5.2 Řepná melasa

Naváží se 2n množství roztoku melasy 1:1 (poznámka 8.3) s přesností 0,1 g do 200 ml odměrné cukrovarnické baňky, vyčeří se 10 ml neutrálního octanu olovnatého (3.9), doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje 153,7 ml filtrátu, přidá se 20 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (3.7), doplní vodou po rysku, promíchá a přelije do kuželové baňky na 300 - 400 ml. Přidají se asi 4 g aktivního uhlí a několik minut se důkladně protřepává. Suspenze se nechá nejméně 15 minut stát, načež se zfiltruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Z filtrátu se odpipetuje 50 ml do 300 ml kuželové baňky, přidá se 50 ml Ofnerova činidla (3.2) a varné kamínky a zahřívá se tak, aby kapalina začala vřít za 4 - 5 minut. Roztok udržuje v mírném

varu přesně 7 minut, potom se var přeruší, obsah baňky se rychle ochladí tekoucí studenou obyčejnou vodou. Po několika minutách se k ochlazenému roztoku přidá 15 ml kyseliny roztoku chlorovodíkové (3.6) a ihned potom přebytek (5 - 20 ml) roztoku jódu (3.4) a baňka se uzavře zátkou. Obsahem baňky se občas zamíchá, po dvou minutách se přidá 5 ml škrobového roztoku (3.5) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.3) do právě vzniklého odbarvení roztoku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Surový a afinovaný cukr

Obsah redukujících látek v surovém a afinovaném cukru (X) v g/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{V_1 - V_2 - 0,02 \cdot V_3}{2 \cdot V_3}$$

kde V_1 je přidané množství odměrného roztoku jódu (3.4) v ml

V_2 přidané množství odměrného roztoku thiosíranu sodného (3.3) v ml

V_3 objem filtrátu, použitého k redukci Ofnerova činidla v ml

6.2 Řepná melasa

Obsah redukujících látek v melase (Y) v g/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{V_1 - V_2 - 0,03 \cdot V_3}{V_3}$$

kde V_1 je přidané množství odměrného roztoku jódu (3.4) v ml

V_2 přidané množství odměrného roztoku thiosíranu sodného (3.3) v ml

V_3 objem filtrátu, použitého k redukci Ofnerova činidla v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Po delším stání se vylučuje z roztoku oxid měďný a je proto nutno pipetovat roztok vždy opatrně svrchu.

8.2 Při vyšším obsahu redukujících látek, než odpovídá 15 ml odměrného roztoku jódu je třeba stanovení opakovat s přiměřeně nižším množstvím pipetovaného filtrátu. Rozdíl do 50 ml se doplní vodou.

8.3 Roztok melasy 1:1 se připraví naředěním melasy 1:1 vodou.

Pokud melasa neobsahuje krystaly cukru, naváží se do baňky 200 g důkladně promíchaného vzorku s přesností 0,1 g, přidá se 200 ml vody a vše se dováží na 400 g. Baňka se vloží do horké vodní lázně a v 5ti minutových intervalech se obsah baňky promíchává. Rozpouštění je dokončeno nejdéle po 25 minutách. Získaný roztok se po ochlazení používá ke zkouškám.

Pokud jsou ve vzorku melasy krystalky přítomny, je nutno zvážít celý vzorek a přidat k němu váhově stejné množství vody. Zahřívání a promíchávání probíhá stejně jako u melasy bez cukru.

K přípravě 1n roztoku melasy se naváží 26,026 g melasy 1:1.

6.1 Stanovení obsahu popela

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení popele v krmivech. Metoda je použitelná pro všechna krmiva obsahující výhradně či převážně organickou složku a pro všechny obsahy.

2. Princip

Popel se stanoví vázkově jako zbytek hmoty po zpopelnění při teplotě 550 °C do konstantní hmotnosti za předepsaných podmínek.

3. Chemikálie

3.1 Dusičnan amonný, roztok 200 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C.

4.2 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.

4.3 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická

4.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

Pro vzorky druhů krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm² a výškou 35 mm.

4.5 Vodní lázeň

5. Postup

5.1 Suchá či předsušená krmiva (poznámka 8.3)

5.1.1 Odváží se asi 5 g (poznámka 8.1) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (m) do předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru se stejnou přesností zvážené spalovací misky (4.4) (m₀).

5.1.2 Navážka vzorku ve spalovací misce (4.4) se umístí na topnou desku nebo nad plynový kahan (4.3) s mírným plamenem a zahřívá do úplného zuhelnatění vzorku. Potom se spalovací miska (4.4) se vzorkem vloží do muflové pece (4.1), předem vyhřáté na (550 ± 20) °C a vzorek se spaluje při této teplotě po dobu 3 hod. Po uplynutí této doby se spalování přeruší, miska se vzorkem se vyjme a vizuálně posoudí na přítomnost uhlíkatých částic. Jsou-li

uhlíkaté částice přítomny, spaluje se za stejných podmínek ještě další 1 hod a kontrola na přítomnost uhlíkatých částic se opakuje. Pokud i poté jsou uhlíkaté částice přítomny, nechá se miska vychladnout, vzorek se zvlhčí několika kapkami roztoku dusičnanu amonného (3.1) (poznámka 8.2), miska se vysuší v sušárně (4.2) při 103 °C do sucha a vloží znovu do muflové pece (4.1) a při teplotě (550 ± 20) °C se spaluje 1 hod. Pokud by ani toto opatření nepomohlo, přidá se k vychladlému popelu horká voda a po zamíchání se filtruje obsah středně hustým filtrem do suché kádinky, tento filtrát se potom kvantitativně převede do původní misky a odpaří do sucha. Filtr s nerozpustným zbytkem se vloží do stejné misky a po vysušení se dále postupuje podle 5.1.2 .

5.1.3 Po skončení spalování, nejsou-li uhlíkaté částice přítomny, se spalovací miska (4.4) s popelem ochladí v exsikátoru a rychle se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_2).

5.1.4 Pokud je ještě podezření na přítomnost uhlíkatých částic, provede se další spalování popele vzorku za výše uvedených podmínek ještě po dobu 1 hod. a po vychladnutí v exsikátoru se opět zváží s výše uvedenou přesností. Není-li rozdíl mezi hmotnostmi prvního a druhého vážení větší než 0,01 g je spalování skončeno, v opačném případě se spalování po dobu 1 hod opakuje tak dlouho, až rozdíl mezi hmotnostmi je menší či rovný výše uvedenému.

5.2 Krmné tuky nebo oleje

Do spalovací misky (4.4), předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g (m_0), se odváží asi 25 g zkušební vzorku se stejnou přesností, do vzorku vloží nastříhané tenké proužky bezpopelného filtru, tyto se zapálí a po vyhoření hlavního podílu tuku či oleje se obsah misky zvlhčí vodou, vysuší a dále se postupuje podle 5.1.2 .

5.3 Mléko a tekuté mléčné výrobky

Do spalovací misky (4.4), předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g (m_0), se odváží asi 25 g zkušební vzorku se stejnou přesností. Obsah misky se odpaří na vodní lázni (4.5) a pak vysuší při (103 ± 2) °C v sušárně (4.2). Následuje pomalé zuhelnění nad mírným plamenem (4.3). Popel se nechá vychladnout a potom se do misky přidá 10 ml horké vody. Rozpustný podíl se odfiltruje přes bezpopelný filtrační papír a promyje malým množstvím horké vody. Filtrát se uschová a filtrační papír se vloží zpět do spalovací misky (4.4), vysuší a vyžihá v muflové peci (4.1) při 500 - 550 °C do běla. Po vychladnutí se do misky přidá kvantitativně filtrát, který se odpaří do sucha při 130 °C a krátce přežihá při 500 - 550 °C. Miska se po vychladnutí v exsikátoru rychle zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah popele v g /kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot (m_2 - m_0)}{m_1 - m_0}$$

kde m_0 je hmotnost prázdné spalovací misky v g

m_1 hmotnost spalovací misky se zkušebním vzorkem v g (= $m_0 + m$)

m_2 hmotnost spalovací misky se spáleným vzorkem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g /kg.

7. Opakovatelnost

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

do 30 g/kg	3 g/kg
od 31 do 50 g/kg	10 relat.
od 51 do 200 g/kg	5 g/kg
od 201 do 400 g/kg	2,5 relat.
nad 400 g/kg	10 g/kg

8. Poznámky

8.1 U krmiv, které mají tendenci se nadouvat se odvažuje pouze 2,5 g a používají se misky větších rozměrů.

8.2 Dusičnan amonný se musí přidávat opatrně, aby se zamezilo dispergovatelnosti popele nebo tvoření hrudek)

8.3 Popel ve vzorcích melasy nebo surového cukru se stanovuje konduktometricky,

6.2 Stanovení obsahu popela v tucích

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje metodu pro stanovení popela, použitelnou pro všechny živočišné a rostlinné tuky a oleje, včetně kyselých tuků.

2. Princip

Popel je anorganický zbytek po zpopelnění za stanovených podmínek. Vzorek tuku se spálí při určené teplotě a získaný zbytek se určí vážkově.

3. Chemikálie

3.1 Peroxid vodíku, roztok 10 % (v/v)

3.2 Uhličitan amonný, pevný

4. Přístroje

4.1 Kelímek (nízký), nebo miska na 50 ml; přednost je dávana křemenným a platinovým

4.2 Vyhřívaná deska nebo kahan

4.3 Muflová pec s možností práce v rozmezí 500 až 600 °C

4.4 Filtrační papír, bezpopelný

4.5 Vodní lázeň s termostatem

4.6 Sušárna elektrická atmosférická s automatickou regulací teploty v mezích ± 2 °C, s možností odvětrávání

5. Postup

5.1 Surové a rafinované tuky a oleje

5.1.1 Nejprve se vyžihá kelímek nebo miska (4.1) v muflové peci (4.3) nastavené na 550 až 650 °C, potom se ochladí v exsikátoru a zváží s přesností na 1 mg.

S přesností nejméně na 10 mg se do kelímku nebo misky (4.1) naváží přibližně 10 g zkušební vzorku (poznámka 8.1). Opatrně se zahřívá na vyhřívané desce nebo nad plamenem kahanu (4.2) v digestoři dokud se vzorek nevznítí (poznámka 8.2).

Po ukončení spalování se kelímek nebo miska (4.1) přemístí do muflové pece (4.3) nastavené na 550 až 650 °C. Při této teplotě se udržuje 4 hodiny nebo po kratší dobu, jestliže zbytek neobsahující uhlík je získán rychleji. Bezuhlíkatý zbytek se vyznačuje objevením popele červenohnědé (za přítomnosti železa), nebo bílé barvy, bez černých částic zůstávajících ve zbytku.

Jestliže vzorek není zbaven uhlíku po 4 hodinách, přidá se několik kapek peroxidu vodíku (3.1), vysuší se na vroucí vodní lázni (4.5) a znovu se zahřívá v muflové peci (4.3), dokud není uhlík odstraněn. Tento postup může být podle potřeby opakován.

Pokud zbytek již neobsahuje uhlík, nechá se miska nebo kelímek se zbytkem ochladit v exsikátoru a zváží se s přesností na 1 mg.

5.2 Kyselé oleje

5.2.1 Postupuje se podle odstavce 5.1.1, ale v prvním kroku se kelímek nebo miska (4.1) ohřívá při teplotě 500 až 550 °C v muflové peci (4.3). Po skončení spalování se kelímek nebo miska (4.1) nechá vychladnout a zbytek se rozpustí ve vodě. Obsah kelímku nebo misky se zfiltruje přes filtrační papír (4.4), který neobsahuje popel, do kádinky.

5.2.2 Filtrační papír (4.4) se zbytkem se vloží do kelímku nebo misky (4.1) a suší se v sušárně (4.6) při 103 ± 2 °C do úplného vysušení. Kelímek nebo miska (4.1) se přemístí na vyhřívanou desku nebo do plamene kahanu (4.2) a opatrně se zahřívá podle bodu 5.1.1, dokud není spalování ukončeno. Potom se zahřívá v muflové peci (4.3) při teplotě 500 až 550 °C, dokud nezmizí částice uhlíku, nebo dokud dochází ke změnám vzhledu zbytku. Jestliže zbytek obsahuje uhlík, postupuje se podle odstavce 5.1.1.

5.2.3 Filtrát získaný podle bodu 5.2.1 se kvantitativně převede do kelímku (4.1) a na vroucí vodní lázni (4.5) se odpaří do sucha. K odparku se přidá 0,5 až 2 g uhličitanu amonného (3.2) a zbytek se žihá v muflové peci (4.3) při teplotě 500 až 550 °C. Kelímek nebo miska se zbytkem se nechá vychladnout v exsikátoru a zváží se s přesností na 1 mg.

6. Výpočet

Obsah popela vyjádřený v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = 1000 \cdot \frac{m_2 - m_1}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

m_1 hmotnost prázdného kelímku nebo misky v g

m_2 hmotnost kelímku nebo misky s popelem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g /kg.

Výsledek menší než 0,1 g/kg se uvádí jako "stopy".

7. Opakovatelnost

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

do 1 g/kg 20% relat

nad 1 g/kg 15% relat

8. Poznámky

8.1 Při nižších obsazích popela může být použita větší navážka přidáním 10 g části po počátečním spálení a při vyšších obsazích může být použita nižší navážka. S narůstající navážkou oleje může být použit knot z filtračního papíru, který neobsahuje popel, vložený do oleje a zapálený, zatímco olej je zahříván na vyhřívané desce.

8.2 Počáteční ohřev může být proveden v otvoru muflové pece jestliže je pec umístěna v digestoři.

6.3 Stanovení podílu popela nerozpustného v kyselině chlorovodíkové

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dva postupy stanovení a to jednak pro jednoduchá organická krmiva a jednak pro minerální, organominerální krmiva a krmiva, obsahující nad 10 mg/kg nerozpustného podílu popele v kyselině chlorovodíkové.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení nerozpustného podílu popele v kyselině chlorovodíkové. Metody jsou použitelné pro všechny obsahy.

2. Princip

Nerozpustný podíl popele v kyselině chlorovodíkové se stanoví vážkově jako nerozpustná část popele, získaného spalování vzorku podle Přílohy 9, část 6.1 Stanovení popele, v kyselině chlorovodíkové resp. přímo rozpouštěním vzorku v kyselině chlorovodíkové.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina trichloroctová, roztok 200 g/l

3.3 Kyselina trichloroctová, roztok 10 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C

4.2 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.

4.3 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická

4.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

Pro vzorky krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm² a výškou 35 mm.

4.5 Vodní lázeň s termostatem

5. Postup

5.1 Krmiva s převážně organickou složkou

5.1.1 Popel, získaný při stanovení popele podle Přílohy 9, část 6.1 Stanovení popele, se kvantitativně převede pomocí 75 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) do kádinky na 250 ml nebo 400 ml (podle množství pevného podílu), zahřeje se pod hodinovým sklíčkem na topné desce či vařiči (4.3) k varu a mírně se vaří ještě 15 minut.

5.1.2 Ještě horký roztok se filtruje středně hustým, bezpopelným filtrem, zbytek na filtru se promyje 2x až 3x 50 ml horké vody do negativní reakce na aciditu (pH papírek). Filtrát se dále pro toto stanovení nepoužije; může se využít pro stanovení makroprvků (viz jejich stanovení). Promytý filtr s pevným podílem se převede do spalovací misky (4.4), předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 (m_0). Miska s filtrem se vysuší v sušárně (4.2) při teplotě 103 °C po dobu 30 minut a spaluje v muflové peci (4.1) při teplotě 550 °C až 700 °C po dobu 30 minut. Potom se miska vyjme, ochladí v exsikátoru a zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_2).

5.2 Krmiva s převážně minerální složkou krmiva s obsahem nerozpustného podílu v kyselině chlorovodíkové nad 10 g/kg

Odváží se asi 5 g zkušební vzorku, s přesností nejméně na 0.001 g (m_1) do kádinky na 400 ml, přidá se 25 ml vody, opatrně 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a nechá ustát dokud neustane šumění roztoku (vývoj oxidu uhličitýho). Pak se přidá dalších 50 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a po odpěnění roztoku se kádinka s obsahem zahřeje na vroucí vodní lázni (4.5) k varu. Vaří se po dobu nejméně 30 minut až do úplného vyčeření roztoku (zhydrolyzování škrobu).

Dále se postupuje podle 5.1.2

Pokud by filtrace chloridového výluhu probíhala obtížně, je nutno stanovení opakovat s nižší navázkou vzorku stejným postupem, ale s tím rozdílem, že namísto roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) se použije roztok kyseliny trichloroctové (3.2) a filtr se promývá roztokem kyseliny trichloroctové (3.3).

Spaluje se po dobu 3 hod.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah nerozpustného podílu popele v kyselině chlorovodíkové v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot (m_2 - m_0)}{m_1}$$

kde m_0 je hmotnost prázdné spalovací misky v g

m_1 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

m_2 hmotnost spalovací misky se spáleným zbytkem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé g /kg.

7. Opakovatelnost

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

do 10 g/kg	1 g/kg
od 11 do 50 g/kg	10 % rel.
od 51 do 200 g/kg	5 g/kg
od 201 do 400 g/kg	2,5 % rel
nad 400 g/kg	10 g/kg

6.4 Stanovení obsahu popela

Metoda ES převzata ze směrnice komise 71/250/EHS (OJ L155, 12/7/1971)

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje určit obsah popela v krmivech.

2. Princip

Vzorek se zpopelní při 550°C; popel se zváží.

3. Chemikálie

3.1 Dusičnan amonný, 20 % roztok (w/v)

4. Přístroje.

4.1 Topná deska.

4.2 Elektrická muflová pec s termostatem.

4.3 Spalovací kelímky z platiny nebo ze slitiny platiny a zlata (10 % Pt, 90 % Au) buď pravoúhlé (60 x 40 x 25 mm) nebo kulaté (průměr 60 – 70 mm, výška 20 – 25 mm).

5. Postup.

Do spalovacího kelímku, který byl předem vyžhán a zvážen, se naváží 5 g $\pm$ 1 mg vzorku (2,5 g v případě látek, které mají tendenci zvětšovat svůj objem). Kelímek se vloží na topnou desku a postupně ho zahřívá až látka zuhelnatí. Potom se kelímek vloží do muflové pece zahřáté na 550°C $\pm$ 5°C. Při této teplotě se spaluje až vznikne bílý, lehce šedý nebo načervenalý popel, který se zdá být prostý zuhelnatělých částic. Kelímek se vloží do exsikátoru, nechá se vychladnout a ihned se zváží.

6. Výpočet výsledků.

Vypočte se hmotnost zbytku po odečtení hmotnosti kelímku (táry). Výsledek se vyjádří jako procento popela ve vzorku.

7. Poznámky.

7.1 Popel látek, které se obtížně zpopelňují, se musí spalovat nejméně po dobu tří hodin. Po vychladnutí se přidá několik kapek 20 % roztoku dusičnanu amonného (opatrně, aby nedošlo k rozptýlu popela anebo ke tvoření hrudek). Po vysušení v sušárně se pokračuje ve spalování. Postup se opakuje podle potřeby až je zpopelnění úplné.

- 7.2. V případě látek, které jsou rezistentní na proces popsany v bodě 7.1, se postupuje takto: Po spalování po dobu tří hodin se popel rozmíchá v horké vodě a přefiltruje se přes malý, popela prostý filtr. Filtr s popelem se dále spaluje v originálním kelímku. Filtrát se převede do vychladlého kelímku, odpaří do sucha, opět se spálí a popel zvážit.
- 7.3 V případě stanovení popela v olejích a tucích se přesně naváží přibližně 25 g vzorku do kelímku vhodné velikosti. Zuhelnatí se zapálením vzorku proužky popela prostého filtračního papíru. Po spálení se zvlhčí co nejmenším množstvím vody. Vysuší se a spálí podle popisu v bodu 5.

7.1 Stanovení obsahu celkového fosforu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dva postupy stanovení, spektrofotometrická včetně modifikace pro minerální a kapalná krmiva a vážková, určená pro vyšší obsahy fosforu.

Tyto metody specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu fosforu v krmivech, včetně minerálních přísad.

Uvedené postupy jsou použitelné pro všechna krmiva organického i minerálního původu a všechny obsahy fosforu.

2. Princip

Fosfor se stanoví z chloridového výluhu popele vzorku nebo po mineralizaci kyselinou sírovou po reakci s molybdatovanadátovým činidlem spektrofotometricky nebo po vysrážení chinolinovým činidlem vážkově.

3. Chemikálie

3.1 Metoda spektrofotometrická

3.1.1 Kyselina chlorovodíková, roztok přibližně $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.1.2 Kyselina dusičná, koncentrovaná (65 - 68%) ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.1.3 Tetrahydrát heptamolybdenanu amonného $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$

3.1.4 Kyselina dusičná, roztoky 8,5%

3.1.5 Kyselina sírová, koncentrovaná ($\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$)

3.1.6 Amoniak, roztok 25 % ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$)

3.1.7 Uhličitan vápenatý, pevný (fosforu prostý)

3.1.8 Molybdatovanadátové činidlo

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 100 g tetrahydrátu heptamolybdenanu amonného (3.1.3) rozpustí se asi v 600 ml horké vody, ochladí, přidá 10 ml roztoku amoniaku, promíchá, po vytemperování doplní vodou po rysku a promíchá (roztok I).

Do jiné 1 000 ml odměrné baňky se odváží 2,35 g vanadičnanu amonného (3.1.11), rozpustí se v asi 400 ml horké vody, za stálého míchání se přidá pomalu 7 ml roztoku kyseliny dusičné (3.1.2), vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (roztok II).

V 1 000 ml odměrné baňce se smíchá 200 ml roztoku I, 200 ml roztoku II, 134 ml kyseliny dusičné (3.1.2), promíchá, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

Roztoky I a II jsou stálé, ale smíchaný roztok se připravuje vždy čerstvý.

3.1.9 Fosfor, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží přesně 4,3937 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), předem vysušeného (při 103 °C, 1 hod) a v exsikátoru ochlazeného, rozpustí ve vodě, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje teoreticky 1 mg fosforu.

3.1.10 Fosfor, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje přesně 5 ml základního standardního roztoku fosforu (3.1.9), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje teoreticky 0,02 mg fosforu.

Základní standardní roztok se uchovává v nádobce z plastické hmoty na temném a chladném místě, pracovní standardní roztok se připravuje vždy čerstvý.

3.1.11 Vanadičnan amonný NH_4VO_3

3.2 Metoda vážková navíc

3.2.1 Kyselina chlorovodíková, zředěná (1 +1)

3.2.2 Chinolin (neředěný)

3.2.3 Aceton (poznámka 8.1)

3.2.4 Chinolin-molybdenové činidlo

Příprava: Do kádinky asi na 400 ml se odváží 70 g dihydrátu molybdenanu sodného ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) a rozpustí se ve 150 ml vody (roztok A).

Do kádinky na 1 000 ml se odváží 60 g monohydrátu kyseliny citrónové ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), rozpustí ve 150 ml vody a za ochlazování se opatrně přidá 85 ml kyseliny dusičné (3.1.2) (roztok B).

Do kádinky asi na 400 ml se 100 ml vody se přidá 35 ml kyseliny dusičné (3.1.2), 5 ml chinolinu (3.2.2) a promíchá se (roztok C).

Roztok A se za stálého míchání přidá k roztoku B a k této směsi se přidá opět za stálého míchání postupně roztok C.

Výsledná směs se ponechá 24 hod stát. Potom se filtruje přes skleněný kelímek S_4 bez promývání do odměrné baňky na 1 000 ml, přidá se 280 ml acetonu (3.2.3), doplní po rysku a dobře promíchá.

V případě, že roztok je zakalen, opakuje se filtrace stejným kelímkem. Roztok se přechovává na chladném místě a je stálý 1 měsíc.

3.2.5 Uhlí aktivní, práškové

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Metoda spektrofotometrická

- 4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 430 nm a s příslušenstvím
- 4.1.2 Lázeň vodní nebo písková
- 4.1.3 Zkumavky objemu 25 až 30 ml
- 4.1.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám. Pro vzorky krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm² a výškou 35 mm.
- 4.1.5 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C
- 4.1.6 Baňka podle Kjeldahla

4.2 Metoda vážková

- 4.2.1 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku
- 4.2.2 Kelímkový filtrační skleněný S₄
- 4.2.3 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.
- 4.2.4 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická

5. Postup

5.1 Metoda spektrofotometrická (poznámka 8.2)

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1.1 Do pěti odměrných baněk na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 0,0 ; 5,0 ; 10,0 ; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku fosforu (3.1.10), což odpovídá koncentracím fosforu v 50 ml objemu 0,0; 0,1; 0,2; 0,4 a 0,5 mg.

5.1.1.2 Do každé odměrné baňky se odpipetuje 10 ml molybdatovanadátového činidla (3.1.8), doplní vodou po rysku a promíchá. Po 10 minutovém stání při laboratorní teplotě se měří absorbance každého roztoku v kyvetě optické délky 10 mm při vlnové délce 430 nm proti roztoku s nulovým obsahem fosforu.

5.1.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf. Ve výše uvedených koncentracích je kalibrační graf zcela lineární.

5.1.2 Pracovní postup pro krmiva organického původu, která neobsahují vápenaté nebo hořečnaté hydrogenfosforečnany

5.1.2.1 Do spalovací misky (4.1.4) se odváží asi 2,5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 1 g uhličitanu vápenatého (3.1.7) (poznámka 8.3) a pečlivě promíchá skleněnou tyčinkou, která se kvantitativně zbaví vzorku do spalovací misky (uhličitán vápenatý nevadí). Spalovací miska (4.1.4) se vloží do studené muflové pece (4.1.5) a tato se pozvolna vyhřeje na teplotu (550 ± 20) °C. Zpopelňuje se tak dlouho, až se získá bílý nebo světle šedý popel (vizuální posouzení), přičemž přítomnost menšího množství uhlíkatých částic nevadí. Potom se spalovací miska nechá vychladnout, obsah se zvlhčí

vodou, převede kvantitativně pomocí vody do kádinky obsahu asi 250 ml a pod sklíčkem se přidá postupně a opatrně tolik roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) až zcela ustane šumění (vývoj oxidu uhličitýho). Pak se přidá ještě 10 ml roztoku této kyseliny (3.1.1), kádinka se umístí na vyhřátou vodní lázeň nebo pískovou lázeň (4.1.2) a obsah se odpaří opatrně do sucha (eliminace oxidu křemičitýho). Po ochlazení se odparek vylouží 10 ml roztoku kyseliny dusičné (3.1.4), opět se umístí na vodní či pískovou lázeň (4.1.2), roztok se asi 5 minut povaří, aniž by se odpařil k suchu a pomocí horké vody se převede do odměrné baňky na 500 ml. Po vytemperování se doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok).

5.1.2.2 Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje, podle očekávaného obsahu fosforu ve zkoušeném vzorku, takové množství zásobního roztoku, aby množství fosforu v něm obsaženého bylo max. 0,4 mg (poznámka 8.4).

Dále se postupuje podle 5.1.1.2 .

Množství fosforu se zjistí z kalibračního grafu.

Vedle toho se provede slepá zkouška, za použití stejného pracovního postupu a stejného množství činidel jako u zkoušeného vzorku, pouze místo zásobního roztoku vzorku se přidá voda. Případně zjištěné množství fosforu u slepé zkoušky se od množství zjištěného u zkoušeného vzorku odečte.

5.1.3 Minerální a kapalná krmiva (poznámka 8.2)

Odváží se asi 1 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do 250 ml baňky podle Kjeldahla (4.1.6), přidá se 20 ml kyseliny sírové (3.1.5), vzorek se důkladně nechá provlhnout kyselinou tak, aby částčky vzorku neulpěly na stěnách baňky, zahřeje k varu a vaří asi 10 minut. Pak se mírně ochladí, přidají se 2 ml kyseliny dusičné (3.1.2) a opět se mírně zahřeje. Tento postup se opakuje přidáním poněkud většího množství kyseliny dusičné (3.1.2) až do získání zcela bezbarvého roztoku. Nakonec se roztok ochladí, přidá opatrně menší množství vody, promíchá a takto částečně zředěný roztok se převede horkou vodou kvantitativně do odměrné baňky na 500 ml. Po vytemperování se doplní odměrná baňka po rysku vodou, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok).

Dále se postupuje podle 5.1.2.2 .

5.2 Metoda vážková (pro vyšší obsahy fosforu)

5.2.1 Krmiva organického původu

5.2.1.1 Do spalovací misky (4.1.4) se odváží asi 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g a obsah misky se pozvolna zpopelní na elektricky vyhřívané desce či plynovém kahanu (4.2.4). Potom se spalovací miska (4.1.4) vloží do muflové pece (4.1.5) vyhřáté na teplotu $(550 \pm 20) ^\circ\text{C}$ a spaluje po dobu 3 hodin. Po uplynutí této doby se miska vyjme, ochladí a spálený vzorek se vizuálně posoudí na přítomnost uhlíkatých částic. Jsou-li ještě přítomny, spaluje se za výše uvedených podmínek ještě 1 hodinu. Po ochlazení se popel mírně zvlhčí vodou a pomocí kyseliny chlorovodíkové (3.2.1) a vody se kvantitativně převede do kádinky na 250 ml. Celkové množství roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) nemá být vyšší než 75 ml. Potom se kádinka přikryje krycím sklíčkem, obsah se uvede do varu a vaří se asi 15 minut. Obsah kádinky se ještě za horka filtruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 200 ml, promývá horkou vodou, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok).

5.2.1.2 Zásobní roztok, pokud se ihned nezpracuje, se uchovává v nádobce z plastické hmoty, avšak nejdéle do 10 dnů.

5.2.1.3 Z tohoto zásobního roztoku se do kádinky obsahu asi 400 ml odpipetuje, podle očekávaného obsahu fosforu ve zkoušeném vzorku, takový objem (poznámka 8.4) který obsahuje asi 5 až 10 mg fosforu, přidá se 5 ml kyseliny dusičné (3.1.2) a obsah roztoku pod krycím sklíčkem se mírně vaří 5 min, po ochlazení se upraví přidáním vody asi na 100 ml. Potom se přidá 50 ml chinolin - molybdenového činidla (3.2.4) (stále pod krycím sklíčkem), zahřeje tak, aby do 10 minut nastal mírný var a vaří přesně 1 minutu. Potom se obsah kádinky rychle ochladí pod tekoucí vodou za míchání krouživými pohyby a filtruje za sníženého tlaku (4.2.1) přes filtrační skleněný kelímek (4.2.2), předem vysušený (1 hod. při 250 °C nebo 2 hod. při 200 °C), ochlazený v exsikátoru a zvážený s přesností nejméně na 0,001 g. Vlastní filtrace se provede tak, že nejprve se slévá roztok nad sraženinou, pak se sraženina promývá dekantací asi 5 x po 25 ml vody a teprve potom se převede na filtr. Filtr se sraženinou se vysuší v sušárně (4.2.3) buď při teplotě 250 °C po dobu 1 hodiny, nebo při teplotě 200 °C po dobu 2 hodin a po ochlazení v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g.

5.2.2 Krmiva minerálního původu

Odváží se asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do kádinky obsahu asi 600 ml, kádinka se přikryje krycím sklíčkem a přidá se postupně 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) za občasného promíchání. Po skončení bouřlivé reakce (šumění) se obsah uvede do mírného varu a vaří při tomto varu 15 minut. Potom se obsah mírně ochladí, podle intenzity zbarvení se přidá úměrné množství aktivního uhlí (3.2.5) a ještě za tepla se obsah kádinky filtruje řídkým filtrem do odměrné baňky na 500 ml, přičemž první podíl filtrátu se kvantitativně vrátí zpět na filtr. Promývá se horkou vodou, po vytemperování se obsah baňky doplní po rysku a promíchá (zásobní roztok).

Dále se postupuje podle 5.2.1.3.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah celkového fosforu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot F}{10^3 \cdot m_0} \quad (\text{poznámka 8.5})$$

kde C je množství fosforu zjištěné z kalibračního grafu (po případném odečtu množství fosforu zjištěné při slepé zkoušce) v µg/ml;

F faktor ředění

m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.2 Metoda vážková

Obsah celkového fosforu v g/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{14 \cdot m_1}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.5})$$

kde m_1 je hmotnost vysušené sraženiny v g

m_0 hmotnost alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg pro obsahy do 30 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy nad 30 g/kg fosforu.

7. Opakovatelnost

7.1 Metoda spektrofotometrická

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu: do 50 g/kg 3 % relat.

nad 50 g/kg 0,15 g/kg

7.2 Metoda vážková

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky:

8.1 Aceton je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ní je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Vyšší obsah fosforu, obvykle nad 30 g/kg, se stanovuje vážkově.

8.3 Obsahuje-li zkoušený vzorek vápník nebo hořčík v nezanedbatelném množství není třeba uhličitán vápenatý přidávat.

8.4 Pokud byl proveden rozklad vzorku způsobem mokré mineralizace kyselinou sírovou, pak by koncentrace této kyseliny v objemu alikvotního podílu neměla přesáhnout 0,15 mol/l. Pipetování zvláště malých objemů (pod 10 ml), zejména dělenými pipetami se neprovádí. Ředění se proto volí postupné a zásadně nedělenými pipetami.

8.5 Uvedený vzorec pro výpočet fosforu vyjádřeného v elementární formě (P). Pro jiná vyjádření platí dále uvedené přepočty:

- jako P_2O_5 X .2,2915

- jako Na_3PO_4 X .5,2939

7.2 Stanovení obsahu vápníku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny čtyři postupy stanovení, titrační manganometrická, atomové absorpční spektrometrie, titrační chelatometrická (pro krmné směsi) a vážková.

Tyto metody specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu vápníku v krmivech, krmných směsích a premixech.

Metody umožňují stanovení vápníku ve všech druzích krmiv od obsahu 0,5 g/kg.

2. Princip

Vápník se stanoví z chloridového výluhu popele vzorku nebo u minerálních krmiv po rozpuštění vzorku v kyselině chlorovodíkové vysrážením šťavelanem amonným z amoniakálního prostředí a po izolaci šťavelanu vápenatého a okyselení titračně manganometricky nebo vážkově jako síran vápenatý nebo přímo po přidavku lanthanité soli v kyselém prostředí metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) při vlnové délce 422,7 nm nebo přímo ze slabě alkalického prostředí titračně chelatometricky (krmné směsi).

3. Chemikálie

3.1 Metoda titrační manganometrická

3.1.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.1.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = \text{přibližně } 6 \text{ mol/l}$

3.1.3 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.1.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$

3.1.5 Amoniak ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$), roztok 5 %

3.1.6 Šťavelan amonný, roztok 10 g/l

3.1.7 Šťavelan amonný, nasycený roztok při 20 °C

3.1.8 Kyselina citrónová, roztok 300 g/l

3.1.9 Chlorid amonný, roztok 50 g/l

3.1.10 Manganistan draselný, odměrný roztok $c(\text{KMnO}_4) = 0,02 \text{ mol/l}$

3.1.11 Uhličitan draselný, pevný

3.1.12 Uhličitan sodný, pevný

3.1.13 Uhlí aktivní

3.1.14 Indikátor bromkrezolová zeleň, ethanolický roztok 0,4 g/l

3.2 Metoda atomové absorpční spektrometrie

3.2.1 Chlorid lanthanitý, roztok 20 g/l

Příprava: 25 g oxidu lanthanitého se odváží do odměrné baňky na 1000 ml, přidá se 5 ml konc. kyseliny chlorovodíkové, po rozpuštění se přidá malé množství vody, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.2.2 Vápník, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží přesně 2,497 g uhličitanu vápenatého, předem vysušeného (1 hod při 103 °C) a v exsikátoru ochlazeného, rozpustí se v 50 ml 6 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkové, vytemperuje, doplní po rysku vodou a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje teoreticky 1 mg Ca.

3.2.3 Vápník, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku vápníku, přidá se několik kapek konc. kyseliny chlorovodíkové, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje teoreticky 40 µg Ca.

3.2.4 Acetylen (poznámka 8.9)

3.3 Metoda titrační chelatometrická

3.3.1 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = 1 \text{ mol/l}$

3.3.2 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = 5 \text{ mol/l}$

3.3.3 Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrát, odměrný roztok $c(\text{chelaton 3}) = 0,05 \text{ mol/l}$

Příprava: 18,61 g chelatonu se rozpustí vodou v odměrné baňce na 1 000 ml, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.3.4 Chlorid vápenatý, odměrný roztok $c(\text{CaCl}_2) = 0,05 \text{ mol/l}$

3.3.5 Indikátor methylová červeň, ethanolický roztok 1 g/l

3.3.6 Indikátor fluorexon, směs s pevným dusičnanem draselným v poměru 1 + 100

3.3.7 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = 2 \text{ mol/l}$

3.3.8 Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrát, odměrný roztok $c(\text{chelaton 3}) = 0,02 \text{ mol/l}$

Příprava: 7,45 g chelatonu se rozpustí vodou v odměrné baňce na 1 000 ml, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.3.9 Kyselina thioglykolová, roztok 10%

3.3.10 Indikátor směsný

Příprava: V třecí misce se utře 1 g fluorexonu, 50 g dusičnanu draselného, 0,2 g thymolftaleinu a 0,2 g murexidu.

3.3.11 Triethanolamin pro chelatometrii, roztok (1+1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Metoda titrační manganometrická a chelatometrická

4.1.1 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.1.2 Kelímek filtrační skleněný s filtrační vložkou o pórizitě S_3 a S_4

4.1.3 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.1.4 Kelímek nebo miska spalovací (porcelánová, křemenná, platinová)

4.2 Metoda atomové absorpční spektrometrie

4.2.1 Spektrometr atomový absorpční, vybavený pro stanovení vápníku s plamenem vzduch-acetylén

4.2.2 Lázeň písková s regulovatelnou teplotou a teploměrem pro rozmezí teplot do 150 °C

4.2.3 Miska nebo kelímek spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event. Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

Pro vzorky krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm² a výškou 35 mm.

4.2.4 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C

4.2.5 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická

5. Postup zkoušky

5.1 Metoda manganometrická (titrační) a metoda vážková

5.1.1 Krmiva organického původu

5.1.1.1 Do spalovací misky (4.1.4) se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (m) a vzorek se zpopelní, jak je uvedeno v Příloze 9, část 6.1 Stanovení popele, v muflové peci (4.2.4) při (550 ± 20) °C.

5.1.1.2 Po ochlazení popele se přidá 40 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1.1), mírně zahřívá a pomocí asi 60 ml vody se obsah kvantitativně převede do kádinky na 250 ml. Pak se přidá několik kapek kyseliny dusičné (3.1.3), kádinka se přikryje hodinovým sklíčkem, obsah se zahřeje k mírnému varu a vaří asi 30 minut. Pak se filtruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 250 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok).

5.1.1.3 Jsou-li v roztoku po povaření přítomny uhlíkaté částice, roztok se filtruje, jak je výše uvedeno, promyje roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.1.2), filtr se vrátí do spalovací misky (4.1.4) a spálí v muflové peci (4.2.4) při (550 ± 20) °C až do úplného vymizení uhlíkatých částic (vizuální posuzování) obvykle 3 až 5 hod. Potom se miska s popelem ochladí, přidají se 2 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2) a po zředění horkou vodou se obsah filtruje středně hustým filtrem do téže odměrné baňky. Po promytí filtru horkou vodou se obsah baňky vytemperuje, doplní po rysku vodou a promíchá (zásobní roztok).

5.1.1.4 Do kádinky na 250 ml se odpipetuje alikvotní podíl zásobního roztoku, obsahující podle předpokládaného obsahu asi 10 až 40 mg vápníku, přidá se 1 ml roztoku kyseliny

citrónové (3.1.8), 5 ml roztoku chloridu amonného (3.1.9), obsah kádinky se zředí asi na 100 ml vodou, kádinka přiklopí hodinovým sklíčkem a obsah se zahřeje k varu. Pak se přidá asi 8 až 10 kapek roztoku indikátoru bromkrezolové zeleni (3.1.14) a 30 ml horkého nasyceného roztoku šťavelanu amonného (3.1.7). Vznikne-li sraženina, rozpustí se několika kapkami kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) a obsah kádinky se pomalu za neustálého míchání neutralizuje roztokem amoniaku (3.1.5) do právě vzniklé změny zabarvení indikátoru (pH 4,4 až pH 4,6) a vzniku sraženiny šťavelanu vápenatého. Kádinka se umístí na vroucí vodní lázeň (4.1.1) na dobu 30 minut a pak ještě na 1 hod nechá stát při laboratorní teplotě.

5.1.1.5 Obsah se filtruje za sníženého tlaku (4.1.3) přes filtrační kelímek (4.1.2) a to tak, že nejprve se slévá roztok nad usazenou sraženinou, sraženina se promývá dekantací roztokem šťavelanu amonného (3.1.6) a nakonec se převede na filtr i sraženina. Tato se důkladně promyje vodou do negativní reakce dalšího filtrátu na šťavelany či chloridy a přímo na filtru se rozpustí (poznámka 8.1) v 50 ml horkého roztoku kyseliny sírové (3.1.4) do titrační baňky či kádinky, kelímek se promyje horkou vodou jímanou do stejné baňky (kádinky) a nakonec se obsah baňky (kádinky) upraví vodou asi na 100 ml. Pak se obsah baňky (kádinky) zahřeje na 70 °C až 80 °C a ihned titruje po kapkách odměrným roztokem manganistanu draselného (3.1.10) do právě vzniklého růžového zabarvení roztoku, které setrvá alespoň 1 minutu.

5.1.1.6 Krmiva obsahující velmi nízké obsahy vápníku se zkouší až do vysrážení šťavelanu vápenatého podle 5.1.1.1 až 5.1.1.4 a pak se sraženina odfiltruje hustým filtrem (papírovým), promyje důkladně vodou do negativní reakce na šťavelany či chloridy, filtr se sraženinou se vysuší, vloží do spalovacího kelímku či misky (4.2.3), předem vysušené (30 minut při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g, spálí a vyžihá v muflové peci (4.2.4). Po zchlazení se popel zropí pár kapkami roztoku kyseliny sírové (3.1.4), odpaří na pískové lázni (4.2.2) do sucha, znovu krátce vyžihá v muflové peci (4.2.4) při (550 ± 20) °C a po zchlazení v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_1).

5.1.2 Krmiva minerálního původu

5.1.2.1 Do kádinky na 600 ml se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, vzorek se zvlhčí vodou a za občasného promíchání se přidá postupně 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2). Po každém přidání se kádinka přikryje hodinovým sklíčkem. Po zklidnění reakce se obsah kádinky uvede do varu a vaří asi 15 minut. Po částečném zchlazení se přidá podle intenzity zbarvení roztoku aktivní uhlí (3.1.13), promíchá a filtruje řídkým filtrem do podložené odměrné baňky na 500 ml. Filtr se promyje asi 200 ml horké vody, obsah baňky se vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok).

Dále se postupuje podle 5.1.1.4 .

5.1.2.2. V případě analýzy minerálních krmiv, jakými jsou například hlinitovápennaté fosfáty, které nejsou snadno rozpustné v kyselině chlorovodíkové se postupuje následovně: Navážka vzorku se smíchá v platinovém kelímku (4.2.3) s pětinasobným množstvím směsi uhličitanu sodného (3.1.12) a draselného (3.1.11) v poměru 1 + 1 , opatrně zahřívá na kahanu (4.2.5) až se směs roztaví. Po krátkém tavení se tavenina nechá vychladnout a opatrně se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2), jak je uvedeno v 5.1.2.1 .Dále se pak postupuje podle 5.1.2.1 .

5.2 Metoda spektrometrická (AAS)

5.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.2.1.1 Nejméně do 6 odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 0,0 ml; 5,0 ml; 10,0 ml; 15,0 ml; 20,0 ml a 25,0 ml pracovního standardního roztoku vápníku (3.2.3),

do každé z baněk se přidá 20 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.2.1), doplní vodou po rysku a promíchá. Takto připravené roztoky odpovídající teoretickým koncentracím 0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10,0 μg vápníku v 1 ml (poznámka 8.2).

5.2.1.2 Absorbance každého roztoku se měří na přístroji pro atomovou absorpční spektrometrii (4.2.1) při vlnové délce 422,7 nm za použití plamene acetylén (3.2.4) - vzduch, příslušně seřízeného. Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací v $\mu\text{g}/\text{ml}$ se sestrojí kalibrační graf.

5.2.2 Vlastní provedení

5.2.2.1 Zásobní roztok zkoušeného vzorku se připraví podle 5.1.1, s tím rozdílem, že roztok po rozpouštění popela se odpaří na pískové lázni (4.2.2) do sucha, přidají se 2 ml 6 mol/l kyseliny chlorovodíkové (3.1.2), po rozpuštění (čirý roztok) se zředí horkou vodou a filtruje středně hustým filtrem do 250 ml odměrné baňky. Po vytemperování se doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok pro AAS).

5.2.2.2 Ze zásobního roztoku pro AAS, podle očekávaného obsahu vápníku, se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml alikvotní podíl obsahující asi 1 mg vápníku (poznámka 8.3), přidá se 20 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.2.1), baňka se doplní vodou po rysku a promíchá.

Dále se postupuje podle 5.2.1.1 (sestrojení kalibračního grafu).

5.2.2.3 Z hodnot naměřených absorbancí se z kalibračního grafu zjistí odpovídající koncentrace vápníku.

5.2.2.4 Vedle toho se provede slepá zkouška (blank) stejným způsobem jako u vzorku (od rozpouštění popela) s použitím stejných chemikálií a ve stejném množství jako u vzorku, s výjimkou zkušebního vzorku. Případně naměřená absorbance resp. jí odpovídající koncentrace vápníku se od zjištěné u vzorku odečte.

5.3 Metoda titrační chelatometrická (pro krmné směsi)

Vzorek se zpracuje podle 5.1.1.1 a 5.1.1.2 případně i 5.1.1.3

5.3.1 Nepřímá chelatometrie

Ze zásobního roztoku se odpipetuje alikvotní podíl (poznámka 8.3 a 8.4) do titrační baňky vhodného obsahu, přidá se 50 ml vody, několik kapek indikátoru methylové červení (3.3.5) a obsah se neutralizuje roztokem hydroxidu draselného (3.3.1) do právě vzniklé změny zabarvení indikátoru. Potom se k obsahu titrační baňky přidá 5 ml 5 mol/l roztoku hydroxidu draselného (3.3.2), malé množství indikátoru fluorexonu (3.3.6) až vznikne zřetelná fluorescence roztoku a z byrety se odměří přesně 10 až 25 ml odměrného roztoku chelatonu (3.3.3) (poznámka 8.5). Přebytek odměrného roztoku chelatonu se zpětně titruje odměrným roztokem chloridu vápenatého (3.3.4) až do právě vzniklé zelené fluorescence titrovaného roztoku.

5.3.2 Přímá chelatometrie

Ze zásobního roztoku se odpipetuje alikvotní podíl (poznámka 8.7) do titrační baňky vhodného obsahu, přidá se 50 ml vody, 0,2 ml kyseliny thioglykolové (3.3.9), promíchá se, přidá se 1 ml roztoku triethanolaminu (3.3.11), promíchá a obsah se neutralizuje roztokem hydroxidu draselného (3.3.7) do právě vzniklé změny zabarvení roztoku. Potom se k obsahu titrační baňky přidá 5 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3.7) a malé množství směšného indikátoru (3.3.10) až vznikne zřetelná fluorescence roztoku. Za stálého míchání se titruje

odměrným roztokem chelatonu 3 (3.3.8) až do vymizení fluorescence titrovaného roztoku (poznámka 8.8).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1. Metoda titrační manganometrická

Obsah vápníku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{20,04 \cdot V \cdot C}{m} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku manganistanu draselného v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku manganistanu draselného v mol/l

m hmotnost alikvotního podílu navážky zkušební vzorku v g

6.2 Metoda vážková (jako síran vápenatý)

Obsah vápníku v g/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{294,4 \cdot m_1}{m} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde m_1 je hmotnost vyváženého síranu vápenatého v g

m hmotnost navážky zkušební vzorku nebo její alikvotní podíl v g

6.3 Metoda spektrometrická (AAS)

Obsah vápníku v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{C}{10 \cdot m} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde C je koncentrace vápníku zjištěná z kalibračního grafu (event. po odečtení slepé zkoušky) v $\mu\text{g/ml}$

F faktor ředění zásobního roztoku

m hmotnost alikvotního podílu zkušební vzorku v g

6.4 Metoda titrační chelatometrická - nepřímá

Obsah vápníku v g/kg (Q) se vypočítá podle vzorce:

$$Q = \frac{(V_1 \cdot C_1 - V_2 \cdot C_2)}{m} \cdot 40,08 \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde V_1 je objem přidaného nadbytku odměrného roztoku chelatonu v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku chloridu vápenatého v ml

C_1 přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu v mol/l

C_2 přesná koncentrace odměrného roztoku chloridu vápenatého v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

6.5 Metoda titrační chelatometrická - přímá

Obsah vápníku v g /kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{400,8 \cdot V \cdot C}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 při titraci v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností pro obsahy do 20 g/kg na 0,1 g/kg a pro obsahy nad 20 g/kg na celé jednotky g/kg

7. Opakovatelnost

7.1 Manganometrická titrační metoda

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

pod 50 g/kg	1 g/kg
nad 50 g/kg	2 % rel.

7.2 Vážková metoda

Nebyla dosud stanovena.

7.3 Spektrometrická metoda (AAS)

Nebyla dosud stanovena.

7.4 Metoda titrační chelatometrická

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Rozpouštění šťavelanu vápenatého lze provést také tak, že se celý filtrační kelímek vloží do titrační baňky (kádinky), ale v tom případě je bezpodmínečně nutné zbavit zbytků roztoku šťavelanu amonného celý kelímek (i vně).

Při vyšších obsazích hořčíku ve zkoušeném vzorku se provede přesrážení šťavelanu vápenatého.

8.2 V případě stanovení vápníku v minerálních krmivech, které jsou bohaté na alkalické kovy se doporučuje rozpouštět a ředit roztokem, který obsahuje sodíkové (draslíkové) ionty v takovém poměru, jako má zkoušený vzorek (matrice = zpřesnění výsledků).

Uvedená série roztoků pro kalibraci je uvedena jako příklad a může být nahrazena jinou, která lépe vyhovuje použitému přístroji.

8.3 Při pipetování značně malých množství zásobního roztoku (např. 1 až 5 ml) se doporučuje ředění provádět postupně s většími objemy roztoku a zásadně nedělenou pipetou (přesnost).

8.4 Alikvotní část zásobního roztoku se volí s ohledem na očekávaný obsah vápníku ve zkoušeném vzorku tak, aby odpovídal spotřebě použitého odměrného roztoku v jedné polovině objemu použité byrety.

8.5 Po přidání odměrného roztoku chelatonu dojde k vymizení fluorescence a roztok nabude růžového zabarvení. V případě, že se tak nestane, je nutné přidat množství odměrného roztoku chelatonu 3 úměrně zvýšit.

8.6 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu vápníku v elementární formě (Ca). Pro jiná vyjádření platí uvedené přepočty:

- jako CaO $X(Y,Z,Q) \cdot 1,3992$

- jako CaCO_3 $X(Y,Z,Q) \cdot 2,4972$

8.7 Objem alikvotního podílu filtrátu se volí s ohledem na předpokládaný obsah vápníku ve vzorku, obvykle se pohybuje v rozsahu 5 - 50 ml. Spotřeba chelatonu 3 by neměla přesáhnout 5 ml.

8.8 Fluorescence vymizí alespoň po dobu 1 minuty.

8.9 Acetylén je hořlavým plynem, proto při každé manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

7.3 Stanovení obsahu hořčíku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 83, 30/3/73

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu hořčíku v krmivech a minerálních premixech. Metoda je vhodná zejména pro obsahy do 50 g/kg.

2. Princip

Hořčík se stanoví po mineralizaci vzorku (organická krmiva) nebo přímým rozpouštěním (minerální krmiva) z chloridového výluhu přímo metodou atomové absorpční spektrometrie při vlnové délce 285,2 nm.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 9 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,45 \text{ mol/l}$

3.4 Hořčík kovový v páscích či drátkách, jako standardní látka

3.5 Síran hořečnatý heptahydrát ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), jako standardní substance (alternativní)

3.6 Hořčík, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží 1,000 g kovového hořčíku (3.4), dokonale zbaveného oxidů nebo 10,143 g heptahydrátu síranu hořečnatého (3.5), přidá se 80 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), rozpustí, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje teoreticky 1 mg hořčíku.

Roztok se uchovává v nádobce z plastu nejvýše 6 měsíců.

Jako základní standardní roztok je možno použít i komerční roztok s deklarovanou (ověřenou) koncentrací hořčíku.

3.7 Chlorid strontnatý hexahydrát ($\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) nebo dusičnan strontnatý $[\text{Sr}(\text{NO}_3)_2]$, roztok obsahující 2,5 % Sr

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží 76,08 g hexahydrátu chloridu strontnatého nebo 60,38 g dusičnanu strontnatého, rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.8 Acetylén (poznámka 8.3)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr absorpční atomový vhodných parametrů

4.2 Miska spalovací (platinová, křemenná, porcelánová)

4.3 Pec muflová s termostatem a teploměrem nejméně do 550 °C

4.4 Lázeň vodní s termostatem

4.5 Sušárna elektrická s termostatem a teploměrem nejméně do 105 °C

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do šesti odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetují taková množství základního standardního roztoku hořčíku (3.6), aby koncentrace hořčíku odpovídala parametrům použitého spektrometru (4.1) - podle návodu výrobce přístroje (poznámka 8.1).

5.1.2 Vedle toho se připraví kontrolní roztok tak, že do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje takové množství (např. 50 ml) roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3), aby konečná koncentrace této kyseliny nepřesáhla 0,4 mol/l.

5.1.3 Do každé z odměrných baněk se odpipetuje 10 ml roztoku chloridu (dusičnanu) strontnatého (3.7) a přidá tolik kyseliny chlorovodíkové (3.2), aby výsledné koncentrace této byla cca 0,4 mol/l, přičemž hodnota 0,4 mol/l se nesmí překročit. Pak se baňka doplní vodou po rysku a promíchá. Měří se na přístroji pro atomovou absorpční spektrometrii (4.1), po nastavení optimálních parametrů a nulové hodnoty kontrolním roztokem, při vlnové délce 285,2 nm a za použití plamene acetylén (3.8) - vzduch.

5.1.4 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Krmiva s převážně organickou složkou

5.2.1.1 Do spalovací misky (4.2) se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, zkušební vzorek se spaluje v muflové peci (4.3) při teplotě 550 °C až do získání popele bez přítomnosti uhlíkatých částic.

5.2.1.2 K vychladlému popelu se přidá 5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1), na vodní lázni (4.4) se odpaří do sucha, vysuší ještě po dobu 1 hod. v sušárně (4.5) při 103 °C (přeměna silikátů na nerozpustnou formu) a vychladlému odparku se přidá 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2). Po rozpuštění za tepla se obsah převede kvantitativně pomocí horké vody do odměrné baňky na 250 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým skládaným, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl (asi 30 ml) filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok).

5.2.1.3 Z tohoto zásobního roztoku se odpipetuje alikvotní podíl (poznámka 8.1), obsahující množství hořčíku v mezích kalibračního grafu, do odměrné baňky na 100 ml a dále se postupuje podle 5.1.3 .

Množství hořčíku se zjistí z kalibračního grafu.

5.2.2 Krmiva s převážně minerální složkou

Postupuje se shodně jako v 5.2.1.1 .

5.2.2.1 K vychladlému popelu se přidá dostatečné množství (15 až 30 ml) kyseliny chlorovodíkové (3.1), obsah se na vodní lázni (4.4) odpaří do sucha a ještě vysuší při teplotě 103 °C v sušárně (4.5) za dobu 1 hod. Odparek se po vychladnutí rozpustí v 10 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2) za tepla a po rozpuštění se obsah kvantitativně převede pomocí horké vody do odměrné baňky na 500 ml. Po vytemperování, doplnění po rysku vodou a promíchání se filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu (asi 30 ml) se nezachycuje (zásobní roztok).

Dále se postupuje podle 5.2.1.3 .

5.2.3 Krmiva s výlučně minerální složkou

5.2.3.1 Do kádinky o obsahu asi 600 ml se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 250 až 300 ml vody, 40 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), uvede se do varu a při mírném varu se udržuje 30 minut. Potom se obsah kádinky kvantitativně převede pomocí horké vody do odměrné baňky na 500 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, skládaným, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu (asi 30 ml) se nezachycuje (zásobní roztok).

Za přítomnosti sloučenin křemíku ve zkoušeném vzorku se zkušební vzorek rozpustí v dostatečném množství (15 až 30 ml) kyseliny chlorovodíkové (3.1). Dále se postupuje podle 5.2.2.1 (odpaření do sucha atd.).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah hořčíku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m} \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde m_1 je množství hořčíku zjištěné z kalibračního grafu v mg

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na desetiny g/kg pro obsahy hořčíku do 20 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy hořčíku nad 20 g/kg.

7. Opakovatelnost

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

8. Poznámky:

8.1 Ředění standardního roztoku hořčíku, popř. i zásobních roztoků zkoušeného vzorku, je nutno provádět postupně tak, aby nebylo pipetováno méně než 10 ml a pipety používat výhradně nedělené (přesnost).

8.2 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu hořčíku v elementární formě (Mg). Pro jiná vyjádření platí dále uvedené přepočty:

- jako MgO X .1,658

- jako MgCO₃ X .3,469

8.3 Acetylén je hořlavým plynem, proto při každé manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

7.4 Stanovení obsahu draslíku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu draslíku v krmivech.

2. Princip

Draslík se stanoví v chloridovém výluhu po zpopelnění vzorku a za přídavku chloridu cesného a dusičnanu hlinitého k eliminaci vlivu interferujících látek, metodou emisní plamenové spektrometrie.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.3 Chlorid cesný (CsCl), pevný

3.4 Dusičnan hlinitý nonahydrát $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}]$, pevný

3.5 Chlorid draselný (KCl), bezvodý

3.6 Tlumivý roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 50 g chloridu cesného (3.3) a 250 g dusičnanu hlinitého (3.4), rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

Uchovává se v plastických nádobách.

3.7 Chlorid draselný, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží přesně 1,907 g chloridu draselného (3.5), předem vysušeného po dobu 1 hod. při 105°C a v exsikátoru ochlazeného, přidá se 300 ml vody, po rozpuštění 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 1,0 mg draslíku. Uchovává se v plastických nádobách.

Jako základní standardní roztok je možno použít i komerční roztok s deklarovanou (ověřenou) koncentrací draslíku.

3.8 Chlorid draselný, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.7), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 0,04 mg draslíku. Připravuje se vždy čerstvý.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr plamenový

4.2 Miska platinová, křemenná či porcelánová (případně opatřené víčky)

4.3 Pec muflová s termostatem

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 5,0 ; 10,0 ; 15,0 ; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku (3.8), což odpovídá koncentracím 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 a 1,0 mg draslíku v 100 ml roztoku. Do každé z baněk se odpipetuje, včetně další prázdné baňky (slepý roztok), 10 ml tlumivého roztoku (3.6) (poznámka 8.1), 8 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplní se vodou po rysku a promíchá.

5.1.2 Na plamenovém spektrometru (4.1) se nastaví potřebné parametry a při vlnové délce 763 nm se obvyklou technikou změří hodnota každého roztoku, při nastavení nulové hodnoty slepým roztokem.

5.1.3 Z naměřených hodnot kalibračních roztoků a jejich odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do spalovací misky (4.2) se odváží asi 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g a zpopelní v muflové peci (4.3) při teplotě 450 °C po dobu 3 hod. Po ochlazení se popel převede pomocí 250 až 300 ml vody a 60 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) do odměrné baňky na 500 ml a za účelem vypuzení oxidu uhličitého se baňka s obsahem zahřeje na vroucí vodní lázni na teplotu 90 °C ponechá při této teplotě po dobu 2 hod. Po vytemperování se doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.2.2 Z tohoto filtrátu (zásobní roztok) se odpipetuje alikvotní část, obsahující podle předpokladu max. 1 mg draslíku (viz tabulka 1) do odměrné baňky na 100 ml, přidá se 10 ml tlumivého roztoku (3.6), (poznámka 8.1) doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) po rysku a promíchá. Dále se postupuje podle 5.1.2.

Množství draslíku se zjistí z kalibračního grafu.

Obsahuje-li vzorek vyšší obsah draslíku, než je uveden v tabulce 1, zředí se ještě před přidáním tlumivého roztoku (3.6) a použije se takové množství 6 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), aby výsledná koncentrace kyseliny byla asi 0,5 mol/l.

Tabulka 1 : Odpipetované podíly při navážce zkušební vzorku 10 g a zásobního roztoku 500 ml)

Očekávaný obsah draslíku v	Zředovací	Alikvotní část	zásobního
----------------------------	-----------	----------------	-----------

g/kg	faktor	roztoku
do 1,0		50 ml
od 1,1 do 5,0		10 ml
od 5,1 do 10,0		5 ml
od 10,1 do 50,0	1:10	10 ml
od 50,1 do 100,0	1:10	5 ml
od 100,1 do 200	1:20	5 ml

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah draslíku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde m_1 je množství draslíku, zjištěné z kalibračního grafu v mg

m_0 hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jedno desetinné místo pro obsahy do 20 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy nad 20 g/kg.

7. Opakovatelnost

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

od 2 do 50 g/kg 10 % relat.

nad 50 g/kg 5 g/kg

8. Poznámky

8.1 Tlumivý roztok za účelem eliminace interference rušivých prvků není nutné vždy přidávat. Je nutné si bezpečně ověřit případy ve kterých to není, nebo je třeba.

8.2 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu draslíku v elementární formě (K). Pro vyjádření jako K_2O platí přepočet: $X \cdot 1,205$

7.5 Stanovení obsahu sodíku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu sodíku v krmivech.

2. Podstata zkoušky

Sodík se stanoví v chloridovém výluhu po zpopelnění vzorku a za přídavku chloridu cesného a dusičnanu hlinitého k eliminaci vlivu interferujících látek metodou emisní plamenové spektrometrie

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.3 Chlorid cesný (CsCl), pevný

3.4 Dusičnan hlinitý nonahydrát $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}]$, pevný

3.5 Tlumivý roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 50 g chloridu cesného (3.3) a 250 g dusičnanu hlinitého (3.4), rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

Uchovává se v plastických nádobkách.

3.6 Chlorid sodný, bezvodý

3.7 Chlorid sodný, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží přesně 2,541 g chloridu sodného, předem vysušeného (1 hod při 105°C) a v exsikátoru ochlazeného, přidá se asi 300 ml vody, po rozpuštění 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 1 mg sodíku. Roztok se uchovává v plastických nádobkách.

Jako základní standardní roztok je možno použít i komerční roztok s deklarovanou (ověřenou) koncentrací sodíku.

3.8 Chlorid sodný, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.7), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 0,04 mg sodíku. Připravuje se vždy čerstvý.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr plamenový

4.2 Miska spalovací (platinová, křemenná, porcelánová)

4.3 Pec muflová s termostatem

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje diferencovaně 5,0 ; 10,0 ; 15,0 ; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku (3.8), což odpovídá koncentracím 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 a 1,0 mg sodíku ve 100 ml. Do každé z baněk se odpipetuje 10 ml tlumivého roztoku (3.9), 8 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) včetně do další prázdné (slepý roztok), každá z baněk se doplní vodou po rysku a promíchá.

5.1.2 Nastaví se potřebné parametry plamenného spektrometru (4.1) a při vlnové délce 589 nm se obvyklou technikou proměří každý roztok, při nastavení nulové hodnoty slepým roztokem.

5.1.3 Z naměřených hodnot standardů a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

Do spalovací misky (4.2) se odváží asi 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, zpopelní v muflové peci (4.3) při teplotě 450 °C za dobu 3 hod. (poznámka 8.1). Po ochlazení se popel převede pomocí 250 až 300 ml vody a 60 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) do odměrné baňky na 500 ml a za účelem vypuzení oxidu uhličitého se baňka s obsahem zahřeje na vodní lázni na teplotu 90 °C, ponechá při této teplotě asi 2 hod, přičemž se občas promíchá. Po vytemperování a doplnění vodou po rysku se promíchá, filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Z tohoto filtrátu (zásobní roztok) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml alikvotní část obsahující max. 1 mg sodíku (viz tabulka 1), přidá se 10 ml tlumivého roztoku (3.5), doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) po rysku a promíchá. Dále se postupuje podle 5.1.2 .

Množství sodíku se zjistí z kalibračního grafu.

Obsahuje-li vzorek vyšší obsah sodíku, než je uvedeno v tabulce 1, zředí se vhodným způsobem před přidáním tlumivého roztoku (3.5). Při ředění se použije takové množství roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), aby výsledná koncentrace kyseliny byla 0,5 mol/l.

Tabulka 1: Odpipetované podíly zásobního roztoku při navážce zkušební vzorku 10 g a zásobního roztoku 500 ml

Očekávaný obsah sodíku v g/kg	Zředovací faktor	Alikvotní podíl zásobního roztoku v ml
do 1,0	-	50
od 1,1 do 5,0	-	10
od 5,1 do 10,0	-	5
od 10,1 do 50,0	1 : 10	10
nad 50,1	1 : 20	5

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah sodíku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde m_1 je množství sodíku, zjištěné z kalibračního grafu v mg

m_0 hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jedno desetinné místo do obsahu 20 g/kg a na celé jednotky g/kg nad obsah 20 g/kg.

7. Opakovatelnost

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

od 2 g/kg do 50 g/kg	10 % relat.
nad 50 g/kg	5 g/kg

8. Poznámky

8.1 Při spalování je nutné zabránit vznícení vzorku. Pro krmiva, obsahující více než 40 g/kg sodíku se spaluje ve spalovací misce opatřené víčkem po dobu 2 hod. Po vychladnutí se přidá trochu vody, pomocí Pt drátku se vytvoří kaše, vysuší se a opět 2 hod spaluje v misce zakryté víčkem. Dále se postupuje, jak uvedeno v 5.2, víčko se opláchne rovněž do odměrné baňky. U krmiv, obsahujících většinou minerální složky, se vzorek nespaluje, ale přímo v 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) rozpouští.

8.2 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu sodíku v elementární formě (Na). Pro vyjádření jako NaHCO_3 platí přepočet $X \cdot 3,654$ a jako Na_2CO_3 platí: $X \cdot 2,305$

7.6 Stanovení obsahu ve vodě rozpustných chloridů

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení ve vodě rozpustných chloridů v krmivech a minerálních přísadách. Zvláštní modifikace specifikuje podmínky pro stanovení ve vodě rozpustných chloridů v rybích moučkách a v tepelně opracovaných krmivech (výlisky lněných pokrutin či šrotů, slizovitých a koloidních materiálů - např. dextrin a pod.)

Metoda včetně modifikací zahrnuje použití pro všechna krmiva a všechny obsahy.

2. Princip

Chloridy se stanoví z vodního výluhu vzorku nepřímou argentometrickou titrací podle Volharda po vyčerení Carresovými činidly.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina dusičná koncentrovaná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.2 Dusičnan stříbrný, odměrný roztok $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$

Příprava: 16,989 g dusičnanu stříbrného, předem vysušeného 2 hod při teplotě 150°C a ochlazeného v exsikátoru, se odváží do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

Standardizace tohoto odměrného roztoku se neprovádí.

3.3 Thiokyanatan amonný, odměrný roztok $c(\text{NH}_4\text{SCN}) = 0,1 \text{ mol/l}$

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 7,612 g thiokyanatanu amonného rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

Standardizuje se pomocí odměrného roztoku dusičnanu stříbrného za použití indikace síranem železitoamonným. Koncentrace se vyjádří v mol/l s přesností nejméně na 0,001.

3.4 Síran železitoamonný dodekahydrát $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}]$ nasycený roztok (při 20°C), jako indikátor

3.5 Carresovo činidlo I

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$, přidá se 3 ml ledové kyseliny octové a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Carresovo činidlo II

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexakynoželeznanu draselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}]$, přidá se asi 50 ml vody, po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 n-Hexan nebo diethylether (poznámka 8.1)

3.8 Aceton (poznámka 8.1)

3.9 Uhlí aktivní, chloridů prosté a neabsorbující chloridy

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň písková nebo topná deska

4.2 Třepačka nebo elektromagnetická míchačka vhodné konstrukce

4.3 Odstředivka vhodných parametrů

5. Postup

Do odměrné baňky na 500 ml se odváží asi 10 g zkušební vzorku (poznámka 8.2) s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se asi 400 ml vody, promíchá, dále přidá 5 ml Carresova činidla I (3.5), opět promíchá, 5 ml Carresova činidla II (3.6) (poznámka 8.3), asi 0,5 až 1 g aktivního uhlí (3.9) a opět důkladně promíchá. Odměrná baňka se zazátkuje, umístí na třepačku nebo elektromagnetickou míchačku (4.2) a protřepává (promíchává) se 30 minut. Pak se obsah baňky doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok) (poznámka 8.4).

Do titrační baňky či kádinky vhodného objemu se odpipetuje alikvotní podíl zásobního roztoku, obsahující nejvýše 100 mg chloridů, vyjádřených jako chlorid sodný, je-li třeba doplní se na objem 50 ml vodou, přidá 5 ml kyseliny dusičné (3.1), 20 ml roztoku síranu železitoamonného (3.4) jako indikátoru (poznámka 8.5) a promíchá. Před titrací se přidají 2 kapky odměrného roztoku thiokyanatanu amonného (3.3) přímo z byrety, ze které bude titrováno (jsou součástí spotřeby) a za stálého intenzivního promíchávání se přidá přesně z byrety přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.2) a to asi o 5 až 10 ml více, než je ekvivalentní množství chloridů. Těsně před začátkem titrace se ještě přidá 5 ml n-hexanu nebo diethyléru (3.7) a důkladně znovu promíchá (koagulace sraženiny). Přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.2) (poznámka 8.5) se titruje odměrným roztokem thiokyanatanu amonného (3.3) do právě vzniklého červenohnědého zabarvení roztoku, které vydrží asi 1 minutu (spotřeba V_1).

U vzorků rybích mouček se odvažuje asi 5 g vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do kónické baňky, přidá se asi 50 ml horké vody, promíchá, dále přidá přesně 50,0 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.2) a 20 ml kyseliny dusičné (3.1). Baňka se zakryje hodinovým sklíčkem, umístí na pískovou lázeň nebo topnou desku (4.1), uvede do varu a po dobu 15 minut se mírně vaří. Potom se obsah baňky ochladí, hodinové sklíčko se opláchne vodou do baňky, vodou upraví objem asi na 50 ml, přidá 5 ml síranu železitoamonného (3.4) jako indikátoru a titruje se odměrným roztokem thiokyanatanu amonného (3.3) do právě vzniklého červenohnědého zabarvení roztoku, které vydrží alespoň 30 sekund (spotřeba V_1) (poznámka 8.5).

Vedle toho se provede slepá zkouška s použitím stejného množství použitých činidel, zejména přesně stejný přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného, jako při vlastní analýze vzorku (spotřeba V_2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah ve vodě rozpustných chloridů vyjádřených jako chlorid sodný (NaCl) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{(V_2 - V_1) \cdot C \cdot 58,443}{m}$$

kde V_2 je spotřeba odměrného roztoku thiokyanatanu amonného na slepou zkoušku v ml

V_1 spotřeba odměrného roztoku thiokyanatanu amonného na vlastní vzorek v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,5 g/kg do obsahu 10 g/kg a na 1 g/kg pro obsahy nad 10 g/kg.

7. Opakovatelnost

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

do 10 g/kg 0,5 g/kg

nad 10 g/kg 5 % relat.

(rybí moučky 10 % relat.)

8. Poznámky

8.1 Aceton, n-hexan a diethylether jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto je nutné při jakékoli manipulaci s nimi dodržovat příslušná bezpečnostní pravidla.

8.2 U krmiv s vyšším obsahem tuku než 50 g/kg se navážka zkušební vzorku nejdříve odtuční alespoň částečně, promytím diethyletherem nebo n-hexanem dekantací s odlitím extrakčního činidla.

8.3 U minerálních přísad a rybích mouček se Carresova činidla ani aktivní uhlí nepřidávají.

8.4 Vzorky tepelně opracovaných krmiv, lněných pokrutin a šrotů či směsí s jejich převážným obsahem popř. koloidní povahy (dextrinový škrob a pod.) se před filtrací odstředí popř. se filtruje dekantací a 100 ml supernatantu nebo dekantátu se odpipetuje do odměrné baňky na 200 ml, doplní acetonem (3.8) po značku, promíchá a teprve nyní filtruje, jak v textu uvedeno.

8.5 Titraci lze též provést potenciometricky přímo odměrným roztokem dusičnanu stříbrného do potenciálu ekvivalenčního bodu, indikovaného pomocí stříbrné a merkurosulfátové elektrody. Hodnota ekvivalenčního bodu se určí z průběhu titrační křivky při modelovém stanovení chloridů (jako inflexní bod titrační křivky). V tomto případě se neprovádí slepá zkouška, nepřidává se síran železitoamonný a výpočtový vzorec bude:

$$X = \frac{V_3 \cdot C_1 \cdot 58,443}{m}$$

kde V_3 je spotřeba odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v ml

C_1 přesná koncentrace odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku

7.7 Stanovení obsahu celkových uhličitánů

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení uhličitánů v krmných směsích. Metodou se stanoví celkové uhličitany, s výjimkou uhličitánů nerozložitelných kyselinou chlorovodíkovou (např. uhličitánů železa) a je použitelná pro obsahy od 5 do 100 g/kg. Navíc umožňuje modifikaci pro vyšší i nižší obsahy při zvláštních kalibracích.

2. Princip

Uhličitany se stanoví po rozkladu vzorku kyselinou chlorovodíkovou a vzniklý oxid uhličitý se změří v kalibrované trubici volumetricky nebo manometricky.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.2 Uhličitán vápenatý, srážený, pevný - standardní látka pro kalibraci

3.3 Vzorek krmiva pro kalibraci, neobsahující uhličitany (např. obilní šrot a pod.)
(poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Přístroj nebo zařízení, umožňující kvantitativní rozklad uhličitánů ve vzorku, v uzavřené reakční nádobce s vhodným dávkovacím zařízením a spojené citlivým volumetrem nebo manometrem (vodní sloupec a pod.)

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do reakční nádoby (poznámka 8.2) přístroje či zařízení pro stanovení uhličitánů (4.1) se odváží 0,20 g uhličitánu vápenatého jako standardní látky, přidá se do 10 g vzorku krmiva pro kalibraci a obsah se promíchá.

5.1.2 Pak se do reakční nádoby přidá 50 ml vody (poznámka 8.3) a obsah se promíchá. Do dávkovacího zařízení přístroje, které bude plynotěsně spojeno s reakční nádobkou, se odměří 10 ml (poznámka 8.4) roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), dávkovací zařízení se připojí k reakční nádobce a tato se připojí k měřicímu zařízení (4.1). Potom se pomalu, ale nepřerušovaně z dávkovacího zařízení připustí roztok kyseliny chlorovodíkové (3.1) a kohout dávkovacího zařízení se ihned uzavře (poznámka 8.5). Reakční nádobou se intenzívně třepe buď přímo v ruce ale tak, aby se obsah reakční nádoby nezahříval teplem dlaně, nebo vhodným třepacím zařízením, až do okamžiku, kdy dojde k ustálení měřené hodnoty objemu

(tlaku). Vyčká se ještě asi 2 minuty a zjistí se naměřená hodnota. Potom se pomalu uvolní uzávěr reakční nádoby za účelem vyrovnaní tlaku a nastavení přístroje na nový vzorek.

5.1.3 Stejný postup se provede s navážkami uhličitanu vápenatého (3.2) o hmotnostech 0,50 g; 0,70 g; 0,90 g a 1,00 g (poznámka 8.6), které odpovídají obsahům uhličitanů 50 ; 70 ; 90 a 100 g/kg. Každá navážka se doplní do 10,0 g vzorkem krmiva pro kalibraci (3.3).

Z naměřených hodnot (objemu či tlaku) a jim odpovídajících koncentrací odpovídajících obsahů se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

Do reakční nádoby přístroje či zařízení pro stanovení uhličitanů (4.1) se odváží 10,00 g zkušební vzorku (poznámka 8.7) a dále se postupuje podle 5.1.2 .

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah veškerých uhličitanů, vyjádřených jako CaCO_3 se zjistí přímo z kalibračního grafu (poznámka 8.8).

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aby byl zaručen nulový obsah uhličitanů je nutné provést slepou zkoušku za naprosto stejných podmínek (nezjistí se žádný významný vzrůst objemu či tlaku).

8.2 Pokud není dáno samou konstrukcí přístroje či zařízení, je nutné používat vždy stejné reakční nádoby, a to jak pro kalibraci tak i vlastní provedení stanovení nebo mít k dispozici nádoby, které vůči sobě nevykazují žádné rozdíly. Je nutné předem ověřit.

8.3 Množství přídavku vody se řídí podle obsahu reakční nádoby (pro uvažovaný postup se předpokládá objem reakčních nádobek 200 ml) resp. podle návodu k přístroji nebo zařízení.

8.4 Množství přidané kyseliny může být případně odlišné podle návodu k použitému přístroji či zařízení.

8.5 Uzavření přívodu z dávkovacího zařízení musí být provedeno dostatečně rychle, aby výsledek nebyl zkreslen změnou objemu či tlaku zvětšením reakčního prostoru. Doporučuje se uzavřít přívod dříve než vyteče poslední malý podíl kyseliny. Především je nutno dodržet stejné podmínky při kalibraci i vlastním provedení

8.6 Uvedené kalibrační dávky jsou příkladem a mají být voleny podle návodu přístroje či zařízení pro stanovení uhličitanů i s ohledem na obsahy uhličitanů, které budou stanovovány.

8.7 Uvedená navážka zkušební vzorku je určena pro krmné směsi, obsahující 20 g/kg až 70 g/kg uhličitanů, vyjádřených jako CaCO_3 za předpokladu, že měřicí zařízení je pro tyto obsahy konstruováno a tuto navážku zkušebních vzorků kalibrováno. Pro vyšší (nižší) obsahy se volí obvykle např. poloviční (dvojnásobná) navážka zkušební vzorku i kalibrace za

těchto podmínek. Pro indikační stanovení vyšších obsahů uhličitánů, než na které je provedena kalibrace se odvažuje polovina (čtvrtina atd.) navážky zkušebního vzorku a doplní se do 10,0 g vzorkem krmiva pro kalibraci. Výsledek se pak vynásobí dvěma (čtyřmi atd.).

8.8 Pro vyjádření obsahu veškerých uhličitánů jako:

NaHCO_3 platí přepočet = $X \cdot 0,8393$,

Na_2CO_3 platí přepočet = $X \cdot 1,059$

MgCO_3 platí přepočet = $X \cdot 0,8424$

kde X je obsah veškerých uhličitánů, vyjádřených jako CaCO_3 .

7.8 Stanovení oxidů křemíku, hliníku, vápníku a hořčíku (ve vápencích)

1. Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení uvedených oxidů ve vápencích.

2. Princip

Nerozpustný zbytek po rozpouštění vzorku v kyselině chlorovodíkové se vytaví s uhličitanem sodným, tavenina se vylouží kyselinou chlorovodíkovou a po spojení s původním filtrátem se odpaří do sucha. Vyloučená sraženina se odfiltruje, spálí, zváží a po odkouření s kyselinou fluorovodíkovou a sírovou znovu zváží. Obsah oxidu křemičitého se určí z rozdílu obou vážení.

Ve filtrátu po stanovení oxidu křemičitého se amoniakem vysráží hydroxidy, které se po odfiltrování a spálení určí vážkově jako oxidy amoniakální skupiny.

Ve filtrátu po stanovení oxidů trojmocných kovů se chelatometrickou titrací stanoví oxid vápenatý a suma oxidů vápenatého a hořečnatého.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 1)

3.2 Kyselina dusičná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 4)

3.3 Uhličitan sodný, bezvodý

3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok 1%

3.5 Kyselina sírová ($\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 4)

3.6 Kyselina fluorovodíková ($\rho = 1,128 \text{ g/cm}^3$), roztok 40%

3.7 Tetraboritan disodný, dekahydrát, pevný

3.8 Chlorid amonný, pevný

3.9 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.10 Amoniak ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$), roztok 10%, prostý uhličitanů

3.11 Methylová červeň, ethanolický roztok 0,5%

3.12 Dusičnan amonný, roztok 1%, neutralizovaný amoniakem na methylovou červeň

3.13 Hydroxid draselný, roztok 20%

3.14 Disodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové dihydrát, odměrný roztok c(chelaton 3) = 0,05 mol/l

Příprava: 18,62 g chelatonu 3 se rozpustí ve vodě a doplní v odměrné baňce na 1000 ml a promíchá.

3.15 Fluorexon, rozetřený s pevným chloridem draselným v poměru (1 + 100)

3.16 Tlumivý roztok, pH 10

Příprava: 350 ml 20% roztoku amoniaku se smíchá s 54 g chloridu amonného (3.8) a doplní se převařenou vodou na 1000 ml

3.17 Eriochromčern T, rozetřená s pevným chloridem draselným v poměru (1+100)

3.18 Dusičnan sodný, pevný

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Vodní nebo písková lázeň

4.2 Sušárna elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.

4.3 Muflová pec, elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C.

4.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

5. Postup

5.1 Stanovení oxidu křemičitého

Do kádinky o objemu 600 ml se naváží asi 1 g zkušebního vzorku s přesností 0,001 g, zakryje se hodinovým sklem a pozvolna se přidává 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a opatrně se povaří 10 minut na pískové lázni (4.1). Po mírném ochlazení se přidá 1 ml kyseliny dusičné (3.2) a opět se 5 minut povaří. Objem roztoku se doplní asi na 150 ml, zahřeje se k varu a po ochlazení se zfiltruje hustým filtrem (filtrát A).

Filtr s nerozpuštěným zbytkem se vysuší a spálí ve spalovací misce (4.4). Po vychladnutí se zpopelněný zbytek vytaví s 5 g uhličitanu sodného (3.3) za přidání 0,1 g dusičnanu sodného (3.18). Během tavení se obsah kelímku několikrát promíchá krouživým pohybem. Po skončení tavení se obsah kelímku nechá vychladnout a tavenina se vylouží horkou vodou v kádince. Po rozpuštění taveniny se kelímek vyjme a opláchne teplou vodou do kádinky. Roztok z kádinky se spojí s filtrátem A, zakryje se hodinovým sklem a opatrně se přidá 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) (roztok B). Kelímek se přežihne, zbytky taveniny ulpělé na stěnách se rozpustí v kyselině chlorovodíkové (3.1) a přidají se k roztoku B. Takto získaný roztok se zahřeje, aby se vypudil oxid uhličitý a po opláchnutí hodinového skla se odpařuje na vodní nebo pískové lázni (4.1) do sucha. Odparek se ovlhčí kyselinou chlorovodíkovou (3.1) a opět se odpaří do sucha. Miska s odparkem se vloží do sušárny (4.2), kde se ponechá půl hodiny při teplotě (110 ± 2) °C. K odparku se ještě za tepla přidá 30 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), nechá se stát 5 až 10 minut na teplém místě, poté se přidá 100 ml horké vody a důkladně se promíchá skleněnou tyčinkou. Po desetiminutovém stání se vyloučená kyselina křemičitá odfiltruje filtrem střední hustoty a filtrát se zachycuje do podstavené kádinky. Zbytek na filtru se promyje nejprve horkou kyselinou chlorovodíkovou (3.4) a potom horkou vodou.

Protože jedním odpařením se zpravidla nevyloučí veškerá kyselina křemičitá kvantitativně, je nutno filtrát znovu odpařit do sucha. Dále se postupuje stejně jako při prvním odpařování. Pro druhou filtraci se použije hustého filtru. Oba filtry s vyloučenou kyselinou křemičitou se vloží do spalovací misky (4.4), vysuší se a spálí v muflové peci (4.3) při teplotě (1100 ± 25) °C po dobu 2 hodin. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek zváží. Žihání a vážení se opakuje,

pokud se nedosáhne konstantní hmotnosti. Obsah kelímku se ovlhčí vodou, přidá se 0,5 ml kyseliny sírové (3.5), 15 ml kyseliny fluorovodíkové (3.6) a odkouří se na pískové lázni (4.1) do sucha. Odkouření s kyselinou sírovou a fluorovodíkovou se ještě jednou opakuje. Kelímek se zbytkem se opatrně vyžihá na kahanu a po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Rozdíl hmotnosti před a po odkouřování odpovídá obsahu oxidu křemičitého.

5.1.1 Příprava zásobního roztoku

Zbytek po odkouření se vytaví se směsí 0,5 g uhličitanu sodného (3.3) a 0,1 g tetraboritanu disodného (3.7). Tavenina se rozpustí v 10 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a přidá se k filtrátu po stanovení oxidu křemičitého. Filtrát se převede do 500 ml odměrné baňky, po ochlazení se doplní vodou po rysku a promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se použije pro další stanovení.

5.2 Stanovení oxidů amoniakální skupiny

Ze zásobního roztoku po oddělení kyseliny křemičité se odpipetuje vhodné množství do kádinky. Zahustí se odpařováním na vodní nebo pískové lázni (4.1) na objem 100 ml a přidají se 2 g chloridu amonného (3.8). Roztok se zahřeje k varu, zoxiduje se několika kapkami kyseliny dusičné (3.9) a krátce se povaří. Ještě za tepla se sráží po kapkách roztokem amoniaku (3.10) do změny zbarvení indikátoru methylové červeně (3.11). Přidají se 3 kapky roztoku amoniaku (3.10) navíc. Roztok se ponechá na teplém místě až se sraženina dokonale vyloučí a usadí. Zfiltruje se filtrem střední hustoty a promyje horkým roztokem dusičnanu amonného (3.12), filtrát se jímá do kádinky (použije se při stanovení oxidu vápenatého a hořečnatého). Sraženina se přímo na filtru rozpustí 20 ml teplé kyseliny chlorovodíkové (3.1), přičemž se filtrát zachycuje do kádinky, ve které se provádělo srážení amoniakem. Filtr se důkladně promyje teplou vodou a uschová. Filtrát se opět zahustí na objem 100 ml a hydroxidy se znovu vysráží roztokem amoniaku (3.10). Sraženina hydroxidů se zfiltruje filtrem střední hustoty a důkladně promyje teplým roztokem dusičnanu amonného (3.12), až do vymizení reakce na chloridové ionty. Filtrát se jímá do stejné kádinky jako při předchozí filtraci. Filtr se sraženinou s filtrem po prvním srážení se vloží do předem vyžíhané a zvážené spalovací misky (4.4) vysuší se v sušárně (4.2), spálí a vyžihá v muflové peci (4.3) při $(1100 \pm 25) ^\circ\text{C}$ do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží.

Obsahuje-li vzorek malé množství oxidů amoniakální skupiny, použije se celý objem zásobního roztoku po oddělení oxidu křemičitého. Pro stanovení oxidů amoniakální skupiny, je možno použít též filtrátu po stanovení kyselinou nerozpustného podílu popele.

5.3 Stanovení oxidu vápenatého

Filtrát po stanovení oxidů amoniakální skupiny se doplní na definovaný objem a z něho se odpipetuje alikvotní podíl do vysoké kádinky o obsahu 400 ml, zředí se vodou na 200 - 250 ml a za míchání se rychle zalkalizuje 20 ml hydroxidu draselného (3.13), uvede se do mírného varu a po vypuzení amoniaku se ochladí. Přidá se malé množství indikátoru fluorexonu (3.15) a titruje se na černém podkladě roztokem chelatonu (3.14) právě do vymizení žlutozelené fluorescence.

5.4 Stanovení oxidu hořečnatého

Filtrát po stanovení oxidů amoniakální skupiny se doplní na definovaný objem a z něho se odpipetuje alikvotní podíl do vysoké kádinky o obsahu 400 ml, zředí se vodou na 200 - 250 ml a za míchání se rychle zalkalizuje asi 20 ml tlumivého roztoku (3.16) na pH 10. Z byrety se přidá stejný objem roztoku chelatonu (3.14), jaký se spotřeboval na titraci při stanovení oxidu

vápenatého. Přidá se malé množství indikátoru eriochromčerni T (3.17) a titruje se roztokem chelatonu z vínově červeného zabarvení do kovově modrého.

6. Výsledek

6.1 Obsah oxidu křemičitého v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = 10^3 \cdot \frac{m - m_1}{m_0}$$

kde m je hmotnost vyžíhaného surového oxidu křemičitého v g

m_1 hmotnost vyžíhaného zbytku po odkouření v g

m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.2 Obsah oxidu amoniakální skupiny v g/kg (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = 10^3 \cdot \frac{m_1}{m_0}$$

kde m_1 je hmotnost vyžíhaných oxidů v g

m_0 hmotnost alikvotního podílu navážky zkušební vzorku v g

6.3 Obsah oxidu vápenatého (Z) v g/kg se vypočte podle vzorce:

$$Z = \frac{56,08 \cdot C \cdot V \cdot V_2}{m \cdot V_3}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu 3 v mol/l

V_2 objem zásobního roztoku v ml

V_3 objem zásobního roztoku, pipetovaný ke stanovení v ml

m hmotnost alikvotního podílu navážky zkušební vzorku v g

6.4 Obsah oxidu hořečnatého (U) v g/kg se vypočte podle vzorce:

$$U = \frac{40,304 \cdot C \cdot V_2 \cdot (V_1 - V)}{m \cdot V_3}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 podle bodu 5.3 v ml

V_1 spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 podle bodu 5.4 v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu 3 v mol/l

V_2 objem zásobního roztoku v ml

V_3 objem zásobního roztoku, pipetovaný ke stanovení v ml

m hmotnost alikvotního podílu navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky nebo desetiny g /kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Opakovatelnost pro stanovení oxidu křemičitého

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 2 g/kg.

7.2 Opakovatelnost pro stanovení oxidů amoniakální skupiny

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

do 10 g/kg	0,7 g/kg
od 10,1 do 25 g/kg	1,0 g/kg
od 25,1 do 50 g/kg	1,5 g/kg
od 50,1 do 100 g/kg	2,5 g/kg
nad 100 g/kg	4,0 g/kg

7.3 Opakovatelnost pro stanovení oxidu vápenatého

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 4,5 g/kg.

7.4 Opakovatelnost pro stanovení oxidu hořečnatého

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

do 10 g/kg	1,5 g/kg
nad 10 g/kg	3 g/kg.

7.9 Stanovení celkového obsahu síry

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu síry v krmivech. Je vhodná pro všechny obsahy síry v krmivech i krmných směsích.

2. Princip

Síra se stanoví vázkově po zpopelnění vzorku s přidavkem dusičnanu hořečnatého a vysrážením jako síran barnatý z chloridového výluhu popele.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.2 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.3 Amoniak ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$), zředěný (1 + 4)

3.4 Chlorid barnatý, roztok 100 g/l

3.5 Indikátor acidobázický - Fenolová červen

Příprava: 0,1 g indikátoru se rozpustí v 50 ml ethylalkoholu za slabého zahřívání a roztok se doplní vodou na 100 ml.

3.6 Dusičnan hořečnatý heptahydrát ($\text{Mg}_2\text{NO}_3 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), roztok ethanolický

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 360,0 g dusičnanu hořečnatého rozpustí se v ethylalkoholu a doplní se jím po rysku a promíchá.

3.7 Dusičnan amonný (NH_4NO_3), pevný

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Miska odpařovací porcelánová na 100 ml

4.2 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C.

4.3 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.

4.4 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická

4.5 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event. Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

5. Postup

Do porcelánové odpařovací misky (4.1) se odváží asi 1 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 10 ml roztoku dusičnanu hořečnatého (3.6) a miska se na 10 minut odstaví. Potom se obsah misky vysuší v sušárně (4.3) při 120 °C a zpopelní v muflové peci (4.2) při teplotě (450 ± 25) °C po dobu 4 hod (poznámka 8.1).

Popel se ovlhčí vodou, přidá 6 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1), výluh se krátce povaří a filtruje za horka středně hustým filtrem do kádinky 400 ml. Promyje se asi třikrát horkou vodou, filtrát se několik minut povaří, zneutralizuje roztokem amoniaku (3.3) na indikátor fenolovou červen (3.5) do změny zabarvení a potom upraví vodou na objem 200 ml. Tento roztok se zahřeje k varu, přidá se 1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), a najednou 30 ml horkého roztoku chloridu barnatého (3.4) (poznámka 8.2).

Po vysrážení se roztok se sraženinou opět na několik minut zahřeje a potom se ponechá stát po několik hodin, nejlépe do druhého dne. Sraženina se filtruje přes bezpopelný hustý filtr (poznámka 8.3) a promývá horkou vodou až již nový přírůstek filtrátu nedává pozitivní reakci na chloridy. Filtr se sraženinou se vysuší a spálí ve spalovací misce, předem vyžíhané a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g, při teplotě (550 ± 25) °C v muflové peci (4.2). Po spálení a ochlazení v exsikátoru se miska se sraženinou zváží se stejnou přesností.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah síry v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce

$$X = \frac{137,4 \cdot m}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.4})$$

kde m je hmotnost vyvážky v g

m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg pro obsahy do 30 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy nad 30 g/kg síry.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Pokud se získá šedý vyžíhaný zbytek, přidá se po ochlazení ke zbytku krystalek dusičnanu amonného a provede se přežíhání při uvedené teplotě.

8.2 Při obsahu síry do 10 g/kg, postačuje pro vysrážení 30 ml roztoku chloridu barnatého.

8.3 Při filtraci se doporučuje přidat předem rozvařenou drť bezpopelného filtračního papíru.

8.4 Uvedený vzorec platí pro výpočet obsahu síry, vyjádřené v elementární formě (S). Pro jiná vyjádření platí dále uvedené přepočty: - jako $\text{SO}_2 \cdot X \cdot 1,998$

- jako SO_3 . X .2,498

- jako SO_4 . X .2,997

kde X je obsah síry v g/kg

7.10 Stanovení obsahu vápníku

Metoda ES převzata ze směrnice komise 71/250/EHS (OJ L155, 12/7/1971)

1. Účel a rozsah

Metoda umožňuje určit celkový obsah vápníku v krmivech.

2. Princip

Vápník se mineralizuje na suché cestě a popel se podrobí působení kyseliny chlorovodíkové (solné) a vápník se vysráží jako šťavelan vápenatý. Sraženina se rozpustí v kyselině sírové a uvolněná kyselina šťavelová se titruje, roztokem manganistanu draselného.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková (solná), p. a., h : 1,14.
- 3.2 Kyselina dusičná, p. a., h: 1,40.
- 3.3 Kyselina sírová, p. a., h: 1,13.
- 3.4 Amoniak (čpavek), p. a., h: 0,98.
- 3.5 Šťavelan amonný p. a., nasycený roztok (za studena).
- 3.6 Kyselina citrónová p. a., 30 % roztok (w/v)
- 3.7 Chlorid amonný p. a., 5 % roztok (w/v)
- 3.8 bromokresolová zeleň, 0,04 % roztok (w/v).
- 3.9 Manganistan draselný, odměrný roztok 0,1 N=0,02 M.

4. Přístroje.

- 4.1 Elektrická muflová pírka se vzduchovou cirkulací a termostatem.
- 4.2 Platinové, křemíkové nebo porcelánové misky na žíhání.
- 4.3 Filtrační skleněné kelímky, s pórovitostí G4.

5. Postup.

Do spalovací misky se naváží přibližně 5 g vzorku (v případě potřeby i více), ± 1 mg. Spauje se při teplotě 550°C a popel se přenese do 250ml kádinky.

Přidá se 40 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), 60 ml vody a několik kapek kyseliny dusičné (3.2). Přivede se k varu a udržuje se v mírném varu po dobu 30 minut. Ochladí se a roztok se přelije do 250ml odměrné baňky. Kádinka se vypláchne do odměrné baňky, obsah baňky se doplní vodou po rysku, promíchá a zfiltruje.

Do baňky na 250 ml se odpítuje takový objem filtrátu, aby obsahoval 10-40 mg vápníku (podle předpokládaného obsahu). Přidá se 1 ml roztoku kyseliny citrónové (3.6) a 5 ml roztoku chloridu amonného (3.7).

Doplní se vodou na přibližně 100 ml. Uvede se do varu, potom se přidá osm až deset kapek roztoku bromkresolové zeleně (3.8) a 30 ml horkého roztoku šťavelanu amonného (3.5). Pokud se začne tvořit sraženina, rozpustí se několika kapkami kyseliny chlorovodíkové (3.1).

Za stálého míchání se velmi pomalu neutralizuje čpavkem až se dosáhne pH 4,4 – 4,6, to znamená až indikátor změní barvu. Kádinka se vloží do lázně s vařící vodou a ponechá se tam po dobu třiceti minut tak, aby se vytvořená sraženina mohla usadit. Kádinka se vyjme z vodní lázně, obsah se nechá hodinu ustát a pak se přefiltruje přes filtrační kelímek G4.

Kádinka i kelímek se vymývají vodou až se přebytek šťavelanu amonného úplně odstraní (nepřítomnost chloridu ve vymývací vodě ukazuje, že obě nádoby jsou dostatečně vymyty).

Sraženina na filtru se rozpustí v 50 ml horké kyseliny sírové (3.3). Kelímek se vypláchne horkou vodou a filtrát se doplní až na přibližně 100 ml. Teplota se zvýší na 70 – 80°C a titruje se po kapkách odměrným roztokem manganistanu draselného (3.9) až se objeví růžové zabarvení, které setrvá jednu minutu.

6. Výpočet výsledků.

Jeden ml odměrného roztoku manganistanu draselného (3.9) odpovídá 2,004 mg vápníku. Výsledek se vyjádří jako procento ze vzorku.

7. Poznámky.

7.1 Při velmi nízkém obsahu vápníku postupovat takto:

Šťavelan vápenatý se přefiltruje přes bezpopelný filtr. Po promytí se filtr vysuší a spálí při teplotě 550°C v platinovém kelímku. Zbytek po spálení se znovu rozpustí v několika kapkách kyseliny sírové (3.3.), odpaří se do sucha, znovu se spálí při teplotě 550°C a nakonec se zváží. Jestliže W je váha získaného síranu vápenatého, alikvotní podíl obsahu vápníku = $W \cdot 0,2944$.

7.2 Jestliže vzorek je složen pouze z minerálních látek, rozpouští se v kyselině chlorovodíkové, bez předchozího zpopelnění. V případě látek, jako např. fosforečnan hlinito-vápenatý, které se v kyselině nesnadno rozpouštějí, musí se před rozpouštěním podrobit alkalickému tavení : Vzorek se důkladně promíchá v platinovém kelímku se směsí pětinasobku jeho hmotnosti, skládající se ze stejných dílů uhličitanu draselného a uhličitanu sodného. Opatrně se zahřívá až je směs úplně roztavena. Potom se vychladí a rozpustí v kyselině chlorovodíkové.

7.3 Jestliže má vzorek vysoký obsah hořčíku, provede se přesrážení šťavelanu vápenatého.

8.1 Stanovení obsahů mědi, železa, manganu a zinku

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení mědi, železa, manganu a zinku v krmivech a premixech. Uvedenými metodami lze stanovit všechny formy uvedených prvků.

2. Princip

Měď, železo, mangan a zinek se stanoví v krmivech po zpopelnění, rozpuštěním popele vzorku v kyselině chlorovodíkové (minerální premixy přímým rozpouštěním v kyselině chlorovodíkové) a měřením chloridového výluhu metodou atomové absorpční spektrometrie.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 0,3 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 20)

3.4 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.5 Acetylén, (poznámka 8.1)

3.6 Standardní roztoky mědi, železa, manganu a zinku

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží pro

3.6.1 měď: 3,929 g pentahydrát síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

3.6.2 železo: 8,635 g dodekahydrátu síranu železitoamonného ($\text{NH}_4\text{FeSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

3.6.3 mangan: 4,388 g pentahydrátu síranu manganatého ($\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) nebo 4,060 g tetrahydrátu síranu manganatého ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

3.6.4 zinek: 4,398 g heptahydrátu síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) nebo 1,000 g granulovaného zinku

Navážené soli (kovy) se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2) a každá z baněk se doplní tímto roztokem po rysku.

Tyto standardní roztoky obsahují teoreticky 1,0 mg příslušného prvku v 1 ml. Skutečný obsah prvků ve standardních roztocích se stanoví chelatometricky.

Roztoky se uchovávají v plastických nádobách.

Jako základní standardní roztoky je možno použít i komerční roztoky s deklarovanou (ověřenou) koncentrací prvku.

3.7 Pracovní standardní roztok měď

Příprava: Standardní roztok mědi se 10 krát zředí kyselinou chlorovodíkovou (3.2)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr absorpční atomový včetně příslušenství

4.2 Lázeň vodní

4.3 Miska platinová, křemenná či porcelánová (případně opatřené víčky)

4.4 Pec muflová s termostatem

5. Postup

5.1 Příprava kalibračních roztoků (poznámka 8.2)

Do sady odměrných baněk na 1 000 ml se diferencovaně odpipetuje :

5.1.1 pro měď

2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku mědi (3.7), doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 0,25 mg až 2,5 mg mědi v 1000 ml.

5.1.2 pro železo

2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku železa (3.6.2), doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 2 až 10 mg železa v 1000 ml.

5.1.3 pro mangan

2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku manganu (3.6.3), doplní po rysku roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 2 až 10 mg manganu v 1000 ml.

5.1.4 pro zinek

0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 ml standardního roztoku zinku (3.6.4), doplní po rysku roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 0,5 mg až 2,5 mg zinku v 1000 ml.

5.1.5 Sestrojení kalibračních grafů

Kalibrační roztoky (roztoky zkoušeného vzorku) se proměří na atomovém absorpčním spektrometru (4.1) po nastavení příslušných parametrů podle typu a návodu použitého přístroje za použití plamene acetylén (3.5) - vzduch. Roztokem s nulovým obsahem stanovovaného prvku (3.2) se přístroj nastaví na nulovou hodnotu a pro jednotlivé prvky se použijí následující vlnové délky :

pro měď 324,8 nm

železo 248,3 nm

mangan 279,5 nm

zinek 213,8 nm

Ze získaných hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí příslušné kalibrační grafy.

5.2 Vlastní provedení v krmivech

5.2.1 Do spalovací misky (4.3) se odváží, podle předpokládaného obsahu prvků, asi 5 g až 20 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, zpopelní za dostatečného přístupu vzduchu v muflové peci (4.4) při teplotě $(550 \pm 20) ^\circ\text{C}$ tak, jak je uvedeno v Příloze 9, část 6.1 Stanovení popele.

5.2.2 Získaný popel se po vychladnutí zvlhčí vodou, vylouží 30 ml roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.1), digeruje na vodní lázni (4.2) (vroucí) po dobu 30 minut a pak filtruje hustým filtrem do podložené odměrné baňky na 200 ml. Zbytek na filtru se důkladně promyje zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (3.3).

5.2.3 Filtr se zbytkem se vysuší, zpopelní za výše uvedených podmínek (asi po dobu 30 minut), obsah spalovací misky se po vychladnutí vylouží 20 ml teplého roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a výluh se filtruje hustým filtrem do téže odměrné baňky. Zbytek na filtru se promyje 5krát teplou zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (3.3). Obsah odměrné baňky se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou po rysku a promíchá. Podle očekávaného obsahu jednotlivých prvků se tento výluh měří buď přímo, nebo po potřebném naředění pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2). Dále se postupuje podle 5.1.5..

5.2.4 Naměřené koncentrace příslušného prvku se zjistí z příslušného kalibračního grafu.

5.3 Vlastní provedení v minerálních premixech

Do kádinky vhodného obsahu se odváží 5 g až 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 30 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a dále se postupuje podle 5.2.2, 5.2.3 a 5.2.4.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah příslušného prvku (mědi, železa, manganu a zinku) v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce

$$X = \frac{200 \cdot C \cdot F}{m_0}$$

kde C je koncentrace příslušného prvku zjištěná z příslušného kalibračního grafu v mg/l

m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Acetylén ve směsi se vzduchem je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Uvedené koncentrace kalibračních roztoků jsou jako příklad. Konkrétní řešení závisí na použitém přístroji, jeho citlivosti a pod. Při jiných než uvedených koncentracích je nutno upravit výpočtový vzorec.

8.2 Stanovení obsahu mědi, železa, manganu, a zinku včetně obsahu vápníku, hořčíku, draslíku a sodíku

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení mikroprvků železa, mědi, manganu, zinku a makroprvků vápníku, sodíku, draslíku a hořčíku v krmivech.

2. Princip

Vzorek se převede do roztoku kyselinou chlorovodíkovou, pokud je třeba po zpopelnění při $(550 \pm 10) ^\circ\text{C}$, případně po odstranění kysličníku křemičitého a uvedené prvky se stanoví, po vhodném naředění, metodou atomové absorpční spektrometrie.

3. Chemikálie

Úvodní poznámky:

Pro přípravu činidel a analytických roztoků se používá voda, která neobsahuje prvky, které jsou stanovovány. Taková voda se získá buď dvojí destilací v borosilikátové nebo křemenné destilační aparatuře nebo dvojitým průchodem přes ionexovou kolonu.

Chemikálie musí minimálně p.a. čistoty a musí být ověřeno, že neobsahují stanovované prvky slepým pokusem. Pokud je třeba musí být použité chemikálie přečištěny.

Kromě standardů uvedených dále mohou být použity obchodní standardy, pokud mají zaručený obsah (atest) a před použitím byly zkontrolovány

3.1 Acetylén (poznámka 8.1)

3.2 Kyselina chlorovodíková (HCl), koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,3 \text{ mol/l}$

3.5 Dusičnan lanthanitý hexahydrát $[\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, roztok 133 g/l

Mohou být použity i jiné soli lanthanu, pokud výsledná koncentrace lanthanu v roztoku bude stejná

3.6 Chlorid cesný (CsCl), roztok 100 g/l

Mohou být použity i jiné soli cesia, pokud výsledná koncentrace cesia v roztoku bude stejná.

3.7 Standardní roztoky mědi, železa, manganu a zinku

Příprava: Do odměrné baňky 1000 ml se odměří 100 ml vody, 125 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá. Do stejné baňky se naváží:

392,9 mg pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),

702,2 mg hexahydrátu síranu železnatoamonného $[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$

307,7 mg monohydrátu síranu manganatého ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
439,8 mg heptahydrátu síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Po rozpuštění solí se baňka doplní vodou po rysku a roztok se promíchá.
Standardní roztok obsahuje 100 μg uvedených prvků v 1 ml.

K přípravě standardního roztoku se mohou použít také obchodní standardy s deklarovanou (ověřenou) koncentrací prvku.

3.8 Pracovní standardní roztoky mědi, železa, manganu a zinku

Příprava: Do odměrné na 100 ml se odpipetuje 20 ml standardního roztoku (3.7), doplní se vodou po rysku a promíchá.

Pracovní standardní roztok obsahuje 20 μg uvedených prvků v 1 ml.

Pracovní standardní roztoky se připravují vždy čerstvé

3.9 Standardní roztoky vápníku, draslíku, hořčíku a sodíku Příprava: Do odměrné baňky 1000 ml se naváží:

1,907 g chloridu draselného (KCl)

2,028 g heptahydrátu síranu hořečnatého ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

2,542 g chloridu sodného (NaCl)

Do kádinky se naváží 2,497 g uhličitanu vápenatého (CaCO_3), přidá se pomalu 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a po skončení vývoje kyslíčnicku uhličitého se roztok povaří 5 minut na topné desce. Po vychlazení se roztok převede do odměrné baňky s naváženými solemi draslíku, hořčíku a sodíku. Až se soli rozpustí, se baňka doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.4) po rysku a roztok se promíchá.

Standardní roztok obsahuje 1 mg vápníku, draslíku a sodíku a 200 μg hořčíku v 1 ml.

K přípravě standardního roztoku se mohou použít také obchodní standardy s deklarovanou (ověřenou) koncentrací prvku.

3.10 Pracovní standardní roztoky vápníku, draslíku, hořčíku a sodíku

Příprava: Do odměrné na 250 ml se odpipetuje 25 ml standardního roztoku (3.9), doplní se kyselinou chlorovodíkovou (3.4) po rysku a promíchá.

Pracovní standardní roztok obsahuje 100 μg vápníku, draslíku a sodíku a 20 μg hořčíku v 1 ml.

Pracovní standardní roztoky jsou stále jeden týden a skladují se v polyetylenových lahvích.

3.11 Lanthanocesiový slepý roztok

Příprava: Do odměrné baňky 100 ml se odměří 5 ml roztoku dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml roztoku chloridu cesného, 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3), doplní se vodou po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Veškeré odměrné nádoby (včetně pipet), které se použije při přípravě kalibračních roztoků se musí před použitím opláchnout kyselinou chlorovodíkovou (3.4)

- 4.2 Platinové, křemíkové nebo porcelánové spalovací kelímky (horní průměr 4 - 6 cm, spodní průměr 2 - 2,5 cm, výška asi 5 cm) předem vyvařené v kyselině chlorovodíkové (3.3)
- 4.3 Elektrická muflová pec s automatickou kontrolou teploty a záznamem
- 4.4 Skleněné nádobí, borosilikátové, před použitím vyvařené v kyselině chlorovodíkové (3.3)
- 4.5 Elektrická topná deska nebo plynový kahan
- 4.6 Vodní lázeň s možností regulace 95 ± 2 °C
- 4.7 Atomový absorpční spektrometr, vhodný pro měření při uvedených vlnových délkách, vybavený plamenem vzduch-acetylen a možností korekce pozadí

5. Postup

5.1 Zjištění přítomnosti organické hmoty

Lžička se vzorkem se vloží do plamene - pokud dojde k tání, vzorek organickou hmotu neobsahuje, pokud dojde ke změně barvy a tání se neobjeví, vzorek organickou hmotu obsahuje.

5.2 Spalování a příprava roztoku pro analýzu

Do spalovacího kelímku (4.2) se podle předpokládaného obsahu prvků naváží 1 - 5 g vzorku, s přesností 0,001 g.

Pokud vzorek obsahuje organickou hmotu postupuje se podle odstavce 5.2.1.

Pokud vzorek neobsahuje téměř žádnou nebo žádnou organickou hmotu, postupuje se podle odstavce 5.2.2.

5.2.1 Kelímek se vzorkem se zahřívá na topné desce nebo v plameni plynového kahanu až do úplného zuhelnatění. Během zahřívání je nutno zabránit vzplanutí vzorku. Potom se kelímek vloží do muflové pece (4.3), předehřáté 15 minut na teplotu (550 ± 10) °C a při této teplotě se ponechá 3 hodin. Po vychladnutí se obsah kelímku ovhlčí 2 ml vody. Pokud jsou přítomny uhlíkaté částice, vysuší se kelímek na vodní lázni (4.6) a spaluje se další 2 hodiny při teplotě (550 ± 10) °C v muflové peci (4.3). Znovu se nechá vychladnout a přidají se 2 ml vody.

5.2.2 K obsahu kelímku se přidá pomalu a opatrně (možný vývoj kysličníku uhličitého) 10 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3). Potom se za stálého míchání přidává po kapkách další kyselina chlorovodíková (3.3), dokud neustane pění. Roztok se občasného míchání zahřívá až do odpaření téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a vzniklý roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky o objemu 100 ml. Po vychladnutí se doplní vodou po rysku.

5.3 Slepý pokus

Pro každou měřenou sérii se připraví slepý pokus (roztok) tak, že se provedou operace 5.2, 5.2.1 a 5.2.2 s vyloučením zkušebního vzorku.

5.4 Spektrometrické stanovení mědi, železa, manganu a zinku

5.4.1 Podmínky měření

Atomový absorpční spektrometr se nastaví podle instrukcí výrobce, optimalizuje se pro měření acetylém-vzduch. Měření se provádí při následujících vlnových délkách:

Měď (Cu) :	324.8 nm
Železo (Fe):	248.3 nm
Mangan (Mn):	279.5 nm
Zinek (Zn) :	213.8 nm

5.4.2 Příprava kalibračních křivky

Z pracovního standardního roztoku (3.8) se připraví naředěním kyselinou chlorovodíkovou (3.4) série kalibračních roztoků s odpovídající koncentrací.

Změří se absorbance kalibračních roztoků proti kyselině chlorovodíkové (3.4) a sestrojí se kalibrační křivka naměřených hodnot proti odpovídajícímu obsahu mědi, železa, manganu a zinku.

5.4.3 Měření zkoušeného roztoku

Absorbance zkoušeného roztoku se měří za stejných podmínek jako absorbance kalibračních roztoků proti slepému pokusu resp. kyselině chlorovodíkové (3.4). Pokud je třeba ředí se zkoušené roztoky kyselinou chlorovodíkovou (3.4), aby se získala absorbance ležící v lineární části kalibrační křivky.

5.5 Spektrometrické stanovení vápníku, hořčíku, draslíku a sodíku

5.5.1 Podmínky měření

Atomový absorpční spektrometr se nastaví podle instrukcí výrobce, optimalizuje se pro měření acetylém-vzduch. Měření se provádí při následujících vlnových délkách:

Vápník (Ca):	422,6 nm
Hořčík (Mg):	285,2 nm
Draslík (K):	766,5 nm
Sodík (Na) :	589,6 nm

5.5.2 Příprava kalibračních křivky

Do odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje 5 ml dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml chloridu cesného (3.6), 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a vhodný objem pracovního standardního roztoku (3.10) a doplní se po rysku.

Změří se absorbance kalibračních roztoků proti lanthanocesiovému slepému roztoku (3.11) a sestrojí se kalibrační křivka naměřených hodnot proti odpovídajícímu obsahu vápníku, hořčíku, draslíku a sodíku.

5.5.3 Měření zkoušeného roztoku

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml chloridu cesného (3.6), 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a vhodný objem zkoušeného roztoku a doplní se po rysku.

Také ke slepému pokusu se přidává 5 ml dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml chloridu cesného (3.6), 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a doplní se na 100 ml.

Absorbance naředěného zkoušeného roztoku se měří za stejných podmínek jako absorbance naředěných kalibračních roztoků proti slepému pokusu, resp. lanthancesiovému slepému roztoku (3.11). Pokud je třeba ředit se zkoušené roztoky lanthanocesiovým slepým roztokem (3.11), aby se získala absorbance ležící v lineární části kalibrační křivky.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah jednotlivých prvků v mg/kg nebo g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace příslušného prvku, odečtená z kalibračního grafu v mg/l nebo g/l

F faktor ředění

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se při obsahu:

10 - 100 mg/kg s přesností na 1 mg

100 mg/kg - 1 g/kg s přesností na 10 mg

1 g/kg - 10 g/kg s přesností na 100 mg

10 g/kg - 100 g/kg s přesností na 1 g.

7. Opakovatelnost

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

pro vápník, železo, draslík, hořčík a mangan	0,11 .X mg/kg
pro měď, sodík a zinek	0,15 .X mg/kg

kde X je výsledek stanovení.

Uvedená opakovatelnost platí pro obsahy:

vápníku od 1 000 - 300 000 mg/kg

mědi 15 - 15 000 mg/kg

železo 2 000 - 30 000 mg/kg

hořčík 1 000 - 110 000 mg/kg

mangan 15 - 15 000 mg/kg

sodík 2 000 - 250 000 mg/kg

zinek 25 - 15 000 mg/kg

8. Poznámky

8.1 Acetylén je nebezpečná hořlavina, proto je třeba při jakékoli manipulaci s ním dodržovat bezpečnostní pravidla

8.3 Stanovení obsahu mědi, železa, manganu a zinku

Metoda EU uvedená v Official Journal no. L 206, 29/7/78

1. Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení mědi, železa, manganu a zinku v krmivech a premixech. Dolní mez stanovitelnosti je pro železo :

	20 mg/kg
měď	10 mg/kg
hořčík	20 mg/kg
zinek	20 mg/kg

2. Princip

Vzorek se převede do roztoku kyselinou chlorovodíkovou po destrukci organické hmoty, pokud je přítomna. Obsah mědi, železa, manganu a zinku se stanoví po vhodném naředění metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS).

3. Chemikálie

Úvodní poznámka

Pro přípravu chemikálií a reakčních a analytických roztoků se používá voda bez stanovovaných kationtů, získaná buď dvojí destilací v aparatuře z borosilikátového skla nebo dvojitým průchodem před ionex. Chemikálie musí být nejméně analytické čistoty (p.a). Nepřítomnost stanovovaných mikroelementů musí být ověřována slepým pokusem. Pokud je to nezbytné, musí být chemikálie přečištěny.

Místo dále popsanych standardních roztoků mohou být používány také komerční standardní roztoky. Mohou být používány za předpokladu, že mají deklarované obsahy a před použitím byly zkontrolovány.

3.1 Kyselina chlorovodíková, $\rho = 1,19$

3.2 Kyseliny chlorovodíková, roztok 6 mol/l

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok 0,5 mol/l

3.4 Kyselina fluorovodíková, roztok 38 – 40% (v/v) s obsahem železa pod 10 mg/l (vyjádřeno jako síran)

3.5 Kyselina sírová, $\rho = 1,84$

3.6 Peroxid vodíku (asi 100 objemů kyslíku = 30% hmotnostních)

3.7 Železo, standardní roztok 1 000 $\mu\text{g Fe / ml}$, připravený takto :

1 g železného drátu se rozpustí v 200 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2), přidá se 16 ml peroxidu vodíku (3.6) a objem se upraví vodou na 1000 ml.

3.7.1 Železo, pracovní standardní roztok 100 $\mu\text{g/ml}$, připravený zředěním standardního roztoku (3.7) 1+9 vodou

3.8 Měď, standardní roztok 1 000 µg Cu / ml, připravený takto :

1 g práškové mědi se rozpustí v 25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2), přidá se 5 ml peroxidu vodíku (3.6) a objem se upraví vodou na 1000 ml.

3.8.1 Měď, pracovní standardní roztok 10 µg/ml, připravený dvojnásobným zředěním standardního roztoku (3.8) 1+9 vodou

3.9 Hořčík, standardní roztok 1 000 µg Mg / ml, připravený takto :

1 g práškového hořčíku se rozpustí v 25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a objem se upraví vodou na 1000 ml.

3.9.1 Hořčík, pracovní standardní roztok 10 µg/ml, připravený dvojnásobným zředěním standardního roztoku (3.8) 1+9 vodou

3.10 Zinek, standardní roztok 1 000 µg Zn / ml, připravený takto :

1 g lístků nebo proužků kovového zinku se rozpustí v 25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a objem se upraví vodou na 1000 ml.

3.10.1 Zinek, pracovní standardní roztok 10 µg/ml, připravený dvojnásobným zředěním standardního roztoku (3.8) 1+9 vodou

3.11 Chlorid lanthanitý, roztok připravený takto :

12 g oxidu lantanitého se rozpustí v 150 ml vody, přidá se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a objem se upraví vodou na 1000 ml.

4. Přístroje

4.1 Muflová pec s teplotní regulací a záznamem

4.2 Skleněné nádoby z odolného borosilikátového skla, doporučuje se používat pouze pro stanovení mikroelementů (poznámka 10.1)

4.3 Spalovací kelímky platinové nebo křemenné

4.4 Atomový absorpční spektrometr, vyhovující požadavkům metody na citlivost a přesnost v použitém rozsahu

5. Postup

5.1 Vzorky, obsahující organickou hmotu

5.1.1 Spalování a příprava roztoku pro analýzu

Do platinového nebo křemenného spalovacího kelímku (4.3) se naváží 5 až 10 g vzorku s přesností 0,2 mg (poznámka 10.2), vysuší se v sušárně při 105 °C a potom se kelímek vloží do studené muflové pece (4.1). Pec se uzavře (poznámka 10.3) a teplota se postupně zvyšuje během 90 minut na 450 až 475 °C. Tato teplota se udržuje 4 až 16 hodin (např. přes noc), aby se odstranila karbonizovatelná hmota. Potom se pec otevře a kelímek se nechá vychladnout (poznámka 10.4).

Kelímek se vypláchne celkem 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) do kádinky. Kyselina se přidává pomalu a opatrně (může docházet k uvolňování CO₂). Dále se po kapkách přidává kyselina chlorovodíková (3.1), dokud neustane pění. Odpaří se do sucha za občasného

promíchání skleněnou tyčinkou. Ke zbytku se přidá dalších 15 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a asi 120 ml vody. Promíchá se skleněnou tyčinkou, která musí zůstat v kádince, kádinka se přikryje hodinovým sklem. Uvede se do mírného varu a vaří se dokud se popel rozpouští.

Roztok se zfiltruje přes bezpopelný filtr a filtrát se jímá do 250 ml odměrné baňky. Kádinka a filtr se promyjí 5ml horké kyseliny chlorovodíkové (3.2) a dvakrát vřící vodou. Odměrná baňka se doplní vodou po značku (výsledná koncentrace kyseliny je asi 0,5 mol/l).

Pokud se na filtru objeví zbytky uhlíkatých částic, vloží se filtr zpět do pece a znovu se spaluje při 450 až 475 °C. Toto spalování, které vyžaduje obvykle pouze několik hodin (asi 3 až 4 hodiny), je dokončeno pokud má popel bílou nebo převážně bílou barvu. Popel se rozpustí asi ve 2 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), odpaří se k suchu a přidá se 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Povaří se a roztok se zfiltruje do odměrné baňky a baňka se doplní po značku (výsledná koncentrace kyseliny je asi 0,5 mol/l).

Zelená krmiva (čerstvá nebo sušená) mohou obsahovat velké množství křemičitanů, které mohou vázat mikroelementy a musí být pro odstaněny.

U krmiv s vysokým obsahem křemičitanů se postupuje podle 5.1.1 až k filtraci. Promytý filtr s nerozpustným zbytkem se umístí do spalovacího kelímku (4.3). Spaluje se v muflové peci (4.1) při teplotě pod 550 °C do úplného vymizení uhlíkatých částic. Nechá se vychladnout, přidá se několik kapek vody a 10 až 15 ml kyseliny fluorovodíkové (3.4) a potom se odpaří do sucha. Přidá se 5 kapek kyseliny sírové (3.5) a zahřívá se dokud vznikají bílé dýmy. Po přidání 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a asi 30 ml vody se roztok povaří a opět zfiltruje do téže 250 ml odměrné baňky a doplní vodou po značku (koncentrace kyseliny je asi 0,5 mol/l). Dále se postupuje podle bodu 5.1.2.2.

5.1.2 Spektrofotometrické stanovení

5.1.2.1 Příprava kalibračních roztoků

Pro každý stanovovaný prvek se připravují kalibrační roztoky z pracovních standardních roztoku, uvedených v bodech 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 a 3.10.1. Výsledná koncentrace kyseliny chlorovodíkové v kalibračních roztocích je asi 0,5 mol/l a (v případě železe, hořčíku a zinku) konečná koncentrace chloridu lantanitého v kalibračních roztocích je 0,1% (w/v). Koncentrace kalibračních roztoků musí ležet v rozsahu citlivosti použitého spektrometru. Dále uvedená tabulka je příkladem obvyklých kalibračních rozsahů, které však závisí na citlivosti použitého přístroje. Je možné použít i jiný rozsah koncentrací.

Železo

μg Fe / ml	0	0,5	1	2	3	4	5
prac.std.roztok (3.7.1) (ml)	0	0,5	1	2	3	4	5
Kys. chlorovodíková (3.2) (ml)	7	7	7	7	7	7	7
Roztok chloridu lantanitého (3.11) (ml)	10	10	10	10	10	10	10

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetují množství roztoků podle uvedené tabulky a doplní se vodou po značku.

Měď

μg Cu / ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
prac.std.roztok (3.8.1) (ml)	0	1	2	4	6	8	10

Kys. chlorovodíková (3.2) (ml)	8	8	8	8	8	8	8
--------------------------------	---	---	---	---	---	---	---

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetují množství roztoků podle uvedené tabulky a doplní se vodou po značku.

Hořčík

μg Mg / ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
prac.std.roztok (3.8.1) (ml)	0	1	2	4	6	8	10
Kys. chlorovodíková (3.2) (ml)	7	7	7	7	7	7	7
Roztok chloridu lantanitého (3.11) (ml)	10	10	10	10	10	10	10

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetují množství roztoků podle uvedené tabulky a doplní se vodou po značku.

Zinek

μg Zn / ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
prac.std.roztok (3.10.1) (ml)	0	0,5	1	2	4	6	8
Kys. chlorovodíková (3.2) (ml)	7	7	7	7	7	7	7
Roztok chloridu lantanitého (3.11) (ml)	10	10	10	10	10	10	10

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetují množství roztoků podle uvedené tabulky a doplní se vodou po značku.

5.1.2.2 Příprava roztoků pro vlastní stanovení

Pro stanovení mědi se roztoky připravené podle bodu 5.1.1 mohou použít přímo. Pokud je nutné upravit koncentraci podle rozsahu kalibrační křivky, je možné odpipetovat alikvotní podíl do 100 ml odměrné baňky a doplnit ji po značku 0,5 mol/l kyselinou chlorovodíkovou (3.3)

Pro stanovení železa, manganu a zinku se odpipetuje alikvotní podíl roztoku připraveného podle 5.1.1 do 100 ml odměrné baňky, přidá se 10 ml roztoku chloridu lantanitého (3.11) a doplní se po značku 0,5 mol/l kyselinou chlorovodíkovou (3.3) (poznámka 10.5).

5.1.2.3 Slepý pokus

Slepý pokus musí zahrnovat všechny předepsané kroky uvedeného postupu s vyloučením navážky zkušební vzorku.

Kalibrační roztok „0“ nesmí být použit jako slepý pokus.

5.1.2.4 Měření atomové absorpce

Kalibrační roztoky a roztoky zkoušených vzorků se měří v oxidačním plameni kyslík - acetylén při následujících vlnových délkách :

Železo 248,3 nm

Měď 324,8 nm

Mangan 279,5 nm

Zinek 213,8 nm

Každé měření se provádí čtyřikrát.

5.2 Minerální krmiva

Pokud zkoušený vzorek neobsahuje organickou hmotu, není spalování nutné. Postupuje se podle druhého odstavce bodu 5.1.1. Také odpařování s kyselinou flourovodíkovou může být vynecháno.

6. Výpočet

Koncentrace prvku v měřeném roztoku se vypočte z kalibrační křivky a výsledek se vyjádří jako mg stanovovaného mikroprvku v kilogramu vzorku.

7. 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.

8. Reprodukovatelnost

Nestanovena.

9. 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.

10. Poznámky

10.1 Při stanovení mikroelementů je důležité zabránit riziku kontaminace, zejména u zinku, mědi a železa. Z tohoto důvodu musí být veškeré pomůcky použité při tomto stanovení prosté těchto prvků. Aby se snížilo obecné riziko kontaminace, je vhodné pracovat v bezprašné atmosféře na úzkostlivě čistém zařízení a s pečlivě umytým skleněným nádobím. Na kontaminaci z různých zdrojů (ze skleněného nádobí, chemikálií, prachu a podobně) je zejména citlivé stanovení zinku.

10.2 Navážka vzorku na spalování se vypočte podle předpokládaného obsahu mikroprvku v krmivu ve vztahu k citlivosti přístroje. U některých krmiv je vzhledem k nízkému obsahu prvku nutné zvýšit navážku na 10 – 20 g a snížit konečný objem roztoku na 100 ml.

10.3 Spalování musí být prováděno v uzavřené peci bez vhánění vzduchu nebo kyslíku.

10.4 Teplota na teploměru pece nesmí překročit 475 °C.

10.5 Přítomnost velkého množství fosforečnanů interferuje při stanovení železa, manganu a zinku. Tato interference se koriguje přidáním roztoku chloridu lantanitého (3.11). Pokud je poměr hmotnosti $\frac{Ca + Mg}{P} > 2$ může být přidávání roztoku chloridu lanthanitého do kalibračních roztoků i do roztoku vzorku vynecháno.

9.1 Stanovené volné, vázané a celkové kyselosti vodního výluhu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení volné, vázané i celkové kyselosti vodního výluhu. Je použitelná pro všechna krmiva.

2. Princip

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

Vázaná kyselost vodního výluhu se stanoví po uvolnění vazeb vnitřní neutralizace formaldehydem alkalimetrickou titrací do hodnoty $\text{pH} = 8,5$ nebo na indikátor fenolftalein.

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

3. Chemikálie

3.1 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ nebo

3.2 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ (poznámka 8.1)

3.3 Formaldehyd, roztok 10 %

3.4 Thymol, pevný

3.5 Indikátor fenolftalein 0,1% v ethylalkoholu

3.6 Voda destilovaná, zneutralizovaná na $\text{pH} = 8,5$ nebo na indikátor fenolftalein

4. Přístroje a pomůcky

4.1 pH metr vhodné konstrukce s příslušenstvím (elektrody)

4.2 Míchačka elektromagnetická s míchadlem

5. Postup

5.1 Volná kyselost

Do kádinky na 400 ml se odváží přesně 10,00 g zkušební vzorku, pipetou přidá přesně 200 ml vody (3.6), obsah kádinky se promíchá a nechá volně vyluhovat při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Během této doby se obsah kádinky nejméně 3krát promíchá. Pak se obsah kádinky filtruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky (poznámka 8.2), přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje .

Z tohoto filtrátu (supernatantu), který je možno konzervovat zrnkem thymolu (3.4), se odpipetuje 100 ml do kádinky na 250 ml, kádinka se umístí na elektromagnetickou míchačku (4.2), vloží míchadlo a za studena se titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.1)

(poznámka 8.1) do $\text{pH} = 8,5$ nebo do právě vzniklého červenofialového zabarvení indikátoru fenolftaleinu (3.5), které vydrží alespoň 30 sekund (spotřeba V_1).

5.2 Vázaná kyselost

9.2 Stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích. Je použitelná pro všechny druhy i obsahy kyselosti.

2. Princip

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

3. Chemikálie

3.1 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.2 Síran kobaťnatý heptahydrát ($\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), srovnávací roztok 50 g/l

3.3 Indikátor fenolftalein, roztok 20 g/l ethylalkoholu 96 %

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Třepačka vhodné konstrukce

4.2 Mikroburet s dělením po 0,05 ml

5. Postup

Do 200 ml odměrné baňky (se širokým hrdlem) se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, vzorek se nejprve rozmíchá s malým množstvím vody tak, aby se netvořily hrudky, přidá se asi 100 ml vody a umístí na třepačku (4.1) (poznámka 8.1), po uzátkování baňky se protřepává 10 minut, potom se sejme, doplní vodou po rysku a promíchá. Obsah se filtruje (poznámka 8.2) suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Z tohoto filtrátu se odpipetuje do dvou titračních baněk po 50 ml, do jedné z nich se přidá 1 ml roztoku síranu kobaťnatého (3.2) (srovnávací roztok), do druhé 2 ml indikátoru fenolftaleinu (3.3) a ihned se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.1) do právě vzniklého zabarvení, jaké má srovnávací roztok, které potrvá alespoň 30 sekund.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Kyselost vodního výluhu v mmol/kg (X) nebo ve stupních °SH (Y) (poznámka 8.3) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot V \cdot C}{m}$$

$$Y = \frac{1000 \cdot V \cdot C}{2,5 \cdot m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l;

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

Přepočet: °SH = 2,5 mmol/l

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celá čísla.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Výluh je možné připravit bez vytřepávání na třepačce, jen s občasným zamícháním, ale v tomto případě po dobu 30 minut.

8.2 Filtrace potřebného množství by neměla trvat déle než 10 minut. Jinými způsoby oddělení pevného podílu je nechat tento usadit nebo jej odstředit a pipetovat pečlivě potřebný podíl, aby se nezvířila hladina.

8.3 V některých současných normách nebo předpisech se uvádí namísto jednotky "°SH" jednotka "2,5 mmol/kg", která je zcela ekvivalentní.

Ke ztitrovanému roztoku, podle 5.1, se přidá 5 ml roztoku formaldehydu (3.3), těsně před použitím zneutralizovaného na pH = 8,5 nebo na indikátor fenolftalein, přičemž pH titrovaného roztoku se sníží resp. dojde k odbarvení roztoku.

Z opět naplněné byrety se titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.1) (poznámka 8.1) do hodnoty pH = 8,5 nebo do právě vzniklého červenofialového zbarvení indikátoru, které vydrží alespoň 30 sekund (spotřeba V_2).

Obě stanovení musí být provedena během 30 minut, při konzervaci výluhu thymolem tentýž den.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Volná kyselost vodního výluhu v mg KOH/100 g vzorku (X) nebo v mmol/kg vzorku (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{5611 \cdot V_1 \cdot C}{m}$$

$$Y = \frac{1000 \cdot V_1 \cdot C}{m}$$

6.2 Vázaná kyselost vodního výluhu v mg KOH/100 g vzorku (X_1) nebo v mmol/kg vzorku (Y_1) se vypočítá podle vzorce:

$$X_1 = \frac{5611 \cdot V_2 \cdot C}{m}$$

$$Y_1 = \frac{1000 \cdot V_2 \cdot C}{m}$$

6.3 Celková kyselost vodního výluhu v mg KOH/100 g (Z) nebo v mmol/kg vzorku (Z_1) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = X + X_1$$

$$Z_1 = Y + Y_1$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu draselného (sodného) při postupu podle 5.1 v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu draselného (sodného) při postupu podle 5.2 v ml

T přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného (sodného) mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g (podle přesně dodržené popsané metodiky je to polovina navážky zkušebního vzorku)

Přepočet:

$$mgKOH / 100gvzorku = mmol / kgvzorku \cdot 5,611$$

$$mmol / kgvzorku = \frac{mgKOH / 100gvzorku}{5,611}$$

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky.

7. Opakovatelnost

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

8. Poznámky

8.1 Pro titraci je možno použít i odměrného roztoku hydroxidu sodného, avšak vyjádření je vždy v mg KOH, resp. v mmol/kg

8.2 Pro obtížně filtrovatelná krmiva nebo krmiva, jejichž částice se nezachytí filtrací, je možno oddělit výluh odstředěním.

10.1 Stanovení kyseliny kyanovodíkové

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny kyanovodíkové volné i vázané v glukosinolátech v krmivech, zejména v lněném semeni, maniokové mouce a v některých druzích bobů.

2. Princip

Vzorek se rozmíchá ve vodě, kyselina kyanovodíková se uvolní enzymaticky a vodní parou se předestiluje do okyseleného roztoku dusičnanu stříbrného. Vzniklý kyanid stříbrný se oddělí filtrací a zbylý dusičnan stříbrný se stanoví titračně thiokyanatanem amonným.

3. Chemikálie

3.1 Suspense sladkých mandlí

Příprava: 20 oloupaných mandlí se rozdrtí a rozmíchá ve 100 ml vody 37 - 40 °C teplé. Proveďte se ověření, že 10 ml suspense neobsahuje žádnou kyselinu kyanovodíkovou, buď pomocí pikrátového papírku nebo se proveďte slepý pokus podle závěru odstavce 5.

3.2 Octan sodný, roztok 10% zneutralizovaný na indikátor fenolftalein

3.3 Odpěňovací emulze (např. silikonový olej)

3.4 Kyselina dusičná HNO_3 , koncentrovaná ($\rho=1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.5 Dusičnan stříbrný, odměrný roztok $c(\text{AgNO}_3) = 0,02 \text{ mol/l}$

Příprava: 3,3978 g dusičnanu stříbrného, předem vysušeného 2 hod při teplotě 150 °C a ochlazeného v exsikátoru, se odváží do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Thiokyanatan amonný, odměrný roztok $c(\text{NH}_4\text{SCN}) = 0,02 \text{ mol/l}$

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 1,5224 g thiokyanatanu amonného (NH_4SCN), rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 Síran železitoamonný dodekahydrát $[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2] \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, nasycený roztok

3.8 Amoniak ($\rho=0,91 \text{ g/cm}^3$), roztok 10%

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Termostat s regulací teploty

- 4.2 Destilační přístroj na přehánění vodní parou spojený s chladičem se zahnutým připojeným kusem
- 4.3 Baňka destilační 1000 ml s plochým dnem s kulatou skleněnou zátkou
- 4.4 Olejová lázeň

5. Postup

Do destilační baňky (4.3) se naváží asi 20 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,005 g, přidá se 50 ml vody a 10 ml suspence sladkých mandlí (3.1). Baňka se zazátkuje a umístí se na 16 hodin do termostatu (4.1) vyhřátého na 38 °C. Po vyjmutí se baňka ochladí, přidá se 80 ml vody, 10 ml roztoku octanu sodného (3.2) a kapka odpěňovací emulze (3.3).

Baňka se připojí k destilačnímu přístroji (4.2) a upevní se do olejové lázně (4.4) předem vyhřáté na teplotu mírně nad 100 °C. Vydestiluje se 200 - 300 ml při důkladném prohánění proudem vodní páry a mírném zahřívání olejovou lázní. Destilát se jímá do 50 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) s 1 ml kyseliny dusičné (3.4) v kuželové baňce chráněné před světlem, přičemž konec chladiče musí být ponořen do jímacího roztoku.

Potom se obsah kuželové baňky převede kvantitativně do 500 ml odměrné baňky, doplní po rysku vodou, promíchá a filtruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž se první podíl filtrátu nezachycuje. (poznámka 8.1). Do titrační baňky se odpipetuje 250 ml filtrátu, přidá se asi 1 ml roztoku síranu železitoamonného (3.7) a přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného se stanoví titrací odměrným roztokem thiokyanatanu amonného (3.6).

Slepý pokus může být proveden, pokud je třeba, podle stejného postupu, ale bez vlastního vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah kyseliny kyanovodíkové v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{54,06 \cdot (C_1 \cdot V_1 - C_2 \cdot V_2)}{m}$$

kde V_1 je alikvotní objem odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v ml

C_1 přesná koncentrace odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v mol/l

C_2 přesná koncentrace odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

1 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) odpovídá 0,54 mg kyseliny kyanovodíkové (HCN)

Od obsahu kyseliny kyanovodíkové ve vzorku se musí odečíst hodnota slepého pokusu (pokud byl prováděn).

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Pokud vzorek obsahuje velké množství síranů (např. fazole) dochází k tvorbě nerozpustného síranu stříbrného, který je odfiltrován společně s kyanidem stříbrným a tím dochází ke ztrátě odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5).

V takovém případě se postupuje takto:

Na sraženinu na filtru se působí 50 ml roztoku amoniaku (3.8), aby se rozpustil kyanid stříbrný. Dále se filtr promyje zředěným amoniakem a ve filtrátu se stanoví obsah stříbra a přepočte se na dusičnan stříbrný (3.5).

Obsah kyseliny kyanovodíkové ve vzorku může být také stanoven titrací okyseleného amoniakálního filtrátu kyselinou dusičnou.

10.4 Stanovení obsahu glukosinolátů v řepce

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení nejdůležitějších glukosinolátů v semeni řepky.

2. Princip

Glukosinoláty se extrahují vřelou vodou z extrahovaného řepkového šrotu za současné inaktivace myrosinázy. Odparek extraktu se silyluje směsí hexamethyldisilazanu a trimethylchlorsilanu v prostředí pyridinu a silylované glukosinoláty se stanoví metodou plynové chromatografie.

3. Chemikálie

- 3.1 Petrolether, obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)
- 3.2 Pyridin bezvodý, předestilovaný
- 3.3 Sinigrin (Kalium myronat - např. Serva kat.č. 35150) roztok 500 mg/100 ml
- 3.4 Hexamethyldisilazan pro plyn.chromatografii (dále jen HMDS)
- 3.5 Trimethylchlorsilan pro plyn.chromatografii (dále jen TMCS)
- 3.6 Dusík žárovkárenský
- 3.7 3% OV - 1 On Chromosorb W - HP 80/100 mesh

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Přístroj extrakční podle Soxhleta, nejméně s 10 refluxními cykly za 1 hod nebo podle Twisselmana s průtokem nejméně 10 ml za min. nebo automatický extrakční přístroj Soxtec (poznámka 8.1)
- 4.2 Plynový chromatograf s příslušenstvím
- 4.3 Sušárna elektrická s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou
- 4.4 Odstředivka (zkumavková)
- 4.5 Vysokoobrátkový mlýnek (tříštivý)
- 4.6 Silylační ampule

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

Jestliže je vzorek semene řepky vlhčí než 7% je nutno jej vysušit přes noc v sušárně při teplotě 45 °C. Suchý vzorek semene se rozemele na tříštivém mlýnku (4.5) tak, aby nejméně 50% vzorku prošlo sítím s oky 0,2 mm.

5.2 Extrakce

5 - 10 g šrotu řepky se nasype do extrakční patrony a extrahuje petroletherem (3.1) po dobu 3 hodin. Vyextrahovaný řepkový šrot (řepková mouka) se nechá volně vysušit na vzduchu v digestoři přes noc.

Do odstředivkové zkumavky se naváží 100 mg odtučněného řepkového šrotu a zkumavka se vloží do vodní lázně teplé 95 °C. Po jedné minutě se do zkumavky přidá 1 ml vařící vody (poznámka 8.2) a zkumavka se volně uzavře zátkou. Po dalších 2 minutách se do zkumavky přidá 1 ml vnitřního standardu sinigrinu (3.3) a extrahuje se dalších 25 minut. Potom se zkumavka ochladí na laboratorní teplotu a odstředí (4.4) po dobu 3 minut při 5000 - 6000 ot./min. Z čirého extraktu se odpipetuje 0,5 ml do kónické silylační ampule (4.6) a odpaří se do sucha při 95 °C proudem vzduchu. Dosuší se 20 minut v sušárně (4.3) při teplotě 103 ± 2 °C.

5.3 Derivatizace

Do silylační ampule (4.6) s odparkem se přidá směs 1 ml pyridinu (3.2), 0,4 ml HMDS (3.4) a 0,2 ml TMCS (3.5) a ampule se uzavře. Silyluje se nejméně 120 min při teplotě 120 °C (poznámka 8.3) .

Po skončení silylace se zkumavka ochladí a po otevření se obsah rychle přelije do odstředivkové zkumavky a zazátkuje. Odstřeďuje se při 6 000 ot/min po dobu 7 minut. Vzorek se opatrně dekantuje do vzorkovnice k nástřiku na chromatografickou kolonu.

5.4 Vlastní proveden plynové chromatografie

Obsah glukosinolátů se stanoví metodou plynové chromatografie podle návodu ke konkrétnímu plynovému chromatografu (4.2) a za podmínek, odpovídajícím použité koloně

Kolona : Chromosorb W - HP - 80/100 mesh, 3% OV - 1

Dusík (3.6): 40 ml / min.

Vodík (3.8): 40 ml / min.

Vzduch : 400 ml / min.

Teplota : termostatu kolon : 232 °C (isotherm.)

nástřikové komory : 270 °C

detektoru : 290 °C

Nástřík : 1 - 3 µl

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah glukosinolátů v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1 \cdot P_v \cdot 1000}{P_s \cdot m_0}$$

kde m_1 je navážka vnitřního standardu v mg

P_V součet ploch jednotlivých glukosinolátů ve vzorku

P_S plocha píku vnitřního standardu

m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v mg

Pro přepočet obsahu glukosinolátů v % na obsah glukosinolátů v μmol platí vzorec:

$$GSL(\mu\text{mol}) = 24,08 \cdot GSL(\%)$$

Znečištění semeny hořčice se na chromatogramu projeví píkem allylsinolátu a 4-hydroxybenzyl sinolátu. Přítomnost allyl sinolátu se zjistí z nástřiku vzorku bez přidání vnitřního standardu (sinigrin = allylsinolát). Při vyhodnocení vzorku s přidaným vnitřním standardem se musí od plochy píku allyl sinolátu (vnitřní standard + příspěvek znečištění) odečíst plocha daná znečištěním.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na celé jednotky.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether a vodík jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Přídavek 1 ml vařící vody ke šrotu ve zkumavce se provede tak, aby nedošlo k ochlazení obsahu zkumavky pod 95 °C a aby došlo k dokonalému smočení šrotu ve vodě.

8.3 Silylační činidlo je nutno přidávat jen k jednomu vzorku časově tak, aby byla minimálně vystavena atmosférické vlhkosti.

10.5 Stanovení obsahu 5-vinyl-2-thiooxazolidonu (goitrinu)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vinylthiooxazolidonu (dále jen VOT) v krmivech.

Metoda stanovení VOT je použitelná pro obsahy od 200 mg/kg.

2. Princip

Ze vzorku krmiva je enzymaticky uvolněn 2-hydroxy-3-butenyl-isothiokyanát, ze kterého vzniká VOT a ten se stanoví metodou plynové nebo vysokotlaké kapalinové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 Petrolether, bod varu 40 - 60 °C, bromové číslo nižší než 1 (poznámka 8.1)

3.2 Chloroform

3.3 Kyselina citrónová monohydrát, roztok 2,1 g/100 ml

3.4 Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), roztok 35,8 g/500 ml

3.5 Tlumivý roztok pH 7

Příprava: Smíchá se 82,4 ml roztoku hydrogenfosforečnanu disodného (3.4) a 17,6 ml roztoku kyseliny citrónové (3.3)

3.6 Bílá hořčice (*Sinapis alba*), nerozdrcená semena, ne starší než 2 roky

Příprava: Semena se před použitím jemně umelou a extrahují se za studena petroletherem (3.1). Preparovaná mletá hořčice musí obsahovat aktivní thioglukosidasu (myrosinasu) a nesmí obsahovat více než 500 mg VOT/kg

3.7 VOT, standardní látka

3.8 VOT, standardní roztok

Příprava: Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg VOT (3.7) s přesností nejméně 0,001 g a rozpustí se v chloroformu (3.2). Baňka se doplní chloroformem po rysku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 500 µg VOT

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Laboratorní mlýnek nebo mixér, vhodné konstrukce

4.2 Vodní lázeň, nastavitelná na 45 °C

4.3 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím (kyvety o obsahu 100 ml, uzavíratelné zátkou)

4.4 Plynový chromatograf s plamenoionizačním detektorem. Následující podmínky mohou sloužit jako vodítko

4.4.1 Sloupec: skleněný s vnitřním průměrem 2-6 mm, délka 1,5 - 2,5 m

4.4.2 Nosný materiál: vypraný v kyselině a silanisovaný - např. Gas Chrom Q nebo Diatomine CLQ, zrnitost 80 - 100 mesh (150-190 µm) a 100-120 mesh (125-150 µm) (poznámka 8.3)

4.4.3 Stacionární fáze: 5% OV 17 (poznámka 8.2)

4.4.4 Teplota sloupce: 160-175 °C

4.4.5 Nástřikový blok: přímý nástřik do sloupce

4.4.6 Detektor: minimálně 20 °C nad teplotou sloupce

4.4.7 Nosný plyn: dusík, průtok 30 ml/min

4.5 Vysokotlaký kapalinový chromatograf

4.5.1 Sloupec: nerezová ocel, vnitřní průměr 4,6 mm, délka 15 cm

4.5.2 Náplň sloupce: křemenný gel, průměrná velikost částic 5µm např. Partisil 5, Lichrosorb SI 60 nebo Spherisorb 5 (poznámka 8.4)

4.5.3 Mobilní fáze: směs 2,2,4-trimethylpentan-ethylalkohol 4 + 1, rychlost průtoku 1 ml/min

4.5.4 Detektor: UV, pracovní rozsah 255 nm

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

Část vzorku se semele tak, aby prošla beze zbytku přes síto 1 mm a aby při mletí nedošlo k zahřátí vzorku. Stanovení se musí provést ihned po semletí.

5.2 Příprava extraktu

Do odstředivací kyvety (4.3) se naváží asi 2 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,005 g. Pokud vzorek obsahuje více než 50 g/kg tuku se přidá 25 ml petroletheru (3.1), třepe se asi 2-3 minuty, odstředí se a vrchní vrstva se odlije. Přidá se dalších 25 ml petroletheru, rozmíchá, protřepe opět 2-3 minuty a znovu odstředí, vrchní vrstva se odlije a zbylé rozpouštědlo se odstraní proudem vzduchu. K odtučněnému vzorku (nebo původnímu s obsahem tuku nižším než 50 g/kg) v kyvetě se přidá 15 ml tlumivého roztoku (3.5) a 0,2 g bílé hořčice (3.6) navážené s přesností nejméně 0,01 g. Kyveta se uzavře zátkou a důkladně se protřepe. Potom se kyveta vloží na 90 minut do vodní lázně vyhřáté na 45 °C (4.2).

Po této době se kyveta vyjme a nechá vychladnout. Pipetou se do kyvety přidá 40 ml chloroformu (3.2), kyveta se dobře uzavře a obsah se protřepává 2 minuty. Kyveta se vloží do odstředivky (4.3) a odstředí se tak dlouho, až je kapalina nad sedimentem zcela čirá. Část chloroformové vrstvy se odebere do vysušené, dobře uzavíratelné reagenční lahvičky a použije se dále k chromatografické analýze, která se provede bezprostředně.

5.3 Vlastní stanovení

5.3.1 Plynová chromatografie

Do chromatografu se nastříkne 5 µl extraktu, získaného podle odstavce 5.2 a pořídí se chromatografický záznam. Změří se plocha píku VOT a koncentrace VOT v µg/ml v extraktu se stanoví pomocí kalibračního grafu.

5.3.2 Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Na sloupec se nanese 4 µl extraktu, získaného podle odstavce 5.2 a pořídí se chromatografický záznam. Změří se plocha píku VOT a koncentrace VOT v µg/ml v extraktu se stanoví pomocí kalibračního grafu.

5.4 Kalibrační graf

5.4.1 Plynová chromatografie

Do sady odměrných baněk na 25 ml se napipetuje 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 a 8,0 ml standardního roztoku VOT (3.8), baňky se doplní po rysku chloroformem (3.2) a promíchají. Tyto kalibrační roztoky obsahují 20,0; 40,0; 80,0; 120,0 a 160,0 µg VOT/ml. Do plynového chromatografu se nastříkuje vždy 5 µl každého standardu a měří se plochy píků. Kalibrační graf se sestaví vynesáním ploch píků proti koncentracím standardů VOT.

5.4.2 Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Kalibrační standardní roztoky se připraví podle odstavce 5.4.1 a na sloupec se nanese 4 µl z každého z nich. Změří se plochy píků a kalibrační graf se sestaví vynesáním ploch píků proti koncentracím standardů VOT.

5.5 Slepý pokus

Provede se podle odstavce 5.2, avšak bez přídavku zkoušeného vzorku. Při výpočtu se hodnota slepého pokusu odečte od výsledku stanovení.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah VOT v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{40 \cdot C}{m}$$

kde C je koncentrace VOT v µg/ml, zjištěná z kalibračního grafu

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg /kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether je nebezpečnou hořlavinou 1.třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržet bezpečnostní pravidla.

8.2 Alternativní stacionární fáze pro plynovou chromatografii je EGSS - X. Některá krmiva však dávají na tomto sloupci za uvedených podmínek rušivé píky.

8.3 Retenční čas při stanovení plynovou chromatografií při 165 °C při použití sloupce:

- 1) 5% OV 17 na Diatomit CLQ 80-100 mesh je pro VOT 9 minut
- 2) 1% EGSS-X na Diatomit CLQ 80-100 mesh je pro VOT 8 minut

8.4 Retenční čas pro stanovení vysokotlakou kapalinovou chromatografií při použití sloupce Lichrosorb SI 60 je pro VOT 7,5 minuty

10.6

Stanovení obsahu kyseliny erukové

1. Účel a rozsah

Tato 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.

2. Princip

Metoda je založena na převedení triacylglycerolů mastných kyselin na methylestery mastných kyselin a následujícím kvantitativním stanovení pomocí plynové chromatografie po jejich rozdělení na stacionární polární náplni.

3. Chemikálie

3.1 Dusík žárovkárenský, čistoty 99,99 % nebo jiný inertní plyn

3.2 Vodík elektrolytický, čistoty 99,5 % (poznámka 8.1)

3.3 Tlakový vzduch podle požadavků výrobce chromatografu

3.4 Standardní směs methylesterů mastných kyselin nebo řepkový olej o známém složení mastných kyselin jako referenční materiál

3.5 Methylalkohol (CH_3OH) neobsahující více než 0,5% vody (poznámka 8.1)

3.6 Petrolether, obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)

3.7 Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), pevný

3.8 Hydroxid draselný, methanolický roztok $c(\text{KOH}) = 1 \text{ mol/l}$

3.9 Hydroxid draselný, methanolický roztok $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.10 Kyselina sírová (H_2SO_4), koncentrovaná ($\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$)

3.11 Methylová oranž, roztok 0,5% v methylalkoholu

3.12 Chlorid sodný, nasycený vodný roztok

3.13 Methylalkoholát sodný, roztok

Příprava: 1 g sodíku se rozpustí ve 100 ml methylalkoholu (3.5) a promíchá

3.14 Kyselina chlorovodíková, methanolický roztok

Příprava: Plyný chlorovodík uvolněný přikapáváním 37% kyseliny chlorovodíkové do koncentrované kyseliny sírové (3.10) se vysuší probubláváním kyselinou sírovou a jímá se do methylalkoholu (3.5) přes malou obrácenou nálevku, která se právě dotýká hladiny methylalkoholu. Methanolický roztok chlorovodíku je stálý a lze jej uchovávat ve tmě ve skleněné láhvi neomezenou dobu.

Místo methanolického roztoku chlorovodíku lze použít methanolický roztok kyseliny sírové c (H_2SO_4) = 0,5 mol/l. Esterifikaci je nutno v tomto případě prodloužit na 30 min a je vhodné odfiltrovat vzniklou sraženinu, nebo použít magnetického míchadla.

3.15 Methylová červeň, ethanolický roztok 10 g/l

3.16 Hexan (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plynový chromatograf s plamenoionizačním detektorem

4.2 Chromatografická kolona, skleněná nebo kovová, délky 2 až 3,5 m o vnitřním průměru 2 až 4 mm

Náplň kolony: nosič pro plynovou chromatografii kysele praný a silanizovaný, zrnění 0,16 až 0,20 mm s 5 až 10% zakotvené polární fáze polyesterového typu (např. diethylenglykol ester kyseliny jantarové, ethylenglykol ester kyseliny adipové, ethylenglykol ester kyseliny jantarové, ester butandioljantarátu, kyanosilikon apod.)

4.3 Dávkovač pro plynovou chromatografii na 1 μl , dělení minimálně po 0,2 μl

4.4 Elektrický vařič nebo písková lázeň,

4.5 Dělicí nálevky na 125 ml

4.6 Destilační baňka na 100 ml

4.7 Vodní lázeň

5. Postup

5.1 Příprava methylesterů

Pro přípravu methylesterů mastných kyselin se použije jeden ze tří alternativních postupů:

5.1.1 Methanolýza triacylglycerolů v alkalickém prostředí (poznámka 8.2)

Naváží se 2 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,001 g do destilační baňky (4.6), přidá se 20 ml methylalkoholu (3.5), 0,25 ml methanolického roztoku hydroxidu draselného (3.8) a varný kamínek. Po promíchání se baňka umístí pod zpětný chladič a obsah se uvede k varu na vařiči nebo pískové lázni (4.4). Roztok se po několika minutách vyčeří a reakce je ukončena po 10 minutách. Baňka se ochladí pod proudem tekoucí vody, obsah se převede do dělicí nálevky (4.5) a baňka se vypláchne 20 ml petroletheru (3.6) také do dělicí nálevky (4.5). Po přidání 20 ml vody se obsah dělicí nálevky protřepe, nechá několik minut stát pro oddělení vrstev a spodní vrstva se přepustí do druhé dělicí nálevky (4.5), ve které se extrahuje opět 20 ml petroletheru (3.6). Spojené petroletherové extrakty se promyjí 3 krát 20 ml vody, petroletherová vrstva se zfiltruje přes bezvodý síran sodný (3.7) do destilační baňky (4.6) a petrolether se oddestiluje.

Pro lepší oddělení vrstev emulze lze přidat k destilované vodě 5 až 10 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.12).

5.1.2 Zmýdelnění s následnou esterifikací za přítomnosti kyseliny sírové (poznámka 8.3)

Do destilační baňky se naváží 2 g vzorku s přesností nejméně 0,001 g a přidá se 25 ml methanolického roztoku hydroxidu draselného (3.9). Obsah baňky se zmýdelňuje varem pod zpětným chladičem za občasného promíchání 30 minut. Po vychladnutí se přidá několik kapek roztoku methylové oranže (3.11) jako indikátoru a obsah baňky se titruje kyselinou sírovou (3.10) do červeného zbarvení. Navíc se přidá 5 kapek kyseliny sírové (3.10) a obsah se znovu vaří 30 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.12), obsah se převede do dělicí nálevky na 250 ml a baňka se vypláchne do dělicí nálevky 50 ml petroletheru (3.6). Po protřepání a rozdělení se spodní vrstva převede do další dělicí nálevky a extrahuje se znovu 50 ml petroletheru (3.6). Spojené petroletherové extrakty se promyjí 3 krát 50 ml vody. Kyselinu sírovou je třeba důkladně vymýt. Její přítomnost se zkouší na methylovou oranž (3.11). Estery se vysuší filtrací přes bezvodý síran sodný (3.7). Petrolether se oddestiluje na vodní lázni (4.7), nebo pomocí vakuové rotační odparky.

5.1.3 Neutralizace volných mastných kyselin a alkalická methanolýza triacylglycerolů s následnou esterifikací mastných kyselin (poznámka 8.4).

Do destilační baňky (4.6) se naváží 2 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,001 g, přidá se 20 ml roztoku methanolátu sodného (3.13) a varný kamínek. Směs se vaří pod zpětným chladičem 10 minut, potom se ochladí, přidá se 25 ml methanolického roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.14) a obsah baňky se znovu povaří pod zpětným chladičem 10 minut. Po ochlazení se přidá 15 ml vody, obsah baňky se převede do dělicí nálevky na 250 ml, extrahuje se 30 ml petroletheru (3.6) a po oddělení vrstev se vodní fáze převede do další dělicí nálevky, ve které se extrakce opakuje. Spojené petroletherové extrakty se promyjí 20 ml vody až do neutrální reakce na methylovou červeň (3.15). Petroletherový extrakt se vysuší filtrací přes bezvodý síran sodný (3.7) a petrolether se odpaří na vodní lázni (4.7).

5.2 Vlastní provedení

Vzorek methylesteru se naředí hexanem (3.16) na přibližně 10%-ní roztok a do plynového chromatografu (4.1) se nastříkuje 0,1 - 1,0 µl.

Parametry kolony:

náplň:	10% DEGS on 80/100 mesh Chromosorb W AW nebo jiná alternativní
kolona:	3 m x 4 mm - skleněná, kovová
mobilitní fáze:	dusík (3.1) - 40 - 60 ml/min
detektor:	FID - 50 °C nad teplotu kolony - vodík (3.2) - 30 ml/min.
nástřik:	20 až 50 °C nad teplotou kolony - vzduch 30 ml/min.
kolona:	180 - 210 °C izotermní analýza
vyhodnocovací zařízení:	integrátor nebo počítač

6. Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Kvalitativní vyhodnocení

Kvalitativní vyhodnocení se provede z retenčních časů standardů čistých methylesterů vyšších mastných kyselin nebo jejich komerčně dodávaných směsí (Supelco, Fluka, Serva).

6.2 Kvantitativní vyhodnocení

Kvantitativní vyhodnocení se provede metodou vnitřní normalizace, plocha jednotlivých identifikovaných mastných kyselin je úměrná jejich procentickému zastoupení v celém jejich spektru konkrétního vzorku. Výpočet je prováděn integrátorem nebo počítačem.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na desetiny % nebo celé g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether, methylalkohol, hexan a vodík jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla. Methanol je navíc zvláště nebezpečným jedem.

8.2 Metodu lze používat pouze pro neutrální tuky a oleje.

8.3 Metodu lze používat pro kyselé oleje a tuky a volné mastné kyseliny.

8.4 Metodu lze používat pro kyselé oleje a tuky a mastné kyseliny.

10.7 Stanovení obsahu kadmia a olova

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kadmia a olova v krmivech. Metoda není vhodná pro minerální premixy, přísady a doplňky.

2. Princip

Vzorek krmiva se mineralizuje na suché cestě (poznámka 9.1) při pomalém nárůstu teploty do 480 °C, popel se rozpustí v kyselině dusičné a jeho výluh se měří metodou plamenné atomové absorpční spektrometrie nebo anodické rozpouštěcí voltametrie s předkoncentrací na visící rtuťové kapkové elektrodě.

3. Chemikálie

3.1 Voda demineralizovaná (dále jen DEMI voda) s měrným odporem min. 14 megaohmů

3.2 Kyselina dusičná, koncentrovaná, čistoty p.p. nebo p.a. redestilovaná v křemenné aparatuře pod bodem varu

3.3 Kyselina dusičná, 2% (mytí skla)

3.4 Kyselina dusičná, roztok $c(\text{HNO}_3) = 1 \text{ mol/l}$

Příprava : Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 70 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.2), doplní se po rysku DEMI vodou (3.1) a promíchá.

3.5 Kadmium, standardní roztok o garantované koncentraci 1,0000 g/l

3.6 Olovo, standardní roztok o garantované koncentraci 1,0000 g/l

3.7 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná

3.8 Kyselina chlorovodíková, zředěná (1 + 1)

3.9 Referenční materiál certifikovaný nebo interní , stejného nebo podobného typu (matrice) jako zkoušený vzorek.

3.10 Dusík nebo argon, požadované čistoty 99,9 %

3.11 Tlumivý roztok octanový pH 4,6

Příprava: Do odměrné baňky 1000 ml se odváží 27,22 g trihydrátu octanu sodného ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{ H}_2\text{O}$), nejvyšší dostupné čistoty, rozpustí ve vodě a promíchá. 98 ml tohoto 0,2 mol/l roztoku se smíchá se 102 ml roztoku kyseliny octové $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$, nejvyšší dostupné čistoty.

3.12 Acetylén (poznámka 9.9)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr absorpční atomový s korekcí pozadí

4.2 Deska topná s regulovatelnou teplotou

4.3 Pec muflová s regulovatelnou teplotou

4.4 Pipeta automatická

4.5 Polarografický analyzátor vhodné konstrukce umožňující práci v režimu anodické rozpouštěcí voltametrie s příslušenstvím (statická kapková elektroda, souřadnicový zapisovač nebo vyhodnocovací software)

4.6 Mikropipeta

5. Postup

5.1 Mineralizace vzorku.

Do skleněné nebo lépe křemenné kádinky na 50 ml nebo do platinové misky (poznámka 9.1) se naváží přibližně 2 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g. Současně se naváží v přibližně stejném množství paralelně dvakrát referenční materiál (3.9) s podobnou maticí, jako zkoušený vzorek. Do souboru se zařadí ještě nejméně jeden slepý vzorek (viz 5.3.2.2). Kádinky se přikryjí hodinovým sklíčkem, vloží na studenou topnou desku (4.2), jejíž teplota se postupně zvyšuje po 50 °C za hodinu až do teploty 300 °C. Potom se kádinky vloží studené muflové pece (4.3). Nastaví se teplota 300 °C a vzorky se ponechají při této teplotě 1 hod. Dále se teplota zvyšuje o 50 °C za hodinu až do teploty 480 °C. Byl-li vzorek odvážen do platinové misky, vloží se přímo do studené muflové pece (4.3) a teplota se zvyšuje postupně po 50 °C za hodinu až do teploty 480 °C (poznámka 9.2). Při této teplotě se vzorky ponechají minimálně 3 hodiny, nejlépe však přes noc. Barva popela se vizuálně posoudí. Pokud je ještě černá, či tmavě šedá, vloží se vzorky zpět do muflové pece (4.3) a pokračuje se ve spalování.

Je-li již popel světle šedý, přidá se opatrně po stěnách nádoby 1,0 ml (v případě většího množství popela 2,0 ml) koncentrované kyseliny dusičné (3.2) a nádoby se vloží na topnou desku (4.2), která se zahřeje na teplotu nižší, než je bod varu (roztok nesmí vřít) a mineralizáty se odpaří do sucha. Potom se vloží opět do muflové pece (4.3), kde se ponechají při teplotě 480 °C po dobu 1 hod. Po vyjmutí z pece a vychladnutí se přidá podle množství popela přesně 10,0 až 20,0 ml roztoku kyseliny dusičné (3.4), přidané objemy se zaznamenají, obsah nádoby se promíchá krouživým pohybem a ponechá stát po dobu nejméně 2 hod. Během této doby se nádobkou ještě několikrát zamíchá (poznámka 9.3). Mineralizát se chrání proti kontaminaci přechováváním např. v uzavřené dóze. Nakonec se mineralizáty přelijí do nádobek (nejlépe plastových) a uzavřou. Mineralizace i vlastní měření se provádějí ve dvou oddělených stopových laboratořích.

Dále se postupuje podle 5.2.2 nebo podle 5.3.2 .

5.2 Metoda plamenné atomové absorpční spektrometrie

5.2.1 Sestrojení kalibračních grafů

5.2.1.1 Příprava kalibračních roztoků pro stanovení kadmia:

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje přesně 5 ml standardního roztoku kadmia (3.5), doplní se roztokem kyseliny dusičné (3.4) po rysku a promíchá. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,050 mg kadmia.

Do sady odměrných baněk na 250 ml se odpipetuje přesně 0,0 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 a 4,0 ml roztoku kadmia s koncentrací 0,050 mg/ml, doplní se po rysku roztokem kyseliny dusičné (3.4) a promíchá. Tato ředění odpovídají koncentracím 0,0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 a 0,8 mg/l kadmia (poznámka 9.4).

Kalibrační roztoky se převedou do plastových nádobek a uzavřou. Uchovávají se při laboratorní teplotě.

5.2.1.2 Příprava kalibračních roztoků pro stanovení olova:

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje přesně 25 ml standardního roztoku olova (3.6), doplní se roztokem kyseliny dusičné (3.4) po rysku a promíchá. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,25 mg olova.

Do sady odměrných baněk na 250 ml se odpipetuje přesně 0,0 ; 1,0 ; 1,5 ; 2,0 a 2,5 ml roztoku olova s koncentrací 0,25 mg/ml, doplní po rysku roztokem kyseliny dusičné (3.4) a promíchá. Tato ředění odpovídají koncentracím 0,0; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 mg/l olova (poznámka 9.4).

Kalibrační roztoky se převedou do plastových nádobek a uzavřou. Uchovávají se při laboratorní teplotě.

5.2.2 Postup zkoušky

Před vlastním měřením se přístroj (4.1) optimalizuje na nejvyšší citlivost stanovovaného prvku. Postupuje se podle návodu (manuálu) konkrétního přístroje. Měření se provádí v plameni s nízkým průtokem acetyleny (3.12), s korekcí pozadí, pro kadmium při vlnové délce 228,8 nm, pro olovo při vlnové délce 217,0 nm.

Absorbance každého kalibračního roztoku včetně roztoku s nulovou koncentrací se měří čtyřikrát (čtyři čtení po 1,5 sekundové integraci). Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících hodnot koncentrací kalibračních roztoků se sestrojí kalibrační graf (poznámka 9.4). Stejným způsobem se proměří mineralizát zkoušeného vzorku, referenčního materiálu, slepého vzorku a z naměřených hodnot absorbance se zjistí odpovídající koncentrace pomocí kalibračního grafu (poznámka 9.5).

5.3 Metoda anodické rozpouštěcí voltametrie

5.3.1 Příprava roztoků pro kalibraci

Vhodným ředěním standardních roztoků kadmia (3.5) a olova (3.6) se připraví pracovní směsný roztok těchto prvků pro vyhodnocování výsledků měření metodou jednoho nebo dvou standardních přídavek (poznámka 9.6).

5.3.2 Postup zkoušky

5.3.2.1 Do polarografické nádoby (4.5) se odpipetuje přesně 3 ml mineralizátu zkoušeného vzorku a přidá 10 ml octanového tlumivého roztoku (3.11). Totéž se provede s mineralizátem referenčního materiálu a slepého vzorku. Po pětiminutovém odstraňování rozpuštěného kyslíku proudem dusíku (3.10) při současném promíchávání roztoku se podle návodu používaného přístroje (4.5) elektrolyticky vyloučí olovo i kadmium za předem definovaných

podmínek na visící rtuťové kapkové elektrodě. Poté se tyto prvky anodicky rozpustí při současném časovém záznamu průběhu rozpouštění (poznámka 9.7).

Záznam polarografické křivky se provádí nejméně dvakrát vedle sebe. Potom se k mineralizátům přidá vhodným dávkovačem určité množství směsného roztoku kadmia a olova. Po 1 minutovém promíchávání roztoku a odstraňování kyslíku proudem dusíku (3.10) se opět zaznamená polarografická křivka. Totéž se opakuje s dalším přídatkem stejného množství směsného roztoku olova a kadmia o stejné koncentraci.

K vyhodnocení se použije záznam s dostatečně rozlišenými píky olova a kadmia (poznámka 9.8). Měří se výška píku stanovovaného prvku od upravené základní linie, která prochází inflexním bodem mezi píkem olova a kadmia - tzv. metoda "peak-zero".

5.3.2.2 Vzhledem k citlivosti použité voltametrické metody se musí ověřit hodnota "slepého vzorku", kdy se zjistí kontaminace vzorku olovem a kadmiem v průběhu mineralizace a rozpouštění, jejich přítomnost v použitých chemikáliích apod. Provádí se celý postup zkoušky bez zkušebního vzorku. Obsah olova a kadmia ve "slepém vzorku" se opět vyhodnotí přídatkem standardu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Matematicko-statistické vyhodnocení výsledků

6.1.1 K vyjádření přesnosti kalibračních metod se definují limitní hodnoty, které souvisejí s úrovní koncentrace, pro kterou je signál ještě statisticky významně odlišný od šumu. V souvislosti s vyjádřením přesnosti a citlivosti kalibračních metod se definují tři specifické úrovně signálu, kterými se otestuje dosažená citlivost přístroje a jeho momentální stav výpočtem:

- kritická úroveň y_C
- limita detekce y_D
- limita stanovení y_S

6.1.2 Dále je třeba ověřit správnost výsledků porovnáním změřené a certifikované hodnoty referenčního materiálu.

6.1.3 Kritická úroveň y_C představuje horní mez 95 % intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu pro absorpenci rovnou nule.

Pro kritickou úroveň y_C platí vztah:

$$y_c = \bar{y} - b \cdot \bar{x} + t \cdot s \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1)$$

kde $\bar{y}$ je aritmetický průměr všech absorbancí (pro voltametrickou metodu výška jednotlivých píků v mm) kalibračních roztoků včetně roztoku s nulovou koncentrací;

b směrnice kalibračního grafu;

$\bar{x}$ aritmetický průměr všech koncentrací kalibračních roztoků;

x_i	jednotlivé koncentrace kalibračních roztoků;
t	kvantil Studentova rozdělení při 95 % hladině významnosti a pro $(n - 2)$ stupňů volnosti;
n	počet všech absorbancí (pro voltametrickou metodu výška jednotlivých píků v mm) v kalibraci;
s	odhad směrodatné odchylky všech absorbancí (pro voltametrickou metodu výška jednotlivých píků v mm) v kalibraci podle vzorce

$$s = \frac{1}{n-1} \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (1a)$$

Nad kritickou úrovní y_c lze signál odlišit od šumu.

Koncentrace x_c odpovídající hodnotě kritické úrovně se určí z kalibračního modelu pomocí vztahu:

$$x_c = \frac{y_c - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (2)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

6.1.4 Limita detekce y_D odpovídá hodnotě absorbance (výšce píku), pro kterou je dolní mez 95 % intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna y_c .

Pro lineární kalibrační model se používá aproximace ve tvaru:

$$y_d = y_c + t \cdot s \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

Koncentrace odpovídající limitě detekce x_D se pak vypočte podle vztahu:

$$\bar{x}_D = \frac{y_D - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (4)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

Limita detekce udává absorbanci signálu, která ještě umožňuje detekci koncentrace. Velikost x_D udává minimální koncentraci, kterou lze ještě s 95 % pravděpodobností odlišit od nulové hodnoty. Počítá se ze všech čtyř čtení absorbancí každého (i nulového) kalibračního roztoku. Do výpočtu se zahrnují všechna měření kalibračních roztoků v celém průběhu měření (poznámka 9.5).

6.1.5 Limita stanovení y_s je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a rovna číslu C. Pro číslo C se volí obvykle velikost $C = 0,1$.

Pro lineární model se používá vztah ve tvaru:

$$y_s = \frac{s}{C} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

Koncentrace odpovídající limitě stanovení se vypočte podle vztahu:

$$x_s = \frac{y_s - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (6)$$

6.1.6 K výpočtu obsahu příslušného prvku ve zkoušeném vzorku i referenčním materiálu lze přistoupit teprve tehdy, je-li koncentrace příslušného prvku ve změřeném referenčním materiálu nad limitou detekce.

Nejprve se vypočítá absorpance (výška píku) limity detekce pomocí vztahů (1) a (3) a současně koncentrace limity detekce podle vztahu (4). Tato hodnota určuje hranici, od které výsledky měření je možné pokládat za statisticky průkazné. Všechny koncentrace vzorků nacházející se pod touto hodnotou již nelze s 95% pravděpodobností odlišit od nulové hodnoty.

Pro zjištění použitelnosti voltametrické metody se použije metoda dvou standardních přídavků, kde závislost výšky píku na koncentraci je vlastně modifikovaná kalibrační křivka, ze které lze metodami lineární regrese vypočítat směrnici a další parametry. Použijí se vzorce (1) až (4) k určení hodnoty kritické úrovně y_c a limity detekce y_D 7.1. Pouze místo hodnot absorpací se pro y dosadí výšky jednotlivých píků v mm.

6.2 Výpočet pro metodu atomové absorpční spektrometrie

Obsah kadmia (olova) v mg/kg se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot V}{m} \quad (7)$$

kde X je obsah sledovaného prvku v mg/kg

c koncentrace sledovaného prvku v mg/l

V objem mineralizátu v ml

m navážka vzorku v g

Vzorky s nižšími koncentracemi než je limita detekce je nutné změřit citlivější metodou, např. ETA AAS nebo voltametricky.

6.3 Výpočet pro voltametrického stanovení

6.3.1 Obsah olova (kadmia) v mg/kg (X) metodou jediného standardního přídavku se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot V_1 \cdot C_1 \cdot V_2 \cdot h}{m \cdot [(V_3 + V_2) \cdot h_1 - V_3 \cdot h]} \quad (8)$$

kde m je hmotnost zkušební vzorku v g ;

V_1 množství kyseliny (3.4.) použité k rozpouštění popele vzorku v ml;

V_3 množství roztoku mineralizátu pipetovaného do polarografické nádoby v ml ;

h výška píku příslušného prvku v mm ;

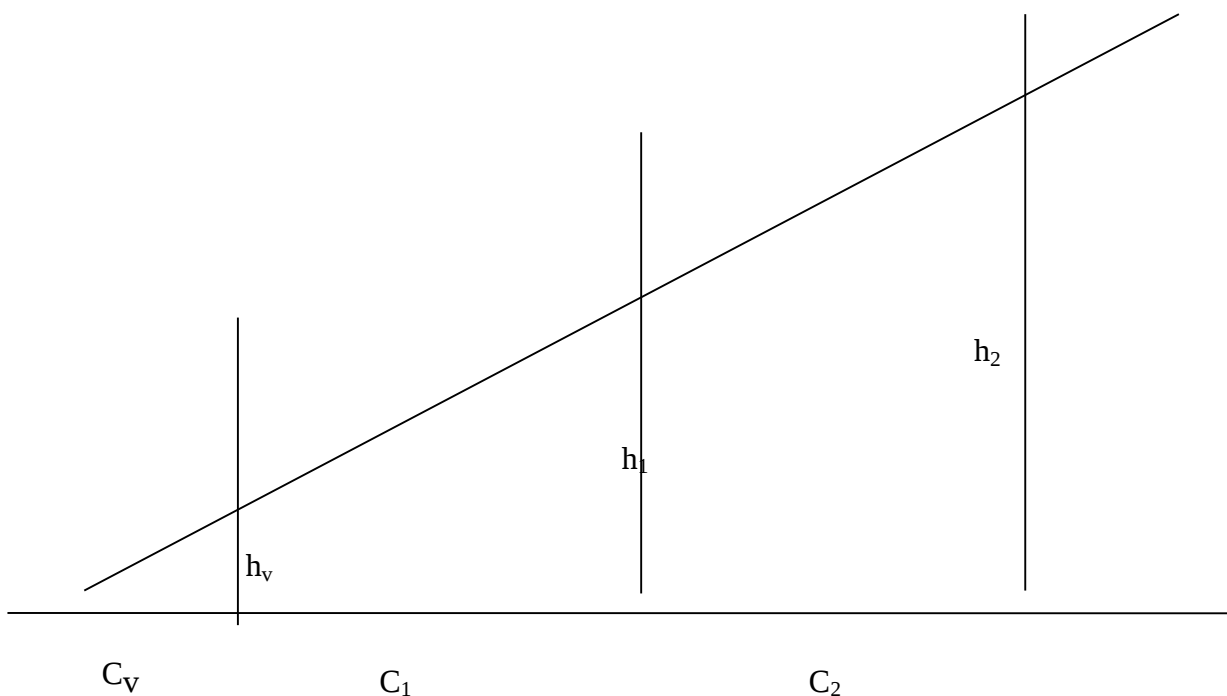
V_2 množství směsného standardu přidaného k roztoku vzorku do polarografické nádoby v ml ;

C_1 koncentrace příslušného prvku v standardním přídávku v mg/ml;

h_1 výška píku příslušného prvku po přídávku v mm;

6.3.2 Obsah olova (kadmia) metodou dvou standardních přídávků se určí graficky podle příkladu 1.

Příklad 1 Grafické vyhodnocení výsledků obsahu olova a kadmia metodou dvou standardních přídávků :



kde h_V je výška píku Pb (Cd) ve vzorku (mm)

h_1	výška píku Pb (Cd) po prvním přidavku (mm)
h_2	výška píku Pb (Cd) po druhém přidavku (mm)
C_1	koncentrace Pb (Cd) v prvním přidavku ($\mu\text{g/ml}$)
C_2	koncentrace Pb (Cd) ve druhém přidavku ($\mu\text{g/ml}$)
C_v	koncentrace Pb (Cd) ve vzorku ($\mu\text{g/ml}$)

Od vypočteného obsahu olova (kadmia) určeného metodou dvou standardních přidavků podle (příklad 1), nebo výpočtem podle vzorce (8) je nutno odečíst obsah olova (kadmia) ve "slepém vzorku".

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně prováděných stanovení, který vyhovuje podmínkám 6.1 a vyjadřuje se s přesností na desetiny mg /kg.

7. Závěrečný protokol

Závěrečný protokol musí obsahovat tyto informace :

- limitu detekce
- výsledek analýzy certifikovaného nebo interního referenčního materiálu
- deklarovanou hodnotu certifikovaného nebo interního referenčního materiálu
- výsledky analyzovaných vzorků.

8. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

9. Poznámky

9.1 Pro mineralizaci vzorku lze použít i jiné než popsané způsoby mineralizace. Nejedná se o uzanční metodu. Správnost výsledků se kontroluje interními a certifikovanými referenčními materiály.

9.2 Platinové misky nemají stejné dno. Přestup tepla u každé misky je jiný. Proto se vkládají do muflové pece již na začátku mineralizace.

9.3 Jinou možností rozpouštění popele vzorku je použití ultrazvukové lázně.

9.4 K sestavení kalibrační křivky se použijí jen ty kalibrační roztoky, jejichž absorbance se nacházejí v lineární oblasti kalibračního grafu.

9.5 Pokud v průběhu měření dojde k výraznému poklesu absorbance kalibračních roztoků, je třeba přístroj zastavit a odstranit příčinu tohoto stavu. Dále je třeba znovu změřit tu část vzorků, které následovaly.

9.6 Pro běžné obsahy kadmia a olova v krmivech vyhovuje koncentrace olova 2 $\mu\text{g/ml}$, koncentrace kadmia 1 $\mu\text{g/ml}$ a dávkovaný objem 50 μl . Koncentrace kadmia a olova je nutno volit tak, aby nárůst píku vzorku s přidavkem byl zhruba dvojnásobný proti píku samotného vzorku.

9.7 Doporučené parametry měření při použití polarografického analyzátoru PA - 4 a statické kapkové elektrody SMDE - 1.

- initial potencial - 800 mV
- scan range - 800 až - 100 mV
- clock FSDPP
- operation mode DPP
- program ASV/CSV
- scan rate 20 mV/s
- sensitivity 11 - 15 (podle skutečného obsahu Cd a Pb)
- RC 100
- filter 0.2 s
- presweep time 7 s
- deposit time 120 s
- systém elektrod 3 elektrodový systém:
- ref. el. - Ag/AgCl
- pomocná el. - Pt
- drop size 80 ms

9.8 Při použití Ag/AgCl referenční elektrody jsou přibližné potenciály píků pro kadmium při 550 mV, pro olovo při 400 mV.

9.9 Acetylén je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

10.8 Stanovení obsahu ricinových slupek

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu ricinových slupek

2. Princip

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

3. Chemikálie

3.1 Kyselina sírová ($\rho = 1,84 \text{ g/ml}$), zředěná (1 + 9)

3.2 Hydroxid sodný, roztok 5 %

3.3 Peroxid vodíku, roztok 30 %

3.4 Kyselina dusičná ($\rho = 1,4 \text{ g/ml}$), roztok 5%

3.5 Kyselina dusičná ($\rho = 1,4 \text{ g/ml}$), roztok 40%

3.6 Chlorid draselný, pevný krystalický

4. Přístroje

4.1 Čtvercová miska

4.2 Mikroskop

4.3 Pinseta

5. Postup

Do 1 000 ml kádinky se naváží 50 až 100 g původního nebo hrubě namletého vzorku s přesností 0,1 g. Přidá se 200 až 600 ml roztoku kyseliny sírové (3.1) a vaří se 3 až 5 minut (poznámka 8.1). Obsah kádinky se dekantuje obyčejnou vodou, aby se odstranil hlavní rozvařený podíl.

Zbytek se pak vaří 3 minuty s 200 až 400 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2). Obsah kádinky se slévá na misku (4.1) a opět se dekantuje obyčejnou vodou.

Je-li zbytek tmavý, odbarví se malým množstvím peroxidu vodíku (3.3), případně se ještě povaří s kyselinou dusičnou (3.4) a opět dekantuje vodou.

Ricinové slupky, které jsou tmavě hnědé (kompaktní a štipavé) se kvantitativně vyberou pinsetou (4.3) na zvážené sklíčko, vysuší a zváží.

Jejich detailní identifikace se provádí mikroskopicky (4.2) po krátkém povaření s 10 ml kyseliny dusičné (3.5) za přídavku několika krystalů chloridu draselného (poznámka 8.2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah ricinových slupek v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1,2 \cdot 10^3 \cdot m_2}{m_1}$$

kde m_1 je hmotnost navážky vzorku v g

m_2 hmotnost ricinových slupek v mg

1,2 přepočítávací koeficient na 20 % ztráty ricinových slupek vyloužením

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg /kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Má-li roztok snahu překypět, ochlazuje se vodou ze stříčky.

8.2 Doporučuje se připravit si pro srovnání ricinové slupky, které byly podrobeny stejným operacím jako zkušební vzorek.

10.9 Stanovení obsahu fluoru

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 975.08

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení fluoru v krmivech.

2. Princip

Fluor se stanoví iontově selektivní elektrodou v chloridovém výluhu krmiva.

10.10 Stanovení obsahu reziduí organochlorových a organofosfátových pesticidů

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 970.52

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení aldrinu, dieldrinu, DDT, DDE, TDE, endrinu, heptachloru, hexachlorcyklohexanu a PCB v krmivech.

2. Princip

Rezidua pesticidů a PCB se extrahují z krmiv vhodným rozpouštědlem a v extraktu se stanoví pomocí chromatografických metod (papírová, tenkovrstevná nebo plynová).

10.11 Stanovení obsahu hexachlorbenzenu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 977.19

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení hexachlorbenzenu v tucích.

2. Princip

Hexachlorbenzen se stanoví metodou plynové chromatografie.

10.12 Stanovení obsahu dusitanů

Tato metoda je uvedena v Metoden Buch LUFA 4.10.1

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dusitanů v krmivech .

2. Princip

Vzorek krmiva se rozmíchá ve zředěném roztoku hydroxidu sodného o pH 8 a vzniklá suspenze se zahřeje na 50 °C. Po vyčerení roztoku síranem zinečnatým se dusitany stanoví ve filtrátu v pufovaném roztoku fotometricky (diazotace kyselinou sulfanilovou a následná kopulace s N-naftyl-1-etylendiamin dihydrochlorid).

10.13 Stanovení obsahu rtuti

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení rtuti v krmivech.

2. Princip

Rtut' v krmivech se stanoví technikou generování par kovové rtuti s následným zachycením a obohacením na zlatém amalgamátoru.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina dusičná koncentrovaná ($\rho = 1,4 \text{ g/ml}$) čistoty p.p.

3.2 Rtut' kovová čistoty min. 99,99 %

3.3 Základní roztok rtuti

Příprava: 1,0000 g rtuti (3.2) se rozpustí ve 30 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se v odměrné baňce na 1000 ml demineralizovanou vodou po rysku.

1 ml pracovního roztoku obsahuje 1 mg rtuti.

3.4 Pracovní roztok rtuti pro kalibraci prvního rozsahu

Příprava: Pro kalibraci prvního rozsahu se odpipetuje 5 ml základního roztoku rtuti (3.3) do odměrné baňky na 100 ml, přidá se 1 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se deionizovanou vodou po rysku. (Lze použít i roztok o koncentraci $5 \mu\text{g}$ rtuti v 1 ml z kalibrace druhého rozsahu.) Z tohoto naředěného roztoku se odpipetuje 0; 1; 2; 4; 6; 8 a 10 ml do odměrných baněk na 100 ml, do každé baňky se přidá 1 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se deionizovanou vodou po rysku.

1 ml pracovního roztoku obsahuje 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a $0,5 \mu\text{g}$ rtuti

Roztoky jsou stálé při uskladnění ve tmě minimálně 1 měsíc.

3.5 Pracovní roztok rtuti pro kalibraci druhého rozsahu

Příprava: Pro kalibraci druhého rozsahu se odpipetuje 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6 ml do odměrných baněk na 100 ml, do každé baňky se přidá 1 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se deionizovanou vodou po rysku.

1 ml pracovního roztoku obsahuje 1; 2; 3; 4; 5 a $6 \mu\text{g}$ rtuti

Roztoky jsou stálé při uskladnění ve tmě minimálně 1 týden.

3.6 Kyslík (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Jednouúčelový atomový absorpční spektrometr pro stanovení rtuti (dále jen analyzátor)

Veškeré pomůcky používané při měření je nutno bezprostředně před použitím vyžítat v plameni do červeného žáru, aby se odstranila možná kontaminace z okolí.

5. Postup

5.1 Úprava vzorku

Representativní množství konečného vzorku se zhomogenizuje rozetřením v třecí misce. Z tohoto upraveného vzorku se navažuje podle očekávaného obsahu rtuti 0,05 až 0,1 g s přesností 0,0005 g do niklové lodičky analyzátoru.

5.2 Kalibrace analyzátoru

Analyzátor (4.1) se uvede do provozu a nastaví se pracovní parametry podle návodu výrobce.

Při kalibraci je nutno nejprve zrušit hodnoty přecházející kalibrace. Potom se provádí kalibrace v obou rozsazích tak dlouho, až je dosaženo ustálení absorpčního signálu. Rozdíl absorbancí dvou po sobě následujících kalibrací se nesmí lišit o více než 5 % relat.

V průběhu vlastního měření vzorků se kalibrace pravidelně opakuje.

5.3 Vlastní postup zkoušky

Niklová lodička s naváženým vzorkem se vloží do podavače analyzátoru a spustí se měřicí cyklus. U každého vzorku se provedou minimálně tři měření, aby se vyloučila možnost zkreslení výsledku nedokonalým uvolněním rtuti z amalgamu.

6. Výpočet

Obsah rtuti v mg/kg se zjistí odečtením na displeji analyzátoru.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na desetiny mg /kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 1,5 % relativních.

10.14 Stanovení obsahu aflatoxinu B₁

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 102, 15/04/76, L 327, 13/11/92 a L 094, 13/04/94

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení aflatoxinu B₁ v krmivech, včetně těch, která obsahují slupky citrusů. Limit detekce je 1 µg/kg.

2. Princip

Vzorek krmiva se extrahuje chloroformem, získaný extrakt se zfiltruje a přečistí na Florisilové koloně s náplní C₁₈. Konečné rozdělení a stanovení se provede technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), za použití reverzní fáze a postkolonové derivatizace jodem a fluorescenční detekce.

10.15 Stanovení obsahu arsenu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 986.15

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení arsenu v krmivech .

2. Princip

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

10.16 Stanovení gossypolu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 123, 29/05/72

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu volného a celkového gossypolu a chemicky příbuzných sloučenin v koncentraci nad 20 ppm v bavlníku a krmných směších, které bavlník obsahují.

2. Princip

Gossypol se extrahuje buď za přítomnosti 3-aminopropan-1-ol (při stanovení volného gossypolu) nebo dimethyformamidu (při stanovení celkového gossypolu). Gossypol je reakcí s anilinem převeden na gossypol-dianilin a absorbance roztoku je měřena při 440 nm.

3. Chemikálie

3.1 Směs propan-2-ol(dále jen propanol) a hexan, roztok (40:60) (poznámka 8.1)

3.2 Rozpouštědlo A

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se nalije asi 500 ml směsi propanol - hexan (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-olu, 8 ml ledové kyseliny octové a 50 ml vody. Doplní se po rysku směsí propanol - hexan (3.1) a promíchá.

Rozpouštědlo A je stále jeden týden.

3.3 Rozpouštědlo B

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se napipetují 2 ml 3-aminopropan-1-olu a 10 ml ledové kyseliny octové. Vychladí se na laboratorní teplotu a doplní se po rysku n,n dimethylformamidem a promíchá.

Rozpouštědlo B je stále jeden týden.

3.4 Anilin

Příprava: Pokud absorbance anilinu (slepý pokus) přesáhne 0,022 musí se anilin destilovat přes zinkový prach, přičemž nejméně prvních 10 % destilované frakce se odlije. Při skladování se v chladniče, v tmavé zábrusové láhvi vydrží tato chemikálie několik měsíců

3.5 Gossypol, standardní roztok A

Příprava: Do 250 ml odměrné baňky se naváží 27.9 mg octanu gossypolu, rozpustí se, doplní po rysku rozpouštědlem A (3.2) a promíchá. Do další 250 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml standardního roztoku, doplní se rozpouštědlem A (3.2) po rysku a promíchá. Před použitím se nechá hodinu stát při laboratorní teplotě.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0.02 mg gossypolu.

3.6 Gossypol standardní roztok B

Příprava: Do 50 ml odměrné baňky se naváží 27.9 mg octanu gossypolu, rozpustí se, doplní po rysku rozpouštědlem B (3.3) a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0.5 mg gossypolu.

Gossypol standardní roztok A a gossypol standardní roztok B jsou stálé 24 hodin, pokud jsou chráněny před světlem.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Třepačka laboratorní nebo mixér přibližně 35 ot/min

4.2 Spektrofotometr s příslušenstvím (kyveta o optické délce 10 mm)

4.3 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Zkušební vzorek Navažované množství zkušební vzorku závisí na předpokládaném obsahu gossypolu. Je vhodnější pracovat s malým množstvím zkušební vzorku a co největším podílem filtrátu tak, aby obsah gossypolu byl dostatečný pro přesné spektrofotometrické měření.

Pro stanovení volného gossypolu v bavlíniku by neměla navážka přesáhnout 1 g, v krmných směsích může být 5 g. Ve většině případů je vhodný podíl filtrátu 10 ml (měl by obsahovat 50 - 100 µg gossypolu).

Pro stanovení celkového gossypolu by měla být navážka 0.5 - 5 g, takže 2 ml filtrátu by měly obsahovat 40 - 200 µg gossypolu.

5.2 Sestrojení kalibračního grafu

5.2.1 Volný gossypol

Do dvou řad po pěti odměrných baňkách na 25 ml se odpipetuje diferencovaně 2,0 , 4,0 , 6,0 , 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu A (3.5) a je-li třeba doplní se na přesný objem 10 ml rozpouštědlem A (3.2). Do jedné řady baněk se obsahy doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají. Do druhé řady baněk se odpipetuje přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se po dobu 30 minut zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3), po ochlazení na laboratorní teplotu se doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají. Pak se ponechají jednu hodinu stát.

5.2.1.1 Kalibrační roztoky druhé řady se měří na spektrofotometru (4.2) proti kalibračním roztokům první řady v kyvetách optické délky 10 mm při vlnové délce 440 nm.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.2.2 Celkový gossypol

Do pěti odměrných baněk na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 2,0 , 4,0 , 6,0 , 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu B (3.6), do šesté baňky na 50 ml se odpipetuje 10 ml rozpouštědla B (3.3) a tímtež se doplní je-li třeba kalibrační roztoky přesně na objem 10 ml. Baňky se po dobu 30 minut zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3), po ochlazení na laboratorní teplotu se doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají.

Z každé z těchto odměrných baněk se odpipetuje do dvou řad odměrných baněk na 25 ml vždy po 2 ml těchto roztoků. Jedna řada těchto kalibračních roztoků se doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a obsahy se promíchají. Do druhé řady kalibračních roztoků se přidá přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se po dobu 30 minut zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3), po ochlazení na laboratorní teplotu se doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají. Pak se ponechají stát po dobu jedné hodiny.

Dále se postupuje podle 5.2.1.1.

5.3 Vlastní provedení

5.3.1 Volný gossypol

5.3.1.1 Do širokohrdlé kuželové baňky na 250 ml na jejíž dno bylo přidáno drcené sklo se odváží příslušné množství zkušebního vzorku (viz 5.1). Do této baňky se odpipetuje přesně 50,0 ml rozpouštědla A (3.2), baňka se uzavře a vytřepává nebo mixuje (4.1) po dobu jedné hodiny. Pak se obsah baňky filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Během filtrace se filtrační nálevka přikryje hodinovým krycím sklem. Do dvou odměrných baněk (označí se A a B) na 25 ml se odpipetuje 2 x přesně stejný objem filtrátu, obsahující s ohledem na očekávaný obsah gossypolu ve zkoušeném vzorku, 50 až 100 µg gossypolu a pokud je třeba, doplní se na rozpouštědlem A (3.2) na objem přesně 10 ml. Roztok v baňce A se pak doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchá (referenční roztok A).

Do dalších dvou odměrných baněk na 25 ml (označí se C a D) se odpipetuje přesně 10 ml rozpouštědla A (3.2). Baňka C se doplní směsí propanol - hexan (3.1) a promíchá (referenční roztok C). Do odměrných baněk B a D se odpipetuje přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se zahřívají po dobu 30 minut na vroucí vodní lázni (4.3) (vybarvení roztoků), ochladí na laboratorní teplotu, doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají. Potom se nechají asi 1 hod. stát.

5.3.1.2 Na spektrofotometru (4.2) se měří absorbance roztoku D proti C (slepý pokus) a absorbance roztoku B proti roztoku A (vzorek) v kyvetách optické délky 10 mm při vlnové délce 440 nm. Od absorbance vzorku se odečte absorbance slepého pokusu a rozdíl absorbancí (korigovaná absorbance = A) je základem výpočtu obsahu volného (celkového) gossypolu. Množství gossypolu se zjistí buď pomocí specifických absorbančních koeficientů (viz 6.1), nebo z kalibračního grafu (viz 6.2).

5.3.2 Celkový gossypol

Do odměrné baňky na 50 ml se odváží takové množství zkušebního vzorku které obsahuje, s ohledem na očekávaný obsah gossypolu ve zkoušeném vzorku, asi 1 až 3 mg gossypolu, přidá se přesně 10 ml rozpouštědla B (3.3) (roztok vzorku). Do další odměrné baňky na 50 ml se přidá přesně 10 ml rozpouštědla B (slepý pokus). Obě baňky se zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3) po dobu 30 minut, potom se ochladí na laboratorní teplotu a obě baňky se doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají. Po 10 až 15 minutách (usazení) se obsah baněk filtruje suchým, středně hustým filtrem do suchých kádinek, přičemž první podíly filtrátů se nezachycují (referenční roztoky).

Do dvou odměrných baněk na 25 ml se z filtrátu roztoku vzorku odpipetuje přesně po 2 ml (označí se A a B) a z filtrátu slepého pokusu do dalších dvou odměrných baněk na 25 ml rovněž po 2 ml (označí se C a D). Roztok v baňkách A a C se doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají. K roztoků v baňkách B a D se přidá přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se vloží na 30 minut do vroucí vodní lázně (4.3) (vybarvení roztoků), po ochlazení na

laboratorní teplotu se doplní směsí propanol - hexan (3.1) po rysku a promíchají. Potom se ponechají asi 1 hodinu stát.

Dále se postupuje podle 5.3.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Ze specifických absorbančních koeficientů

Obsah volného gossypolu (X), nebo celkového gossypolu (Y) v g/kg se vypočítá podle vzorců:

$$X = \frac{12500 \cdot A}{625 \cdot m \cdot F}$$

$$Y = \frac{12500 \cdot A}{600 \cdot m \cdot F}$$

kde A je korigovaná hodnota absorpance roztoku vzorku

m navážka zkušební vzorku v g

F faktor ředění

625 specifický absorbanční koeficient pro volný gossypol ($A^{440 \text{ nm}}$)

600 specifický absorbanční koeficient pro celkový gossypol ($A^{440 \text{ nm}}$)

6.2 Z kalibračního grafu

Obsah volného (celkového) gossypolu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1 \cdot F \cdot 1000}{m_0}$$

kde m_1 je množství gossypolu zjištěné z kalibračního grafu v mg

m_0 navážka zkušební vzorku v g

F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

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

do 500 mg/kg 15 % relat.

od 500 do 750 mg/kg 75 mg/kg

nad 750 mg/kg

10 % relat.

8. Poznámky

8.1 Hexan i propanol jsou nebezpečnými hořlavinami 1.třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

10.17 Stanovení theobrominu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu theobrominu v odpadech z výroby kakaa.

2. Princip

Theobromin se extrahuje chloroformem. Extrakt se odpaří do sucha, rozpustí ve vodě a nechá reagovat s roztokem dusičnanu stříbrného a uvolněná kyselina dusičná se stanoví alkalimetrickou titrací.

3. Chemikálie

3.1 Chloroform

3.2 Amoniak, koncentrovaný ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$)

3.3 Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), pevný

3.4 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.5 Dusičnan stříbrný, odměrný roztok $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.6 Fenolová červeň, ethanolický roztok 1%

3.7 Petrolether, b.v. 40-60 °C (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Kuželová baňka 500 ml s plochým dnem a se zábrusovou zátkou

4.2 Destilační přístroj na přehánění vodní parou spojený s chladičem

5. Postup

Do kuželové baňky (4.1) se naváží asi 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,01 g, přidá se 270 ml chloroformu (3.1) a 10 ml amoniaku (3.2) (poznámka 8.3). Baňka se uzavře a třepe důkladně 5 minut. Přidá se 12 g bezvodého síranu sodného (3.3), opět se třepe a nechá se do příštího dne usadit. Potom se obsah baňky filtruje do 500 ml kuželové baňky a zbytek na filtru se promyje 100 ml chloroformu (3.1). Rozpouštědlo se oddestiluje a poslední zbytky se odpaří na vodní lázni. Extrakt se znovu rozpustí v 50 ml vody a zahřeje k varu. Vychladí se, zneutralizuje roztokem hydroxidu sodného (3.4) na fenolovou červeň (3.6). Dále se přidá 20 ml roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) a uvolněná kyselina dusičná se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.4) do změny barvy indikátoru (pH 7,4).

6. Výpočet

Obsah theobrominu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{180 \cdot C \cdot V}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

1 ml odměrného roztoku hydroxidu sodného (3.4) = 18 mg theobrominu

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether je nebezpečná hořlavina I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Velikost navážky vzorku se upraví tak, aby obsah theobrominu ve zkušebním vzorku byl maximálně 80 mg.

8.3 Pokud materiál obsahuje více než 8% tuku musí být předem odtučněn 6 hodinovou extrakcí petroletherem.

11.1 Zkoušení jakosti siláží

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro zkoušení jakosti konzervace silážovaných krmiv. Uvedené metody zkoušení jsou použitelné pro všechny druhy silážovaných krmiv.

2. Princip

Připraví se základní vodní výluh vzorku siláže a z něho chemickými a fyzikálně-chemickými metodami stanovení se zjišťují jednotlivé jakostní znaky. Ostatní zkoušky se provádějí ze vzorku upraveného podle 5.2.

3.2 Chemikálie

3.1 Toluén (poznámka 8.1)

3.2 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.3 Formaldehyd, roztok 200 g/l, čerstvě zneutralizovaný na $\text{pH} = 8,5$ nebo indikátor fenolftalein

3.4 Uhličitan draselný, roztok 20 g/l

3.5 Kyselina boritá, roztok 20 g/l

3.6 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,025 \text{ mol/l}$

3.7 Glycerín

3.8 Indikátor směsný - methylová červeň a metylénová modř

Příprava: Smíchají se stejné objemy 0,2% ethanolického roztoku methylové červeně a 0,1% ethanolického roztoku methylenové modře, připraveného za slabého zahřívání.

3.9 Chlorid amonný, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 3,1412 g chloridu amonného, předem vysušeného při 103 °C (2 hodiny) a v exsikátoru ochlazeného, rozpustí se ve vodě, toutéž doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 1 mg amoniaku vyjádřeného jako NH_3

3.10 Methylisobutylketon (dále jen "MIBK") - vnitřní standard

Příprava a uchování: MIBK redestilovaný s bezvodým síranem sodným se uchovává na tmavém místě, či v tmavé reagenční láhvi. Je nepřípustné jej míchat do zásoby s oxidačním činidlem síranem ceričitým.

3.11 Síran ceričitý, roztok 100 g/l - oxidační činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odváží 5,0 g tetrahydrátu síranu ceričitého ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), přidá se 5 ml roztoku kyseliny sírové o koncentraci asi $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 5 \text{ mol/l}$, promíchá, po rozpuštění se doplní vodou po rysku a opět promíchá. Případně vzniklá sraženina po ustání jeden den se odfiltruje středně hustým filtrem. Roztok, který slouží k oxidaci kyseliny mléčné na acetaldehyd, je stálý asi jeden měsíc.

3.12 Síran sodný, bezvodý

3.13 Diethylether (poznámka 8.1)

3.14 Kyselina stearová

3.15 TWEEN-80 (sorbitanová fáze)

3.16 Kyselina fosforečná, min 65 %

3.17 Přednáplň chromatografické kolony - pórovina (křemičitý nosič s 15 % kyseliny fosforečné)

Příprava: 100 g póroviny o zrnitosti 0,10 až 0,20 mm se přelije 15 g kyseliny fosforečné a promíchá. Dobře promíchaná směs se suší při teplotě 110 °C po dobu 3 až 5 hodin. Po vychladnutí se inkrust rozetře a plní do prachovnice. Preparát je silně hygroskopický.

Tato přednáplň tvoří v délce asi 4 cm začátek chromatografické kolony (poznámka 8.2).

3.18 Náplně chromatografické kolony (poznámka 8.3)

a) Chromosorb W-AW 80/100s s 10 % SP-1200 a 1 % kyseliny fosforečné

b) Separon SDA o zrnitosti 0,125 až 0,20 mm

c) Carbowax 20 M 80/100

d) Chromaton N AW-HMDS s 5 % TWEEN-80 a 10 % kyseliny stearové

Příprava: 10% g Chromatonu o zrnitosti 0,200 až 0 250 mm se přelije asi 30 ml směsí toluen-diethylether 25 + 5 obsahující 0,5 g TWEEN-80 a 1,0 g kyseliny stearové. Získaná kašovitá hmota se velmi jemně promíchá a jakmile začne tuhnout, dosuší se v digestoři např. infralampou. Konečné dosušení se provede při 120 °C.

3.19 Kyselina chlorovodíková, odměrný roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ připravená izotermickou destilací (poznámka 8.4)

3.20 Kyselina octová, odměrný roztok $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}) = 0,1 \text{ mol/l}$ připravená izotermickou destilací (poznámka 8.4)

3.21 Kyselina ϵ -amino-kapronová

3.22 Kyselina n-kapronová

3.23 Hydroxylethylcelulosa (dále jen "HEC"), roztok 10 g/l nebo

3.24 Polyvinylalkohol (dále jen "PVA"), roztok 10 g/l

3.25 1,1,1-tris-hydroxyaminomethan (dále jen "TRIS")

3.26 Voda redestilovaná

3.27 Vedoucí elektrolyt

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 0,440 g kyseliny ϵ -amino-n-kapronové, pipetou odměří 20 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové a 10 ml roztoku HEC nebo PVA. Odměrná baňka se doplní redestilovanou vodou po rysku a promíchá. Takto upravený elektrolyt se převede do kádinky na 400 ml a malými přídávky kyseliny ϵ -amino-n-kapronové se upraví pomocí pH metru na hodnotu $4,50 \pm 0,02$. Potom se roztok převede do nádoby z plastické hmoty a dobře uzavřený se uchovává v chladničce.

3.28 Koncový elektrolyt

Příprava: Do kádinky na 250 ml se pomocí malé pipety odváží 0,11 až 0,12 g kyseliny n-kapronové, pipetou se odměří 100 ml redestilované vody, kádinka se umístí na elektromagnetickou míchačku, vloží se míchadélko a zapne ohřev. Roztok se za stálého míchání mírně zahřívá až do úplného rozpuštění kyseliny. Po ochlazení na laboratorní teplotu se roztok malými přídávky TRISu pomocí pH metru upraví na $\text{pH} = 7,60 \pm 0,02$. Upravený roztok se převede do nádoby z plastické hmoty a dobře uzavřený se uchovává v chladničce.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mixér vhodné konstrukce

4.2 pH-metr vhodné konstrukce s příslušenstvím pro potenciometrickou titraci

4.3 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.4 Byreta na 25 ml, dělená po 0,05 ml

4.5 Misky dle Conweye z vhodného materiálu (sklo, plexisklo a pod.), vnitřního průměru 100 mm, průměru vnitřní části 40 mm a hloubky misky 15 mm

4.6 Mikrobyreta na 2 a 5 ml

4.7 Chromatograf plynový s vyhodnocovacím zařízením

4.8 Kolona chromatografická s parametry

- materiál sklo
- délka 240 cm
- světlost 3 mm
- detekce FID
- nástřík 1 až 2 μl
- nosný plyn dusík
- průtok plynu 35 ml/min
- teplota 175 °C až 188 °C (podle použité náplně)

4.9 Mikrodávkořač na 5 μl

4.10 Mikropipety 10 a 20 μl

4.11 Lahvičky reagenční na 10 ml s upraveným uzávěrem

Úprava: Do šroubového uzávěra lahvičky z plastické hmoty se provrtá otvor o průměru 6 až 8 mm a utěsní se vložením kotoučku silikonové pryže pod jeho uzávěr. Odběr vzorku k nástřiku do kolony se provede mikrodávkovacem přes vzniklé septum.

4.12 Přístroj pro kapilární izotachoforézu vhodné konstrukce (dále jen "ITP analyzátor")

4.13 pH metr vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.14 Nádobky z plastické hmoty na 100 a 250 ml

4.15 Konzistometr, přístroj pro měření stlačitelnosti s příslušenstvím

5. Postup

5.1 Odběr vzorků a jejich předání ke zkoušení

Mimo obecné zásady pro odběr vzorků, kdy odebrané vzorky siláží se hermeticky uzavírají do nepropustných obalů z inertních hmot (polyetylén, polyvinylchlorid, sklo apod.) se musí vzorky odebírat za takových teplotních i časových podmínek, aby během transportu do laboratoře, nemohlo dojít ke kvalitativním změnám.

Zápis o odběru vzorku je nutno doplnit o následující údaje:

- způsob a technika sběru porostu na siláž
- datum začátku a ukončení silážování
- délka řezanky
- případně použité konzervační přísady nebo jiná aditiva a jejich dávkování
- způsob stlačování a zakrytí
- smyslové posouzení v místě odběru

5.2 Úprava vzorku pro zkoušení

Vzorek siláže se po příjmu do zkušební laboratoře smyslově posoudí. Po smyslovém posouzení se ihned na nepropustné inertní podložce dokonale promíchá a pořezáním se upraví na velikost částic pod 20 mm. Z takto upraveného vzorku se po opětovném promíchání odebere po množství pro stanovení vlhkosti, jakosti konzervace, event. i pro stanovení výživné hodnoty (pro řízkové siláže i pro stanovení stlačitelnosti). Pokud ve vyjímáných případech nelze vzorek ihned upravit pro zkoušení, může se uchovat v původním stavu nejvýše po dobu 24 hodin v chladničce při teplotě 3 °C až 5 °C, hermeticky uzavřený v inertním obalu.

5.3 Příprava vodního výluhu siláže (zásobní roztok)

Do nádoby mixéru se odváží ($50 \pm 0,1$) g vzorku upraveného podle 5.2, přidá se přesně 450 ml vody, vloží do mixéru (4.1) a po dobu 4 minut se intenzívně mixuje při vysokých otáčkách. U vzorků siláže ze zavadnuté píce se před vlastní mixací nechá vzorek nasáknout po dobu asi 5 minut přidanou vodou. Po provedené mixaci se suspence filtruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Pokud z časových důvodů není možno výluh dále zpracovat (použít pro další stanovení), konzervuje se přidavkem 0, 5 ml toluenu (3.1) již před filtrací. V případě, že některé ze stanovení z tohoto výluhu bude provedeno metodou plynové chromatografie, nelze konzervaci použít. Výluh se uchovává v chladničce a to nejdéle do druhého dne.

Celkové množství výluhu se podle obsahu vlhkosti zkoušeného vzorku pohybuje většinou od 475 ml do 490 ml. Odchylka od 500 ml, uvažovaných při výpočtech např. silážních kyselin je, vzhledem k charakteru zkoušeného materiálu a množství zkušební vzorku pro přípravu výluhu, v podstatě zanedbatelná (poznámka 8.5).

Přesné stanovení celkového množství výluhu siláže v ml (X), po provedeném stanovení obsahu vlhkosti zkoušeného vzorku, se vypočítá podle vzorce:

$$X = 450 + \frac{m.V}{10^3}$$

kde V je obsah vlhkosti zkoušeného vzorku v g/kg

m hmotnost zkušební vzorku v g

Pro výpočet výsledků silážních kyselin se jako faktor F (faktor ředění) dosadí buď

$$\frac{X}{20} \quad (\text{exaktně}), \text{ nebo}$$

$$\frac{500.K}{20} \quad (\text{zpřesnění}) \quad (\text{poznámka 8.5})$$

5.4 Stanovení hodnoty pH a formové titrace

Aktivní kyselost se stanoví jako pH vodního výluhu siláže elektrometricky a hodnota formolové titrace se stanoví po ztitrování volné kyselosti a přidání formaldehydu titračně alkalimetricky.

5.4.1 Provedení

Do kádinky vhodného objemu se odpipetuje 100 ml filtrátu vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3, vloží se elektrody připojené na pH-metr (4.2) a změří se hodnota pH s přesností nejméně na 0,1 pH.

Potom se kádinka se výluhem umístí na elektromagnetickou míchačku (4.3), vhodí míchadélko a obsah kádinky se za stálého míchání titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) do hodnoty pH = 8,5. Tato spotřeba se nezaznamenává.

Ke ztitrovanému roztoku se přidá 10 ml čerstvě zneutralizovaného roztoku formaldehydu (3.3), přičemž hodnota pH poklesne, a za stálého míchání se z naplněné byrety opět titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) do hodnoty pH = 8,5 (spotřeba V).

5.4.2 Výpočet a vyjádření výsledku

Hodnota formolové titrace, vyjádřená jako NH_3 , v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{17,03.V.C}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu draselného v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

5.5 Stanovení obsahu amoniaku a výpočet stupně proteolýzy

Amoniak uvolněný ve slabě alkalickém prostředí účinkem uhličitanu draselného se po difúzi v roztoku kyseliny borité stanoví titračně acidimetricky.

Stupeň proteolýzy se vypočítá z obsahu amoniaku, hodnoty formolové titrace, vyjádřené jako NH_3 a obsahu dusíkatých látek, vyjádřené jako dusík.

5.5.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 5,0 ; 10,0 ; 20,0 ; 30,0 ; 40,0 a 50 ml základního standardního roztoku chloridu amonného (3.9), což v 10 ml kalibračních roztoků odpovídá koncentracím 0,5 ; 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 a 5,0 mg amoniaku vyjádřeného jako NH_3 . Každá z odměrných baněk se doplní po rysku vodou a promíchá. Dále se všechny kalibrační roztoky zpracují podle 5.5.2.

Ze získaných spotřeb odměrného roztoku kyseliny sírové (3.6) na kalibrační roztoky a jim odpovídajících koncentrací amoniaku se sestrojí kalibrační graf.

5.5.2 Vlastní provedení

Do mezikruží misky podle Conwaye (4.5) se odpipetuje 10 ml filtrátu vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3, resp. kalibračního roztoku, připraveného podle 5.5.1. Do střední části misky se odpipetuje 3 ml roztoku kyseliny borité (3.5) a do mezikruží k odpipetovanému filtrátu vodního výluhu (kalibračního roztoku) se odpipetuje 1 ml roztoku uhličitanu draselného (3.4), miska se rychle hermeticky uzavře víčkem, přičemž k utěsnění se použije malé množství glycerínu (3.7). Po opatrném promíchání kroužením (obsahy částí misky se nesmějí smíchat) se miska s obsahem ponechá stát při laboratorní teplotě asi 12 hodin, nejlépe přes noc. Potom se miska opatrně otevře, do střední části se přidá indikátor (3.8) a ihned titruje odměrným roztokem kyseliny sírové (3.6) do právě vzniklé barevné změny.

Ze získané spotřeby odměrného roztoku kyseliny sírové se zjistí z kalibračního grafu odpovídající množství amoniaku, vyjádřeného jako NH_3 .

5.5.3 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah amoniaku, vyjádřeného jako NH_3 v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m_0}$$

Stupeň proteolýzy v % (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{5,147 \cdot 10^4 \cdot (X + Z)}{N \cdot S}$$

kde Z je výsledek hodnoty formolové titrace, zjištěné podle 5.4, vyjádřené jako NH_3 v g/kg

m_1 množství amoniaku, vyjádřené jako NH_3 , zjištěné z kalibračního grafu v mg

N obsah dusíkatých látek, stanovených podle přílohy 9, metoda 2.1 a vyjádřených jako dusík v g/kg

S obsah sušiny, stanovený podle přílohy 9, metoda 1.1 v g/kg

m_0 hmotnost alikvotního podílu zkušební vzorku, odebraného ke stanovení v g

5.6 Stanovení obsahu alkoholu

Alkoholy se stanoví z vodního výluhu siláže metodou plynové chromatografie. Uvedeným způsobem lze stanovit i nižší karboxylové kyseliny, aceton a úpravou podmínek i nižší ketony, aldehydy a estery, charakterizující chuťové vlastnosti krmiva.

5.6.1 Provedení

Do reagenční lahvičky (4.11) se odpipetuje 2 ml vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3, přidá se mikropipetou 10 μl MIBK (3.10), uzavře a promíchá. Pokud je nutné přítomnou kyselinu mléčnou převést na acetaldehyd, což se doporučuje s ohledem na prodloužení životnosti chromatografické kolony (poznámka 8.6), přidá se 1 až 2 ml oxidačního činidla roztoku síranu ceričitého (3.11). Po 15 minutách se provede nástřík do předem připravené kolony (4.8) a pořídí se chromatografický záznam (4.7).

Přítomné látky eluují v následujícím pořadí:

1. nízkovroucí estery, ketony a aldehydy ("chuťové látky")
2. acetaldehyd (oxidační produkt kyseliny mléčné)
3. ethylalkohol
4. aceton
5. n-propylalkohol
6. kyselina mravenčí (záznam s detektorem FID málo citlivý)
7. kyselina octová
8. n-butylalkohol
9. kyselina propionová
10. standard MIBK
11. kyselina isomáselná
12. kyselina n-máselná
13. kyselina isovalerová
14. kyselina n-valerová (poznámka 8.7)

5.6.2 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah ethylalkoholu, event. dalších látek se provede metodou vnitřního standardu obvyklou technikou.

5.7 Stanovení obsahu silážních kyselin

Silážní kyseliny se stanoví z připraveného filtrátu vodního výluhu siláže přímo metodou kapilární izotachoforézy způsobem srovnání se standardem.

5.7.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 0,5; 1,0; 3,0 ; 5,0 a 7,0 ml odměrného roztoku kyseliny octové (3.20), což odpovídá koncentracím kalibračních roztoků ve 100 ml $0,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l až $7 \cdot 10^{-3}$ mol/l, každá z baněk se doplní redestilovanou vodou (3.26) po rysku a promíchá.

Připraví se ITP analyzátor (4.12) pro měření, podle příslušného návodu k němu a jednotlivé kalibrační roztoky (roztoky zkoušeného vzorku) se postupně dávkuje pomocí dávkovacího kohoutu na začátek separační kolony do rozhraní mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Odezva migrace aniontu kyseliny octové (jednotlivých kyselin) se zaznamenává dvouliniovým zapisovačem nebo jiným vhodným registračním zatížením.

Tímto způsobem se provádí kalibrace pomocí roztoku kyseliny octové (3.20). Přepočet na ostatní stanovované kyseliny, které se v použitém elektrolytickém systému dělí v pořadí kyselina šťavelová, mravenčí, pyrohroznová, mléčná, jantarová, octová, propionová, kyseliny máselné a valerové je uveden v tabulce 1.

Z naměřených vln lineárního záznamu nebo vzdálenosti píků křivek diferenciálního záznamu a příslušných koncentrací kalibračních roztoků se sestrojí graf (poznámka 8.8).

5.7.2 Vlastní provedení

Z filtrátu vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3 se odpipetuje 20,0 ml do odměrné baňky na 100 ml, doplní redestilovanou vodou (3.26) po rysku a promíchá. Takto zředěný výluh se dávkuje do ITP analyzátoru (4.12) tak, jak je uvedeno v 5.7.1 a dále se postupuje podle tohoto článku.

Z naměřených hodnot délky vln z lineárního záznamu nebo vzdáleností píků křivek diferenciálního záznamu v mm se zjistí z kalibračního grafu koncentrace odpovídající kyselině octové v mmol/l (C_1).

5.7.3 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah příslušné silážní kyseliny v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{F \cdot M_r \cdot C_1 \cdot C_2}{K_r}$$

kde F je ředění filtrátu vodního výluhu vzorku siláže

M_r	relativní molekulová hmotnost příslušné kyseliny (viz tabulka 1)
C_1	koncentrace v mmol/l zjištěná z kalibračního grafu
C_2	koncentrace odměrného roztoku kyseliny octové v mol/l použité pro sestrojení kalibračního grafu
K_r	přepočtový faktor

Protože pro každou kyselinu jsou hodnoty F , M_r , K_r , C konstantní, pak výpočtový vzorec přejde na:

$$X = 10 \cdot C_1 \cdot F_k$$

kde F_k je relativní faktor uvedený pro každou kyselinu v tabulce 1

Poloha zón jednotlivých kyselin se určí pomocí modelové směsi silážních kyselin, protože mimo nich se mohou v záznamu objevit i jiné kyseliny jako např. sírová či fosforečná resp. anionty těchto kyselin. Každá kyselina (aniont kyseliny) má v záznamu vždy stejnou polohu, která pro pracovní soustavu charakterizuje relativní výšku zóny (viz tabulka 1).

Relativní faktor F_k je konstantní, pokud nebyla změněna koncentrace filtrátu vodního výluhu vzorku siláže (např. větším zředěním).

Tabulka 1 Tabelované hodnoty relativní molekulové hmotnosti, relativních faktorů a zón jednotlivých kyselin popř. elektrolytů

Kyselina	M_r	K_r	F_k	Relativní výška zóny
Vedoucí elektrolyt	-	-	-	0
šřavelová	90,036	1,525	0,29520	7,1
mravenčí	46,026	0,885	0,26003	15,3
pyrohroznová	88,062	1,000	0,44031	23,5
mléčná	90,078	1,055	0,42691	41,0
jantarová	118,088	1,260	0,46860	46,5
octová	60,052	1,000	0,30026	60,0
propionová	74,078	1,050	0,35275	78,0

máselná	88,104	1,000	0,40047	84,0
valerová	102,130	1,150	0,44404	90,5
Koncový elektrolyt	-	-	-	100,0

5.8 Stanovení stupně stlačitelnosti řízkových siláží

Stupeň stlačitelnosti se stanoví po 15 minutovém zatížení definovaného množství vzorku siláže na konzistometru za definovaných podmínek jako rozdíl výšek vrstvy před a po stlačení.

5.8.1 Provedení

Na základní desku, umístěnou na vodorovné ploše konzistometru (4.15) se vloží podložná miska, válec s děrovanou příčkou a skleněný válec. Do tohoto skleněného válce se odváží (250 ± 1) g zkoušeného vzorku siláže, připraveného podle 5.2, zkušební vzorek se rovnoměrně rozvrství po celé ploše děrované příčky, která tvoří dno válce. Výška této vrstvy se zjistí na kalibrované straně válce (d_1). Potom se volně nasadí děrovaný píst s vodící tyčinkou a víčko, které se přichytí pružinami. Vodící tyčinka se přidrží tak, aby píst byl přímo nad zkoušeným vzorkem a nasadí se obě závaží. Pak se vodící tyčinka se závažím uvolní a od tohoto okamžiku se počítá čas. Po 15 minutovém stlačování se proti spodní hraně děrovaného pístu zjistí výška hladiny stlačeného zkoušeného vzorku (poznámka 8.9).

5.8.2 Výpočet a vyjádření výsledku

Stupeň stlačitelnosti siláže v mm (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = d_1 - d_2$$

kde d_1 je výška vrstvy nestlačeného zkušební vzorku v mm s přesností na 0,1 mm

d_2 výška vrstvy zkušební vzorku po stlačení v mm s přesností na 0,1 mm

5.9 Stanovení výživné hodnoty

Výživná hodnota siláže se stanovuje výpočtem z nalezených hodnot obsahu dusíkatých látek (stanovených podle Přílohy 9, část 2.1), popele (stanoveného podle Přílohy 9, část 6.1), vlákniny (stanovené podle Přílohy 9, část 4.1), BNLV (vypočtené podle Přílohy 9, část 5.5) a obsahu vlhkosti - sušiny (stanovené podle Přílohy 9, část 1.1).

U obsahu vlhkosti - sušiny se pro účely přesných bilančních pokusů provádí korekce, vzhledem k úniku těkavých látek za podmínek metody

Obsah korigované sušiny v g/kg siláže se vypočítá podle vzorců: pro siláže do pH = 4,2 (X), od pH = 4,3 do 4,5 (Y) a nad pH = 4,5 (Z)

$$X = S + 0,92.F + 0,89.TSK + 0,31.KM + 0,83.NH_3 + A$$

$$Y = S + 0,93.F + 0,93.TSK + 0,24.KM + 0,85.NH_3 + A$$

$$Z = S + 0,98.F + 0,86.TSK + 0,15.KM + 0,93.NH_3 + A$$

kde	S	je obsah sušiny v g/kg
	F	obsah kyseliny mravenčí v g/kg
	TSK	součet obsahů těkavých silážních kyselin (octové, propionové, máselné) v g/kg
	KM	obsah kyseliny mléčné v g/kg
	A	obsah alkoholu v g/kg
	NH ₃	obsah amoniaku, vyjádřeného jako NH ₃ v g/kg

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Výsledkem každého stanovení je aritmetický průměr dvou výsledků souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností u stanovení:

pH	na 0,05
hodnoty formolové titrace	na 0,1
amoniaku jako NH ₃	na celé jednotky
silážních kyselin	na celé jednotky
stlačitelnosti siláží	na 0,1 mm
stupně proteolýzy	na 0,01

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit u stanovení :

pH	0,05
hodnoty formolové titrace	0,1
amoniaku jako NH ₃	0,1
alkoholu	zatím neuvedena
silážních kyselin	1,0
stlačitelnosti siláží	zatím neuvedena

8. Poznámky

8.1 Toluen a diethylether jsou nebezpečné hořlaviny I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Přednáplň je nutno vyměnit asi po 50 provedených stanoveních.

8.3 Jsou uvedeny alternativní možnosti volby a) až d).

8.4 Izotermická destilace se provádí následovně: Do větší prachovnice se zábrusem a širokým hrdlem nebo jiné prostorné nádoby se zábrusem (např. exsikátor bez náplně) se odlije asi do 1/4 její výšky příslušná kyselina (látka) a vloží do ní menší nádobka do poloviny naplněná redestilovanou vodou. Po uzavření vnější nádoby se nechá stát při laboratorní teplotě asi 14 dní, přičemž dojde k difúzi par kyseliny (látky) do redestilované vody. Po uplynutí této doby se menší nádobka s difundovanou kyselinou (látkou) vyjme a její koncentrace se určí titračně.

Tímto způsobem se připraví příslušná kyselina (látka) velmi značné čistoty a z ní se připravují pomocí redestilované vody potřebné superčisté roztoky.

8.5 Pro určité zpřesnění celkového množství vodního výluhu siláže se 500 ml vynásobí pro siláže koeficientem $K = 0,98$ a pro siláže ze zavadlé píce koeficientem $K = 0,95$.

8.6 Tato oxidační úprava mění přítomnou kyselinu mléčnou na acetaldehyd v první části chromatografického záznamu.

Neprovede-li se oxidace kyseliny mléčné na acetaldehyd, eluuje se kyselina mléčná v některých případech až za kyselinou isovalerovou. Ostatní přítomné látky (alkoholy, aceton, monokarboxylové kyseliny) jsou v uvedeném oxidačním prostředí stále nejméně 2 hodiny.

8.7 Eventuelně přítomná kyselina pyrohroznová se objevuje na chromatografickém záznamu před kyselinou isomáselnou.

8.8 Kalibrační graf má obecnou platnost, pokud nedojde k žádné změně pracovních podmínek. Dodržením pracovních podmínek se rozumí zejména:

- a) konstantní příprava a ředění filtrátu vodního výluhu vzorků siláže
- b) použití stejného kapilárního systému a přístroje ITP
- c) stejný způsob dávkování (tj. konstantní množství roztoku zkoušeného vzorku identický dávkovací kohout)
- d) stejný elektrolytický systém (vedoucí a koncový elektrolyt)
- e) konstantní hodnota hnacího proudu
- f) stejný způsob registrace záznamu odezvy kyselin (rychlost chodu zapisovače)
- g) stejný objem při dávkování roztoku vzorku i kalibračního roztoku

8.9 Veškerá odlisovaná šťáva a to jak nad horní vrstvou pístu, tak i na podložní misce se může odměřit kalibrovaným válcem a zjistit objem odlisované šťávy, podle něhož lze usuzovat na fyzikální vlastnosti řízků, především na stupeň poutání vody resp. koloidní vlastnosti vody.

Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

II

Příloha č. 10 vyhlášky 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

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů chemického zkoušení doplňkových látek, premixů a krmných směsí s doplňkovými látkami a premixy

Název postupu postupu	Označení

1. Stimulátory růstu	
1.1. Stanovení obsahu avilamycinu	-A-
1.2. Stanovení obsahu avoparcinu	-A-
1.3. Stanovení obsahu flavosfolipolu	-A-
1.4. Stanovení obsahu olachindoxu	-B-
1.5. Stanovení obsahu monensinu	-A-
1.6. Stanovení obsahu monensinu	-A-
1.7. Stanovení obsahu salinomycinu	-A-
1.8. Stanovení obsahu salinomycinu	-A-
1.9. Stanovení obsahu tylosinu	-A-,-B-
1.10. Stanovení obsahu virginiamycinu	-A-,-B-
1.11. Stanovení obsahu zinkbacitracinu	-A-
1.12. Stanovení obsahu zinkbacitracinu	-B-
1.14. Stanovení obsahu avoparcinu	-B-
1.15. Stanovení obsahu monensinu	-B-
1.17. Stanovení obsahu virginiamycinu	-B-
2. Antikokcioidika	
2.1. Stanovení obsahu amprolia	-A-
2.2. Stanovení obsahu amprolia	-B-
2.3. Stanovení obsahu diclazurilu	-A-
2.4. Stanovení obsahu lasalocidu	-A-

2.5.	Stanovení obsahu maduramicinu	-A-
2.6.	Stanovení obsahu metylbenzochátu	-A-
2.7.	Stanovení obsahu narasinu	-A-
2.8.	Stanovení obsahu narasinu	-A-
2.9.	Stanovení obsahu nikarbazinu	-B-
2.11.	Stanovení obsahu robenidinu	-A- -B-
2.12.	Stanovení obsahu sulfachinoxalinu	-B-
2.13.	Stanovení obsahu meticlorpindolu	-A-
2.14.	Stanovení obsahu meticlorpindolu	-B-
2.15.	Stanovení obsahu kurasanu	-A-
2.16.	Stanovení obsahu salinomycinu - je uvedeno v Příloze č.10, část 1	
2.17.	Stanovení obsahu monensinu - je uvedeno v Příloze č.10, část 1	
2.18.	Stanovení obsahu dinitolmidu	-B-
2.19.	Stanovení obsahu halofuginonu	-B-
2.20.	Stanovení obsahu decoquinátu	-B-
2.21.	Stanovení obsahu arprinocidu	-B-
2.22.	Stanovení obsahu ethopabátu	-A-
2.23.	Stanovení obsahu lasalocidu	-A-

3. Chemoterapeutika

3.1.	Stanovení obsahu dimetridazolu	-A-
3.2.	Stanovení obsahu dimetridazolu	-B-

4. Vitaminy

4.1.	Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E	-A-
4.2.	Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E	-A-
4.3.	Stanovení obsahu vitamínu E	-A-
4.4.	Stanovení obsahu přidávaného vitamínu E	-A-
4.5.	Stanovení obsahu vitamínu E	-A-
4.6.	Stanovení obsahu cholinu	-A-
4.7.	Stanovení obsahu pantothenanu vápenatého	-A-

- 4.8. Stanovení obsahu vitamínu B1, B2, B6 -A-
- 4.9. Stanovení obsahu vitamínu B2 -A-
- 4.10. Stanovení obsahu vitamínu B6 -A-
- 4.12. Stanovení obsahu vitamínu A -B-

5. Mikroprvky

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

6. Vehikula a pojiva

- 6.1. Stanovení obsahu oxidu křemičitého - je
uvedeno v příloze č.9, část 7 -A-
- 6.2. Stanovení obsahu oxidu hlinitého - je
uvedeno v příloze č.9, část 7 -A-

7. Výpočty

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

8. Antioxidanty

- 8.1. Stanovení obsahu etoxyquinu -B-
- 8.2. Stanovení obsahu butylhydroxytoluenu, butylhydroxyanisolu a galátů -B-

9. Barviva

- 9.1. Stanovení obsahu kapsantinu -B-
- 9.2. Stanovení obsahu nativních a přidaných karotenoidů -B-

10. Konzervanty

- 10.1. Stanovení obsahu kyseliny mravenčí -B-
- 10.2. Stanovení obsahu oxidu siřičitého -B-
- 10.3. Stanovení obsahu formaldehydu -A-

11. Zchutňovadla

11.1. Stanovení obsahu sacharinu -B-

12. Mikrobiotika

12.1. Stanovení počtu zárodků bakterií kmene Streptococcus -B-

12.2. Stanovení počtu zárodků bakterií kmene Bacillus -B-

1.1 Stanovení obsahu avilamycinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení avilamycinu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Avilamycin se stanoví difúzní plotnovou metodou na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Micrococcus luteus* ATCC 10 240.

3. Chemikálie

3.1 Aceton (poznámka 8.1)

3.2 Směs aceton - voda (1 + 1)

3.3 Avilamycin, základní standardní roztok s deklarovanou účinností

3.4 Avilamycin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží takové množství standardní substance avilamycinu (3.3), s přesností nejméně na 0,001 g, které s ohledem na deklarovanou účinnost vytvoří koncentraci avilamycinu 1 mg v 1 ml. Rozpustí se v acetonu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

3.5 Avilamycin, kalibrační standardní roztoky

Příprava: Ze základního roztoku avilamycinu (3.4) se vhodným zředěním směsí aceton-voda (3.2) připraví tři roztoky o koncentracích 2, 1 a 0,5 µg/ml (poznámka 8.2).

3.6 Testovací mikroorganismus *Micrococcus luteus* ATCC 10 240

Příprava a udržování kmene: Základní kmen je udržován pravidelným přeočkováním na šikmém masopeptonovém agaru, inkubován 18 až 24 hodin při teplotě 37 °C a uchován při teplotě 4 °C

Příprava inokulační suspence: Kultura kmene, přeočkováná den před vlastním stanovením se převede 5 ml fyziologického roztoku (3.8) do sterilní zkumavky, touto suspensí se naočkuje rozehřátá živná půda ochlazená na teplotu 48 °C a opatrně promíchá.

3.7 Živná půda pro vlastní testaci (testovací půda)

Složení: Pepton 6,0 g

Extrakt kvasničný 15,0 g

Agar 15,0 g

Voda doplnit do 1 000 ml

Směs se upraví na pH = 6,0 a sterilizuje 15 minut při 115 °C

- 3.8** Fyziologický roztok Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1** Plotna skleněná 360 mm x 360 mm, nebo 250 mm x 250 mm
- 4.2** Rám kovový 340 mm x 340 mm, nebo 200 mm x 200 mm
- 4.3** Korkovrt o průměru 9 mm
- 4.4** Odstředivka laboratorní vhodné konstrukce s příslušenstvím
- 4.5** Termostat vhodné konstrukce
- 4.6** Třepačka laboratorní
- 4.7** Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.8** Vodováha
- 4.9** Pipeta podle Pasteura

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží přesně 5,00 g zkušebního vzorku, přidá se přesně 200,0 ml acetonu (3.1) a 30 minut se protřepává. Potom se extrakt nechá asi 30 minut usadit. Supernatant se rozředí směsí aceton-voda (3.2), s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah avilamycinu ve zkoušeném vzorku, na testovací koncentrace 2,0 , 1,0 a 0,5 µg avilamycinu v 1 ml (poznámka 8.2).

5.1.2 Na sterilní plotnu (4.1) opatřenou kovovým rámem (4.2), utěsněným malým množstvím agarové půdy a upravenou do vodováhy (4.8), se nalije 300 ml nebo 60 ml (podle velikosti použité plotny) rozehřáté testovací půdy (3.7), ochlazené na 40 °C a naočkované vhodným množstvím inokulační suspence (3.6). Po utužení agarové půdy se plotna (4.1) vloží na 1 hod. do chladničky a po jejím vyjmutí se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem v půdě 9 x 9 nebo 6 x 6 jamek. Do těchto jamek se vnášejí testační koncentrace standardních roztoků (3.5) a testované roztoky zkoušeného vzorku pomocí Pasteurových pipet. Kalibrační standardní roztoky (testační koncentrace) se vnášejí do 3 nebo 2 řad ve středu plotny (4.1), testované roztoky zkoušeného vzorku odpovídající příslušné koncentraci standardů po obou stranách plotny. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hod. při teplotě 37 °C.

Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem s přesností nejméně na 0,1 mm. Ze získaných hodnot měření se vypočte průměrná hodnota velikosti inhibičních zón jednotlivých koncentrací pro standard i zkoušený vzorek.

5.2 Krmné směsi

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží přesně 40,00 g zkušebního vzorku, přidá se přesně 200,0 ml acetonu (3.1) a dále se postupuje podle odstavce 5.1.1 a 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah avilamycinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aceton je nebezpečnou hořlavinou I.třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.2 Stanovení obsahu avoparcinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 257, 10/09/81

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny tři zkušební metody, z nichž dvě jsou pro stanovení avoparcinu v premixech bez i za přítomnosti ionoforových antikokcidik, jako např. monenzinu, lasalocidu, maduramicinu i dalších obdobného charakteru. Třetí z metod je uvedena pro krmiva.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení avoparcinu v premixech a krmivech.

2. Princip

Vzorek se rozpustí ve směsi aceton-voda-kyselina chlorovodíková a avoparcin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633, mikrobiologicky difúzní plotnovou metodou.

Za přítomnosti ionoforových antikokcidik se tyto odstraní předextrakcí vzorku dichlormethanem.

3. Chemikálie

3.1 Dichlormethan

3.2 Kyselina chlorovodíková ($h = 1,17 \text{ g/ml}$), zředěná 1 + 9

3.3 Kyselina fosforečná (H_3PO_4), koncentrovaná ($h = 1,7 \text{ g/ml}$)

3.4 Aceton (poznámka 8.1)

3.5 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$

3.6 Síran manganatý, tetrahydrát ($\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$), pevný

3.7 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), pevný

3.8 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), pevný

3.9 Ethylalkohol - voda (1 + 4)

3.10 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.11 Extrakční roztok

Příprava: 650 ml acetonu (3.4) se smíchá s 325 ml vody a 25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá.

3.12 Avoparcin síran, standardní substance s ověřenou či deklarovanou účinností

3.13 Avoparcin, základní standardní roztok

Příprava: Podle obsahu účinné látky se odváží tolik standardní substance síranu avoparcinu (3.12) s přesností nejméně na 0,001 g, aby výsledný roztok obsahoval přesně 100 µg avoparcinu v 1 ml. Odvážené množství se převede pomocí fosforečnanového tlumivého roztoku (3.15) do odměrné baňky na 100 ml, po rozpuštění se doplní tímto tlumivým roztokem po rysku a promíchá. Tento základní standardní roztok se uchovává při teplotě 5 °C a je stálý po dobu 7 dnů.

3.14 Avoparcin, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku avoparcinu (3.13), doplní fosforečnanovým tlumivým roztokem (3.15) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 10 µg avoparcinu. Připravuje se čerstvý těsně před zkoušením.

Z tohoto roztoku se připraví dalším ředěním tlumivým fosforečnanovým roztokem (3.15) testační koncentrace 4, 2 a 1 µg v 1 ml (poznámka 8.2).

3.15 Tlumivý fosforečnanový roztok

Příprava: 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.8) se rozpustí v 950 ml vody a jeho pH se upraví kyselinou fosforečnou (3.3) na hodnotu 4,5.

3.16 Živné půdy:

3.16.1 Udržovací půda

Příprava: Živný agar č. 2 "Sevac" se připraví podle návodu výrobce. Agar se pak rozdělí po 7 až 9 ml do zkumavek, tyto se uzavrou a sterilizují 20 minut při teplotě 121 °C. Po sterilizaci se nechá utuhnout v šikmé poloze.

3.16.2 Sporulační půda

Příprava: Živný agar č. 2 v množství 40 g se připraví podle návodu výrobce, přidá se 0,4 g síranu manganatého (3.6) a do objemu 1 000 ml voda. Agar se pak rozdělí po 250 až 300 ml do Rouxových láhví (4.15) (nebo baněk na 500 ml) a sterilizuje 20 minut při teplotě 121 °C.

3.16.3 Testovací půda

Příprava: Odváží se hydrogenfosforečnan draselný 0,7 g

dihydrogenfosforečnan draselný 0,45 g

glukóza 10,0 g

kvasničný autolyzát 2,5 g

agar 18,0 g

Uvedené látky se rozmíchají v 1 000 ml vody, pH se upraví na hodnotu 6,0 a sterilizuje po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Sterilní půda se rozlije po 250 ml do předem vysterylizovaných kuželových baněk

3.16.4 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Udržování kmene: Kultura se 1krát měsíčně přeočkovává na šikmý agar. Inkubuje se 16 až 18 hodin při teplotě 37 °C a uchovává v chladničce při teplotě 5 °C. (poznámka 8.3).

Příprava sporové suspence: Nárůst základní kultury na šikmém agaru se smyje 3 ml fyziologického roztoku (3.10) a přenese se asepticky do Rouxových láhví (4.15), obsahujících sporulační půdu (3.16.2). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.15) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dní. Pak se prověřením sporulace pod mikroskopem (4.16) smyje narostlá kultura s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.10) centrifuguje, (4.3) k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.10), suspence se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu centrifuguje (4.3). Toto promývání spor se opakuje třikrát. Nakonec se suspence spor převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspence spor představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspence se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspence na 100 ml agaru.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Přístroj extrakční (např. podle Soxhleta)

4.2 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.3 Odstředivka laboratorní vhodné konstrukce s příslušenstvím (centrifugační kyvety se zátkami)

4.4 Autokláv

4.5 Třepačka vhodné konstrukce

4.6 Termostat

4.7 pH metr

4.8 Plotny skleněné 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm

4.9 Rámy kovové 240 mm x 240 mm nebo 200 mm x 200 mm

4.10 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.11 Korkovrt o průměru 9 mm

4.12 Pipety podle Pasterura

4.13 Patrony extrakční

4.14 Baňka odpařovací na 500 ml

4.15 Láhve Rouxovy na 1 000 ml

4.16 Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Za nepřítomnosti ionoforových antikokcidik

5.1.1.1 Odváží se příslušné množství (poznámka 8.4) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do kuželové baňky vhodné velikosti, suspenduje se ve 2/3 celkového objemu extrakčního roztoku (3.11) (poznámka 8.4) a nechá se 30 min. volně stát. Potom se pomocí kyseliny chlorovodíkové (3.2) upraví hodnota pH na 1,5 až 2 a obsah se extrahuje 30 minut na třepačce (4.5). Po extrakci se upraví pomocí roztoku hydroxidu sodného (3.5) pH na hodnotu 4,5. Ve zbylé 1/3 extrakčního roztoku (3.11) se upraví pH na hodnotu 4,5 a po korekci na přidaná množství kyseliny a hydroxidu se přidá do kuželové baňky. Potom se pevný podíl nechá usadit a supernatant se jednak buď odstředí (4.3) nebo přefiltruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Tento supernatant nebo filtrát se naředí pomocí tlumivého fosforečnanového roztoku (3.15) na testovací koncentrace 4, 2 a 1 µg avoparcinu v 1 ml (poznámka 8.6).

5.1.1.2 Na sterilní skleněnou plotnu (4.8) s kovovým rámem (4.9), která je položená na vyrovnávací podložce (4.10) a utěsněná malým množstvím agarové půdy (3.16.1) se vylije 60 ml rozehřáté testovací půdy (3.16.3), ochlazené na 55 - 60 °C a naočkované 0,1 ml až 0,3 ml spórové suspence (3.16.4). Po utužení agarové vrstvy se vloží plotna (4.8) na 1 hodinu do chladničky. Potom se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.11) v půdě 6 x 6 jamek, do nichž se vnášejí jednotlivé testační koncentrace standardu (3.14) a testované koncentrace zkoušeného vzorku (viz 5.1.1.1) pomocí Pasteurovy pipety (4.12). Testační roztoky standardu se plní do dvou řad pod sebou ve středu plotny a po obou stranách se plní do dvou řad testované koncentrace zkoušeného vzorku, odpovídající příslušnému ředění standardu. Plotna se zakryje děrovaným alobalem a inkubuje se 16 až 18 hodin při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm. Ze získaných hodnot se vypočte průměrná hodnota velikosti inhibičních zón jednotlivých ředění pro standard i zkoušený vzorek.

5.2.2 Za přítomnosti ionoforových antikokcidik

5.2.2.1 Nejprve se provede předběžná extrakce zkušební vzorku. Do střední části extrakčního přístroje (4.1) se vloží extrakční patrona (4.13) naplněná asi do poloviny odváženým vzorkem. Na vrchu se utěsní smotkem extrahované vaty. Do extrakční baňky se odměří asi 250 ml dichlormethanu (3.1), baňka se připojí k extrakčnímu přístroji (4.1) a celý přístroj se umístí na vodní lázni (4.2), vyhřáté a udržované při teplotě 50 °C. Dichlormethan (3.1) po zahřátí destiluje a pomocí vodního chladiče extrakčního přístroje (4.1) kondenzuje do střední části, kde je umístěna patrona (4.13) se vzorkem. Po naplnění této střední části

dichlormethanem (3.1) tento přeteče zpět do extrakční baňky a celý cyklus se opakuje. Toto se nechá opakovat asi 5 krát až 7 krát. Pak se extrakční přístroj (4.1) odstaví, patrona se vzorkem se vyjme a nechá po dobu 24 hod. vysušit při laboratorní teplotě.

Dále se postupuje podle 5.1.1.1 a 5.1.1.2.

5.2 Krmiva

Odváží se asi 50 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g do kuželové baňky, přidá se přesně 100,0 ml extrakčního roztoku (3.11), baňka se umístí na třepačku (4.5) a obsah se vytřepává po dobu 30 minut. Potom se obsah baňky převede do centrifugační kyvety, tato se vloží na odstředivku (4.3) a odstředí. Z čirého supernatantu se odpipetuje alikvotní podíl tak, aby výsledná koncentrace, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah avoparcinu v zkoušeném vzorku, byla asi 4 µg/ml. Z tohoto roztoku se připraví testované koncentrace 2, 1 a 0,5 µg avoparcinu v 1 ml (poznámka 8.6). Ředění se provede pomocí tlumivého roztoku (3.15).

Dále se postupuje podle 5.1.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah avoparcinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aceton je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Metoda ES uvádí pro krmiva koncentrace testačních roztoků 2, 1, 0,5 a 0,25 µg/ml.

8.3 Metoda ES uvádí dobu inkubace přes noc a při teplotě 30 °C.

8.4 Navážka zkušební vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah avoparcinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace avoparcinu ve výluhu byla minimálně 10 µg/1 ml.

8.5 Metoda ES uvádí pro obsahy avoparcinu tyto hodnoty opakovatelnosti

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

8.6 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.3 Stanovení obsahu flavomycinu (flavofosfolipolu)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení flavomycinu v premixech

2. Princip

Flavomycin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96 % (poznámka 8.1)

3.2 Ethylalkohol-voda, směs (1 + 1)

3.3 Medium antibiotické č.1 (fa OXOID)

3.4 Agar č.1

3.5 Živný agar č.2

3.6 Flavomycin, standardní substance známé aktivity

3.7 Flavomycin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží tolik standardní substance flavomycinu (3.6), s ohledem na deklarovanou účinnost, s přesností nejméně na 0,001 g tak, aby výsledná koncentrace flavomycinu byla 1 mg v 1 ml. Odvážené množství se rozpustí ve směsi ethylalkohol-voda (3.2), doplní touto směsí po rysku a promíchá.

Tento roztok je při uchování v chladničce stálý po dobu dvou měsíců.

3.8 Flavomycin, pracovní standardní roztok

Příprava: Základní standardní roztok (3.7) se naředí směsí ethylalkohol-voda na koncentraci 100 µg/ml a dále vodou na testační koncentrace 2, 1 a 0,5 µg v 1 ml (poznámka 8.3).

3.9 Testovací mikroorganismus *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Uchování kmene: Ve zkumavkách na šikmém udržovacím agaru při teplotě 5 °C, po třech týdnech se přeočkovává a kultivace se provádí 24 hod. při teplotě 37 °C .

Příprava suspenze k testování: Kultura kmene narostlá na udržovacím agaru se převede 5 ml fyziologického roztoku (3.10) do sterilní zkumavky a touto suspensí (asi 3 ml) se naočkuje rozehřátá testovací půda při teplotě 48 °C.

3.10 Fyziologický roztok Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.11 Udržovací agar pro uchování kmene

Příprava: Odváží se 40 g živného agaru č.2 (3.5), přidá se 1 000 ml horké vody, za stálého míchání se zahřívá až do vyčerení roztoku. Rozlije se do zkumavek a sterilizuje 20 minut při teplotě 120 °C. Po sterilizaci se zkumavky uloží v šikmé poloze do ztuhnutí půdy.

3.12 Živná půda pro vlastní testaci

Příprava: Odváží se 30,5 g antibiotického media č.1 (3.3), rozmíchá se ve 1 000 ml horké vody a sterilizuje 20 minut při teplotě 120 °C. Potom se sterilní médium rozlije do předem vysterilizovaných kuželových baněk na 300 ml.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm

4.2 Rám kovový 340 mm x 340 mm nebo 200 mm x 200 mm

4.3 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.4 Korkovrt o průměru 9 mm

4.5 Termostat vhodné konstrukce

4.6 Autokláv

4.7 Třepačka laboratorní

4.8 Vodováha

4.9 Pipeta podle Pasteura

4.10 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží asi 5 g zkušební vzorku (poznámka 8.2) s přesností nejméně na 0,001 g, zalije 200 ml směsí ethylalkohol - voda (3.1) a zahřívá na vodní lázni (4.10) vytemperované na 85 °C po dobu 15 minut. Potom se baňka umístí na třepačku (4.7) a vytřepává po dobu 15 minut, ochladí a roztok se převede do odměrné baňky na 250 ml, doplní směsí ethylalkohol-voda (3.2) po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah flavomycinu ve zkoušeném vzorku, se připraví naředěním směsí ethylalkohol-voda (3.2) testované koncentrace 2 µg , 1 µg a 0,5 µg v 1 ml (poznámka 8.3).

Naočkovaná testovací živná půda (3.12), 70 ml nebo 300 ml - podle velikosti použité plotny (4.1), se rozlije na skleněnou plotnu opatřenou rámem a utěsněnou malým množstvím agaru

(3.4), umístěnou ve vodorovné poloze (4.8). Po ztuhnutí vrstvy se plotna (4.1) uloží na jednu hodinu do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.4) v půdě 6 x 6 nebo 9 x 9 jamek, do nichž se vnáší testovací standardní i testované koncentrace zkoušeného vzorku pomocí Pasteurovy pipety (4.9). Testovací koncentrace standardu se plní do dvou nebo tří řad u středu plotny (4.1), testované koncentrace zkoušeného vzorku po obou stranách plotny na strany odpovídající příslušným řaděm testovacích koncentrací standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hodin při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých zón se měří s přesností na 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah flavomycinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Navážka zkušebního vzorku se volí s ohledem na očekávaný nebo deklarovaný obsah flavomycinu.

8.3 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.4 Stanovení obsahu olachindoxu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody zkoušení, spektrofotometrická (pro premixy) a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) (pro premixy i krmné směsi) (poznámka 8.1).

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení olachindoxu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Olachindox se stanoví ve vodném výluhu vzorku u premixů spektrofotometricky, nebo extrakcí směsí aceton-voda a vyčerení Carresovými činidly, následujícím vytřepání petroletherem, v premixech a krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 Pro metodu spektrofotometrickou (premixy)

3.1.1 Tlumivý roztok (Britton-Robinson)

Příprava: Odváží se 4,90 g kyseliny fosforečné (3.1.6), 2,40 g ledové kyseliny octové (3.1.7), 2,474 g kyseliny borité (3.1.8), rozpustí se a doplní na objem 1 000 ml. 100 ml tohoto promíchaného roztoku se smíchá s 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.9)

3.1.2 Olachindox, standardní substance se známou účinností

3.1.3 Olachindox, základní standardní roztok (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 50 mg standardní substance olachindoxu (3.1.2) 100 % účinnosti nebo přepočtené množství nižší účinnosti, rozpustí se v upravené vodě (3.1.4), doplní toutéž po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvý.

3.1.4 Upravená voda (čerstvě převařená a ochlazená destilovaná voda zbavená oxidu uhličitého)

3.1.5 Olachindox, pracovní standardní roztok (poznámka 8.1)

Příprava: Základní standardní roztok olachindoxu (3.1.3) se zředí 25 x upravenou vodou (3.1.4) tak, že tento roztok obsahuje 0,01 mg olachindoxu v 1 ml.

Připravuje se vždy čerstvý.

3.1.6 Kyselina fosforečná, 80 % ($\rho=1,633$ g/ml)

3.1.7 Kyselina octová, ledová ($\rho=1,050$ g/ml)

3.1.8 Kyselina boritá

3.1.9 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 2$ mol/l

3.2 Pro metodu HPLC navíc (krmné směsi)

3.2.1 Aceton (poznámka 8.2)

3.2.2 Methylalkohol (poznámka 8.2)

3.2.3 Směs aceton - voda (9 + 1)

3.2.4 Carresovo činidlo I

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21.9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}]$, 3 g kyseliny octové ledové (3.1.7), doplní vodou po rysku a promíchá.

3.2.5 Carresovo činidlo II

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexakynoželeznatanu draselného $(\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O})$, rozpustí ve vodě doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.2.6 Petrolether, bod varu 40 až 50°C (poznámka 8.2)

3.2.7 Kyselina octová, roztok 1 % ($\rho=1,000$ g/ml)

3.2.8 Mobilní fáze [směs kyseliny octové (3.2.7) a methylalkoholu (3.3.2)] (9 + 1)

3.2.9 Olachindox, standardní roztok

Příprava: Do odměrné banky na 100 ml se odváží 25,0 mg standardní substance olachindoxu (3.1.2) 100 % účinnosti, nebo přepočtené množství nižší účinnosti, rozpustí se v asi 80 ml vody, doplní toutéž po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 0,25 mg olachindoxu.

3.2.10 Dusík žárovkárenský, kyslíku prostý

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Pro metodu spektrofotometrickou

4.1.1 Spektrofotometr registrační, vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.1.2 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.2 Pro metodu HPCL navíc

4.2.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (kolona pro chromatografii na reverzní fázi - např. BONDAPACK C18, 10 μm , 300 mm x 3,9 mm - např. WATERS)

- 4.2.2 Třepačka mechanická laboratorní
- 4.2.3 Odparka vakuová, rotační
- 4.2.4 Filtr s fritou S₄
- 4.2.5 Lázeň vodní s termostatem
- 4.2.6 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku
- 4.2.7 Odpařovací baňka vhodného objemu

5. Postup

5.1 Metoda spektrofotometrická (premixy)

Do odměrné baňky na 200 ml se odváží asi 1 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se asi 100 ml upravené vody (3.1.4) a intenzívně se promíchává na míchačce (4.1.2) při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Potom se baňka doplní upravenou vodou (3.1.4) po rysku, promíchá a po 15 minutovém stání se obsah baňky filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z dalšího podílu filtrátu se odpipetuje alikvotní podíl tak, aby koncentrace olachindoxu, s ohledem na předpokládaný (deklarovaný) obsah ve zkoušeném vzorku, byla v odměrné baňce, do které je pipetováno, přibližně stejná jako u pracovního standardního roztoku olachindoxu (3.1.5). Zředí se vždy jen upravenou vodou (3.1.4).

Absorbance se měří na registračním spektrofotometru (4.1.1) v rozmezí vlnových délek 333 nm až 400 nm. Za naprosto shodných podmínek se měří absorbance pracovního standardního roztoku olachindoxu (3.1.5).

5.2 Metoda vysokoúčinné chromatografie (krmné směsi)

5.2.1 Kalibrace a měření (poznámka 8.3)

Do sady odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje diferencovaně 1,0 ; 2,0 ; 3,0 ; 4,0 a 5,0 ml standardního roztoku olachindoxu (3.2.9), doplní vodou po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím 2,5 ; 5,0 ; 7,5 ; 10,0 a 15,0 µg olachindoxu v 1 ml.

5.2.1.1 Pracovní podmínky:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok mobilní fáze	2 ml/min.
Detekce UV vlnová délka	372 nm
Injektovaný objem	20 µl
Retenční čas (při použité koloně)	10 až 15 min.

5.2.1.2 Kalibrační roztoky (resp. alikvotní podíl roztoku zkoušeného vzorku) se nastříkují na kolonu a eluují se pomocí mobilní fáze (3.2.8). Z více nástřiků a jimi provedených chromatografických záznamů se zjistí průměrné hodnoty píků olachindoxu a to jak u kalibračních roztoků tak i roztoku zkoušeného vzorku. Zjištěné hodnoty u kalibračních roztoků se použijí k sestavení kalibračního grafu.

Koncentrace roztoku zkoušeného vzorku se zjistí z kalibračního grafu.

5.2.2 Vlastní provedení

Do kuželové baňky na 250 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, které obsahuje podle předpokládaného (deklarovaného) obsahu olachindoxu ve zkoušeném vzorku asi 0,5 mg olachindoxu, s přesností nejméně na 0,001 g, přičemž navážka zkušební vzorku musí být nejméně 2 g (případná úprava na požadované množství ředěním). Do baňky se přidá přesně 90,0 ml směsi aceton-voda (3.2.3), baňka se uzavře zátkou a po dobu dvou hodin se intenzívně protřepává na třepačce (4.2.2). Pak se k suspensi přidá 5 ml Carresova činidla I (3.2.4), promíchá a 5 ml Carresova činidla II (3.2.4). Po opětovném promíchání se suspenze filtruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž prvních asi 10 ml se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se odpipetuje 50 ml do odpařovací baňky (4.2.7) a roztok se na odparce (4.2.3) odpaří na objem asi 5 ml při teplotě nejvýše 50 °C. Zbytek po odpaření se pomocí 25 ml vody a 50 ml petroletheru (3.2.6) (poznámka 8.4) převede do dělicí nálevky na 100 ml a protřepe. Po oddělení fází se spodní vodná fáze převede do druhé dělicí nálevky, opět se přidá 50 ml petroletheru (3.2.6) a znovu protřepe. Vodní fáze se převede do odměrné baňky na 50 ml, probublá dusíkem (3.2.10) a zahřeje na vodní lázni (4.2.5) při teplotě poněkud nižší než 60 °C pro odstranění stop petroletheru. Po ochlazení se odměrná baňka doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje za sníženého tlaku (4.2.6) přes filtr s fritou (4.2.4).

Dále se postupuje podle odstavce 5.2.1.1 a 5.2.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah olachindoxu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot 10^3 \cdot A \cdot F \cdot C_s}{A_s \cdot m}$$

kde A je korigovaná hodnota absorpce zkoušeného vzorku

A_s korigovaná hodnota absorpce pracovního standardního roztoku olachindoxu

C_s koncentrace olachindoxu v pracovním standardním roztoku v mg

F faktor ředění roztoku zkoušeného vzorku

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Korigovaná hodnota absorpce standardu i zkoušeného vzorku se určí následovně:

Ze záznamu spektrofotometrické křivky se zjistí (a to jak u standardu, tak i zkoušeného vzorku) absorpce při vlnové délce 333 nm ($=A_{333}$), při vlnové délce 400 nm ($=A_{400}$) a při maximu absorpce (obvykle 375 nm $=A_{\max}$) a korigovaná hodnota absorpce (A_s) se vypočte podle vzorce:

$$A_s = A_{\max} - (0,6269 \cdot A_{400} + 0,3731 \cdot A_{333})$$

6.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Obsah olachindoxu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{100 \cdot C}{m}$$

kde C je koncentrace olachindoxu v měřeném roztoku zkoušeného vzorku v µg/ml

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy (spektrofotometrická metoda)

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi (metoda HPLC)

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Roztoky olachindoxu jsou značně fotolabilní, proto se baňky obalují hliníkovou folií a pracuje se při tlumeném světle. Nelze rovněž je uschovávat do druhého dne.

Záznam spektra v oblasti vlnových délek 333 až 500 nm lze využít jako kvalitativní důkaz přítomnosti olachindoxu ve zkoušeném vzorku. Posuzuje se charakteristický průběh a poloha maxima ve srovnání se záznamem spektra standardu.

8.2 Petrolether a methylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy, methylalkohol je navíc nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.3 S ohledem k vysoké fotolabilitě olachindoxu je nutné zkoušení provádět za omezeného přístupu UV záření.

8.4 Místo petroletheru je možno použít hexan.

1.5 Stanovení obsahu monenzinu

1. Účel a rozsah

Tento postup specifikuje podmínky pro stanovení monenzinu v krmivech a premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Monenzin je fermentační produkt kmene *Streptomyces cinnamonensis* a jeho sodná sůl, chemického složení $C_{36}H_{61}O_{11}Na$, se používá jako kokcidiostatikum.

2. Princip

Obsah monenzinu se stanoví na základě jeho inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* CCM 1999 (ATCC 6633) difúzním plotnovým postupem.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96% (poznámka 9.1)

3.2 Extrakční roztok, ethylalkohol (3.1) - aceton - voda, směs (12 + 5 + 3) (poznámka 9.1)

3.3 Ředící roztok, ethylalkohol (3.1) - voda, směs (1 + 9)

3.4 Oxid hlinitý, bázecký, pro sloupcovou chromatografii, grade F 20

3.5 Síran draselný, krystalický

3.6 Monenzin, standardní substance - sodná sůl monenzinu s účinností vyjádřenou v obsahu čistého monenzinu.

Originální ampule se uchovávají v temnu při 5 °C.

3.7 Monenzin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží takové množství práškové standardní substance monenzinu (3.6) s přesností nejméně na 0,001 g, tak, aby s ohledem na deklarovanou účinnost byla koncentrace monenzinu - kyseliny 1 mg v 1 ml. Přidá se asi 45 ml extrakčního roztoku (3.2) a po rozpuštění se doplní (extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá. Je stálý 2 týdny při teplotě 5 °C a v temnu.

3.8 Monenzin, pracovní standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 20 ml základního standardního roztoku monenzinu (3.7), doplní ředícím roztokem (3.3) po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 20 ml do odměrné baňky na 100 ml, doplní vodou po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvý.

Tento roztok obsahuje 16 µg monenzinu v 1 ml.

3.9 Monenzin, pracovní standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku monenzinu (3.7), doplní extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá. Přípravuje se vždy čerstvý.

Tento roztok obsahuje 100 µg monenzinu v 1 ml.

3.10 Chlorid sodný, pevný

3.11 Fyziologický roztok

Příprava: 8,0 g chloridu sodného (3.10) se rozpustí, doplní na 1000 ml a sterilizuje 20 minut při 121 °C

3.12 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* CCM 1999 (ATCC 6633)

Příprava a udržování kmene: Kultura se uchovává na šikmé udržovací půdě (3.14.2) při teplotě 5 °C a 1krát měsíčně se přeočkovává. Po přeočkování se vždy inkubuje po dobu 24 h při teplotě 37 °C v termostatu (4.6).

3.13 Sporová suspenze testovacího mikroorganismu

Příprava sporové suspenze: Kultura vyrostlá na šikmém agaru se smyje asi 3 ml fyziologického roztoku (3.11) a přenes se asepticky do Rouxových láhví (4.11), obsahujících sporulační půdu (3.14.1). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.11) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dní. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.13) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.11) odstředí (4.7), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.11), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.7). Toto promývání spór se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spór převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spór představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.14 Živé půdy

3.14.1 Sporulační půda, živný agar č. 2 sušený SEVAC

Příprava: 40 g živného agaru se rozpustí v 1 000 ml teplé vody, přidá se 400 mg síranu manganatého (3.15), povaří se, rozdělí po 250 ml do Rouxových láhví (4.11) a sterilizuje 20 minut při tlaku 0,05 MPa a teplotě 110 °C.

3.14.2 Udržovací půda, živná agar č. 2 SEVAC

Příprava: Stejná jako u sporulační půdy (3.14.1) kromě přídavku síranu manganatého, před sterilací se rozdělí do zkumavek po 7 až 9 ml a po sterilizaci se nechá utuhnout v šikmé poloze.

3.14.3 Testovací půda

Příprava: 0,7 g hydrogenfosforečnanu draselného, 0,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného 10,0 g glukosy, 15,0 g agaru (nebo Bacto-agaru Difco) a 2,5 g kvasničného autolyzátu "SEVAC" se rozpustí v 1 000 ml vody, pH upraví na hodnotu 6,0 a rozlije po 300 ml do baněk na 500 ml. Sterilizuje se 15 minut při přetlaku 0,05 MPa.

3.15 Síran manganatý, pevný

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1** Plotna skleněná 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm
- 4.2** Rám čtvercový kovový o délce vnitřní hrany 340 mm nebo 200 mm
- 4.3** Korkovrt průměru 9 mm
- 4.4** Vodováha
- 4.5** Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.6** Termostat vhodných parametrů
- 4.7** Odstředivka vhodných parametrů s příslušenstvím
- 4.8** Lázeň vodní s termostatem
- 4.9** Trubice chromatografická s kohoutem, délky 500 mm, vnitřní světlost 20 mm, bez frity
- 4.10** Vata AKUVER
- 4.11** Láhev Rouxova
- 4.12** Pipeta podle Pasteura
- 4.13** Laboratorní třepačka
- 4.14** Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se asi 2 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g do kuželové baňky na 250 ml, přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.1) (poznámka 9.2) a třepe se 15 minut na třepačce (4.13). Potom se suspenze zfiltruje nebo odstředí.

Supernatant se naředí ředícím roztokem na testovací koncentraci 8 ; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml (poznámka 9.4).

5.1.2 Paralelně se připraví z pracovního standardního roztoku (3.8) ředěním vodou testační koncentrace standardů 8 ; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml.

5.1.3 300 ml (70 ml) rozehráté testovací půdy (3.14.3) zchlazené asi na 60 °C se naočkuje sporovou suspensí (3.13). Naočkována půda se rozlije na plotnu (4.1) opatřenou rámem a umístěnou ve vodorovné poloze (4.4). Po ztuhnutí agarové vrstvy se plotna uloží na 1 hodinu do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem v půdě 9 x 9 (6 x 6) jamek, do nichž se vnášejí jednotlivé testované roztoky a kalibračními roztoky standardů Pasteurovou pipetou (4.12). Standardy se plní do 3 řad pod sebou ve středu plotny, testované roztoky zkoušeného vzorku po obou stranách odpovídající koncentraci standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hodin při 37 °C.

Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Odváží se 10 až 20 g zkušebního vzorku s přesností 0,01 g do kuželové baňky na 250 ml, přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.1) (poznámka 9.3) a nechá se volně extrahovat 3 hodiny za občasného promíchání nebo přes noc v chladničce. Po skončení extrakce se roztok zfiltruje.

5.2.2 Příprava chromatografické kolony : Na dno chromatografické trubice se vloží malý smotek vaty AKUVER (4.10), vsype se oxid hlinitý (3.4), a to po několika vrstvách, z nichž každá se mírně stlačí, do výše asi 7 cm. Potom se kvantitativně převede na kolonu 25 ml filtrátu a nechá protékat. Sloupec se promývá dalšími podíly extrakčního roztoku (3.2) v dávkách po 5 ml. Eluát se jímá do odměrné baňky na 50 ml, tato se doplní extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá.

Dále se ředěním ředícím roztokem (3.3) připraví testovací koncentrace 8 ; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml (poznámka 9.4).

5.2.3 Vedle toho se připraví standardní kalibrační roztoky: 20 až 25 ml pracovního standardního roztoku (3.9) se převede na chromatografický sloupec (4.9) a eluuje stejně, jak uvedeno v odstavci 5.2.2 .

5.2.4 300 ml (70 ml) rozehráté půdy (3.14.3) a zchlazené asi na 60 °C se naočkuje sporovou suspensí (3.13). Naočkována půda se rozlije na plotnu (4.1) opatřenou rámem (4.2) utěsněným malým množstvím agarové půdy a umístěnou ve vodorovné (4.4) poloze. Po ztuhnutí agaru se uloží plotna (4.1) na 1 hod do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí v půdě korkovrtem (4.3) 9 x 9 (6 x 6) jamek asi 25 až 30 mm od sebe, do kterých se vnášejí jednotlivé testované roztoky a kalibrační roztoky standardů. Standardy se plní do 3 (2) řad pod sebou ve středu plotny, po obou stranách se plní do 3 (2) řad testované roztoky zkoušeného vzorku, odpovídající svou koncentrací příslušnému ředění standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 18 až 20 hod při teplotě 37 °C v termostatu (4.6). Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah monenzinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nestanovena.

8. Reprodukovatelnost

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

od 20 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.

9. Poznámky

9.1 Ethylalkohol a aceton jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla.

9.2 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku je možno upravit s ohledem na deklarovaný obsah monenzinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace monenzinu ve výluhu byla minimálně 10 µg/1 ml.

9.3 Maximální hmotnost navážky krmné směsi je 40 g. Pokud při této navážce není možno dosáhnout požadované koncentrace monenzinu ve výluhu 10 µg/ml, je třeba do postupu zařadit odpaření určitého množství filtrátu na vakuové odparce při teplotě maximálně 40 °C. Odparek se rozpustí v extrakčním roztoku (3.2) a dále se postupuje podle bodu 5.2.2.

9.4 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.6 Stanovení obsahu monensinu (salinomycinu a narasinu)

1. Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu v krmivech a premixech pro obsahy od 0,2 mg/kg u monensinu a od 1,5 mg/kg u salinomycinu a narasinu.

Pro účely této metody se používá tato definice: monensin, salinomycin a narasin jsou ionoforní polyetherické monokarboxylové kyseliny (IPMA), sumárních vzorců :

Monensin sodná sůl- $C_{36}H_{61}O_{11}Na$, volná kyselina $C_{36}H_{62}O_{11}$;

salinomycin sodná sůl - $C_{42}H_{69}O_{11}Na$, volná kyselina $C_{42}H_{70}O_{11}$;

narasin - $C_{43}H_{72}O_{11}$.

2. Princip

Obsah monensinu salinomycinu a narasinu se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem a přečištění na pevné fázi metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s postkolonovou derivatizací a UV detektorem.

3. Chemikálie a zkušební pomůcky

3.1 Voda, čistota HPLC

3.2 Methanol, CH_3OH , čistota HPLC

3.3 Dichlormethan, CH_2Cl_2 , $\rho = 1,32 \text{ g.cm}^{-3}$

3.4 Kyselina sírová, H_2SO_4 , $\rho = 1,83 \text{ g.cm}^{-3}$, čistota HPLC nebo ch.č.

3.5 Octan ethylnatý; čistoty > 99,5 %, $C_4H_8O_2$,

3.6 Hexan; čistoty > 90 %, C_6H_{14}

3.7 Aceton; čistoty > 99,5 %, CH_3COCH_3

3.8 Kyselina octová, čistota HPLC, čistota 100 %, CH_3COOH , $\rho = 1,05 \text{ g.cm}^{-3}$

3.9 Kyselina octová, roztok 5 %

Příprava: V odměrné baňce na 100 ml se smísí 70 ml vody a 5,0 ml kyseliny octové (3.8), vytemperuje na laboratorní teplotu, vodou se doplní po značku a promíchá.

3.10 Mobilní fáze

Příprava: V odměrné baňce na 1000 ml se smísí asi 925 ml methanolu (3.2) a 75,0 ml kyseliny octové (3.9), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá.

3.11 p-N,N'-dimethylaminobenzaldehyd (p-DMBA), $C_9H_{11}NO$, např. Sigma, D 8904, (light sensitive)

3.12 Derivatizační činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 250 ml methanolu (3.2), opatrně se přidá 15,0 ml kyseliny sírové (3.4) (chlazení !) a v této směsi se rozpustí 17,5 g p-DMBA (3.11), ochladí se na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá. Směs se uchovává v chladu (při teplotě do 10 °C) a ve tmě. Stabilní maximálně 21 dní.

3.13 Monensin, sodná sůl, monohydrát, standardní substance, čistota min. 89,9 %, např. Riedel-deHaën, VETRANAL, Cat.No. 61200.

3.14 Salinomycin, sodná sůl, hydrát, $C_{42}H_{69}O_{11}Na \cdot 2,5H_2O$, čistota min. 97 %, např. Riedel-deHaën, VETRANAL, Cat.No.40820,
nebo salinomycin, sodná sůl, bezvodá forma, min. čistota 98%, např. Hoechst.

3.15 Narasin, min. čistota 97 %, např. Sigma, Cat.No. N-1271

3.16 Základní roztok směsný

Příprava : Do odměrné baňky na 100 ml se naváží postupně takové množství monensinu (3.13), salinomycinu (3.14) a narasinu (3.15), aby výsledná koncentrace odpovídala 0,2 mg sodných solí monensinu a salinomycinu a 0,2 mg narasinu v 1 ml. Baňka se doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá.

3.17 Kolonky pro SPE 500 mg Silica, např. Waters - Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT020520

3.18 Methanol, roztok 90 %

Příprava : Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 100,0 ml vody, přidá se 800 ml neutrálního methanolu (3.2), promíchá, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá.

3.19 Extrakční roztok 20 % octanu ethylnatého v hexanu

Příprava : Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml octanu ethylnatého (3.5), doplní n-hexanem (3.6) po značku a promíchá.

3.20 Promývací roztok pro SPE (5 % aceton v dichlormethanu)

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odměří 12,5 ml acetonu (3.7), doplní dichlormethanem (3.3) po značku a promíchá.

3.21 Eluční roztok pro SPE (8,0 % roztok methanolu v dichlormethanu)

Příprava : Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 40,0 ml methanolu (3.2), doplní dichlormethanem (3.3) po značku a promíchá.

3.22 Fosfátový tlumivý roztok : V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí 0,2282 g trihydrátu hydrogenfosforečnanu draselného $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ve 300 ml vody a po rozpuštění se doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá (chlazení).

4. Přístroje

- 4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím
- 4.2 Třepačka mechanická laboratorní
- 4.3 Koncentrátor vzorků
- 4.4 Ultrazvuková lázeň
- 4.5 Odstředivka laboratorní
- 4.6 Extrakční jednotka (např. spe 12 J.T. Baker)

5. Postup

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti 1,0 až 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a šrotování a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám IPMA. Roztoky IPMA se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření). Za umělého osvětlení jsou roztoky stabilní.

5.1 Extrakce a přečištění extraktu na pevné fázi

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 0,1 až 100 mg IPMA s přesností na 0,001 g (0,5 g pro základní substance a trituráty, 5 g pro premixy doplňkových látek, 20 g až 30 g pro krmné směsi). Zkušební vzorek triturátu se přelije 200,0 ml methanolu (3.18), zkušební vzorek premixu se přelije 100,0 ml methanolu (3.18) a zkušební vzorek krmné směsi se přelije 100,0 ml extrakčního roztoku (3.19). Baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce (4.2) 30 minut. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 2 až 5 ml se nepoužije.

5.1.1 Krmné směsi

Na extrakční jednotku (4.6) se nasadí kolonka Silica (3.17), kondicionuje se 4 ml extrakčního roztoku (3.19) a poté se na kolonku nanese takové množství extraktu, aby výsledná koncentrace ležela v rozmezí 3 až 25 mg/l, maximálně však 5 ml extraktu získaného podle 4.1 (poznámka 10.1). Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 krát 4 ml promývacího roztoku (3.20) a poté se IPMA eluuje do 10 ml vialky 8 ml elučního roztoku (3.21). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků (4.3) pod proudem dusíku při 50 °C, odparek se zalije 2,0 až 5,0 ml fosfátového pufru (3.22) tak, aby výsledná koncentrace ležela v rozmezí 4 až 40 mg/l. Extrakt se promíchá, rozpustí na ultrazvuku (4.4) (30 s) a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (4.5) po dobu 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu

5.1.2 Trituráty a premixy doplňkových látek

Podle deklarovaného obsahu IPMA se extrakt získaný podle 4.1 naředění fosfátovým pufrem (3.22) tak, aby výsledná koncentrace ležela v oblasti kalibrační křivky. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (4.5) po dobu 3 minut při 10000 ot./min.

5.2 Stanovení metodou HPLC

5.2.1 Chromatografické podmínky

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému .

Následující podmínky jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky, za předpokladu, že dají rovnocenné výsledky.

Požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně :

	kapacitní faktor $k \geq 2,5$
	tailing faktor $t_{\alpha} \leq 1,35$
	rozlišení monensin B/monensin A - $R \geq 1,3$
	monensin A/salinomycin - $R \geq 1,5$
	salinomycin/narasin - $R \geq 1,5$.
Kolona:	C ₁₈ -reverzní fáze, Nova-Pak C ₁₈ , 4 μ m, 150 x 3,9 mm nebo obdobná.
Mobilní fáze:	viz 3.10, při použití alternativní kolony se musí mobilní fáze upravit tak, aby vyhovovala požadovaným validačním parametrům.
Průtok mobilní fáze:	0,6 ml/min
Teplota kolony:	38 °C nebo teplota okolí
Průtok derivatizačního činidla:	0,8 ml/min
Objem derivatizační smyčky:	1000 μ l
Vnitřní průměr deriv. smyčky	0,25 mm
Teplota derivat. postkolon. systému:	(90 – 95) °C $\pm$ 2 °C
Detektor UV:	598 nm
Objem nástřiku:	50 μ l
RetTime: pro uvedenou kolonu při	
teplotě okolí (min) :	
monensin	4,8
salinomycin	5,6
narasin	6,5

Průtok mobilní fáze, derivatizačního činidla a teplota derivatizace musí být zachovány.

5.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 25 ml se pipetuje 0,5; 1,0; 2,0 a 5,0 ml základního roztoku IPMA (3.16), doplní fosfátovým tlumivým roztokem (3.22) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci 4,0; 8,0; 16,0 a 40,0 mg/l. Na

chromatografickou kolonu se nanáší 50 µl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

6. Výpočet

Obsah monensinu (X_M) vyjádřený v mg/kg se rovná součtu obsahu monensinu A a B, které se vypočtou podle vzorce:

$$X_M = \frac{c \times V \times R \times \left(1 + \frac{A_{M_B}}{A_{M_A}} \times F_P \right)}{m_a}$$

kde	c	je	koncentrace monensinu A odečtená z kalibrační křivky pro standard monensinu A v mg/l
	m_a		hmotnost zkušební vzorku v g
	V		objem extraktu v ml
	R		zředovací faktor
	F_P		korelační faktor pro mikrobiologickou aktivitu monensinu B; $F_P = 0,28$
	A_{MB}		plocha píku monensinu B
	A_{MA}		plocha píku monensinu A

Obsah salinomycinu (X_S) a narasinu (X_N) vyjádřený v mg/kg se vypočte podle vzorce:

$$X_{S(N)} = \frac{c \times V \times R}{m_a}$$

kde	c	je	koncentrace salinomycinu nebo narasinu odečtená z kalibrační křivky v mg/l
	m_a		hmotnost zkušební vzorku v g
	V		objem extraktu v ml
	R		zředovací faktor

7. Opakovatelnost

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

od 0,2 do 30 mg/kg	15 % relat.
od 30 do 90 mg/kg	4,5 mg/kg

nad 90 mg/kg

5 % relat.

8. Reprodukovatelnost

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

do 30 mg/kg

5 mg/kg

od 30 do 100 mg/kg

15 % relat.

od 100 do 200 mg/kg

15 mg/kg

od 200 do 50 000 mg/kg

10 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,2 mg/kg.

9. Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,5 mg/kg pro monensin, 1,5 mg/kg pro salinomycin a narasin..

10. Poznámky

10.1 U vzorků s obsahem IMPA pod 5 mg/kg se kolonka kondicionuje 5 ml extrakčního roztoku (3.19) a poté se na kolonku nanese 10 ml extraktu získaného podle 4.1. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 krát 6 ml promývacího roztoku (3.20) a poté se IPMA eluuje do 10 ml vialky 8 ml elučního roztoku (3.21). Dále se postupuje stejně jako u krmných směsí.

1.7 Stanovení obsahu salinomycinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení salinomycinu v premixech a krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice: Salinomycin je stimulátor růstu a antikokcidikum. Po chemické stránce je to sodná sůl polyetheru kyseliny monokarboxylové, sumárního vzorce $C_{42}H_{69}O_{11}Na$, produkované kmenem *Streptomyces albus*.

2. Princip

Salinomycin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96 % (poznámka 8.1)

3.2 Ethylalkohol 90 % (poznámka 8.1)

3.3 Ethylalkohol 25 %

3.4 Fyziologický roztok

Příprava: 8,0 g chloridu sodného (3.10) se rozpustí, doplní na 1000 ml a sterilizuje 20 minut při 120 °C

3.5 Síran manganatý ($MnSO_4$), pevný

3.6 Oxid hlinitý, bázecký pro sloupcovou chromatografii

3.7 Salinomycin, standardní substance o známé účinnosti

3.8 Salinomycin, základní standardní roztok (pro premixy i krmné směsi)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží takové množství standardní substance salinomycinu (3.7), s ohledem na deklarovanou účinnost, s přesností nejméně na 0,001 g, které vytvoří koncentraci salinomycinu 1 mg v 1 ml. Toto vypočtené a navážené množství se rozpustí v 96 % ethylalkoholu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce při 4 °C a takto uchován je roztok stabilní po dobu 14 dní.

3.9 Salinomycin, pracovní standardní roztok

Příprava: Ze základního standardního roztoku salinomycinu se vhodným ředěním 25 % ethylalkoholem (3.3) připraví testační koncentrace 4 ; 2 a 1 µg v 1 ml (poznámka 8.3).

3.10 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Příprava a udržování kmene: Základní kmen je udržován pravidelným přeočkováním na šikmém masopeptonovém agaru, inkubován při teplotě 37 °C 18 až 24 hod a uchováván při teplotě 4 °C.

3.11 Živné médium č. 1 pro pěstování testačního kmene

Složení:	Pepton	6,0 g
	Pankreat.hydrolyzát kaseinu	4,0 g
	Extrakt kvasničný	3,0 g
	Extrakt masový	1,5 g
	Glukosa	1,0 g
	Agar	12,0 g

Voda doplnit do 1 000 ml Sterilizuje se 15 minut při teplotě 121 °C.

3.12 Sporová suspenze testovacího mikroorganismu

Příprava: Nárůst kultury na šikmém agaru se smyje 3 ml fyziologického roztoku (3.4) a přenesení asepticky do Rouxovy láhve (4.11) obsahující 300 ml živného média č. 1 (3.11), ke kterému se přidalo 300 mg síranu manganatého (3.5). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozestře po povrchu živného média.

Takto připravené Rouxovy láhve (4.11) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dní. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.13) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.4) odstředí (4.4), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.4), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.4). Toto promývání spór se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spór převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spór představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.13 Živné médium č. 2 pro vlastní testaci - testovací půda

Složení:	Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	0,69 g
	Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	0,45 g
	Extrakt kvasničný	2,5 g
	Glukosa	10,0 g
	Agar	12,0 g

Voda doplnit do 1 000 ml Sterilizuje se 15 minut při teplotě 121 °C.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1** Plotna skleněná 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm
- 4.2** Rám kovový 340 mm x 340 mm nebo 200 mm x 200 mm
- 4.3** Korkovrt o průměru 9 mm
- 4.4** Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím
- 4.5** Termostat vhodné velikosti
- 4.6** Třepačka laboratorní
- 4.7** Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.8** Vodováha
- 4.9** Pipety podle Pasteura
- 4.10** Trubice chromatografická s kohoutem, průměr 20 mm bez frity
- 4.11** Láhev Rouxova na 1 000 ml
- 4.12** Měřítka posuvná
- 4.13** Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se asi 10 g zkušební vzorku s přesností 0,01 g do kuželové baňky na 250 ml (poznámka 8.2), přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.2) a 30 minut se protřepává na třepačce (4.6). Filtruje se přes suchý středně hustý filtr do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se dále ředí ethylalkoholem (3.3), s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah salinomycinu ve zkoušeném vzorku, na koncentrace 4 ; 2 a 1 µg salinomycinu v 1 ml (poznámka 8.3).

5.1.2 Testovací plotna se připraví následovně:

Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) s kovovým rámem (4.2) utěsněným malým množstvím agarové půdy, upraveným do vodováhy (4.8), se nalije 60 nebo 300 ml (podle velikosti použité plotny) rozehřáté testovací půdy (živné médium č. 2 - 3.13), která je ochlazená na teplotu 60 °C a naočkována vhodným množstvím sporové suspenze testovacího mikroorganismu (3.12). Po utužení agarové vrstvy se plotna (4.1) vloží na 1 hod. do chladničky. Potom se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.3) v půdě 6 x 6 nebo 9 x 9 jamek, do nich se vnášejí vzorky i standardy pomocí Pasteurových pipet (4.9). Testační koncentrace standardu (3.9) se plní do tří nebo dvou řad ve středu plotny, testované koncentrace vzorku (viz 5.1.1) po obou stranách plotny na strany odpovídající příslušnému ředění standardu. Plotny (4.1) se inkubují 16 až 18 hod při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem (4.12) s přesností na 0,1 mm.

5.2. Krmné směsi

5.2.1 Do kuželové baňky vhodného objemu (poznámka 8.2) se odváží asi 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g (poznámka 8.2), přidá se určené přesné množství (poznámka 8.2) ethylalkoholu (3.2) a 30 minut se vytřepává na třepáče (4.6). Vzniklá suspenze se převede na chromatografickou kolonu, která je připravena tak, že do chromatografické trubice (4.10) ve svislé poloze se na dno vloží smotek vaty, trubice se naplní do výšky asi 75 mm oxidem hlinitým (3.6). Eluát se dále ředí ethylalkoholem (3.3) s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah salinomycinu ve zkoušeném vzorku, na koncentrace 4 ; 2 a 1 µg salinomycinu v 1 ml (poznámka 8.3).

Dále se postupuje podle 5.1.2 .

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah salinomycinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla

8.2 Navážka zkušební vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah salinomycinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace salinomycinu ve výluhu byla 10 µg/1 ml.

8.3 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.14 Stanovení obsahu avoparcinu

Tato metoda je překladem EU metody, uvedené v Official Journal no L 257,10/09/81

1A. Účel a rozsah

Tato metoda je určena pro stanovení avoparcinu v krmivech a premixech. Spodní limit stanovení je 2 mg/kg (2 ppm). Přítomnost polyetherových antibiotik může rušit stanovení.

2A. Princip

Vzorek se extrahuje směsí aceton-voda-kyselina chlorovodíková. Antibiotická aktivita extraktu se stanoví měřením difuze avoparcinu v agarovém médiu s naočkovaným mikroorganizmem *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Difuze se projevuje tvorbou inhibičních zón mikroorganismu. Průměr těchto zón je považován za přímo úměrný logaritmu antibiotické koncentrace v rozsahu použitých koncentrací.

3A. Mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

3A.1 Udržování kmene

Zkumavky se šikmým agarem (4.1) se naočkují kulturou *Bacillus subtilis* a inkubují se přes noc při teplotě 30 °C. Poté se zkumavky uchovávají při teplotě asi 4 °C. Přeočkování se provádí jedenkrát měsíčně.

3A.2 Příprava sporové suspenze (poznámka 10.1)

Nárůst základní kultury na nadávno připraveném šikmém agaru (3.1) se smyje 2 - 3 ml sterilní vody. Pomocí této suspenze se naočkuje 300 ml kultivačního média (4.1) v Rouxově lahvi a inkubuje se 3 - 5 dnů při 30 °C. Po mikroskopické kontrole sporulace se smyje narostlá kultura 15 ml ethanolu (4.2) a důkladně se promíchá. Takto připravená suspenze může být uchovávána při teplotě 4 °C alespoň 5 měsíců.

4A. Kultivační média a chemikálie

4.1 Kultivační medium (poznámka 10.2)

Příprava : Odváží se

- 6 g peptonu
- 4 g tryptonu
- 3,0 g kvasničného extraktu
- 1,5 g masového extraktu
- 1,0 g glukosy
- 15,0 g agaru,

doplní se vodou do 1000 ml, pH se po sterilaci upraví na 6,5

4A.2 Ethylalkohol, 20% roztok

Příprava : 200 ml ethylalkoholu se zředí 800 ml vody

4A.3 Kyselina chlorovodíková ($\rho=1,19$ g/ml)

4A.4 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 2$ mol/l

4A.5 Tlumivý fosforečnanový roztok, $c = 2$ mol/l

Příprava : 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), voda do 1000 ml, pH se upraví na hodnotu 4,5.

4A.6 Směs aceton - voda - kyselina chlorovodíková (4.3) : 65 - 32,5 - 2,5

4A.7 Avoparcin síran, standardní substance s ověřenou či deklarovanou účinností

5A. Standardní roztoky

Rozpusť se přesně odvážené množství asi 10 mg standardní substance (4.7) ve fosforečnanovém tlumivém roztoku a naředí se tímto tlumivým roztokem tak, aby vznikl zásobní roztok o koncentraci 100 μg avoparcinu v 1 ml. Uchováván v uzavřené lahvi při teplotě 4 °C je zásobní roztok stálý po dobu 7 dnů.

5A.1 Pro premixy

Postupným ředěním zásobního roztoku (5) tlumivým roztokem (4.5) se získají následující roztoky :

S8	4,0 $\mu\text{l/ml}$
S4	2,0 $\mu\text{l/ml}$
S2	1,0 $\mu\text{l/ml}$
S1	0,5 $\mu\text{l/ml}$

5A.2 Pro krmiva

S8	2,0 $\mu\text{l/ml}$
S4	1,0 $\mu\text{l/ml}$
S2	0,5 $\mu\text{l/ml}$
S1	0,25 $\mu\text{l/ml}$

6A. Příprava extraktu a zkušebního roztoku

6A.1 Premixy

Odváží se takové množství zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, aby obsahovalo 10 až 100 mg avoparcinu. Navážka se přenesení do odměrné baňky na 100 ml, přidá se 60 ml extrakční směsi (4.6) a třepe se 15 minut na mechanické třepačce. Zkontroluje se pH a pokud je třeba, upraví se pomocí kyseliny chlorovodíkové (4.3) na hodnotu 2. Objem se

upraví extrakční směsí (4.6) po rysku, důkladně promíchá a filtruje přes vhodný filtrační papír (např. Whatman č. 1), přičemž prvních 5 ml filtrátu se odlije. Z filtrátu se odpipetuje vhodný objem, pH se upraví pomocí hydroxidu sodného (4.4) na hodnotu 4,5. Tento roztok se naředí tlumivým roztokem (4.5) tak, aby se získal roztok o koncentraci 4 µl / ml (U8). Dalším postupným ředěním (1+ 1) tlumivým roztokem se připraví roztoky U4 (předpokládaná koncentrace 2 µl / ml), U2 (předpokládaná koncentrace 1 µl / ml) a U1 (předpokládaná koncentrace 0,5 µl / ml).

6A.2 Krmiva

Odváží se 50 g zkušební vzorku a třepa se 30 minut na mechanické třepačce se 100 ml extrakční směsí (4.6). Extrakt se vyčechá centrifugací v uzavřených centrifugačních zkumavkách a z něho se odpipetuje vhodný objem (viz tabulka 1), pH se upraví pomocí hydroxidu sodného (4.4) na hodnotu 4,5. Tento roztok se naředí tlumivým roztokem (4.5) tak, aby se získal roztok o koncentraci 2 µl / ml (U8) (tabulka 1). Dalším postupným ředěním (1 + 1) tlumivým roztokem se připraví roztoky U4 (předpokládaná koncentrace 1 µl / ml), U2 (předpokládaná koncentrace 0,5 µl / ml) a U1 (předpokládaná koncentrace 0,25 µl / ml).

Tabulka 1

Předpokládaný obsah avoparcinu mg/kg	5	7,5	10	15	20	40
navážka zkušební vzorku v g ($\pm 0,1$)	50	50	50	50	50	50
objem extrakční směsí (4.6) v ml	100	100	100	100	100	100
pipetovaný objem vzčiřeného extraktu v ml	20	15	20	15	20	10
konečný objem U8 v ml	25	25	50	50	100	100
Očekávaná koncentrace U8 v µg /ml	2	asi 2	2	asi 2	2	2

7A. Vlastní postup

7A.1 Naočkování zkušební půdy

Zkušební půda (4.1) se naočkuje sporovou suspenzí (3.2) při teplotě 50 - 60 °C. Při předběžné zkoušce na plotnách se zkušební půdou (4.1) se stanoví množství sporové suspenze, potřebné pro získání co největších a nejjasnějších inhibičních zón s různými koncentracemi avoparcinu.

7A.2 Příprava ploten

Difuze do agaru je prováděna na plotně za použití čtyř koncentrací standardního roztoku avoparcinu (S8, S4, S2 a S1) a čtyř koncentrací extraktu (µ8, µ4, µ2 a µ1). Na každé plotně musí být všechny čtyři koncentrace standardního roztoku avoparcinu. Ke stanovení se použije plotna, na kterou je možno do agaru vyhloubit nejméně osm jamek o průměru 10 až 13 mm s minimální vzdáleností středů jamek 30 mm. Zkoušku je výhodné provádět na plotnách, které sestávají ze skleněné desky, opatřené hliníkovým nebo plastovým rámem, 200 mm v průměru a 20 mm vysoký. Na plotnu se nalije takové množství média (4.1) naočkování podle 7.1, aby se vytvořila stejnoměrná vrstva o tloušťce 2 mm (60 ml na plotnu o průměru 200 mm). Plotna se nechá zchladnout ve vodorovné poloze, vyhloubí se jamky a do každé jamky se se

odpipetuje přesné množství antibiotického roztoku (0,10 až 0,15 ml podle průměru jamky). Pro každý vzorek se opakuje zkouška nejméně čtyřikrát s každou koncentrací, takže výsledek zkoušky se počítá z 32 inhibičních zón.

7A.3 Inkubace

Plotny se inkubují při teplotě 30 °C 16 - 18 hodin.

8A. Výpočet - viz OJ no L 257 z 10.9.1981

9A. Opakovatelnost

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

od 2 do 10 mg/kg hodnotu	2 mg/kg
od 10 do 20 mg/kg hodnotu	20 % relat.
od 25 do 50 mg/kg hodnotu	5 mg/kg
nad 50 mg/kg hodnotu	10 % relat.

10A. Poznámky

10A.1 Může být použita i jiná metoda, pokud poskytne podobnou sporovou suspenzi

10A.2 Může být použito jakékoli komerční médium podobného složení, pokud poskytuje stejné výsledky.

1.15 Stanovení obsahu monenzinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení monenzinu v premixech a krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice: Monenzin je fermentační produkt kmene *Streptomyces cinnamonensis* a jeho sodná sůl, chemického složení $C_{36}H_{61}O_{11}Na$, se používá jako kokcidostatikum.

2. Princip

Monenzin se stanoví na základě jeho inhibičního účinku na testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)

3.2 Extrakční roztok, ethylalkohol (3.1) - aceton - voda, směs (12 + 5 + 3) (poznámka 8.1)

3.3 Ředící roztok, ethylalkohol (3.1) - voda, směs (1 + 9)

3.4 Oxid hlinitý, bázecký, pro sloupcovou chromatografii, grade F 20

3.5 Síran draselný, krystalický

3.6 Monenzin, standardní substance - sodná sůl monenzinu s účinností vyjádřenou v obsahu čistého monenzinu.

Originální ampule se uchovávají v temnu při 5 °C.

3.7 Monenzin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží takové množství práškové standardní substance monenzinu (3.6) s přesností nejméně na 0,001 g, tak, aby s ohledem na deklarovanou účinnost byla koncentrace monenzinu - kyseliny 1 mg v 1 ml. Přidá se asi 45 ml extrakčního roztoku (3.2) a po rozpuštění se doplní (extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá. Je stálý 2 týdny při teplotě 5 °C a v temnu.

3.8 Monenzin, pracovní standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 20 ml základního standardního roztoku monenzinu (3.7), doplní ředícím roztokem (3.3) po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 20 ml do odměrné baňky na 100 ml, doplní vodou po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvý.

Tento roztok obsahuje 16 µg monenzinu v 1 ml.

3.9 Monenzin, pracovní standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku monenzinu (3.7), doplní extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá. Přípravuje se vždy čerstvý.

Tento roztok obsahuje 100 µg monenzinu v 1 ml.

3.10 Chlorid sodný, pevný

3.11 Fyziologický roztok

Příprava: 8,0 g chloridu sodného (3.10) se rozpustí, doplní na 1000 ml a sterilizuje 20 minut při 121 °C

3.12 Testovací mikroorganismus Bacillus subtilis ATCC 6633 (CCM 1999)

Příprava a udržování kmene: Kultura se uchovává na šikmé udržovací půdě (3.14.2) při teplotě 5 °C a 1krát měsíčně se přeočkovává. Po přeočkování se vždy inkubuje po dobu 24 h při teplotě 37 °C v termostatu (4.6).

3.13 Sporová suspenze testovacího mikroorganismu

Příprava sporové suspenze: Kultura vyrostlá na šikmém agaru se smyje asi 3 ml fyziologického roztoku (3.11) a přenes se asepticky do Rouxových láhví (4.11), obsahujících sporulační půdu (3.14.1). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.11) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dní. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.13) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.11) odstředí (4.7), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.11), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.7). Toto promývání spór se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spór převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spór představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.14 Živé půdy

3.14.1 Sporulační půda, živný agar č. 2 sušený SEVAC

Příprava: 40 g živného agaru se rozpustí v 1 000 ml teplé vody, přidá se 400 mg síranu manganatého (3.15), povaří se, rozdělí po 250 ml do Rouxových láhví (4.11) a sterilizuje 20 minut při tlaku 0,05 MPa a teplotě 110 °C.

3.14.2 Udržovací půda, živná agar č. 2 SEVAC

Příprava: Stejná jako u sporulační půdy (3.14.1) kromě přidavku síranu manganatého, před sterilací se rozdělí do zkumavek po 7 až 9 ml a po sterilizaci se nechá utuhnout v šikmé poloze.

3.14.3 Testovací půda

Příprava: 0,7 g hydrogenfosforečnanu draselného, 0,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného 10,0 g glukosy, 15,0 g agaru (nebo Bacto-agaru Difco) a 2,5 g kvasničného autolyzátu "SEVAC" se rozpustí v 1 000 ml vody, pH upraví na hodnotu 6,0 a rozlije po 300 ml do baněk na 500 ml. Sterilizuje se 15 minut při přetlaku 0,05 MPa.

3.15 Síran manganatý, pevný

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Plotna skleněná 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm
- 4.2 Rám čtvercový kovový o délce vnitřní hrany 340 mm nebo 200 mm
- 4.3 Korkovrt průměru 9 mm
- 4.4 Vodováha
- 4.5 Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.6 Termostat vhodných parametrů
- 4.7 Odstředivka vhodných parametrů s příslušenstvím
- 4.8 Lázeň vodní s termostatem
- 4.9 Trubice chromatografická s kohoutem, délky 500 mm, vnitřní světlost 20 mm, bez frity
- 4.10 Vata AKUVER
- 4.11 Láhev Rouxova
- 4.12 Pipeta podle Pasteura
- 4.13 Laboratorní třepačka
- 4.14 Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se asi 2 g zkušebního vzorku s přesností 0,001 g do kuželové baňky na 250 ml, přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.1) (poznámka 8.2) a třepe se 15 minut na třepačce (4.13). Potom se suspenze zfiltruje nebo odstředí.

Supernatant se naředí ředícím roztokem na testovací koncentraci 8 ; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml (poznámka 8.4).

5.1.2 Paralelně se připraví z pracovního standardního roztoku (3.8) ředěním vodou testační koncentrace standardů 8 ; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml.

5.1.3 300 ml (70 ml) rozehřáté testovací půdy (3.14.3) zchlazené asi na 60 °C se naočkuje sporovou suspensí (3.13). Naočkováná půda se rozlije na plotnu (4.1) opatřenou rámem a umístěnou ve vodorovné poloze (4.4). Po ztuhnutí agarové vrstvy se plotna uloží na 1 hodinu do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem v půdě 9 x 9 (6 x 6) jamek, do nichž se vnášejí jednotlivé testované roztoky a testační standardy Pasteurovou pipetou (4.12). Standardy se plní do 3 řad pod sebou ve středu plotny, testované roztoky zkoušeného vzorku po obou stranách odpovídající koncentraci standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hodin při 37 °C.

Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Odváží se 10 až 20 g zkušební vzorku s přesností 0,01 g do kuželové baňky na 250 ml, přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.1) (poznámka 8.3) a nechá se volně extrahovat 3 hodiny za občasného promíchání nebo přes noc v chladničce. Po skončení extrakce se roztok zfiltruje.

5.2.2 Příprava chromatografické kolony : Na dno chromatografické trubice se vloží malý smotek vaty AKUVER (4.10), vsype se oxid hlinitý (3.4), a to po několika vrstvách, z nichž každá se mírně stlačí, do výše asi 7 cm. Potom se kvantitativně převede na kolonu 25 ml filtrátu a nechá protékat. Sloupec se promývá dalšími podíly extrakčního roztoku (3.2) po dávkách 5 ml. Eluát se jímá do odměrné baňky na 50 ml, tato se doplní extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá.

Dále se ředěním ředícím roztokem (3.3) připraví testovací koncentrace 8 ; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml (poznámka 8.4).

5.2.3 Vedle toho se připraví standardní kalibrační roztoky: 20 až 25 ml pracovního standardního roztoku (3.9) se převede na chromatografický sloupec (4.9) a eluuje stejně, jak uvedeno v odstavci 5.2.2 .

5.2.4 300 ml (70 ml) rozehřáté půdy (3.14.3) a zchlazené asi na 60 °C se naočkuje sporovou suspensí (3.13). Naočkováná půda se rozlije na plotnu (4.1) opatřenou rámem (4.2) utěsněným malým množstvím agarové půdy a umístěnou ve vodorovné (4.4) poloze. Po ztuhnutí agaru se uloží plotna (4.1) na 1 hod do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí v půdě korkovrtem (4.3) 9 x 9 (6 x 6) jamek asi 25 až 30 mm od sebe, do kterých se vnášejí jednotlivé testované roztoky a testační roztoky standardů. Standardy se plní do 3 (2) řad pod sebou ve středu plotny, po obou stranách se plní do 3 (2) řad testované roztoky zkoušeného

vzorku, odpovídající svou koncentrací příslušnému řešení standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 18 až 20 hod při teplotě 37 °C v termostatu (4.6). Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah monenzinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol a aceton jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku je možno upravit s ohledem na deklarovaný obsah monenzinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace monenzinu ve výluhu byla minimálně 10 µg/1 ml.

8.3 Maximální hmotnost navážky krmné směsi je 40 g. Pokud při této navážce není možno dosáhnout požadované koncentrace monenzinu ve výluhu 10 µg/ml, je třeba do postupu zařadit odpaření určitého množství filtrátu na vakuové odparce při teplotě maximálně 40 °C. Odparek se rozpustí v extrakčním roztoku (3.2) a dále se postupuje podle bodu 5.2.2.

8.4 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.17 Stanovení obsahu virginiamycinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 015, 18/10/84

Tato metoda je překladem metody EU uvedené v Official Journal no L 015, 18/10/84

1A. Účel a použití

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení virginiamycinu v premixech a krmivech. Limit detekce je 2 mg/kg (poznámka 10.1).

2A. Princip

Vzorek je extrahován methanolickým roztokem Tweenu 80. Extrakt se dekantuje nebo odstředí a naředí. Antibiotická aktivita se stanovuje měřením difuze virginiamycinu v agarovém médiu, naočkovaném mikroorganizmem *Micrococcus varians* ATCC 9341.

3A. Mikroorganismy

Testovací mikroorganismus *Micrococcus varians* ATCC 9341

3A.1 Uchování kmene: Ve zkumavkách se šikmou živnou půdou (4.1) se provádí kultivace 24 hodin při teplotě 30 °C. Uchovává se při teplotě asi 4 °C a každých 14 dní se přeočkovává.

3A.2 Příprava suspenze k testování (poznámka 10.2): Kultura kmene ze šikmé živné půdy se převede 2 - 3 ml fyziologického roztoku (4.3) do roztoku a touto suspenzí se naočkuje 250 ml živné půdy (4.1) v Rouxově lahvi a inkubuje se 18 až 20 hodin při 30° C. Nárůst se převede do 25 ml fyziologického roztoku (4.3) opatrně se promíchá. Suspenze se naředí v poměru 1 : 10 fyziologickým roztokem (4.3). Propustnost suspenze při 650 nm v 1 cm kyvetě proti fyziologickému roztoku musí být 75 %. Tato suspenze se může uchovávat jeden týden při 4 °C.

4A. Živná media a chemikálie

4A.1 Živná půda pro uchovávání kmene a pro testování (poznámka 10.3)

Příprava: Odváží se 6,0 g masového peptonu
4,0 g tryptonu
3,0 g kvasničného extraktu
1,5 g masového extraktu

Příprava: Odváží se 1,0 g glukózy (3.7)
10 až 20 g agaru a
1 000 ml vody.

Hodnota pH se upraví po sterilizaci na hodnotu 6,5.

4A.2 Tlumivý roztok fosfátový o pH 6,0

Příprava: Odváží se 2,00 g hydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4)
8,00 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4)
doplnit vodou na 1000 ml

4A.3 Fyziologický roztok, 0,8 % roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě, doplní na 1 000 ml a sterilizuje.

4A.4 Methanol

4A.5 Směs fosforečnanového pufru (4.2) a methanolu (4.4) - 80 : 20

4A.6 Methanolický roztok Tween 80

Příprava : 5 g Tween 80 se rozpustí v methanolu (4.4) a doplní se tímto do 1000 ml.

4A.7 Virginiamycin, standardní substance známé aktivity.

5A. Standardní roztoky

Rozpustí se přesně odvážené množství standardní substance (4.7) v methanolu (4.4) a zředí se methanolem tak, aby výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 1 000 μ g virginiamycinu v 1 ml.

Tento standardní roztok má trvanlivost 5 dnů, je-li uchováván v uzavřené lahvi při teplotě 4 °C.

Z tohoto zásobního roztoku se připravují postupným ředěním fosforečnanovým tlumivým roztokem (4.5) následující roztoky :

S8 1 μ g/ml

S4 0,5 μ g/ml

S2 0,25 μ g/ml

S1 0,125 μ g/ml

6A. Příprava extraktu a zkušebních roztoků

6A.1 Extrakce

6A.1.1 Produkty s obsahem virginiamycinu do 100 mg/kg

Naváží se 50 g vzorku, přidá se 200 ml extrakčního roztoku (4.6) a třepe se 30 minut. Nechá se usadit nebo se odstředí, odpipetuje se 20 ml supernatantu, který se odpaří na rotační vakuové odparce při teplotě do 40 °C na konečný objem 5 ml. Odparek se zředí směsí (4.5) tak, aby výsledná předpokládaná koncentrace byla 1 μ g/ml (U8).

6A.1.2 Produkty s obsahem virginiamycinu nad 100 mg/kg

Naváží se nejvýše 10 g vzorku, obsahují 1 až 50 mg virginiamycinu přidá se 100 ml extrakčního roztoku (4.6) a třepe se 30 minut. Suspeze se nechá usadit nebo se odstředí, a supernatant se zředí směsí (4.5) tak, aby výsledná předpokládaná koncentrace byla 1 µg/ml (U8).

6A.2 Zkušební roztoky

Z roztoku U8 se připraví roztoky U4 (předpokládaný obsah 0,5 µg/ml), U2 (předpokládaný obsah 0,25 µg/ml) a U1 (předpokládaný obsah 0,125 µg/ml) postupným ředěním (1+1) směsí (4.5).

7A. Postup zkoušky

7A.1 Zaočkování zkušebního média

Zkušební medium (4.1) se zaočkuje bakteriální suspenzí (3.2) při teplotě asi 50 °C. Množství bakteriální suspenze potřebné k vytvoření dostatečně velkých a čirých inhibičních zón se stanoví předchozími zkouškami s různými koncentracemi virginiamycinu na plotnách s médiem (4.1).

7A.2 Příprava ploten

Difuze na agaru se provádí na plotnách se čtyřmi koncentracemi standardního roztoku (S1, S2, S4 a S8) a čtyřmi koncentracemi zkušebního roztoku (U1, U2, U4 a U8). Všechny čtyři koncentrace standardu a zkušebního vzorku musí být umístěny na stejné (jedné) plotně. Proto musí být vybrány plotny dostatečně velké, aby bylo možno na nich vytvořit alespoň 8 jamek o průměru 10 až 13 mm a vzdálenosti středů jednotlivých jamek alespoň 30 mm. Zkouška může být prováděna na skleněné plotně o průměru 200 mm, s hliníkovým nebo plastovým okrajem o výšce 20 mm. Na plotnu se nalije takové množství média (4.1), zaočkované podle 7.1, aby vznikla vrstva asi 2 mm silná (60 ml pro plotnu o průměru 200 mm). Po schladnutí se do média vyhloubí jamky a do nich se odměří přesný objem zkušebního a standardního roztoku (0,10 až 0,15 ml do každé jamky, podle jejího průměru). Každá koncentrace se dává nejmeně čtyřikrát, takže každé stanovení se určuje vyhodnocením 32 inhibičních zón.

7A.3 Inkubace

Plotny připravené podle předchozího postupu se inkubují 16 až 18 hodin při 30 ± 2 °C.

8A. Výpočet

Průměry inhibičních zón se změří s přesností 0,1 mm a jejich průměry pro každou koncentraci se zaznamenají na semilogaritmický papír (logaritmus koncentrace proti průměru inhibičních zón). Do grafu se zakreslí „nejvhodnější přímka“ pro standard, která prochází vypočtenými body S1 a S8. Stanovení nejvhodnějšího bodu pro nejnižší koncentraci standardu (S1) se vypočte podle vzorce :

$$S1 = 7 \cdot S1 + 4 \cdot S2 + S4 - 2 \cdot S8$$

Nejvhodnější bod pro nejvyšší koncentraci standardu (S8) se vypočte podle vzorce :

$$Sh = 7 \cdot S8 + 4 \cdot S4 + S2 - 2 \cdot S1$$

Stejně se do grafu zakreslí „nejvhodnější přímka“ pro vzorek, která prochází vypočtenými body U1 a Uh. Nejvhodnější body U1 a Uh pro vzorek se vypočtou podle stejných vzorců, místo hodnot SX však dosadíme do vzorců hodnoty UX, kde X = 1,2,4,8.

Pokud neexistuje žádná interference jsou obě přímky rovnoběžné. V praxi je možno považovat přímky za paralelní, pokud se hodnoty Sh - S1 a Uh - U1 neliší o více než 10 % od jejich průměrné hodnoty. Pokud nejsou přímky paralelní, je možno vypustit hodnoty U1 a S1 nebo U8 a S8 a vypočíst nejvhodnější body podle následujících vzorců :

$$S1 (U1) = 5 \cdot S1(U1) + 2 \cdot S2 (U2) - S4 (U4) \text{ nebo } S1 (U1) = 5 \cdot S2(U2) + 2 \cdot S4 (U4) - S8 (U8)$$

$$Sh (Uh) = 5 \cdot S4(U4) + 2 \cdot S2 (U2) - S1 (U1) \text{ nebo } Sh (Uh) = 5 \cdot S8(U8) + 2 \cdot S4 (U4) - S2 (U2)$$

I takto setstrojené přímky musí splňovat podmínky rovnoběžnosti. V závěrečném protokolu musí být uvedeno, že výsleddek byl získán výpočtem ze tří koncentrací.

Pokud jsou přímky paralelní, vypočte se logaritmus relativní aktivity (log a) podle jednoho z následujících vzorců.

Pro čtyři koncentrace

$$\log a = (U1 + U2 + U4 + U8 - S1 - S2 - S4 - S8) / 0,602 \cdot (U4 + U8 + S4 + S8 - U1 - U2 - S1 - S2)$$

Pro tři koncentrace

$$\log a = (U1 + U2 + U4 - S1 - S2 - S4) / 0,401 \cdot (U4 + S4 - U1 - S1) \text{ nebo}$$

$$\log a = (U2 + U4 + U8 - S2 - S4 - S8) / 0,401 \cdot (U8 + S8 - U2 - S2)$$

Aktivita vzorku odpovídá aktivitě odpovídajícího standardu (U8 = S8).

Pokud je aktivita mimo rozsah 0,5 až 2,0 je nutno opakovat zkoušku s upraveným ředěním koncentrace extraktu vzorku nebo, pokud to není možné, standardu. Pokud není možno žádným způsobem získat výsledek v uvedeném rozsahu je nutno takový výsledek označit za přibližný a je to nutno uvést na závěrečném protokolu.

Pokud získané přímky nejsou paralelní, je nutno stanovení opakovat a pokud ani nyní není dosaženo rovnoběžnosti, musí být stanovení prohlášeno za neuspokojivé.

Výsledek se vyjadřuje v mg virginiamycinu na kg krmiva.

9A. Opakovatelnost

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

do 10 mg/kg	2 mg/kg
od 10 do 25 mg/kg	20 % relat
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat

10A. Poznámky

10A.1 1 mg virginiamycinu odpovídá 1000 mezinárodních jednotek.

10A.2 Mohou být použity i jiné metody přípravy, za předpokladu, že vznikne podobná bakteriální suspenze.

10A.3 Může být použito i komerční médium podobného složení, pokud poskytuje stejné výsledky

2.1 Stanovení obsahu amprolia

1. Účel a rozsah

Pro stanovení amprolia v premixech jsou uvedeny tři metody, a to spektrofotometrická, izotachoretická (poznámka 8.1) a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení v krmných směsích. Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení amprolia v premixech a krmných směsích (poznámka 8.3).

Pro účely této metody se používá tato definice:

Amprolium je antikokcidikum, které se aplikuje v kombinaci s ethopabátem (Amprol Plus). Po chemické stránce je to 1-[4-(amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-picolinium hydrochlorid, sumárního vzorce $C_{14}H_{20}N_4Cl_2$.

2. Princip

Amprolium se stanoví v ethanonolovém extraktu reakcí s acetylaminonitrothiazolem v alkalickém prostředí po extrakci butylalkoholem spektrofotometricky nebo ve vodném výluhu na základě rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli metodou ITP (premixy) nebo po extrakci vzorku směsí methylalkohol-voda, následnou separací látek s vyšším retenčním časem na SEP-PAK patronce "Alumina A", metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s použitím UV detekce (premixy a krmné směsi)

3. Chemikálie

3.1 Spektrofotometrická metoda

3.1.1 Ethylalkohol 96 %, předestilovaný, aldehydů prostý (poznámka 8.2)

3.1.2 Acetylaminonitrothiazol, reakční činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,250 g acetylaminonitrothiazolu, po rozpuštění v ethylalkoholu (3.1.1) se doplní tímtež po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvý a chrání se před denním světlem.

3.1.3 Hydroxid sodný, roztok 200 g/l, uhličitany prostý

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží 200,0 g hydroxidu sodného, rozpustí v čerstvě vyvařené redestilované vodě (prosté oxidu uhličitého), doplní toutéž po rysku a promíchá.

Uchovává se pod kalciovým uzávěrem.

3.1.4 Amprolium, standardní substance (doporučuje se originál preparát z dovozu s garancí 100 % účinnosti, ne starší 3 let, popř. ověřený o účinnosti nejméně 95 %).

Chrání se pečlivě před denním světlem a uchovává se na chladném místě.

3.1.5 Amprolium, základní standardní roztok (poznámka 8.3)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 100,0 mg standardní substance amprolia (3.1.4) 100 % účinnosti nebo příslušně přepočtené množství substance nižší ověřené účinnosti, rozpustí v ethylalkoholu (3.1.1), tímtež doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 1 mg amprolia.

3.1.6 Amprolium, pracovní standardní roztok, (poznámka 8.3).

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku amprolia (3.1.5), doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 100 µg amprolia.

3.1.7 Butylalkohol (poznámka 8.2)

3.2 Izotachoforetická metoda

3.2.1 Vedoucí elektrolyt (poznámka 8.4)

Příprava: Z izotermicky predestilovaného amoniaku (3.2.8) (poznámka 8.5) se připraví roztok $c(\text{NH}_4\text{OH}) = 0,005 \text{ mol/l}$, upravený na hodnotu $\text{pH} = 5,3$ izotermicky (poznámka 8.5) predestilovanou kyselinou propionovou (3.2.7) s přidavkem 5 ml 0,2 % methylcelulozy (3.2.6) do 100 ml roztoku.

3.2.2 Koncový elektrolyt (poznámka 8.4)

Příprava: Kyselina octová, roztok $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}) = 0,005 \text{ mol/l}$ připravená z izotermicky (poznámka 8.5) destilované kyseliny octové.

3.2.3 Amprolium, základní standardní roztok

Příprava: (poznámka 8.3) Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,050 g standardní substance amprolia (3.1.4) s účinností 100 % nebo přepočtené množství substance o nižší účinnosti, rozpustí ve vodě, toutéž doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,5 mg amprolia.

Při uchování v chladu (asi při 5 °C) je roztok stálý 1 měsíc.

3.2.4 Amprolium, pracovní standardní roztok

Příprava: (poznámka 8.3) Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku amprolia (3.2.3), doplní po rysku vodou a promíchá. Uvedené ředění je pro případ, kdy teoretický obsah amprolia ve zkoušeném vzorku je 12,5 mg/g.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 25 µg amprolia. Připravuje se vždy čerstvý. Obecně se pracovní standardní roztok připraví tak, aby s ohledem na očekávaný obsah ve zkoušeném vzorku (teorie) v jeho 1 ml bylo tolik amprolia jako v 1 ml roztoku zkoušeného vzorku.

3.2.5 Hydroxid draselný, pevný

3.2.6 Methylceluloza

3.2.7 Kyselina propionová (h = 0,99 g/ml)

3.2.8 Amoniak, koncentrovaný (h = 0,89 g/ml)

3.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

3.3.1 Methylalkohol (poznámka 8.2) (HPLC grade)

3.3.2 Dioktylsodiumsulfosuccinát, (dále jen DOSS)

3.3.3 Chlorid vápenatý, dihydrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.3.4 Acetonitril (HPLC grade)

3.3.5 Diethylamin (dále jen DEA)

3.3.6 Kyselina octová ledová (h = 1,05 g/ml)

3.3.7 Amprolium, standardní substance (poznámka 8.3)

3.3.8 Amprolium, základní standardní roztok (poznámka 8.3)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 57 až 63 mg standardní substance amprolia (3.3.7), přidá se asi 80 ml extrakční směsi (3.3.12) a po rozpuštění se doplní toutéž po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 570 až 630 μg amprolia.

3.3.9 Amprolium, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku amprolia (3.3.8), doplní se extrakční směsí (3.3.12) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 57 až 63 μg amprolia.

3.3.10 Amprolium, kalibrační standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 25 ml pracovního standardního roztoku amprolia (3.3.9), doplní po rysku extrakční směsí (3.3.12) a promíchá.

Koncentrace tohoto kalibračního standardního roztoku je přibližně 15 μg amprolia/ml.

3.3.11 Mobilní fáze

Pro optimální složení mobilní fáze pro používanou kolonu (viz 4.3.1) se doporučuje empirické odvození složení mobilní fáze mícháním složek A a B tak, aby retenční čas píku amprolia odpovídal kapacitnímu faktoru $k = 10$ až 16

Chromatografický systém je velmi citlivý na eluční sílu mobilní fáze, která pro danou kolonu musí být vhodným nastavením složek A a B mobilní fáze optimalizována.

Prakticky se postupuje takže se analýza spouští nejprve při poměru $A + B = 1 + 1$ a pro dosažení optima se tento poměr pozvolna mění tak, že jeho zvýšení ve prospěch složky A kapacitní faktor zvyšuje a naopak.

Příprava: Do dvou odměrných baněk (složky A a B) na 1 000 ml se odváží popř. odměří pipetou (toto pořadí je nutno dodržet):

	složka A	složka B
DOSS (3.3.2) (g)	1,780	1,780
Acetonitril (3.3.4) (ml)	350	450
Voda (ml)	200	200
Kyselina octová ledová (3.3.6) (ml)	10	10

Každý roztok se dobře promíchá, po řádném rozpuštění se přidají do každé baňky 3 ml DEA (3.3.5), doplní vodou po rysku a promíchají.

3.3.12 Extrakční směs

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří asi 200 ml směsi methylalkohol-voda (2 + 1), přidá se 2,220 g DOSS (3.3.2), 1,470 g dihydrátu chloridu vápenatého (3.3.3) a po rozpuštění se doplní po rysku výše uvedenou směsí a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometrická metoda

4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce

4.1.2 Miska třecí s tloučkem

4.2 Izotachoforetická metoda

4.2.1 Analyzátor izotachoforetický (ITP) se zapisovačem

4.2.2 pH metr

4.2.3 Třepačka (horizontální)

4.2.4 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

4.3.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím (čerpadlo, kolona - reverzní fáze C₁₈, 250 x 4mm, 5 až 10µm, injektážní dávkovací zařízení - Rheodyne, UV detektor, registrační zařízení) popř. i tiskárna, datastanice s integračním software

4.3.2 Stříkačka injekční polyetylenová

4.3.3 Trubice skleněná o průměru 10 mm se zúženým hrdlem na konci

4.3.4 Třepačka laboratorní vhodné konstrukce

4.3.5 SEP-PAK patrona aluminia A

5. Postup (poznámka 8.11)

5.1 Metoda spektrofotometrická

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu (poznámka 8.3)

Do sady dělicích nálevek na 250 ml se diferencovaně odpipetuje 1,0 ; 2,0 ; 3,0; 4,0; 5,0 ml pracovního standardního roztoku amprolia (3.1.6), objem se upraví na 20 ml roztokem ethylalkoholu (3.1.1). Do každé dělicí nálevky se odpipetuje po 1 ml reakčního činidla roztoku acetylaminonitrothiazolu (3.1.2) a 6 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.3) (poznámka 8.6), nálevka se důkladně protřepe a ponechá asi 5 min v klidu. Potom se přidá přesně po 50 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.3), 10 ml butylalkoholu (3.1.7) a intenzívně protřepává po dobu 1 minuty. Po rozdělení fází se spodní vodná vrstva odpustí do další dělicí nálevky na 250 ml a butanolová vrstva se filtruje suchým řídkým papírovým filtrem do suché odměrné baňky na 50 ml. Tento postup se opakuje - vodná vrstva se protřepává s 10 ml butanolu po dobu 1 minuty a rozdělení vrstev po 10 minutách tak dlouho, až se odměrná baňka na 50 ml doplní po značku. Obsah odměrné baňky se promíchá a je-li obsah odměrné baňky kalný, filtruje se přes vrstvu bezvodého síranu sodného (nebo čistý suchý řídký filtr).

Podle použitého spektrofotometru s příslušně nastavenými parametry se proměří absorbance roztoku v kyvetě o optické délce 10 mm při vlnové délce 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

Z nalezených hodnot absorbancí a známých koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní stanovení (poznámka 8.1)

Vzorek se zhomogenizuje ve třecí misce jemným rozetřením vzorku. Do kuželové baňky na 200 ml se odváží asi 2 - 20 g zhomogenizovaného zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (poznámka 8.8), přidá se 100 ml ethylalkoholu (3.1.1) a po opakovaném promíchání se ponechá 30 minut v temnu. Potom se baňka třepe 60 minut na horizontální třepačce a nechá usadit. Extrakt se filtruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 100 ml. Pevný podíl v kuželové baňce se promíchá s dalšími 20 ml ethylalkoholu (3.1.1) a dekantát se filtruje do téže odměrné baňky. K pevnému podílu v kuželové baňce se přidá znovu o něco méně než 10 ml ethylalkoholu (3.1.1), promíchá a dekantát se opět filtruje do téže odměrné baňky, přičemž se jím promyjí zejména okraje filtru. Extrakt v odměrné baňce se doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a po uzavření baňky se důkladně promíchá.

Z tohoto roztoku se odpipetuje do 250 ml dělicí nálevky takové množství extraktu, aby obsah amprolia nepřekročil 0,5 mg a pipetovaný objem se případně doplní na 10 ml ethylalkoholem (3.1.1). Potom se přidá do dělicí nálevky 50 ml hexanu (3.1.8) a obsah dělicí nálevky se třepe asi 1 minutu, poté se přidá 10 ml vody a obsah se intenzívně třepe 1 minutu. Po rozdělení fází (asi 10 minut) se vodná fáze vypustí do dělicí nálevky na 250 ml a je-li zbarvená, vytřepe se opět s 50 ml hexanu (3.1.8). V opačném případě se k obsahu dělicí nálevky přidá 10 ml ethylalkoholu (3.1.1) a obsah dělicí nálevky se promíchá krouživým pohybem, čímž se roztok vyjasní. Přidá se 1 ml roztoku AANT (3.1.2) a 6 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.3) a třepe se intenzívně po dobu 1 minuty. Dělicí nálevka se nechá asi 30 minut v klidu. Potom se přidá 50 ml hydroxidu sodného (3.1.3) a 10 ml butanolu (3.1.7) a intenzívně se třepe 1 min. Po rozdělení fází se spodní vodná vrstva odpustí do další dělicí nálevky na 250 ml a butanolová vrstva se filtruje suchým řídkým papírovým filtrem do suché odměrné baňky na 50 ml. Tento postup se opakuje - vodná vrstva se protřepává s 10 ml butanolu (3.1.7) po dobu

1 minuty a rozdělení vrstev po 10 minutách tak dlouho, až se odměrná baňka na 50 ml doplní po značku. Obsah odměrné baňky se promíchá a je-li obsah odměrné baňky kalný, filtruje se přes vrstvu bezvodého síranu sodného (nebo čistý suchý řídký filtrační papír).

Podle použitého spektrofotometru s příslušně nastavenými parametry se proměří absorbance roztoku v kyvetě o optické délce 10 mm při vlnové délce 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

Množství amprolia se zjistí z kalibračního grafu.

5.2 Metoda kapilární izotachoforézy (poznámka 8.1)

5.2.1 Kalibrace

Ze základního standardního roztoku amprolia (3.3.8) o koncentraci 0,5 mg/ml se připraví kalibrační roztok tak, aby 1 ml tohoto kalibračního roztoku obsahoval přibližně tolik amprolia, kolik je předpokládaný obsah v 1 ml roztoku zkoušeného vzorku. Z tohoto kalibračního roztoku (roztoku vzorku) se dávkuje pomocí dávkovacího kohoutu do předseparační kolony ITP přístroje (4.2.1) (150 μ A) a analytické kolony (20 μ A), obvyklou technikou a za naprosto stejných podmínek, při kalibraci i vlastním provedení. Pořídí se derivační záznam a z tohoto záznamu pro kalibrační roztok i roztok vzorku se změří délka zón amprolia jako vzdálenost vrcholů příslušných píků ve směru časové osy.

5.2.2 Vlastní provedení

Asi 2 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g se odváží do kuželové baňky na 200 ml, přidá se přesně 100 ml vody a 30 minut se protřepává. Suspence se filtruje středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml čirého filtrátu, doplní vodou po rysku a promíchá.

Dále se postupuje podle 5.2.1.

5.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (poznámka 8.3)

5.3.1 Kalibrace systému

Kalibrační standardní roztok amprolia (3.3.10) se nastříkuje do chromatografické kolony vždy mezi extraktem zkoušeného vzorku, a to vždy dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástřiků musí být v toleranci maximálně 2 %. Bází odezvy je plocha píku. Pokud odezvy nástřiků kalibračních standardních roztoků nevykazují žádný drift, je možno jejich hodnoty zprůměrovat a na této průměrné hodnotě založit jednobodovou kalibraci. V opačném případě je nutno počítat množství amprolia z naměřené hodnoty plochy píku jen na základě odezvy nástřiků kalibračních standardních roztoků, které bezprostředně předcházejí nástřikům extraktu zkoušeného vzorku (poznámka 8.7).

Pracovní podmínky:

teplota kolony	teplota okolí
průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
detekce UV, vlnová délka	270 nm

injektovaný objem	20 µl
retenční čas při použití popsané chromatografické kolony	asi 12/min;
(má odpovídat kapacitnímu faktoru $k = 10$ až 15 viz 3.9.11 Mobilní fáze	

Při výše uvedených parametrech se pořídí chromatografický záznam a obvyklým způsobem se zjistí koncentrace amprolia v kalibračních roztocích i roztocích zkoušeného vzorku (poznámka 8.10).

5.3.2 Vlastní provedení

Do kónické baňky na 250 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, zvláště pečlivě zhomogenizovaného (poznámka 8.8), aby po extrakci bylo dosaženo takové koncentrace stanovované látky, která bude přibližně shodná s koncentrací kalibračního standardního roztoku, tj. asi 15 µg/ml amprolia. Ke zkušebnímu vzorku se přidá přesně 100 ml extrakční směsi (3.3.12), baňka se uzavře zátkou a na třepačce (4.3.4) se vytřepává asi 60 minut. Potom se obsah baňky nechá sedimentovat.

Supernatant je nutno před nástřikem do kolony chromatografického přístroje (4.3.1) zbavit složek, jejichž eluční čas je vyšší, než eluční čas stanovovaného analytu. Tato operace se provede připojením patrony SEP-PAK (4.3.5) k polyetylenové stříkačce (4.3.2) o objemu asi 10 ml, do které se odlije asi 8 až 10 ml supernatantu a jemně se protlačí připojenou patronou (4.3.5). První asi 3 ml se nezachycují a další podíl se použije k nástřiku do kolony chromatografu (4.3.1) (poznámka 8.9). Tato operace se neprovádí s kalibračním standardním roztokem.

Dále se postupuje podle 5.3.1 s tím, že se vždy postupně dávákuje do chromatografické kolony dvakrát kalibrační standardní roztok a dvakrát extrakt zkoušeného vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku (poznámka 8.10)

6.1 Spektrofotometrická metoda

Obsah amprolia v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{25 \cdot 10^3 \cdot C}{m}$$

kde C je množství amprolia, zjištěné z kalibračního grafu v mg
 m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.2 Izotachoforetická metoda (premixy)

Obsah amprolia v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{2 \cdot 10^8 \cdot C \cdot h_v}{h_0 \cdot m}$$

kde h_v je délka zóny zkoušeného vzorku v mm

h_0 délka zóny standardu v mm

C koncentrace standardu v mg /ml

m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

6.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Obsah amprolia ve zkoušeném vzorku v mg/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace amprolia ve zkoušeném vzorku, zjištěná pomocí kalibračního standardního roztoku v µg/ml

F faktor ředění

m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Spektrofotometrická metoda

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Izotachforetická metoda (premixy)

Nebyla dosud stanovena.

7.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 V případě, že nelze jednoznačně u daného zkoušeného vzorku identifikovat zónu amprolia, je tato metoda pro zkoušení amprolia nepoužitelná.

8.2 Ethylalkohol, methylalkohol i butylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, (methylalkohol navíc nebezpečným jedem), proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.3 Všechny vzorky, obsahující amprolium je nutno chránit před přímým denním světlem.

8.4 Vedoucí i koncový elektrolyt pro premixy lze použít v tomto složení:

Vedoucí elektrolyt : (roztok octanu amonného $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4) = 0,01 \text{ mol/l}$)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 77,08 mg bezvodého octanu amonného, rozpustí v redestilované vodě, přidá se 5 ml roztoku 10 g/l PVA, doplní po rysku redestilovanou vodou a promíchá. Kyselinou octovou se popř. upraví na pH = 5,1.

Uchovává se v plastové nádobce v chladnu.

Koncový elektrolyt : (roztok beta-alaninu 0,01 mol/l)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 90 až 100 mg beta-alaninu, rozpustí se v 80 ml redestilované vody, pomocí kyseliny octové se upraví pH na hodnotu 4,7 až 4,9, doplní redestilovanou vodou po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce.

8.5 Izotermická destilace se provádí tak, že do větší baňky se zábrusem se přilije příslušná kapalina k predestilování a do ní vloží menší nádobka s redestilovanou vodou. Po uzavření vnější nádoby se nechá 14 dní stát, přičemž dojde difúzí kapalně látky k jejímu predestilování do redestilované vody. Po této době se nádobka s difundovanou kapalinou (látkou) vyjme a její koncentrace se určí titračně. Tímto způsobem se získá látka značné čistoty.

8.6 Přechod vybarveného komplexu do butylalkoholu není zcela kvantitativní, proto je nutné veškerá činidla odměřovat co nejpřesněji a kalibrační graf sestavovat současně při analýze zkoušeného vzorku a za zcela shodných podmínek.

8.7 Pokud při analýze standardu dochází ke zdvojování nebo distorzi píků, může to být nízkým kapacitním faktorem [optimum je 10 až 16 (viz 3.3.12 - Mobilní fáze)].

V některých případech, pokud kolona nebyla po předchozích analýzách adekvátně vypláchnuta, může rovněž docházet k výše popsaným závadám. Pokud k tomu dojde, je třeba kolonu propláchnout po dobu 20 min vodou, 0,2 mol/l roztokem kyseliny šťavelové, opět vodou a acetonitrilem, při použití lineárního gradientu eluce pro každý segment 20 min. Optimalizované složení mobilní fáze většinou vyhovuje dané chromatografické koloně po celou dobu její životnosti.

V případě, že je nutno "omladit" chromatografickou kolonu, jestliže vyčištění podle výše uvedeného nebylo účinné, existuje poslední možnost záchrany kolony tím, že bude propláchnuta po dobu 30 min. 0,2% roztokem šťavelanu sodného a dále 30 min vodou, obojí při průtoku 1,5 ml/min. Doporučuje se 20 až 30 minutový gradient mezi změnou proplachovacích roztoků.

8.8 Navážka vzorku při vyšší deklaraci obsahu amprolia ve zkoušeném vzorku nesmí poklesnout pod 2 g a požadovaná koncentrace 15 µg/ml se upraví vhodným ředěním.

8.9 Pokud není k dispozici SEP-PAK patrona, je možno použít tento náhradní postup:

Odváží se 5 g upraveného oxidu hlinitého do skleněné trubice o průměru 10 mm, při čemž na její zúžený konec se vloží chomáček vaty. Trubice se použije ve svislé poloze jako sloupec a na její vrchní vstup se 10 ml extraktu zkoušeného vzorku nechá samospádem protéci. Další postup je stejný jako při použití patrony.

Úprava oxidu hlinitého:

Použije se acidický oxid hlinitý, 80 až 200 mesh, stupeň aktivity 1,. Tento sorbent se smíchá s vodou v poměru 5 ml vody na 1 g. Po 30 minutách se zfiltruje středně hustým filtrem, na filtru se promyje methylalkoholem a nechá vysušit, nejdříve na vzduchu při laboratorní teplotě a pak při 100 °C za sníženého tlaku (asi 30 mm Hg sloupce).

8.10 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítává se obsah amprolia ve zkoušeném vzorku z tohoto software přímo z naměřených souborů.

8.11 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.2 Stanovení obsahu amprolia

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 108, 22/04/74

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení amprolia v krmných směsích a premixech. Mez stanovitelnosti metody je 40 mg/kg (40 ppm).

2. Princip

Vzorek je extrahován methylalkoholem, extrakt přečištěn na sloupci oxidu hlinitého a pomocí 2,7-dihydroxynaftalénu, hexakynoželezitanu draselného, kyanidu draselného a hydroxidu sodného se vytvoří s amproliem komplex, který se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm.

3. Chemikálie

3.1 Methylalkohol (poznámka 8.1)

3.2 Methylalkohol, roztok zředěný 2 + 1

3.3 Hexakynoželezitan draselný, hexahydrát $[K_3Fe(CN)_6 \cdot 6 H_2O]$, roztok 2 g/l (tento roztok je stabilní po dobu 2 týdnů)

3.4 Kyanid draselný, roztok 10 g/l (poznámka 8.2)
(tento roztok je stabilní po dobu 2 týdnů)

3.5 Hydroxid sodný, roztok 11,25 g/l

3.6 Hydroxid sodný, roztok v methylalkoholu

Příprava: Smíchá se 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.5) a 200 ml methylalkoholu (3.1)

3.7 2,7-Dihydroxynaftalén (dále jen DHN), roztok 25 mg/l v methylalkoholu

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 25 mg DHN, rozpustí v methylalkoholu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

3.8 Komplexotvorné činidlo

Příprava: Do kuželové baňky na 250 ml se zábrusem se odměří 90 ml roztoku DHN (3.7), 5 ml roztoku hexakyanoželezitanu draselného (3.3) a důkladně promíchá. Potom se přidá 5 ml roztoku kyanidu draselného (3.4) (poznámka 8.2 !!), baňka se zazátkuje a obsahem se velmi intenzivně protřepe (4.7). Pak se roztok ponechá ustát asi 30 až 35 minut, přidá se 100 ml roztoku hydroxidu sodného (3.6), promíchá a obsah se filtruje filtračním kelímkem (4.3) za mírně sníženého tlaku (4.2).

Činidlo se používá nejdříve za 75 minut po filtraci.

3.9 Oxid hlinitý (Al_2O_3) pro sloupcovou chromatografii

Příprava: 100 g oxidu hlinitého se roztírá v třecí misce (4.9) s 500 ml vody po dobu 30 minut, filtruje filtračním kelímkem (4.3) za mírně sníženého tlaku (4.2), promyje 3 x 50 ml methyllalkoholu (3.1), vysuší odsáváním (4.2) a po ustání přes noc se vysuší při teplotě 100 °C v sušárně (4.10). Po vychladnutí v exsikátoru se zkontroluje výtěžnost určitého množství standardního roztoku amprolia (3.11) podle postupu 5.1.2. Výsledkem zkoušky musí být propustnost 96 až 104 %.

3.10 Amprolium, standardní substance, bod tání = 248 °C, absorpční koeficient ve vodě při vlnové délce 265 i 325 nm = $11 \cdot 10^3$

3.11 Amprolium, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 50 mg standardní substance amprolia (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí ve zředěném methyllalkoholu (3.2), doplní jím po rysku a promíchá.

3.12 Amprolium, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje přesně 10,0 ml základního standardního roztoku amprolia (3.11), doplní zředěným methyllalkoholem (3.2) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 20 µg amprolia.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety optické délky 10 mm)

4.2 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.3 Kelímkem filtrační, skleněný se sintrem S_3

4.4 Trubice chromatografická skleněná, vnitřní průměr 9 mm, délka 400 až 500 mm

4.5 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím (kyvety centrifugační na 25 ml s víčky)

4.6 Míchačka laboratorní

4.7 Třepačka laboratorní

4.8 Vata obvazová

4.9 Miska třecí s kopistí

4.10 Sušárna laboratorní, vakuová

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady centrifugačních kyvet (4.5) se odpipetuje diferencovaně 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 ml pracovního standardního roztoku amprolia (3.12), první čtyři se doplní na objem 5 ml zředěným methyllalkoholem (3.2). Do jedné kyvety se odpipetuje 5 ml samotného zředěného methyllalkoholu (3.2) = kontrolní roztok.

5.1.2 Do každé centrifugační kyvety (4.5) se odpipetuje přesně 10,0 ml komplexotvorného činidla (3.8), po uzavření se každá promíchá a ponechá v klidu po dobu 18 minut. Potom se vloží do odstředivky (4.5), odstředí se po dobu 3 minut a supernatant se dekantuje do vhodné nádoby. Měří se ihned na spektrofotometru (4.1) v kyvetách o optické délce 10 mm při vlnové délce 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

5.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Krmiva (krmné směsi) a premixy

Do kuželové baňky na 250 ml se zábrusem se odváží asi 10 g zkušební vzorku (pro premixy 3 až 6 g) s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 100,0 ml zředěného methyllalkoholu (3.2), baňka se zazátkuje, vloží na třepačku (4.7) a vytřepává po dobu 60 minut. Potom se obsah baňky zfiltruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Tento filtrát se, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah amprolia ve zkoušeném vzorku, rozředí zředěným methyllalkoholem (3.2) na roztok o koncentraci amprolia v rozmezí 5 až 15 µg/ml.

Na dno chromatografické trubice (4.4), vertikálně umístěné, se vloží smotek obvazové vaty (4.8) a na ní se udusá 5 g oxidu hlinitého (3.9). Na tento sloupec se odpipetuje přesně 25,0 ml extraktu zkoušeného vzorku, extrakt se nechá volně protéci sloupцем, prvních 5 ml eluátu se nezachycuje a dalších 5,0 ml se odměří do centrifugační kyvety (4.5).

Dále se postupuje podle 5.1.2.

Množství amprolia se zjistí z kalibračního grafu.

5.2.2 Koncentráty

Do kuželové baňky na 500 ml se zábrusem se odváží asi 0,5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 250 ml zředěného methyllalkoholu (3.2) a po uzátkování se vytřepává na třepačce (4.7), nebo promíchává na míchačce (4.6) po dobu 60 minut. Potom se obsah baňky filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml filtrátu, doplní zředěným methyllalkoholem (3.2) po rysku a promíchá. Do centrifugační kyvety (4.5) se odměří přesně 5,0 ml tohoto roztoku a dále se postupuje podle 5.1.2.

Množství amprolia se zjistí z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Krmiva (krmné směsi) a premixy

Obsah amprolia v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot 10^4 \cdot C \cdot F}{m}$$

kde C je množství amprolia v mg zjištěné z kalibračního grafu

m navážka zkušební vzorku v g

F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků stanovení dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky:

8.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Kyanid draselný je zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla, zejména je nutné neokyselovat jeho roztok či látku (vývin prudce jedovatého kyanovodíku).

8.3 V metodě ES jsou uvedeny následující hodnoty opakovatelnosti :

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

do 100 mg/kg	10 mg/kg
od 100 do 5 000 mg/kg	10 % relat
od 5 000 do 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat

2.3 Stanovení obsahu diclazurilu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení diclazurilu v premixech pro obsahy 20 mg/kg až 4 000 mg/kg.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Diclazuril je účinné kokcidiostatikum. Chemicky se jedná o 2, 6-dichloro-alfa- (4-chlorofenyl)-4- (4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl) benzenacetonitril sumárního vzorce $C_{17}H_9Cl_3N_4O_2$ a molekulové hmotnosti 407,64 .

2. Princip

Diclazuril se stanoví po extrakci vzorku okyseleným methylalkoholem a přečištění na kolonkách MegaBond Elut způsobem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen metodou HPLC) metodou iontových párů na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3. Chemikálie

3.1 Voda destilovaná, čistoty pro HPLC

3.2 Tetrabutylamonium hydrogensíran (dále jen TBAHS) - činidlo iontových párů

3.3 Acetonitril, čistoty pro HPLC (dále jen ACN)

3.4 Methylalkohol, čistoty pro HPLC (poznámka 8.1)

3.5 n,n-Dimethylformamid (dále jen DMF)

3.6 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/l}$)

3.7 Diclazuril, standardní substance (Jansen Biotech - č.kat. R 64 433) (poznámka 8.2)

3.8 Vnitřní standard pro stanovení diclazurilu (Jansen Biotech č.kat. R 62 646) (poznámka 8.2)

3.9 Diclazuril, základní standardní roztok

Příprava: V DMF se rozpustí takové množství standardní substance diclazurilu (3.7), aby výsledná koncentrace tohoto základního standardního roztoku v $\mu\text{g/ml}$ byla číselně shodná s deklarovaným obsahem diclazurilu ve zkoušeném vzorku v $\mu\text{g/g}$ (=DO).

3.10 Vnitřní standard, základní roztok

Příprava: V DMF se rozpustí takové množství vnitřního standardu (3.8), aby výsledná koncentrace tohoto základního roztoku vnitřního standardu v $\mu\text{g/ml}$ byla číselně shodná s deklarovaným obsahem diclazurilu ve zkoušeném vzorku v $\mu\text{g/g}$ (=DO).

3.11 Referenční pracovní roztok

Příprava: Do odměrné baňky o obsahu [DO/4] ml (poznámka 8.6) se odpipetuje přesně 1 ml základního standardního roztoku diclazurilu (3.9) a přesně 1 ml základního roztoku vnitřního standardu (3.10), přidá se 3 ml vody (3.1) a směsí DMF (3.5) - voda (3.1) v poměru (2 + 3) se doplní po rysku a promíchá.

3.12 Extrakční roztok methylalkoholu

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odpipetuje 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6), doplní po rysku methylalkoholem (3.4) a promíchá.

3.13 Octan amonný ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$), pevný

3.14 TBAHS, roztok $c(\text{TBAHS}) = 0,01 \text{ mol/l}$

3.15 Mobilní fáze

Příprava: Složka A = Do 1 000 ml roztoku TBAHS (3.14) se odváží 5 g octanu amonného (3.14) a promíchá.

Složka B = acetonitril (ACN)

Složka C = methylalkohol

Pokud není k dispozici zařízení pro ternární eluci (poznámka 8.3), smíchají se složky A + B + C v poměru (50 + 25 + 25)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolona - reverzní fáze, injekční dávkovací zařízení např. Rheodyne, UV detektor, popř. i datastanice s integračním softwarem a tiskárna či jiné registrační zařízení

4.2 Kolona - reverzní fáze C18, Hypersil ODS, 10 x 4,6 , 3 μm

4.3 Třepačka laboratorní

4.4 Rotační vakuová odparka

4.5 Baňka odpařovací na 250 ml

5. Postup

5.1 Příprava vzorku k měření

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží asi 1 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 1 ml základního roztoku vnitřního standardu (3.10) a přesně 200 ml extrakčního roztoku (3.12). Baňka se zazátkuje, vloží na třepačku (4.3) a třepáním se vzorek extrahuje po dobu asi 16 hod., nejlépe přes noc. Po ukončení extrakce se nechá pevná část sedimentovat asi 10 minut a pak se z čirého supernatantu odpipetuje přesně [4000/ DO] ml (poznámka 8.6) do odpařovací baňky. Tato se vloží na vakuovou odparku (4.4) a roztok se

odpaří při teplotě 45 °C za sníženého tlaku do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 2 ml DMF (3.5) a pak se přidá ještě přesně 3 ml vody (3.1).

Takto připravený roztok se nastříkuje do kolony přístroje HPLC

5.2 Pracovní podmínky měření

Teplota kolony	teplota okolí, vyrovnaná po celou dobu měření
Průtok mobilní fáze	2 ml/min (lze upravit s ohledem na tlakovou ztrátu)
Detekce UV	280 nm , šíře pásma 4 nm
Injektovaný objem	20 µl
Retenční čas	asi 16 min. při průtoku 2 ml a gradientové ternární eluci asi 35 min. při průtoku 1,4 ml/min., popsané koloně a izokratickém režimu

Doporučuje se použít guard kolony (apř. Tessek C18, 30 x 3,5 µm)

Rozsah 0,01 AUFS (poznámka 8.4)

5.3 Vlastní měření

Před nástřikem do kolony je nutno tuto po dobu 10 minut ekvilibrovat při uvedeném průtoku a složení mobilní fáze. Po ustálení základní linie se nastříkuje referenční pracovní roztok (3.11) a potom roztok zkoušeného vzorku.

Po ukončení každého měření při izokratickém režimu je nutné kolonu proplachovat asi 10 minut složkou mobilní fáze B (3.15) a dalšímu nástřiku po proplachu musí předcházet desetiminutová ekvilibrace kolony při stanoveném průtoku a stejném složení mobilní fáze.

Z každého měření se pořídí záznam a ze záznamu se odměřují píky vnitřního standardu a diclazurilu v referenčním roztoku i roztoku zkoušeného vzorku (poznámka 8.5).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah diclazurilu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce (poznámka 8.5):

$$X = \frac{C \cdot F \cdot p_2 \cdot p_3}{p_1 \cdot p_4}$$

kde	p_1	je	plocha (výška) píku diclazurilu v referenčním roztoku v mm ² (mm)
	p_2		plocha (výška) píku vnitřního standardu v referenčním roztoku v mm ² (mm)
	p_3		plocha (výška) píku diclazurilu ve zkoušeném vzorku v mm ² (mm)
	p_4		plocha (výška) píku vnitřního standardu ve zkoušeném roztoku v mm ² (mm)
	C		koncentrace diclazurilu v referenčním roztoku v µg/ml
	F		multiplikační faktor, který se vypočte ze vztahů

$$F = \frac{V}{m.R}$$

a

$$R = \frac{4000}{201.DO} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Metodika je vyvinuta a vyzkoušena speciálně s chemikáliemi od uvedené firmy.

8.3 Je-li k dispozici zařízení pro ternární eluci pak režim eluce se doporučuje následující:

	Lineární gradient					
Čas (min)	0	20	21	30	31	40
% složky A mobilní fáze	60	40	0	0	60	60
% složky B mobilní fáze	20	30	100	100	20	20
% složky C mobilní fáze	20	30	0	0	20	20

8.4 AUFS = absorbance unit full scale (plná výchylka v jednotkách absorbance)

8.5 Je-li k dispozici výpočetní technika a příslušné výpočtové software, vypočítá se obsah diclazurilu z hodnot měření přímo.

8.6 DO je deklarovaný obsah diclazurilu ve zkoušeném vzorku v µg/g.

2.4 Stanovení obsahu lasalocidu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení lasalocidu v premixech a v krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Lasalocid, obchodním názvem AVATEC, je fermentační antikokcidum se širokým spektrem účinnosti, polyetherový produkt z fermentace *Streptomyces lasaliensis*.

2. Princip

Lasalocid se stanoví na základě inhibičního účinku na testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ředící roztok: směs ethylalkohol 96% (3.2) - voda (1 + 9)

3.2 Ethylalkohol 96 %, 75 % a 20 % (objemově) (poznámka 8.1)

3.3 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.4 Octan ethylnatý

3.5 Lasalocid, standardní substance s ověřenou účinností

3.6 Lasalocid, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 25,00 mg standardní substance lasalocidu (3.5) 100% účinnosti (při jiné účinnosti přepočet), rozpustí se ve 125 ml ethylalkoholu 96 % (3.2) doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 100 µg lasalocidu.

Roztok uchovaný při teplotě 5 °C je stálý po dobu 4 měsíců.

3.7 Lasalocid, pracovní standardní roztok

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.6), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 10 µg lasalocidu.

Připravuje se vždy čerstvý v čase potřeby.

3.8 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Uchování kmene: Kultura se 1krát měsíčně přeočkovává na šikmý agar (3.16), inkubuje se 16 až 24 hodin při 37 °C a uchovává při teplotě 5 °C v chladničce.

Příprava sporové suspenze: Kultura vyrostlá na šikmém agaru se smyje asi 3 ml

fyziologického roztoku (3.10) a přenese se asepticky do Rouxových láhví (4.11), obsahujících sporulační půdu (3.9.1). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.11) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dní. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.14) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.10) odstředí (4.8), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.10), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.8). Toto promývání spór se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spór převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spór představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.9 Živné půdy

3.9.1 Sporulační půda, živný agar č. 2, sušený Sevac

Příprava: 40,0 g živného agaru (3.16) se připraví podle návodu výrobce, přidá se 400 mg síranu manganatého (3.11) do odměrné baňky na 1 000 ml, doplní vodou po rysku a promíchá. Po rozpuštění se půda rozdělí do Rouxových láhví (4.11) a steriluje 20 minut při tlaku 0,05 MPa, $t = 115\text{ °C}$

3.9.2 Udržovací půda - živný agar č. 2, sušený Sevac

Příprava: Proveďte se podle návodu výrobce, rozdělí se do zkumavek po 7 až 9 ml, sterilizuje při tlaku 0,05 MPa a teplotě 115 °C po dobu 20 minut. Pak se nechá ve zkumavkách utuhnout v šikmé poloze.

3.9.3 Testovací půda

Příprava: 0,7 g hydrogenfosforečnanu draselného (3.12), 0,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.13), 10,0 g glukosy (3.14), 18,0 g agaru (3.16) (nebo Bactoagaru Difco) a 2,5 g kvasničného autolyzátu (3.15) se rozpustí v 1 000 ml vody, pH se upraví na hodnotu 6,0 a sterilizuje 15 minut při tlaku 0,05 MPa, $t = 110\text{ °C}$.

Sterilní půda se rozlije po 300 ml do předem vysterilizovaných kuželových baněk.

3.10 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.11 Síran manganatý, monohydrát ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

3.12 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)

3.13 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

3.14 Glukosa

3.15 Kvasničný autolyzát Sevac

3.16 Agar

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm

4.2 Odparka vakuová, rotační

4.3 Rám kovový 340 mm x 340 mm nebo 200 mm x 200 mm

4.4 Korkovrt o průměru 9 mm

4.5 Vodováha

4.6 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.7 Termostat

4.8 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím

4.9 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.10 Třepačka (horizontální)

4.11 Láhev Rouxova

4.12 Pipeta podle Pasteura

4.13 Baňka odpařovací vhodného objemu

4.14 Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

Do kuželové baňky na 500 ml se zabroušenou zátkou se odváží vypočtené množství (poznámka 8.2) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g, přidá se přesně 125 ml ethylalkoholu 96 % (3.2) a po dobu 30 minut se extrahuje na (horizontální) třepačce (4.10), pak se přidá 125 ml vody a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se připraví testované roztoky o koncentracích 8, 4 a 2 µg/ml s použitím ředícího roztoku.

Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) opatřenou rámem (4.2) utěsněným k plotně malým množstvím agaru (3.16) a uloženou ve vodorovné poloze (4.5), se vylije 300 ml (60 ml) živné půdy (3.9.1) do které byla po rozehrátí a zchlazení asi na 55 °C naočkovaná sporová suspenze (3.8). Po ztuhnutí půdy se plotna (4.1) uloží na 1 hod do chladničky při teplotě 5 °C. Po vyjmutí se korkovrtem (4.4) v pravidelných vzdálenostech vytvoří v půdě jamky v 9 řadách a 9 sloupcích.

Z pracovního standardního roztoku lasalocidu (3.7) se naředěním pomocí ředícího roztoku (3.1) připraví testační roztoky o koncentracích 8, 4 a 2 µg lasalocidu v 1 ml. Tyto se pomocí Pasteurovy pipety (4.12) vnášejí do jamek ve středu řady, po stranách se vnášejí testované roztoky zkoušeného vzorku podle odpovídajících koncentrací. Plotna (4.1) se inkubuje po dobu 18 ± 2 hod. v termostatu (4.7) při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

5.2 Krmné směsi

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží vypočtené množství zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g (poznámka 8.2), suspenduje v přesně 250 ml octanu ethylnatého (3.4), baňka se zazátkuje a po dobu 30 minut se vytřepává na (horizontální) třepačce (4.10). Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se odpipetuje přesně 30 ml do odpařovací baňky (4.13), nechá na odparce (4.2) odpařit do sucha, odparek se rozpustí v 5 ml n-hexanu (3.3) převede do dělicí nálevky vhodného objemu s 25 ml 75 % ethylalkoholu (3.2) a intenzívně protřepává 1 minutu. Pak se ponechá asi 1 hod. ustát a ethylalkoholová fáze se odpustí do odměrné baňky na 25 ml, popřípadě doplní 75 % ethylalkoholem (3.2) po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se připraví testovací roztoky o koncentracích 0,5 ; 1 a 2 µg lasalocidu v 1 ml, k ředění se použije 20 % ethylalkohol (3.2).

300 ml rozehřáté testovací půdy (3.9.3), zchlazené na teplotu 70 °C, se naočkuje 0,8 až 1 ml sporové suspenze (3.9.1), rozlije na plotnu (4.1) opatřenou rámem (4.3) utěsněným ke plotně malým množstvím agaru (3.16) a umístěnou ve vodorovné poloze (4.5). Po ztuhnutí agarové vrstvy se plotna (4.1) uloží na 1 hod. do chladničky, po jejím vyjmutí se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.4) 10 x 9 jamek.

Z pracovního standardního roztoku lasalocidu (3.7) se naředěním za použití 20 % ethylalkoholu (3.2) připraví testační roztoky o koncentracích 0,5; 1 a 2 µg v 1 ml. Pomocí Pasteurovy pipety (4.12) se tyto testační roztoky vnášejí do jamek uprostřed řady a do 2 řad pod sebou. Po obou stranách se pak vnášejí testované roztoky zkoušeného vzorku podle standardům odpovídajících koncentrací. Plotna (4.1) se inkubuje 18 až 20 hodin při teplotě 37 °C v termostatu (4.7). Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah lasalocidu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 U premixů se hmotnost zkušebního vzorku volí s ohledem na očekávaný obsah lasalocidu ve zkoušeném vzorku (teorie) tak, aby výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 100 µg lasalocidu v 1 ml.

8.3 U krmných směsí se hmotnost zkušebního vzorku volí s ohledem na očekávaný obsah lasalocidu ve zkoušeném vzorku (teorie) tak, aby zásobní roztok měl koncentraci 7,5 µg lasalocidu v 1 ml. Tak např. při teoretickém obsahu lasalocidu ve vzorku 75 mg/kg se odváží 20,0 g zkušebního vzorku.

2.5 Stanovení obsahu maduramicinu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody; pro premixy a modifikace pro krmné směsi.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení maduramicinu v premixech a krmných směších.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Amonná sůl maduramicinu je monoglykosidní polyetherové ionoforové antibiotikum, sumárního vzorce $C_{47}H_{83}NO_{17}$.

2. Princip

Maduramicin se stanoví po extrakci vzorku směsí acetonitrilu s dichlormethanem, derivatizaci dansylhydrazinem a následném pročištění na florisilu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s použitím fluorimetrické nebo UV detekce.

3. Chemikálie

3.1 Helium kyslíku prosté

3.2 Činidlo derivatizační - Dansylhydrazin (např. FLUKA) (dále jen DH)

3.3 Acetonitril, čistoty HPLC (dále jen ACN)

3.4 Dichlormethan (dále jen DCM)

3.5 Tetrabutylamonium hydrogensulfát (např. ALDRICH) (dále jen TBAHS)

3.6 Voda destilovaná, čistoty pro HPLC

3.7 Směs extrakční, ACN - DCM v poměru (8 + 2)

3.8 Směs eluční, ACN - voda v poměru (9 + 1)

3.9 Síto molekulární, typ 3A, 8 - 12 mesh

3.10 Kyselina trichloroctová, roztok 150 g/l v acetonitrilu

Uchovává se v chladničce nejvýše po dobu jednoho měsíce.

3.12 Dansylhydrazin (dále jen DH)

3.13 Derivatizační činidlo dansylhydrazin

Příprava: 0,380 DH (3.12) se odváží do odměrné baňky na 50 ml, rozpustí v ACN (3.3), doplní tímtež po rysku a dobře promíchá.

1 ml tohoto činidla obsahuje 7,6 mg DH.

Uchovává se v chladničce maximálně po dobu 1 měsíce

3.14 Mobilní fáze

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 0,220 g TBAHS (3.5), rozpustí se ve 150 ml destilované vody (pro HPLC) (3.6), doplní acetonitrilem (3.3) po rysku a probublá plyným heliem (3.1) nebo deaeruje na ultrazvukové lázni (4.9) asi 10 minut.

3.15 Maduramicin, standardní substance o 100 % účinnosti

3.16 Maduramicin, základní standardní roztok

Příprava: Do tří odměrných baněk na 100 ml se odváží postupně 0,0700, 0,1000 a 0,1300 g standardní substance maduramicinu (3.15) 100 % účinnosti nebo přepočtené množství nižší účinnosti, každá baňka se doplní acetonitrilem (3.3) po rysku a promíchá.

Tyto základní standardní roztoky obsahují 0,7 ; 1,0 a 1,3 mg maduramicinu v 1 ml.

3.17 Maduramicin, pracovní standardní roztok

Příprava: Do tří odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje po 3 ml z každého ze základních standardních roztoků maduramicinu (3.16), každá z baněk se doplní extrakční směsí (3.7) po rysku a promíchá.

Tyto pracovní standardní roztoky obsahují 21,0 ; 30,0 a 39,0 µg maduramicinu v 1 ml.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím (čerpadlo, kolona - reverzní fáze C18, 250 x 4,5-10 µm, injektážní dávkovací zařízení - např. typu Rheodyne, fluorometrický detektor - mřížkový typ s excitačním a emisním monochromátorem nebo UV detektorem, popř. datastanice s integračním software, tiskárna nebo jiné registrační zařízení) (dále jen přístroj HPLC)

4.2 Třepačka laboratorní vhodné konstrukce

4.3 Odparka vakuová (pro krmné směsi)

4.4 Baňka odpařovací vakuová na 250 ml s kulatým dnem (pro krmné směsi)

4.5 Mikropipeta o kapacitě 600 µl s výměnnými nástavci

4.6 Patronka čisticí florisilová

4.7 Stříkačka injekční polyethylenová na 5 ml

4.8 Zkumavka reakční s teflonovým uzávěrem na 10 ml

4.9 Lázeň ultrazvuková nebo plyné helium

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Sestrojení kalibračního grafu a kontrola linearit odezvy použité instrumentace

5.1.1 Připraví se kalibrační roztoky standardu tak, že do tří odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje z každého pracovního standardního roztoku maduramicinu (3.17) po 5 ml, každá z baněk se doplní extrakční směsí (3.7) po rysku a promíchá.

Tyto kalibrační roztoky obsahují 4,2 ; 6,0 a 7,8 µg maduramicinu v 1 ml. Tyto se dále derivatizují podle 5.2.2.

5.1.2 Pracovní podmínky:	teplota kolony	teplota okolí
	průtok mobilní fáze	2,0 ml/min
	detekce	fluorimetrická:
	vlnová délka excitační	224 nm
	šíře pásma (band width)	2 nm
	vlnová délka emisní	515 nm
	šíře pásma (band width)	40 nm
	injektovaný objem	50 µl
	retenční čas (při použití popsané kolony a při uvedených podmínkách	asi 8-10 min
	detekce UV:	vlnová délka 224 nm
	citlivost	vhodná

Kolona chromatografu se uvede do rovnováhy, až se dosáhne ustálení základní linie při daném průtoku mobilní fáze (3.14) a pak se nastříkují derivatizované (viz 5.2.2) kalibrační roztoky resp. roztok zkoušeného vzorku. Nastříkují se vždy dvakrát, přičemž odezvy nástřiků stejného roztoku musí být v toleranci 2 %. Z každého nástřiku se pořídí chromatografický záznam. Bází odezvy je výška píku.

5.1.3 Z naměřených hodnot výšek píků a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf (poznámka 8.1)

5.2 Premixy

5.2.1 Do kónické baňky na 500 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, s přesností nejméně na 0,001 g, aby po extrakci vzorku popsaným způsobem bylo dosaženo přibližné koncentrace zásobního roztoku zkoušeného vzorku 6 µg maduramicinu v 1 ml (poznámka 8.3). K odváženému vzorku se přidá přesně 50 ml dichlormethanu (3.4), baňka se uzavře a na laboratorní třepačce (4.2) se extrahuje vzorek po dobu 30 minut. Pak se přidá přesně 200 ml acetonitrilu (3.3), 3,0 g molekulárního síta (3.9) a po uzavření baňky se extrahuje na laboratorní třepačce (4.2) dalších 30 minut. Pevná část vzorku se ponechá dokonale usadit a čirý supernatant se pipetuje k derivatizaci (poznámka 8.4) - zásobní roztok zkoušeného vzorku.

5.2.2 Derivatizace se provede odpipetováním 600 µl derivatizačního činidla DH (3.13) a 1 200 µl roztoku kyseliny trichloroctové (3.10) do reakční zkumavky, přidá se 5 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku (supernatantu), resp. kalibračního roztoku standardu (viz. 5.1.1), baňka se uzavře a po dobu 10 sekund se řádně protřepává (poznámka 8.4). Derivatizovaný

roztok se dekantuje do injekční stříkačky (4.7), spojené s florisilovou patronou (4.6), nechá se volně protéci, přičemž eluát se dále nepoužije.

Po protečení derivatizovaného roztoku se patrona promyje 5 krát 3 ml acetonitrilu (3.3), pak se profoukne pístem injekční stříkačky (4.7), aby byla zbavena zbytku promývacího činidla. Injekční stříkačka (4.7) se odpojí od patrony (4.6), vytáhne se píst stříkačky (4.7) a tato se znovu spojí s patronou (4.6). Zachycená látka na patroně se eluuje eluční směsí (3.8) do odměrné baňky na 5 ml až po doplnění po rysku. Po uzavření baňky se dobře promíchá a takto získaný eluát se nastříkuje do přístroje HPLC (4.1).

Dále se postupuje podle 5.1.2.

Koncentrace maduramicinu se zjistí z kalibračního grafu.

5.3 Krmné směsi

Do kónické baňky na 500 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, s přesností nejméně na 0,001 g, aby po extrakci vzorku popsaným způsobem bylo dosaženo přibližné koncentrace 6 µg maduramicinu v 1 ml (poznámka 8.5). Např. při teoretickém obsahu 5 g/kg se odvažuje přesně 50,000 g vzorku. K odváženému vzorku se přidá přesně 50 ml dichlormethanu (3.4), baňka se uzavře a na laboratorní třepačce (4.2) se vzorek extrahuje po dobu 30 minut. Pak se přidá přesně 200 ml acetonitrilu (3.3) a 15,0 g molekulárního síta (3.9), baňka se znovu uzavře a na laboratorní třepačce (4.2) se extrahuje dalších 30 minut. Pevná část vzorku se nechá dokonale usadit a 60 ml čirého supernatantu se odpipetuje do odpařovací baňky (4.4). Roztok se na vakuové odparce (4.3) při 40 °C odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10 ml extrakční směsi (3.7), čímž se dosáhne přibližné koncentrace 6 µg maduramicinu v 1 ml (poznámka 8.4) - zásobní roztok zkoušeného vzorku.

Dále se postupuje podle 5.2.2 a 5.1.2.

Koncentrace maduramicinu se zjistí z kalibračního grafu (poznámka 8.1)

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah maduramicinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{5 \cdot C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace maduramicinu ve zkoušeném vzorku zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

F faktor ředění

m navážka zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky v mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítá se obsah maduramicinu z tohoto software přímo z naměřených hodnot.

8.2 Doporučuje se pracovat při tlumeném světle.

8.3 Navážka zkušebního vzorku nemá být nižší než 1 g. Při deklarovaném obsahu maduramicinu v premixu např. 1 mg/g se odvažuje 1,5 g. Pokud byl deklarován vyšší obsah maduramicinu, je třeba navážku zkušebního vzorku vyšší než 1 g po vytřepání ředit extrakční směsí (3.7) na požadovanou koncentraci přibližně 6 µg/ml.

8.4 Vzorek po extrakci před i po derivatizaci je stabilní při teplotě 4 °C po dobu asi 8 hodin.

8.5 Navážka zkušebního vzorku nemá být nižší než 25 g. Pokud byl deklarován vyšší obsah maduramicinu, je třeba navážku zkušebního vzorku vyšší než 25 g po vytřepání ředit extrakční směsí na požadovanou koncentraci přibližně 6 µg/ml.

2.6 Stanovení obsahu methylbenzochátu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 329, 30/12/93

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení methylbenzochátu v krmivech. Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg (1 ppm).

2. Princip

Methylbenzochát je extrahován ze vzorku methylalkoholickým roztokem methansulfonové kyseliny, po přečištění extrakcí dichlormethanem je izolován na chromatografickém ionexovém sloupci a znovu extrahován dichlormethanem, nakonec stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

3. Chemikálie

3.1 Dichlormethan

3.2 Methylalkohol pro HPLC (poznámka 9.1)

3.3 Mobilní fáze

Příprava: 75 dílů methylalkoholu (3.2) se smíchá s 25 díly vody (3.10), směs se filtruje membránovým filtrem 0,22 mm (4.5) a odplyní např. na ultrazvukové lázni (4.7) po dobu 10 minut.

3.4 Kyselina methansulfonová, roztok 20 g/l v methylalkoholu(3.2)

3.5 Kyselina chlorovodíková (h=1,17 g/ml), zředěná (1 + 9)

3.6 Iontoměnič Amberlit CG - 120 (Na), 100 - 200 mesh - upravený

Příprava: 100 g iontoměniče se smíchá s 500 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), zahřeje na topné desce (4.6) k varu za neustálého míchání a po ochlazení se dekantuje. Filtruje se přes Büchnerovu nálevku (4.10.), do níž byl vložen středně hustý filtr, za mírně sníženého tlaku (4.4), promyje se 2 x 500 ml vody (3.10) a pak 250 ml methylalkoholu (3.2). Potom se propláchne 250 ml methylalkoholu (3.2) a vysuší se prosáváním vzduchu přes filtrační koláč.

Uchovává se v suchém stavu v uzavřené nádobce.

3.7 Methylbenzochát (7-benzyloxy-6-butyl-3-methoxykarbonyl-4--chinolon), standardní substance nejvyšší čistoty

3.8 Methylbenzochát, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 50 mg standardní substance methylbenzochátu (3.7) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí se v roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.9 Methylbenzochát, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml základního standardního roztoku methylbenzochátu (3.8), doplní methylalkoholem (3.2) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 50 µg methylbenzochátu.

3.10 Voda destilovaná, čistoty pro HPLC

3.11 Krmivo bez obsahu methylbenzochátu a rušících látek (slepý vzorek), což musí být analyticky ověřeno (poznámka 9.2)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (chromatografická kolona 300 mm x 4 mm, C-18, 10 µm či ekvivalentní typ, UV detektor, popř. detektor s diodovým polem pro rozsah 250 až 400 nm, datastanice s integračním software a tiskárnou)

4.2 Odparka vakuová rotační s příslušenstvím (odpařovací baňka na 500 ml s kulatým dnem)

4.3 Trubice chromatografická, skleněná 250 mm x 15 mm, opatřená na konci kohoutem a nádržkou na 200 ml

4.4 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.5 Filtry membránové 0,22 mm a 0,45 mm

4.6 Deska topná, elektricky vyhřívaná

4.7 Lázeň ultrazvuková

4.8 Třepačka laboratorní

4.9 Vata skelná

4.10 Nálevka Büchnerova

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 ml, pracovního standardního roztoku methylbenzochátu (3.9), každá z baněk se doplní po rysku mobilní fází (3.3) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10 µg methylbenzochátu v 1 ml. Připravují se vždy čerstvé.

Dále se postupuje podle 5.2.2.

Z naměřených hodnot výšek (ploch) píků kalibračních roztoků a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do kuželové baňky na 250 ml se odváží asi 20 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,01 g, přidá se přesně 100,0 ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), baňka se uzátkuje, vloží na třepačku (4.8) a vytřepává po dobu 30 minut. Extrakt se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do dělicí nálevky na 500 ml, obsahující 100 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), se odpipetuje přesně 25,0 ml filtrátu extraktu, přidá 100 ml dichlormethanu (3.1) a po dobu jedné minuty se vytřepává. Po oddělení vrstev se dichlormethanová vrstva odpustí do odpařovací baňky na 500 ml (4.2), k vodné vrstvě se přidá dalších 40 ml dichlormethanu (3.1) a po vytřepání a oddělení vrstev se dichlormethanová vrstva odpustí do stejné odpařovací baňky. Extrakce dichlormethanem se provede ještě jednou s 40 ml a dichlormethanová vrstva se po oddělení opět převede do stejné odpařovací baňky. Odpařovací baňka se spojenými dichlormethanovými extrakty se vloží na odparku (4.2) a za sníženého tlaku a při teplotě 40 °C se obsah odpaří do sucha. Odparek se rozpustí ve 20 až 25 ml methylalkoholu (3.2), baňka se zazátkuje a ponechá na chromatografické dělení.

Dále se připraví chromatografická trubice (4.3) tak, že se umístí do vertikální polohy a na její dno (u kohoutu) se vloží smotek skelné vaty (4.9). Vedle toho se připraví suspenze 5 g upraveného iontoměniče (3.6) s 50 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), převede se na chromatografickou kolonu a nechá volně usadit. Roztok kyseliny nad hladinou iontoměniče se odpustí a sloupec se promývá vodou až již nově proteklý eluát nedává kyselou reakci (pH či lakmusový papírek). Pak se přidá na sloupec 50 ml methylalkoholu (3.2) a nechá stéci až po hladinu iontoměniče.

Na takto připravený sloupec se pomocí pipety převede opatrně celý rozpuštěný odparek dichlormethanového extraktu, odpařovací baňka se vypláchne 5 až 10 ml methylalkoholu (3.2), přičemž výplach se převádí rovněž na chromatografický sloupec. Po vsáknutí do vrstvy iontoměniče se sloupec promyje 50 ml methylalkoholu (3.2) při rychlosti průtoku nejvýše 5 ml/min. Tento eluát se nezachycuje. Methylbenzochát se eluuje ze sloupce 150 ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), přičemž eluát se jímá do dělicí nálevky na 1 000 ml. Sloupec se promyje 5 až 10 ml methylalkoholu (3.2) a výplach se jímá do téže dělicí nálevky. Do dělicí nálevky se přidá 300 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), 130 ml dichlormethanu (3.1), vytřepává se jednu minutu a po oddělení vrstev se spodní dichlormethanová vrstva odpustí do odpařovací baňky na 500 ml (4.2). Extrakce vodné vrstvy dichlormethanem (3.1) se opakuje ještě 2 x dávkami po 70 ml dichlormethanu (3.1) a dichlormethanové vrstvy se vždy po oddělení odpustí do téže odpařovací baňky. Baňka se spojenými dichlormethanovými extrakty se vloží na odparku (4.2) a obsah se za sníženého tlaku při teplotě 40 °C odpaří do sucha. Odparek se rozpustí asi v 5 ml methylalkoholu (3.2), převede kvantitativně do odměrné baňky na 10 ml, odpařovací baňka se vypláchne 2 x malým množstvím (1 až 2 ml) methylalkoholu (3.2), výplachy se převedou do téže odměrné baňky, baňka se doplní po rysku methylalkoholem (3.2) a promíchá. Alikvotní podíl obsahující, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah methylbenzochátu ve zkoušeném vzorku a navážku vzorku, tolik

methylobenzochátu vyhovujícího rozsahu kalibračního grafu se filtruje membránovým filtrem 0,45 µm (4.5) a filtrát se nastříkuje na kolonu přístroje HPLC.

5.2.2 Na přístroji HPLC se nastaví potřebné parametry: Průtok 1 až 1,5 ml/min
Detekce UV 265 nm
Injektovaný objem 20 až 50 µl

Dále se upraví stabilita chromatografického systému několikanásobným dávkováním jednoho kalibračního roztoku (viz 5.1) obsahujícího 4 µg methylobenzochátu v 1 ml, až je dosaženo neměnnosti výšek či ploch píků a je zvolen optimální retenční čas.

Každý z kalibračních roztoků se nastříkuje do kolony přístroje HPLC několikrát a pro kalibrační graf se vezmou průměrné hodnoty.

Filtrát extraktu zkoušeného vzorku i modelového vzorku (krmiva bez obsahu methylobenzochátu s přidavkem standardního roztoku methylobenzochátu, viz 5.2.4) se analyzuje za naprosto stejných podmínek. Z každého měření se pořídí chromatografický záznam (poznámka 9.3).

5.2.3 Koncentrace methylobenzochátu se zjistí z výšek (ploch) chromatografického záznamu a kalibračního grafu.

5.2.4 Vedle analýzy zkoušeného vzorku musí být provedena analýza modelového vzorku s krmivem bez obsahu methylobenzochátu (3.11) s přidavkem určitého množství methylobenzochátu. Vzorek se připraví tak, že k navážce vzorku krmiva bez obsahu methylobenzochátu (3.11) se přidá formou základního standardního roztoku methylobenzochátu (3.8) tolik methylobenzochátu, které je podobné očekávanému (deklarovanému) obsahu ve zkoušeném vzorku a jeho navážce. Po přidání ke krmivu se vzorek promíchá, nechá volně asi 10 minut a pak se postupuje podle 5.2.1, 5.2.2 a 5.2.3.

Zjištěný obsah methylobenzochátu v tomto vzorku by měl být nejméně 90 % teoretického (přidaného).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah methylobenzochátu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10 \cdot C \cdot F}{m} \text{ (poznámka 9.3),}$$

kde C je koncentrace zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

F faktor ředění

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti, validace výsledků (viz čl.8) a recovery testu (viz 5.2.4).

Vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu metylbenzochátu od 4 do 20 mg/kg hodnotu 10 % relat.

8. Validace výsledku

Může být provedena buď opakovaným měřením extraktu zkoušeného vzorku s přidavkem methylbenzochátu, nebo porovnáním spekter extraktu zkoušeného vzorku a kalibračního roztoku pomocí detektoru s diodovým polem (4.1)

8.1 Opakované stanovení s přidavkem methylbenzochátu:

K extraktu zkoušeného vzorku, získaného podle 5.2.1, se přidá přibližně takové množství kalibračního roztoku methylbenzochátu, jaké je ve zkoušeném vzorku.

Pík zkoušeného vzorku na chromatografickém záznamu se od tohoto píku může lišit pouze výškou, nikoliv polohou. Rovněž šířka píku tohoto v jeho poloviční výšce se může lišit nejvýše o 10 %.

8.2 Detekce pomocí detektoru s diodovým polem

a/ Vlnové délky při maximální absorbaci zkoušeného vzorku i standardu na vrcholu píku chromatografického záznamu musí být stejné v mezích rozlišovací schopnosti detekčního systému. Pro detekci s diodovým polem je to obvykle 2 nm.

b/ Mezi 250 až 400 nm, spektrum zkoušeného vzorku a standardu na vrcholu píku chromatogramu, nesmí být rozdílné pro tyto části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorpce.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou získána stejná maxima a neobjeví se mezi dvěma spektry odchylka přesahující 15 % absorbance standardu.

c/ Mezi 250 až 400 nm stoupání, vrchol i klesání absorbanční křivky píku zkoušeného vzorku nesmí být rozdílné od ostatních v této části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou maxima stejná a když ve všech bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje 15 % absorbance spektra na vrcholu píku.

Jestliže jedno z těchto kritérií není splněno, výsledek stanovení nelze pokládat za průkazný.

9. Poznámky

9.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

9.2 Pro účely této metody krmivo bez obsahu methylbenzochátu by mělo být podobného složení (typu) jako zkoušený vzorek a nesmí obsahovat detekovatelné množství methylbenzochátu.

9.3 Je-li přístroj vybaven výpočtovou technikou a integračním software, provede se výpočet přímou integrací.

2.7 Stanovení obsahu narasinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení narasinu v premixech a krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Narasin je fermentační antikokcidikum, vykazující široké spektrum účinku.

2. Princip

Narasin se stanoví na základě inhibičního účinku na růstový faktor testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)

3.2 Oxid hlinitý, bázičský ALCOA F 20, 0,12 až 0,30 mesh

3.3 Extrakční roztok, směs ethylalkohol (3.1) - voda (90 + 10)

3.4 Ředící roztok, směs ethylalkohol (3.1) - voda (20 + 80)

3.5 Narasin, standardní substance deklarované čistoty (uchovává se při teplotě 5 °C)

3.6 Narasin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží, podle obsahu účinné látky, takové množství standardní substance (3.6), aby výsledný roztok obsahoval 100 µg narasinu v 1 ml.

Odvážené množství se rozpustí v 50 ml extrakčního roztoku (3.3), doplní jím po rysku a promíchá.

Roztok je stálý při 5 °C po dobu 1 měsíce.

3.7 Narasin, pracovní standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Ředěním základního standardního roztoku (3.6) ředícím roztokem (3.4) se připraví koncentrace 4,0; 2,0 a 1,0 µg v 1 ml.

Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

3.8 Narasin, pracovní standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Odměří se přesně 5,00 ml základního standardního roztoku (3.6), smíchá s 20,00 ml extrakčního roztoku (3.3) potom se důkladně promíchá.

3.9 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Uchování kmene: Na šikmé udržovací půdě (3.11.2) při teplotě 5 °C a jednou měsíčně se přeočkovává. Po každém přeočkování se inkubuje po dobu 16 až 18 hod při teplotě 37 °C.

3.10 Sporová suspenze testovacího mikroorganismu

Příprava sporové suspenze: Kultura vyrostlá na šikmém agaru se smyje asi 3 ml fyziologického roztoku (3.12) a přenese se asepticky do Rouxových láhví (4.13), obsahujících sporulační půdu (3.11.1). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.13) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dní. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.14) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.12) odstředí (4.3), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.12), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.3). Toto promývání spór se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spór převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spór představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.11 Živné půdy

3.11.1 Sporulační půda, živný agar sušený č. 2 SEVAC

Příprava: 40 g živného agaru se rozpustí podle návodu výrobce v odměrné baňce na 1 000 ml, přidá se 400 mg síranu manganatého kryst. (3.13), doplní do 1000 ml vodou a promíchá. Pak se přelije do Rouxových láhví (4.13) a sterilizuje 20 minut v autoklávu (4.11) při přetlaku 0,05 MPa.

3.11.2 Testovací půda

Příprava: 0,7 g hydrogenfosforečnanu draselného (3.14), 0,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.15), 10,00 g glukosy (3.16) 2,5 g kvasničného autolyzátu SEVAC (3.17) a 18,0 g agaru podle ČSL 2 (nebo Bacto-agar Difco) se za horka rozpustí v 1 000 ml vody, upraví se pH na hodnotu 6,0 a rozlije se po 270 ml do kuželových baněk na 500 ml a sterilizuje 15 minut při přetlaku 0,05 MPa.

3.12 Fyziologický roztok Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.13 Síran manganatý, monohydrát ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pevný

3.14 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)

3.15 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

3.16 Glukosa

3.17 Kvasničný autolyzát Sevac

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Plotna skleněná 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm
- 4.2 Rám kovový 340 mm x 340 mm nebo 200 mm x 200 mm
- 4.3 Odstředivka laboratorní
- 4.4 Třepačka (horizontální)
- 4.5 Pipety podle Pasteura
- 4.6 Lázeň vodní
- 4.7 Korkovrt o průměru 9 mm
- 4.8 Vodováha
- 4.9 Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.10 Termostat
- 4.11 Autokláv
- 4.12 Trubice chromatografická o průměru 19 mm, délce 500 mm, s kohoutem a bez frity
- 4.13 Láhev Rouxova

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Do kuželové baňky na 750 ml se zábrusem se odváží přesně 5,000 g zkušebního vzorku, přidá se 350 ml extrakčního roztoku (3.3) (poznámka 8.2), baňka se zazátkuje, vloží na (horizontální) třepačku (4.4) a extrahuje po dobu 30 minut nebo 2 hod v klidu za občasného promíchání. Suspenze se filtruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 500 ml, filtr se promyje několikrát extrakčním roztokem (3.3), baňka se jím doplní po rysku a promíchá (poznámka 8.2).

Z tohoto zásobního roztoku se připraví testovací roztoky o koncentracích teoreticky s 1 , 2 a 4 µg narasinu v 1 ml (poznámka 8.2).

5.1.2 Na plotnu (4.1), opatřenou rámem (4.2) utěsněným v dotyku s plotnou malým množstvím agaru a uloženou ve vodorovné poloze (4.8), se vylije 270 ml testovací půdy (3.11.2), předem rozehřáté a zchlazené na teplotu 55 °C a naočkované sporovou suspensí (3.10). Po ztuhnutí se plotna uloží na 1 hod do chladničky při teplotě 5 °C a pak se v pravidelných vzdálenostech vytvoří korkovrtem (4.7) jamky 9 řad po 9 sloupcích, pro vnášení testovacích i testačních roztoků. Testační roztoky standardu (viz 3.7) se vnášejí Pasteurovou pipetou (4.5) do 3 řad pod sebou ve středu plotny a testovací roztoky zkoušeného vzorku po stranách opět do tří řad pod sebou a podle druhu jejich teoretických koncentrací k příslušné koncentraci testačního roztoku standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 20 hod při

teplotě 37 °C v termostatu (4.10). Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Do kuželové baňky na 250 ml se zábrusem se odváží přesně 5,000 g zkušební vzorku, přidá 20 ml extrakčního roztoku (3.3) a suspenduje se 3 hod za občasného promíchání nebo 30 minut na třepačce (4.4) (poznámka 8.3). Připraví se chromatografická kolona (4.12) na jejíž dno se vloží malý smotek obvazové vaty, vsype se oxid hlinitý (3.2) po několika vrstvách, z nichž každá se mírně stlačí do výše asi 70 mm. Suspenze zkoušeného vzorku se vnese na kolonu a ponechá protékat. Eluát se jímá do odměrné baňky na 50 ml. Sloupec kolony se promývá podíly extrakčního roztoku (3.3) po 5 ml, pak se jím doplní odměrná baňka s eluátem po rysku a promíchá (poznámka 8.3).

Z tohoto roztoku se připraví testované roztoky o koncentracích 1; 2 a 4 µg narasinu v 1 ml, přičemž se ředí vodou.

5.2.2 Testační roztoky standardu se připraví tak, že pracovní standardní roztok (3.8) se celý zpracuje jako zkoušený vzorek počínaje vnesením na chromatografickou kolonu (4.12). Výsledná koncentrace tohoto standardního roztoku v 50 ml odměrné baňce je 10 µg narasinu v 1 ml. Z tohoto roztoku ředěním vodou se připraví testační roztoky o koncentracích 1 ; 2 a 4 µg narasinu v 1 ml, které se vnášejí na plotnu (4.1).

5.2.3 Dále se postupuje podle 5.1.2 s tím rozdílem, že se vyhloubí 10 krát 9 jamek a testované i testační roztoky se plní do 2 řad.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah narasinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah avoparcinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace avoparcinu ve výluhu byla asi 70 µg/1 ml.

8.3 Při předpokládaném obsahu narasinu ve zkoušeném vzorku 70 mg/kg by měla být teoreticky koncentrace tohoto roztoku 7 µg narasinu v 1 ml.

2.8 Stanovení obsahu monensinu (salinomycinu a narasinu)

1. Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení monensinu, salinomycinu a narasinu v krmivech a premixech pro obsahy od 0,2 mg/kg u monensinu a od 1,5 mg/kg u salinomycinu a narasinu.

Pro účely této metody se používá tato definice: monensin, salinomycin a narasin jsou ionoforní polyetherické monokarboxylové kyseliny (IPMA), sumárních vzorců :

Monensin sodná sůl- $C_{36}H_{61}O_{11}Na$, volná kyselina $C_{36}H_{62}O_{11}$;

salinomycin sodná sůl - $C_{42}H_{69}O_{11}Na$, volná kyselina $C_{42}H_{70}O_{11}$;

narasin - $C_{43}H_{72}O_{11}$.

2. Princip

Obsah monensinu salinomycinu a narasinu se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem a přečištění na pevné fázi metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s postkolonovou derivatizací a UV detektorem.

6. Chemikálie a zkušební pomůcky

3.1 Voda, čistota HPLC

3.3 Methanol, CH_3OH , čistota HPLC

3.3 Dichlormethan, CH_2Cl_2 , $\rho = 1,32 \text{ g.cm}^{-3}$

3.4 Kyselina sírová, H_2SO_4 , $\rho = 1,83 \text{ g.cm}^{-3}$, čistota HPLC nebo ch.č.

3.5 Octan ethylnatý; čistoty > 99,5 %, $C_4H_8O_2$,

3.6 Hexan; čistoty > 90 %, C_6H_{14}

3.7 Aceton; čistoty > 99,5 %, CH_3COCH_3

3.8 Kyselina octová, čistota HPLC, čistota 100 %, CH_3COOH , $\rho = 1,05 \text{ g.cm}^{-3}$

6.9 Kyselina octová, roztok 5 %

Příprava: V odměrné baňce na 100 ml se smísí 70 ml vody a 5,0 ml kyseliny octové (3.8), vytemperuje na laboratorní teplotu, vodou se doplní po značku a promíchá.

6.10 Mobilní fáze

Příprava: V odměrné baňce na 1000 ml se smísí asi 925 ml methanolu (3.2) a 75,0 ml kyseliny octové (3.9), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá.

3.11 p-N,N'-dimethylaminobenzaldehyd (p-DMBA), $C_9H_{11}NO$, např. Sigma, D 8904, (light sensitive)

3.13 Derivatizační činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 250 ml methanolu (3.2), opatrně se přidá 15,0 ml kyseliny sírové (3.4) (chlazení !) a v této směsi se rozpustí 17,5 g p-DMBA (3.11), ochladí se na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá. Směs se uchovává v chladu (při teplotě do 10 °C) a ve tmě. Stabilní maximálně 21 dní.

3.13 Monensin, sodná sůl, monohydrát, standardní substance, čistota min. 89,9 %, např. Riedel-deHaën, VETRANAL, Cat.No. 61200.

3.14 Salinomycin, sodná sůl, hydrát, $C_{42}H_{69}O_{11}Na \cdot 2,5H_2O$, čistota min. 97 %, např. Riedel-deHaën, VETRANAL, Cat.No.40820,
nebo salinomycin, sodná sůl, bezvodá forma, min. čistota 98%, např. Hoechst.

3.15 Narasin, min. čistota 97 %, např. Sigma, Cat.No. N-1271

3.17 Základní roztok směsný

Příprava : Do odměrné baňky na 100 ml se naváží postupně takové množství monensinu (3.13), salinomycinu (3.14) a narasinu (3.15), aby výsledná koncentrace odpovídala 0,2 mg sodných solí monensinu a salinomycinu a 0,2 mg narasinu v 1 ml. Baňka se doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá.

3.17 Kolonky pro SPE 500 mg Silica, např. Waters - Sep-Pak Plus Cartridges Silica, WAT020520

3.21 Methanol, roztok 90 %

Příprava : Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 100,0 ml vody, přidá se 800 ml neutrálního methanolu (3.2), promíchá, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá.

3.22 Extrakční roztok 20 % octanu ethylnatého v hexanu

Příprava : Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml octanu ethylnatého (3.5), doplní n-hexanem (3.6) po značku a promíchá.

3.23 Promývací roztok pro SPE (5 % aceton v dichlormethanu)

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odměří 12,5 ml acetonu (3.7), doplní dichlormethanem (3.3) po značku a promíchá.

3.22 Eluční roztok pro SPE (8,0 % roztok methanolu v dichlormethanu)

Příprava : Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 40,0 ml methanolu (3.2), doplní dichlormethanem (3.3) po značku a promíchá.

3.22 Fosfátový tlumivý roztok : V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí 0,2282 g trihydrátu hydrogenfosforečnanu draselného $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ve 300 ml vody a po rozpuštění se doplní methanolem (3.2) po značku a promíchá (chlazení).

7. Přístroje

- 4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím
- 4.2 Třepačka mechanická laboratorní
- 4.3 Koncentrátor vzorků
- 4.4 Ultrazvuková lázeň
- 4.5 Odstředivka laboratorní
- 4.6 Extrakční jednotka (např. spe 12 J.T. Baker)

8. Postup

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti 1,0 až 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a šrotování a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám IPMA. Roztoky IPMA se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření). Za umělého osvětlení jsou roztoky stabilní.

5.1 Extrakce a přečištění extraktu na pevné fázi

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 0,1 až 100 mg IPMA s přesností na 0,001 g (0,5 g pro základní substance a trituráty, 5 g pro premixy doplňkových látek, 20 g až 30 g pro krmné směsi). Zkušební vzorek triturátu se přelije 200,0 ml methanolu (3.18), zkušební vzorek premixu se přelije 100,0 ml methanolu (3.18) a zkušební vzorek krmné směsi se přelije 100,0 ml extrakčního roztoku (3.19). Baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce (4.2) 30 minut. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 2 až 5 ml se nepoužije.

5.1.1 Krmné směsi

Na extrakční jednotku (4.6) se nasadí kolonka Silica (3.17), kondicionuje se 4 ml extrakčního roztoku (3.19) a poté se na kolonku nanese takové množství extraktu, aby výsledná koncentrace ležela v rozmezí 3 až 25 mg/l, maximálně však 5 ml extraktu získaného podle 4.1 (poznámka 10.1). Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 krát 4 ml promývacího roztoku (3.20) a poté se IPMA eluuje do 10 ml vialky 8 ml elučního roztoku (3.21). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků (4.3) pod proudem dusíku při 50 °C, odparek se zalije 2,0 až 5,0 ml fosfátového pufru (3.22) tak, aby výsledná koncentrace ležela v rozmezí 4 až 40 mg/l. Extrakt se promíchá, rozpustí na ultrazvuku (4.4) (30 s) a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (4.5) po dobu 5 minut při 10 000 otáčkách za minutu

5.1.2 Trituráty a premixy doplňkových látek

Podle deklarovaného obsahu IPMA se extrakt získaný podle 4.1 nařadí fosfátovým pufrem (3.22) tak, aby výsledná koncentrace ležela v oblasti kalibrační křivky. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce (4.5) po dobu 3 minut při 10000 ot./min.

5.2 Stanovení metodou HPLC

5.2.1 Chromatografické podmínky

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému .

Následující podmínky jsou doporučené, mohou být použity jiné podmínky, za předpokladu, že dají rovnocenné výsledky.

Požadované validační parametry pro separaci na analytické koloně :

	kapacitní faktor $k \geq 2,5$
	tailing faktor $t_{\alpha} \leq 1,35$
	rozlišení monensin B/monensin A - $R \geq 1,3$
	monensin A/salinomycin - $R \geq 1,5$
	salinomycin/narasin - $R \geq 1,5$.
Kolona:	C ₁₈ -reverzní fáze, Nova-Pak C ₁₈ , 4 μ m, 150 x 3,9 mm nebo obdobná.
Mobilní fáze:	viz 3.10, při použití alternativní kolony se musí mobilní fáze upravit tak, aby vyhovovala požadovaným validačním parametrům.
Průtok mobilní fáze:	0,6 ml/min
Teplota kolony:	38 °C nebo teplota okolí
Průtok derivatizačního činidla:	0,8 ml/min
Objem derivatizační smyčky:	1000 μ l
Vnitřní průměr deriv. smyčky	0,25 mm
Teplota derivat. postkolon. systému:	(90 – 95) °C $\pm$ 2 °C
Detektor UV:	598 nm
Objem nástřiku:	50 μ l
RetTime: pro uvedenou kolonu při	
teplotě okolí (min) :	
monensin	4,8
salinomycin	5,6
narasin	6,5

Průtok mobilní fáze, derivatizačního činidla a teplota derivatizace musí být zachovány.

5.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 25 ml se pipetuje 0,5; 1,0; 2,0 a 5,0 ml základního roztoku IPMA (3.16), doplní fosfátovým tlumivým roztokem (3.22) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci 4,0; 8,0; 16,0 a 40,0 mg/l. Na

chromatografickou kolonu se nanáší 50 µl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

6. Výpočet

Obsah monensinu (X_M) vyjádřený v mg/kg se rovná součtu obsahu monensinu A a B, které se vypočtou podle vzorce:

$$X_M = \frac{c \times V \times R \times \left(1 + \frac{A_{M_B}}{A_{M_A}} \times F_P \right)}{m_a}$$

kde	c	je	koncentrace monensinu A odečtená z kalibrační křivky pro standard monensinu A v mg/l
	m_a		hmotnost zkušební vzorku v g
	V		objem extraktu v ml
	R		zředovací faktor
	F_P		korelační faktor pro mikrobiologickou aktivitu monensinu B; $F_P = 0,28$
	A_{MB}		plocha píku monensinu B
	A_{MA}		plocha píku monensinu A

Obsah salinomycinu (X_S) a narasinu (X_N) vyjádřený v mg/kg se vypočte podle vzorce:

$$X_{S(N)} = \frac{c \times V \times R}{m_a}$$

kde	c	je	koncentrace salinomycinu nebo narasinu odečtená z kalibrační křivky v mg/l
	m_a		hmotnost zkušební vzorku v g
	V		objem extraktu v ml
	R		zředovací faktor

7. Opakovatelnost

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

od 0,2 do 30 mg/kg	15 % relat.
od 30 do 90 mg/kg	4,5 mg/kg

nad 90 mg/kg

5 % relat.

8. Reprodukovatelnost

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

do 30 mg/kg

5 mg/kg

od 30 do 100 mg/kg

15 % relat.

od 100 do 200 mg/kg

15 mg/kg

od 200 do 50 000 mg/kg

10 % relat.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,2 mg/kg.

9. Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je 0,5 mg/kg pro monensin, 1,5 mg/kg pro salinomycin a narasin..

11. Poznámky

11.1 U vzorků s obsahem IMPA pod 5 mg/kg se kolonka kondicionuje 5 ml extrakčního roztoku (3.19) a poté se na kolonku nanese 10 ml extraktu získaného podle 4.1. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí kolonky, promyje se 2 krát 6 ml promývacího roztoku (3.20) a poté se IPMA eluuje do 10 ml vialky 8 ml elučního roztoku (3.21). Dále se postupuje stejně jako u krmných směsí.

2.9 Stanovení obsahu nikarbazuinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení nikarbazuinu v premixech a krmných směších. Není použitelná za přítomnosti komponentů na bázi nitrosloučenin jako jsou

furazolidon, nitrovin a obdobných dalších nitrolátek, jakož i pro obsahy nikarbazuinu pod 50 mg/kg.

Pro účely této metody se používá tato definice: Nikarbazin je antikokcidikum, po chemické stránce je to 4,4'-dinitrocarbanilid kondenzát s 4,6-dimethyl-2-hydroxypyrimidin v poměru 1:1, sumárního vzorce $C_{19}H_{18}N_6O_6$.

2. Princip

Nikarbazin se stanoví spektrofotometricky po extrakci n-hexanem a chromatografické separaci v prostředí alkalického roztoku chloridu draselného.

3. Chemikálie

3.1 Nikarbazin, standardní substance podle BVC II (poznámka 8.1)

3.2 Nikarbazin, základní standardní roztok

Příprava: Přesně 25,00 mg standardní substance nikarbazuinu (3.1) se odváží do odměrné baňky na 100 ml, rozpustí v dimethylformamidu (3.5), doplní tímtéž po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního roztoku obsahuje 0,25 mg nikarbazuinu.

3.3 Nikarbazin, pracovní standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 50 ml základního standardního roztoku (3.2), doplní dimethylformamidem (3.5) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 125 µg nikarbazuinu.

3.4 Nikarbazin, pracovní standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.2), doplní dimethylformamidem (3.5) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 12,5 µg nikarbazuinu.

3.5 Dimethylformamid (poznámka 8.2)

3.6 Oxid hlinitý, bázecký pro sloupcovou chromatografii, stupeň aktivity I (poznámka 8.3)

3.7 Ethylalkohol 96 % aldehyduprostý, predestilovaný (poznámka 8.4)

3.8 n-Hexan (poznámka 8.4)

3.9 Síran sodný, bezvodý a předsušený

3.10 Hydroxid draselný, roztok $c(KOH) = 5 \text{ mol/l}$

3.11 Chlorid draselný, roztok $c(KCl) = 1 \text{ mol/l}$

3.12 Alkalické činidlo

Příprava: 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3.10) a 40 ml roztoku chloridu draselného (3.11) se smíchá s 50 ml vody zbavené oxidu uhličitého a promíchá. Připravuje se vždy čerstvý.

3.13 Kompenzační činidlo - chlorid draselný, roztok 75 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Trubice chromatografická, délky 250 mm a světlosti

a) 25 mm s vložkou ze slinutého skla S₂ (pro krmné směsi)

b) 14 mm bez frity (pro premixy)

4.2 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při 435 nm

4.3 Lampa UV s filtrem o vlnové délce 366 nm

4.4 Lázeň vodní s termostatem

4.5 Odstředivka s příslušenstvím

4.6 Chladič zpětný vodní se zábrusem

5. Postup (poznámka 8.5)

5.1 Premixy

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1.1 Do odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje 4,0 ; 5,0 a 6,0 ml pracovního standardního roztoku (3.3), do každé z baněk se přidá asi 10 ml ethylalkoholu (3.7), 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní se ethylalkoholem (3.7.) po rysku a promíchá.

5.1.1.2 Absorbance roztoků se měří na spektrofotometru (4.2) při vlnové délce 435 nm proti samotnému ethylalkoholu (3.7) v kyvetách optické délky 10 mm

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní provedení

5.1.2.1 Nejprve se připraví sloupec v chromatografické trubici (4.1) tak, že do zúžené části trubice se zasune smotek obvazové vaty a trubice se naplní do jedné třetiny obsahu dimethylformamidem (3.5). Potom se postupně vnáší 10 g oxidu hlinitého (3.6) tak, aby byl stále pod hladinou dimethylformamidu. Po usazení oxidu hlinitého se na povrch sloupce nanese asi 7 až 10 mm vrstva síranu sodného (3.9).

5.1.2.2 Do zábrusové kuželové baňky na 250 ml se odváží přesně 1,000 g zkušební vzorku, přidá se přesně 100 ml dimethylformamidu (3.5) a extrahuje se na vodní lázni (4.4) vyhřáté na 100 °C pod zpětným chladičem (4.6) po dobu 15 minut. Potom se obsah baňky ochladí na laboratorní teplotu a odstředí (4.5) při 3 000 ot/min po dobu 5 minut, přičemž supernatant se chrání před denním světlem.

5.1.2.3 Na připravený sloupec v chromatografické trubici (4.1) se odpipetuje 5 ml supernatantu a stěny trubice se opláchnou 1 ml dimethylformamidu (3.5), přidávaným z pipety. Po nanesení vzorku se přidá 3krát po 5 ml dimethylformamidu(3.5), přičemž současně je nutno sledovat pomocí UV lampy (4.3) pohyb fluoreskujících balastních látek ve sloupci. Dokud jsou tyto ještě v trubici přítomny nelze přikročit k vymývání ethylalkoholem (3.7), nýbrž dalšími přídávky dimethylformamidu (3.5) pokračovat ve vyvíjení. Po úplném odstranění balastních látek (nenastává již fluorescence) se na vrchol chromatografického sloupce (4.1) opatrně nanese přesně 5 ml ethylalkoholu (3.7) za účelem eluce. Prvé přesně 3 ml eluátu se nepoužijí a pod trubici se postaví odměrná baňka na 25 ml. Eluce se obvykle provede přidáním 5krát po 5 ml ethylakoholu (3.7), přičemž průchod nikarbazinu ve sloupci se sleduje UV lampou (4.3), zda nejsou ještě přítomny balastní látky. Po provedené eluci se odměrná baňka odstaví, doplní po rysku ethylalkoholem (3.7) a promíchá.

5.1.2.3.4 Potom se odpipetuje 5 ml roztoku do další odměrné baňky na 25 ml, přidá 10 ml ethylalkoholu (3.7), 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní po rysku ethylalkoholem (3.7) a promíchá.

5.1.2.3.5 Dále se postupuje podle 5.1.1.2 , přičemž vlastní měření se provede 3krát a k vyhodnocení se použije průměrná hodnota.

5.1.2.3.6 Z naměřené absorbance, resp. její průměrné hodnoty se z kalibračního grafu zjistí koncentrace nikarbazinu.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.2.1.1 Do odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje 10,0 ; 15,0 a 20,0 ml pracovního standardního roztoku (pro krmné směsi) (3.4), do každé z odměrných baněk se odpipetuje 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní se ethylalkoholem (3.7) po rysku a promíchá.

5.2.1.2 Absorbance roztoků se měří na spektrofotometru (4.2) při vlnové délce 435 nm v kyvetách optické délky 10 mm proti samotnému ethylalkoholu (3.7).

5.2.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentracím se sestojí kalibrační graf.

5.2.2 Vlastní provedení

5.2.2.1 Odváží se asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,01 g do zábrusové kuželové baňky na 200 ml a extrahuje se 3krát 25 ml n-hexanu (3.8), po odstátí a usazení (baňka se vždy uzavře), se n-hexanový extrakt odlije přes suchý řídký filtr. Hexanový extrakt se dále nepoužije. Filtr s eventuálně ulpělými podíly se vloží zpět do baňky, obsah baňky se vysuší na vroucí vodní lázni (4.4), pak se přidá 100 ml dimethylformamidu (3.5) a zahřeje k varu za občasného promíchání. Potom se odstaví, vytemperuje a odstředí se (4.5) 5 minut při 3 000 ot/min, přičemž supernatant se chrání před denním světlem. Supernatant převede kvantitativně do odměrné baňky obsahu 100 ml, doplní dimethylformamidem (3.5) po rysku a promíchá.

5.2.2.2 Příprava chromatografické trubice (4.1) se provede, jak uvedeno v 5.1.2.1, s tím rozdílem, že se použije trubice světlosti 25 mm s vložkou ze slinutého skla (4.1.a), nepřidává se smotek vaty a množství použitého oxidu hlinitého (3.6) je 17 g.

5.2.2.3 Na vrch připraveného sloupce se odpipetuje 25 ml supernatantu a postupně po malých dávkách (5 ml) se přidává dimethylformamid (3.5) a to tak dlouho, pokud pod zářením UV lampy (4.3) fluoreskují balastní látky. Po úplném odstranění balastních látek se přidá 5 ml ethylalkoholu (3.7). První 2-3 ml eluátu se nepoužijí a potom se pod trubicí se postaví odměrná baňka na 50 ml. Eluce se dále provádí ethylalkoholem (3.7), přičemž se průchod nikarbazinu trubicí neustále sleduje pod UV lampou (4.3). Zhášející zóna nikarbazinu postupuje širším pásmem a prochází po zachycení 22 až 25 ml eluátu. Obsah odměrné baňky se doplní ethylalkoholem (3.7), a to buď přes sloupec (vymývání) nebo přímo, po rysku a promíchá.

5.2.2.4 Z tohoto eluátu se odpipetuje 15 ml do odměrné baňky na 25 ml, přidá se 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní ethylalkoholem (3.7) po rysku a promíchá.

5.2.2.5 Vedle toho se připraví kompenzační slepý roztok a to odpipetováním 15 ml vlastního (pro každý vzorek) eluátu do odměrné baňky na 25 ml, přidá se 5 ml kompenzačního činidla (3.13), ethylalkoholem (3.7) se doplní po rysku a promíchá. Tento roztok slouží jako srovnávací při měření.

5.2.2.6 Absorbance roztoku se měří na spektrofotometru (4.2) při vlnové délce 435 nm v kyvetách optické délky 10 mm proti kompenzačnímu slepému roztoku (viz 5.2.2.5).

Z naměřené hodnoty absorbance se z kalibračního grafu zjistí koncentrace nikarbazinu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah nikarbazinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000.C.F}{m}$$

kde C je množství nikarbazinu ve zkoušeném vzorku zjištěné z kalibračního grafu v mg

m navážka zkušební vzorku v g

F faktor ředění (pro přesně dodržžený postup pro premixy = 2,5 a pro krmné směsi = 5 000)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Standardní substance nikarbazin musí vykazovat maximum absorpance při vlnové délce 366 nm, přičemž $E_{10\text{mm}}^{1\%} = 890 \pm 5 \%$

8.2 Dimethylformamid s roztokem hydroxidu sodného 100 g/l v ethylalkoholu (50 % v/v) nesmí dávat barevnou reakci.

8.3 Oxid hlinitý musí vyhovovat následujícím testu: Do zábrusové baňky na 250 ml se vsype 10 g oxidu hlinitého, přidá se 100 ml vody a silně vytřepává po dobu 2 minut. Po ustání se změří pH výluhu; má být v rozmezí 10,0 až 10,5 pH.

8.4 Ethylalkohol 96 %, n-hexan jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

Veškerý použitý n-hexan je po regeneraci možno znovu použít.

8.5 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.11 Stanovení obsahu robenidinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 329, 30/12/93.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení robenidinu v premixech a krmivech (poznámka 9.1)

Pro účely této metody se používá tato definice: Robenidin je kokcidiostatikum účinné na některé druhy Eimerií. Po chemické stránce je to 1,3-bis-(p-chlorbenzilidenamino)guanidin hydrochlorid.

2. Princip

Robenidin se stanoví po extrakci vzorku okyseleným methylalkoholem, jeho přečištění na chromatografické koloně s oxidem hlinitým, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3. Chemikálie

3.1 Oxid hlinitý acidický, stupeň aktivity I

3.2 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) bezvodý

3.3 Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) nebo bezvodý (Na_2HPO_4)

3.4 Acetonitril, čistoty pro HPLC

3.5 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/ml}$)

3.6 Methylalkohol, okyselený roztok (poznámka 9.2)

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 4 ml konc. kyseliny chlorovodíkové (3.5), doplní po rysku methylalkoholem a promíchá

3.7 Mobilní fáze

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 0,34 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2), rozpustí se ve vodě toutéž doplní po rysku a promíchá (Roztok A).

Do další odměrné baňky na 100 ml se odváží 0,355 g bezvodého hydrogenfosforečnanu sodného nebo 0,896 g dodekahydrátu ($\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) (3.3), rozpustí ve vodě, toutéž doplní po rysku a promíchá (Roztok B).

Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 650 ml acetonitrilu (3.4), asi 200 ml vody, 50 ml roztoku A, 50 ml roztoku B, doplní po rysku a promíchá. Dearuje se

probubláváním heliem (3.11) po dobu asi 10 minut. Deaerovat je možno i v ultrazvukové lázni (4.6) po dobu 15 minut.

3.8 Robenidin, standardní substance o 100 % nebo známé účinnosti

3.9 Robenidin, základní standardní roztok (poznámka 9.3)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 40 mg standardní substance robenidinu (3.8) 100 % účinnosti nebo vypočtené množství o nižší známé účinnosti, rozpustí v okyseleném methyalkoholu (3.6), doplní tímtež po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 400 µg robenidinu.

3.10 Robenidin, pracovní standardní roztok (poznámka 9.3)

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku robenidinu (3.9), doplní mobilní fází (3.7) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 10 µg robenidinu.

3.11 Helium

3.12 Krmivo bez obsahu robenidinu i rušících látek - modelový vzorek (poznámky 9.4 a 9.10)

4 Přístroje a pomůcky

4.1. Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím (dále jen HPLC), čerpadlo, kolona - reverzní fáze C 18, 250 x 4,5-10 µm, např. injektážní kohout např. Rheodyne popř. i datastanice s integračním software a tiskárna (poznámka 9.5).

4.2 Odparka vakuová, rotační

4.3 Třepačka laboratorní

4.4 Kolona chromatografická, skleněná, opatřená ve spodu uzavíracím kohoutem, průměru 10 až 15 mm, délka 250 mm (poznámka 9.6)

4.5 Baňka odpařovací s kulatým dnem, obsahu 250 ml

4.6 Vata skelná

5. Postup (poznámka 9.12)

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do 5 odměrných baněk na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 15,0 ; 20,0 ; 25,0 ; 30,0 a 35,0 ml pracovního standardního roztoku robenidinu (3.10), každá z odměrných baněk se doplní mobilní fází (3.7) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky reprezentují koncentrace 3,0 ; 4,0 ; 5,0 ; 6,0 a 7, 0 µg robenidinu v 1 ml.

5.1.2 Do kolony přístroje pro HPLC (4.1) se dává každý roztok, kalibrační (standard) i zkoušený vzorek, dvakrát po ekvilibraci kolony, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástřiků téhož vzorku musí být v toleranci nejvýše 2 %. Vlastní měření se provede za následujících

parametrů:	teplota kolony	teplota okolní atmosféry
	průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
	detekce	vlnová délka 347 nm (poznámka 9.7)
	injektovaný objem	20 µl
	retenční čas (pro kolonu 250 x 4)	asi 10 minut;

5.1.3 Kolona se uvede do rovnováhy až dosáhne ustálení základní linie při průtoku mobilní fáze (3.7) na výše uvedenou hodnotu, pak se dává kalibrační, resp. roztok zkoušeného vzorku a za výše uvedených parametrů se pořídí záznam.

5.1.4 Z údajů příslušných odezvy a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf. Bází odezvy je plocha píku.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží takové množství dobře zhomogenizovaného zkušební vzorku, které by obsahovalo, podle předpokládaného obsahu robenidinu ve zkoušeném vzorku (teorie), 1 mg robenidinu (poznámka 9.8). Potom se do odměrné baňky přidá přesně 200 ml okyseleného methylalkoholu (3.6), baňka se uzátkuje a vytřepává se na třepačce (4.3) po dobu 30 minut. Po důkladném usazení pevného podílu vzorku se extrakt přefiltruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Tento zásobní roztok zkoušeného vzorku má předpokládanou koncentraci 5 µg robenidinu v 1 ml.

5.2.2 Chromatografická předčišťovací kolona se připraví tak, že na dno této chromatografické trubice (4.4) umístěné ve vertikální poloze se vloží smotek skelné vaty (4.6), upěchuje a ní se nasype 11 g oxidu hlinitého (3.1) a to pokud možno tak, aby náplň kolony nebyla příliš vystavena volné atmosféře. Na připravenou kolonu se odpipetuje 5 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku, nechá se úplně vsáknout do náplně kolony a eluuje se z kolony 100 ml methylalkoholu (3.6) do odpařovací baňky s kulatým dnem (4.5) při průtoku 2 až 3 ml/min. Baňka se pak vloží do odparky (4.2) a obsah se nechá při teplotě 40 °C odpařit do sucha. Odparek se rozpustí v přesně odměřených 5 ml mobilní fáze (3.7). Před nástřikem do kolony přístroje (4.1) se doporučuje roztok odstředit (4.7) z důvodu možné kontaminace částicemi oxidu hlinitého v sedimentu.

Dále se postupuje podle 5.1.2 .

5.2.3 Za účelem ověření dodržení správného postupu (poznámka 9.9) musí být provedena zkouška s modelovým vzorkem (recovery test): K navážce vzorku krmiva bez detekovatelného obsahu robenidinu (3.12) se přidá formou základního standardního roztoku robenidinu (3.9) takové množství robenidinu, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah robenidinu ve zkoušeném vzorku, jaké je obsaženo v navážce zkoušeného vzorku. Toto množství se přidá k příslušné navážce krmiva bez obsahu robenidinu (3.12), na kterou bylo vypočteno (navážka se volí stejná jako u zkoušeného vzorku), promíchá a po 10 minutách se postupuje podle 5.2.1.

5.2.4 Koncentrace robenidinu v roztoku zkoušeného vzorku se zjistí z kalibračního grafu (poznámka 9.10).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah robenidinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce (poznámka 9.10):

$$X = \frac{C.F}{m}$$

kde C je koncentrace robenidinu, zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

F faktor ředění

m navážka zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena (poznámka 9.11).

8. Validace výsledku (poznámka 9.10)

Může být provedena buď opakovaným nástřikem extraktu zkoušeného vzorku s přidavkem robenidinu do kolony přístroje HPLC a porovnáním píků tohoto a zkoušeného vzorku, nebo detekce pomocí detektoru s diodovým polem a srovnáním spekter extraktu zkoušeného vzorku a kalibračního roztoku robenidinu.

a/ Opakovaným stanovením (co-chromatography) s přidavkem robenidinu:

K extraktu zkoušeného vzorku získaného podle 5.2.1 a 5.2.2 se přidá přibližně takové množství kalibračního roztoku robenidinu (viz 5.1.1), jaké je ve zkoušeném vzorku.

Oproti píku zkoušeného vzorku se v chromatografickém záznamu mohou píky robenidinu lišit pouze výškou, nikoliv polohou. Rovněž šířky píků v jejich poloviční výšce se mohou lišit o 10 %.

b/ Detekcí pomocí detektoru s diodovým polem: v chromatografickém záznamu se

ba/ Vlnové délky při maximální absorpci zkoušeného vzorku i standardního spektra na vrcholu píku musí být stejné v mezích rozlišovací schopnosti detekčního systému. Pro detekci s diodovým polem je to obvykle 2 nm.

bb/ Mezi vlnovými délkami 250 a 400 nm spektrum zkoušeného vzorku i standardu na vrcholu píku nesmí být rozdílné pro tyto části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou získána stejná maxima a mezi dvěma spektry se neobjeví odchylka přesahující 15 % absorbance standardu.

bc/ Mezi vlnovými délkami 250 až 400 nm stoupání, vrchol i klesání křivky absorbance píku extraktu zkoušeného vzorku nesmí být rozdílné od ostatních v této části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorbance.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou maxima stejná a když ve všech bodech odchylka nepřevyšuje o 15 % absorbance spektra na vrcholu píku.

Jestliže jednoho z těchto kritérií není dosaženo výsledek stanovení nemůže být zcela průkazný.

9. Poznámky

9.1 Metoda ES uvádí mez stanovitelnosti 5 mg/kg (5 ppm)

9.2 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a zvláště nebezpečným jedem. Proto při jakékoli manipulaci s ním až do jeho úplné asanace je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

9.3 Robenidin je citlivý na denní světlo, proto je třeba nevystavovat žádný roztok jej obsahující přímému dennímu záření.

9.4 Pro účely této metody by jako krmivo bez obsahu robenidinu mělo být podobného typu jako zkoušený vzorek a nemělo by obsahovat detekovatelné množství robenidinu.

9.5 Metoda ES uvádí ještě detektor s diodovým polem

9.6 Metoda ES uvádí materiál trubice jantarové sklo

9.7 Metoda ES uvádí vlnovou délku 347 nm

9.8 Z důvodu reprezentativnosti vzorku se nedoporučuje navažovat méně než 1 g. Extrakt je nutno vhodně naředit methylalkoholem tak, aby 1 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku obsahoval teoreticky 5 µg robenidinu.

9.9 Převzato z metody ES

9.10 Je-li součástí příslušenství přístroje HPLC výpočtová technika s integračním software s programem pro přímé výpočty vypočítává se obsah pomocí tohoto přímo.

9.11 Metoda ES uvádí pro obsahy nad 15 mg/kg 10 % relat. zkoušeného vzorku obsahoval teoreticky 5 µg robenidinu v 1 ml.

9.12 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.12 Stanovení sulfaquinoxalinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 032, 05/02/75.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení sulfaquinoxalinu v premixech a krmných směsích. Mez stanovitelnosti je 20 mg/kg.

Stanovení ruší ostatní sulfonamidy a kyselina arsanilová ($C_6H_8AsNO_3$).

Pro účely této metody se používá tato definice: Sulfaquinoxalin je po chemické stránce (4-amino-N-2-quinoxaliny-benzensulfonamid).

2. Princip

Sulphoquinoxalin se stanoví po extrakci vzorku dimethyformamidem s chloroformem a po jeho alkalické hydrolýze diazotaci a kopulaci n-2-aminoethyl-1-naftylaminem, spektrofotometricky při vlnové délce 545 nm.

3. Chemikálie

3.1 N,N-dimethylformamid

3.2 Chloroform

3.3 Ethylalkohol (poznámka 8.1)

3.4 Alkalické hydrolyzační činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 10 g hydroxidu sodného a 25 g chloridu sodného, rozpustí ve vodě, doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.5 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17$ g/ml)

3.6 Dusitan sodný, roztok 1 g/l (připravuje se vždy čerstvý)

3.7 Sulfamát amonný, roztok 5 g/l (připravuje se vždy čerstvý)

3.8 N-2-aminoethyl-1-naftylamin dihydrochlorid, roztok 1 g/l (dále jen ANC)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 100 mg ANC, rozpustí v 1 % roztoku kyseliny chlorovodíkové, doplní toutéž po rysku a promíchá. Připravuje se vždy čerstvý.

3.9 Sulfaquinoxalin, standardní substance

3.10 Sulfaquinoxalin, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 250 mg standardní substance sulphoquinoxalinu (3.9) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí se v 50 ml roztoku hydroxidu sodného (25 ml 0,1 mol/l roztoku hydroxidu sodného + 25 ml vody), doplní vodou po rysku a promíchá.

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml tohoto roztoku, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto zředěnějšího standardního roztoku obsahuje 25 µg sulfaquinoxalinu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Baňka kuželová se zabroušenou zátkou, objemu 250 ml

4.2 Třepačka laboratorní

4.3 Kelímek filtrační skleněný S₃

4.4 Nálevka dělicí na 250 ml

4.5 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.6 Zkumavky 150 mm x 25 mm

4.7 Lázeň vodní s termostatem

4.8 Spektrofotometr vhodné konstrukce s kyvetami o optické délce 20 mm

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje přesně 2 , 4 , 6 , 8 a 10 ml zředěnějšího standardního roztoku sulfaquinoxalinu (3.10), do každé z baněk se připipetuje 8 ml kyseliny chlorovodíkové (3.5), doplní vodou po rysku a promíchá. Tyto roztoky obsahují 50, 100, 150, 200 a 250 µg sulfaquinoxalinu ve 100 ml. Z těchto roztoků standardu se odpipetuje po 10 ml do zkumavek (4.6), přidá se po 1 ml ANC a obsah zkumavek se promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 5, 10, 15, 20 a 25 µg sulfaquinoxalinu.

5.1.2 Absorbance každého roztoku se měří na spektrofotometru (4.8) v kyvetách optické délky 20 mm při vlnové délce 545 nm proti vodě jako slepému roztoku.

5.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

Do kuželové baňky 250 ml (4.1) se odváží s přesností nejméně na 0,001 g takové množství zkušební vzorku, aby obsahovalo mezi 0,25 až 1,25 mg sulfaquinoxalinu. K navážce vzorku se přidá 20 ml N,N-dimethylformamidu (3.1), promíchá se baňka se vloží na vroucí vodní lázeň (4.7) na dobu 20 minut a po ochlazení proudem studené vody se přidá 60 ml chloroformu (3.2). Baňka se zazátkuje, vloží se na třepačku (4.2) a vytřepává po dobu 30 minut. Pak se obsah baňky zfiltruje přes filtrační kelímek (4.3) pod mírně sníženým tlakem (4.5), baňka se vypláchne a filtr promyje 4 x 5 ml chloroformu (3.2). Filtrát se kvantitativně převede do dělicí nálevky (4.4) a filtr se ještě promyje do této dělicí nálevky 50 ml chloroformu (3.2). Zbytek na filtru se dále nepoužije.

Do dělicí nálevky (4.4) s extraktem vzorku se přidá 50 ml alkalického hydrolyzačního činidla (3.4) a 5 ml ethylalkoholu (3.3), důkladně se promíchá tak, aby se zabránilo vzniku emulze a to buď pomalým převrácením dělicí nálevky asi 20 x, nebo mírným kroužením podle podélné osy. Po oddělení vrstev, což trvá obvykle asi 15 minut, se odpustí spodní vrstva do jiné dělicí nálevky a horní vodná vrstva se převede do odměrné baňky na 250 ml. Spodní chloroformová vrstva se reextrahuje třikrát vždy 50 ml alkalického hydrolyzačního činidla (3.4), přičemž každá z vodních vrstev se přidává do téže odměrné baňky (viz výše). Tato odměrná baňka se pak doplní vodou po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 25 ml do odměrné baňky na 50 ml, přidá se přesně 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.5), doplní vodou po rysku a promíchá. Pokud je třeba, filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž prvních 15 ml filtrátu se nezachycuje.

Po 10 ml roztoku (filtrátu) se převede do dvou zkumavek (4.6) a do každé ze zkumavek se přidá po přesně 2 ml roztoku dusitanu sodného (3.6), promíchá, po 3 minutách stání ještě přesně po 2 ml roztoku sulfamátu amonného (3.7) a opět promíchá. Do první ze zkumavek se přidá pipetou přesně 1 ml roztoku ANC (3.8), do druhé přesně 1 ml vody a obsahy zkumavek se opět důkladně promíchají.

Každá ze zkumavek se uzavře pryžovou zátkou, opatřenou otvorem s trubičkou pro odvod plynu, nebo podobným zařízením, a pomocí mírně sníženého tlaku (4.5) se odsaje rozpuštěný dusík.

Dále se postupuje podle 5.1.2.

Z rozdílu hodnot absorbancí roztoků s roztokem ANC a bez něj se zjistí množství sulfaquinoxalinu z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah sulfaquinoxalinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{50 \cdot C}{m}$$

kde C je množství sulfaquinoxalinu zjištěné z kalibračního grafu v mg
m navážka zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

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

20 až 100 mg/kg	10 mg/kg
100 až 5 000 mg/kg	10 % relat.
5 000 až 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

2.13 Stanovení obsahu meticlorpindolu

1. Účel a rozsah

Jsou zde uvedeny tři metody stanovení, spektrofotometrická pro premixy, metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro premixy a její modifikace pro krmné směsi.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení meticlorpindolu v premixech a krmných směsích.

Pro účely těchto metod se používá následující definice:

Meticlorpindol (clopido, coyden) je chemické antikokcidikum o složení 2,6-di-methyl-3,5-dichlorhydroxypyridin (nebo 3,5-dichlor-2,6-dimethyl-4-pyridinol), sumárního vzorce $C_7H_7Cl_2NO$.

2. Princip

Meticlorpindol se stanoví po extrakci vzorku ethylalkoholem, za přítomnosti antioxidantu předextrakcí n-hexanem, spektrofotometricky porovnáním se standardem nebo

po extrakci vzorku směsí methylalkoholu a hydroxidu amonného metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 Spektrofotometrická metoda

3.1.1 Ethylalkohol čistý 96%, zvlášť denaturovaný 1 % hexanu (poznámka 8.1)

3.1.2 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.1.3 Meticlorpindol, standardní substance nebo premix Lerbec o známé účinnosti resp. koncentraci meticlorpindolu

3.1.4 Meticlorpindol, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 30 mg standardní substance meticlorpindolu o 100 % účinnosti (3.1.3) s přesností 0,1 mg nebo přepočtené množství substance o nižší účinnosti, rozpustí se ve 150 ml ethylalkoholu (3.1.1), doplní jím po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,15 mg meticlorpindolu.

3.1.5 Meticlorpindol, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 25,0 ml základního standardního roztoku meticlorpindolu (3.1.4), doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 75 µg meticlorpindolu.

3.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

3.2.1 Methylalkohol (poznámka 8.1)

3.2.2 Methylalkohol, čistoty pro HPLC (dále jen HPLC) (poznámka 8.1)

3.2.3 Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 , pevný

3.2.4 Dihydrogenfosforečnan sodný NaH_2PO_4 , pevný

3.2.5 Meticlorpindol, standardní substance o 100 % účinnosti

3.2.6 Meticlorpindol, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 50 mg standardní substance meticlorpindolu (3.2.5) s přesností 0,1 mg, rozpustí v methylalkoholu (3.2.1), doplní jím po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 250 µg meticlorpindolu.

3.2.7 Meticlorpindol, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku meticlorpindolu (3.2.6), doplní se methylalkoholem (3.2.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 25 µg meticlorpindolu.

3.2.8 Tlumivý roztok o pH = 6,75

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 0,91 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2.3) a 0,95 g dihydrogenfosforečnanu sodného (3.2.4), rozpustí asi ve 100 ml vody, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.2.8 Mobilní fáze

Příprava: Smíchá se 2,5 dílů methylalkoholu (HPLC) (3.2.2) se 7,5 díly tlumivého roztoku (3.2.8) a promíchá.

3.2.9 Amoniak (NH_3), koncentrovaný ($\rho=0,91$ g/ml)

3.2.10 Amoniakální methylalkohol, roztok

Příprava: Smíchá se 5 ml amoniaku (3.2.9) a 95 ml methylalkoholu (3.2.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometrická metoda

4.1.1 Spektrofotometr registrační s příslušenstvím pro měření v UV oblasti spektra a s křemennými kyvetami optické délky 10 mm

4.1.2 Třepačka ultrazvuková

4.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

4.2.1 Chromatograf kapalinový chromatograf s příslušenstvím (čerpadlo, kolona - reverzní fáze C 18, 250 x 4, 5 až 10 µm, injektážní dávkovací zařízení Rheodyne, UV

detektor) popř. datastanice s integračním softwarem, tiskárna nebo jiné registrační zařízení.

4.2.2 Lázeň ultrazvuková

4.2.3 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím

5. Postup (poznámka 8.5)

5.1 Premixy

5.1.1 Metoda spektrofotometrická (poznámka 8.3)

Do kuželové baňky na 500 ml, se zábrusem se odváží asi 1,5 g vzorku s přesností nejméně na 0,001 g. Za přítomnosti antioxidantu ve zkoušeném vzorku se provede odextrahování kurasanu n-hexanem (3.1.2) a to dekantací vzorku s 50 ml.

Ke vzorku se přidá 200 ml ethylalkoholu (3.1.1), baňka se zazátkuje, vloží na ultrazvukovou třepačku (4.1.2) a vytřepává po dobu 10 minut (poznámka 8.4). Obsah baňky se zfiltruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 250 ml, filtr promyje ethylalkoholem (3.1.1) včetně výplachu původní baňky, doplní jím po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 5 ml do odměrné baňky na 50 ml, doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a promíchá.

Měří se na registračním spektrofotometru (4.1.1) od vlnové délky 230 do 330 nm v 10 mm kyvetách proti ethylalkoholu (3.1.1) a záznam se vyhodnotí způsobem uvedeným v 6.1. Maximum absorpce by mělo být při vlnové délce 270 nm.

Stejným způsobem a za naprosto shodných podmínek se měří pracovní standardní roztok meticlorpindolu (3.1.5).

5.1.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

5.1.2.1 Kalibrace

Do kolony HPLC chromatografu (4.2.1) se nastříkuje postupně pracovní (kalibrační) standardní roztok (3.2.6) i roztok zkoušeného vzorku po ekvilibraci kolony vždy dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích příslušných nástřiků musí být v toleranci nejméně 2 %. Bází odezvy je plocha příslušného píku.

Pracovní podmínky: teplota kolony teplota okolní atmosféry
 průtok mobilní fáze 1 ml/min
 detekce vlnová délka 265 nm UV spektra
 injektovaný objem 20 µl
 retenční čas (pro popsanou kolonu) asi 4,5 min

Zkoušený vzorek i pracovní (kalibrační) standard musí být zkoušeny za naprosto shodných podmínek.

5.1.2.2 Vlastní provedení

Do kuželové baňky na 250 ml se odváží takové množství vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, aby množství meticlorpindolu, podle předpokládaného obsahu ve zkoušeném vzorku (teorie), bylo asi 2500 µg. Přidá se přesně 100 ml amoniakálního roztoku methylalkoholu (3.2.10) a extrahuje se na ultrazvukové lázni (4.2.2) po dobu 30 minut, přičemž je nutno obsah během extrakce několikrát ručně rozmíchat (poznámka 8.4). Baňka se odstaví a ponechá v klidu, aby pevná část vzorku sedimentovala nebo se sedimentace urychlí odstředěním (4.2.3). Z čirého supernatantu zkoušeného vzorku se odpipetuje 10 ml do odpařovací baňky a při 40 °C se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10 ml mobilní fáze. Získaný roztok se použije přímo k nástřiku do chromatografické kolony.

Pracovní (teoretická) koncentrace tohoto roztoku zkoušeného vzorku je asi 25 µg meticlorpindolu v 1 ml.

Dále se postupuje podle 5.1.2.1. Koncentrace meticlorpindolu v roztoku zkoušeného vzorku se zjistí porovnáním příslušné odezvy roztoku zkoušeného vzorku s odezvou pracovního standardního roztoku meticlorpindolu (3.2.7) (poznámka 8.2).

5.2 Krmné směsi (metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC)

5.2.1 Kalibrace

Postupuje se zcela shodně, jak je uvedeno v 5.1.2.1.

5.2.2 Vlastní provedení

Postupuje se shodně, jak je uvedeno v 5.1.2.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot A_K \cdot C}{A_S \cdot m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušební vzorku v g

C koncentrace meticlorpindolu v 50 ml kalibračního roztoku standardu, s ohledem na účinnost standardní substance meticlorpindolu v mg

A_S korigovaná hodnota absorbance roztoku pracovního standardu

A_K korigovaná hodnota absorbance roztoku zkoušeného vzorku

Korigované hodnoty absorbancí zkoušeného vzorku i standardu se vypočítají ze spektrofotometrického záznamu graficky: Body, určené minimálními absorbancemi před a po absorbanci maxima se spojí přímkou a od bodu, kde tato přímka protne kolmicí spuštěnou z bodu maxima absorbance, se měří k bodu absorbance maxima korigovaná hodnota absorbance.

6.2 Metoda HPLC

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce (poznámka 8.2):

$$Y = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace meticlorpindolu ve zkoušeném vzorku, zjištěná porovnáním odezvy zkoušeného vzorku a pracovního (kalibračního) standardního roztoku v µg/ml

F faktor ředění

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Premixy

7.1.1 Metoda spektrofotometrická

Nebyla dosud stanovena.

7.1.2 Metoda HPLC

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Krmné směsi (metoda HPLC)

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol, methylalkohol a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, methylalkohol je vedle toho i zvlášť nebezpečným jedem, proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi až do úplné asanace zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Je-li součástí chromatografické sestavy (příslušenství) integrační a výpočtové software, vypočítávají se hledané koncentrace a obsah přímo zpracováním naměřených souborů.

8.3 Spektrofotometrická metoda stanovení meticlorpindolu není použitelná, pokud je současně ve vzorku přítomen metylbenzochát, protože výsledek analýzy je vyšší cca o 5%.

8.4 Při extrakci vzorku nelze používat mechanickou třepačku, protože vzhledem k nízké rozpustnosti meticlorpindolu v ethylalkoholu není tímto způsobem extrakce účinná a snižuje výsledek analýzy minimálně o 10%.

8.4 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.14 Stanovení metictlorpindolu

Tato metoda je překlad z LUFA č.14.5.1 resp. 14.5.2.

1. Účel a rozsah

Pro stanovení metictlorpindolu jsou uvedeny dvě metody a to pro stanovení v premixech a krmných směsích. Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení metictlorpindolu (3, 5-dichlor-2, 6-dimethyl-4-pyridinol) v premixech a krmivech. Mez stanovitelnosti pro krmné směsi je 30 mg/kg.

2. Princip

Metictlorpindol se stanoví:

a) v premixech po extrakci vzorku zředěným hydroxidem sodným, odfiltrování a zředění alikvotního podílu kyselinou octovou spektrofotometricky při vlnových délkách 267, 297 a 327 nm.

b) v krmných směsích po extrakci směsí methylalkohol-chloroform-amoniak, odpaření extraktu a rozpuštění chloroformem a přečištění na sloupci oxidu hlinitého i následně na sloupci iontoměniče, spektrofotometricky při vlnových délkách 267, 297 a 327 nm s ohledem na korekci pozadí.

3. Chemikálie

3.1 Obecně

3.1.1 Metictlorpindol, standardní substance (fa Chemical Company Nederland, NV., Terneuzen, Niederlande)

3.1.2 Hydroxid sodný, roztok 20 g/l

3.1.3 Kyselina octová, přibližně 40 % (h = 1,05 g/ml)

3.2 Pro krmné směsi navíc

3.2.1 Oxid hlinitý, neutrální (stupeň aktivity II)

Příprava: 60 g oxidu hlinitého, stupně aktivity I, se smísí s 1,8 g vody a silně protřepává po dobu 20 minut. Uchovává se v uzavřené nádobě a ve tmě.

3.2.2 Methylalkohol (poznámka 8.1)

3.2.3 Chloroform (DAB 7)

3.2.4 Amoniak, roztok 25 % (h = 0,91 g/ml)

3.2.5 Methylalkohol 80 % (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odpipetuje 800 ml methylalkoholu (3.2.2), doplní po rysku vodou a promíchá.

3.2.6 Extrakční směs methylalkohol-chloroform-amoniak

Příprava: 50 ml methylalkoholu (3.2.2) se smísí s 50 ml chloroformu (3.2.3) a 30 ml roztoku amoniaku (3.2.4). Připravuje se vždy čerstvý.

3.2.7 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.2.8 Octan sodný, trihydrát ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$), roztok 100 g/l

3.2.9 Iontoměnič DOWEX, typ anex-Cl, 100 až 200 mesh, nejčistší (např. fa Serva, Feinbiochemica Heidelberg)

Příprava: (z předpisu fy DOW Chemical Company - převedení do acetátové formy). Ve 3 000 ml kádince se zahřívá 350 g ionexu s 1 000 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2.7) po dobu 2 až 3 hodin na vroucí vodní lázni (4.2.4), potom se zfiltruje Büchnerovou nálevkou 4.2.5) a promývá do negativní reakce na chloridy (dusičnan stříbrný - 3.2.10). Potom se ionexem naplní skleněná trubice (4.2.8) a sloupec se promývá roztokem octanu sodného (3.2.8) tak dlouho až odtékající kapalina nedává reakci na chloridy (dusičnan stříbrný - 3.2.10), případně jen slabý zákal. Pak se odsaje, promyje asi 3 l vody, převede opět do 3 000 ml kádinky a zahřívá na vroucí vodní lázni (4.2.4) po dobu 3 hodin s 1 000 ml kyseliny octové (3.1.3). Opět se zfiltruje, jak výše uvedeno, a promývá do negativní reakce na chloridy (dusičnan stříbrný - 3.2.10).

Uchovává se pod vodou.

3.2.10 Dusičnan stříbrný, roztok 10 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Obecně

4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (křemenná kyveta o optické délce 10 mm)

4.2 Pro krmné směsi navíc

4.2.1 Trubice chromatografická, skleněná, dlouhá 300 mm (počítáno bez zásobníku), vnitřní průměr 20 mm, na horním konci opatřená zásobníkem o obsahu 250 ml, na spodním konci opatřená 4 mm kohoutem.

4.2.2 Trubice chromatografická, skleněná, dlouhá 100 mm (počítáno bez zásobníku), vnitřní průměr 13 mm, na horním konci opatřená zásobníkem o obsahu 125 ml, na spodním konci opatřená 2 mm kohoutem nad nímž je fritta S_2 .

4.2.3 Třepačka

4.2.4 Lázeň vodní

4.2.5 Nálevka Büchnerova

4.2.6 Odstředivka vhodné konstrukce

4.2.7 Vata skelná

4.2.8 Trubice skleněná, dlouhá 50 mm, zakončená fritou S_0

5. Postup (poznámka 8.3)

5.1 Premixy

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do odměrné baňky na 500 ml se naváží 125 mg standardní substance meticlorpindolu (3.1.1) s přesností nejméně 0,001 g, rozpustí se v 25 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.2), doplní vodou po rysku a promíchá.

Do sady odměrných baněk na 250 ml se odpipetuje diferencovaně 1 až 15 ml tohoto roztoku, doplní po rysku kyselinou octovou (3.1.3) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 1 až 15 µg meticlorpindolu v 1 ml.

Absorbance připravených roztoků se měří na spektrofotometru (4.1.1) v 10 mm křemenných kyvetách při vlnové délce 267 nm proti kyselině octové (3.1.3).

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní provedení

Do odměrné baňky na 1 000 ml (V_1) se odváží asi 1 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 50 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.2) a ponechá se 10 minut stát s občasným promícháním. Potom se doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do odměrné baňky na 250 ml (V_3) se odpipetuje 10 ml filtrátu (V_2), doplní kyselinou octovou (3.1.3) po rysku a promíchá.

Měří se absorbance na spektrofotometru (4.1.1) v 10 mm křemenných kyvetách při vlnových délkách 267, 297 a 327 nm proti kyselině octové (3.1.3). Absorbance tohoto vzorku naměřená při 267 nm se koriguje (poznámka 8.2) na pozadí podle vzorce:

$$A_{kor} = A_{267} + A_{327} - 2A_{297}$$

a koncentrace meticlorpindolu se zjistí z kalibračního grafu.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

Provede se podle 5.1.1.

5.2.2 Vlastní provedení

Do kuželové baňky se zábrusem, obsahu asi 250 ml se odváží asi 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g, rozpustí se v přesně 100,0 ml extrakční směsi (V_1) (3.2.6), baňka se zazátkuje a obsah se vytřepává po dobu 20 minut. Potom se buď nechá 20 minut ustát, nebo se odstředí (4.2.6) při 4 000 ot/min. Do kádinky vhodného obsahu se odpipetuje 50 ml čirého roztoku nebo supernatantu (V_2) a odpaří na vroucí vodní lázni (4.2.4) asi na 5 ml, přidá se 15 ml methyalkoholu (3.2.2), zahřeje krátce k varu a smíchá se 150 ml chloroformu (3.2.3) (roztok 1).

Dále se připraví sloupec oxidu hlinitého. Na dno chromatografické trubice (4.2.1) se vloží smotek skelné vaty (4.2.7), trubice se umístí ve vertikální poloze a naplní 60 g oxidu hlinitého

stupně aktivity II (3.2.1). Na oxid hlinitý se vloží opět smotek skelné vaty (4.2.7) do výše asi 3 cm a sloupec se prolije 100 ml chloroformu (3.2.3). Proteklý chloroform se dále ke stanovení nepoužije.

Na připravený sloupec oxidu hlinitého se převede kvantitativně roztok 1, nechá se ztéci až jeho hladina dosáhne po okraj vrchního smotku skelné vaty. Kádinka od roztoku 1 se vypláchne 50 ml chloroformu (3.2.3) a výplach se převede rovněž na sloupec. Tato operace se opakuje ještě 2 x vždy s 50 ml chloroformu (3.2.3) a výplach po výtoku ze sloupce se pro stanovení dále nepoužije. Dále se stejná kádinka vypláchne ještě 110 ml methyllalkoholu (3.2.5) a opět převede na sloupec oxidu hlinitého. Prvních 30 ml proteklého množství se dále nepoužije a dalších 70 až 80 ml, které obsahují meticlorpindol se jímá do kádinky. Poslední zbytky methyllalkoholického extraktu se vytlačí ze sloupce stlačeným vzduchem do téže kádinky (roztok 2).

Dále se připraví ionexový sloupec. Do chromatografické trubice (4.2.2), umístěné ve vertikální poloze se převede tolik iontoměniče DOWEXu (3.2.9), až je trubice naplněna do výšky 6 cm. Pak se na ionex vloží smotek skelné vaty (4.2.7) a sloupec se promyje nejprve 50 ml kyseliny octové (3.1.3) potom 3 x vždy po 35 ml methyllalkoholu (3.2.5).

Na takto připravený sloupec se převede roztok 2 a nechá se ztéci až k horní hladině ionexu. Kádinka od roztoku 2 se vypláchne 2 x vždy po 50 ml methyllalkoholu (3.2.5) a výplach se vždy převede na sloupec. Roztok vytékající ze sloupce se dále nepoužije. Meticlorpindol se eluuje nejprve 50 ml a potom 48 ml kyseliny octové (3.1.3), eluát se jímá v odměrné baňce (V_3) (pro obsahy meticlorpindolu do 150 mg/kg na 100 ml, pro vyšší obsahy na 200 ml) doplní kyselinou octovou (3.1.3) po rysku a promíchá. Měří se na spektrofotometru (4.1.1) v křemenných kyvetách při vlnových délkách 265, 297 a 327 nm proti kyselině octové (3.1.3). Naměřená hodnota absorbance se koriguje na pozadí následovně: Hodnoty absorbance roztoku zkoušeného vzorku při vlnových délkách 297 a 327 nm se vynesou do systému souřadnic (dílky stupnice proti vlnové délce) a získané body se spojí přímkou která se prodlouží až k hodnotě vlnové délky 267 nm a u příslušného dílku stupnice se zjistí její hodnota. Hodnota absorbance roztoku zkoušeného vzorku při vlnové délce 265 nm se vynesou do téhož systému souřadnic grafu. Rozdíl v dílcích stupnice této hodnoty a zjištěné z prodloužené přímky odpovídá hodnotě pozadí. Tato hodnota se zjistí z kalibračního grafu a odpovídající hodnota koncentrace se odečítá z původně zjištěné (korigovaná hodnota).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Premixy

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2}$$

kde C je koncentrace meticlorpindolu v μg zjištěná podle korigované absorbance kalibračního grafu

V_1 objem odměrné baňky k přípravě výluhu v ml

V_2 pipetovaný objem filtrátu v ml

V_3 konečný objem roztoku zkušební vzorku v ml

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.2 Krmné směsi

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_3}{m \cdot V_2}$$

kde C je koncentrace meticlorpindolu v μg zjištěné podle korigované absorbance (odečet pozadí) z kalibračního grafu

V_1 objem extrakční směsi

V_2 pipetovaný objem filtrátu

V_3 objem odměrné baňky v ml, do které byl jímán eluát

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při teoretickém obsahu meticlorpindolu hodnotu:

pod 100 mg/kg	5 mg/kg
nad 100 mg/kg	5 % relat

8. Poznámky

8.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy a zvláště nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Hodnoty absorbance pro vehikulum (balastní látky) premixů jsou velmi nepatrné a mají lineární závislost na vlnových délkách 267 a 327 nm. Meticlorpindol má silnou absorbanci při vlnové délce 267 nm, zatímco při 297 a 327 nm prakticky nulovou. Naměřené absorbance při 267 nm mohou být korigovány s ohledem na absorbanci vehikula při stejné vlnové délce (267 nm) podle uvedené rovnice.

8.3 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.15 Stanovení obsahu kurasanu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kurasanu v premixech.

2. Princip

Kurasan se stanoví po předextrakci ethylalkoholem a extrakcí hexanem z chloridového výluhu, spektrofotometricky v UV oblasti při vlnové délce 361 nm.

3. Chemikálie

3.1 n-Hexan, spektrálně čistý (poznámka 8.1)

3.2 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

3.4 Síran sodný, bezvodý (vyžíhaný)

3.5 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr pro měření v UV oblasti spektra

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Do kuželové baňky na 100 ml se zábrusem se odváží asi 2 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g a přidá se 10 ml ethylalkoholu (3.5). Baňka se uzavře zátkou a vytřepává. Po usazení se ethylalkohol odlije, přidá se znovu 10 ml ethylalkoholu (3.5) a opět vytřepává. Toto se provede ještě 2krát, vždy po vytřepání a usazení vzorku se ethylalkohol odlije a dále se nepoužije. Ke vzorku v baňce se přidá 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) a po zazátkování baňky se vytřepává a výluh se filtruje suchým středně hustým filtrem do odměrné baňky na 100 ml. Extrakce vzorku 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) se provede ještě 2krát výluh se po usazení pevného podílu vždy slije přes filtr do stejné 100 ml odměrné baňky. Tato se doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.3) po rysku a promíchá. Z tohoto zásobního roztoku se odpipetuje 10 ml do dělicí nálevky na 100 ml, přidají 4 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2), 10 ml n-hexanu (3.1) a vytřepává. Po oddělení fází se vodná fáze odpustí do další dělicí nálevky a hexanová fáze se filtruje přes suchý, středně hustý filtr, na němž je tenká vrstva síranu sodného (3.4), do odměrné baňky na 50 ml. K vodné fázi se přidá opět 10 ml n-hexanu (3.1) a znovu vytřepává, po oddělení se opět vodná vrstva odpustí do původní dělicí nálevky, hexanová vrstva se filtruje do stejné 50 ml odměrné

baňky. Přídavek 10 ml n-hexanu (3.1) k vodné vrstvě, vytřepání a filtrace hexanového extraktu se provede ještě jednou a spojené hexanové extrakty se doplní v 50 ml odměrné baňce po rysku n-hexanem (3.1) a promíchají.

5.2 Absorbance se měří na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 361 nm v kyvetách 10 mm oproti čistému n-hexanu (3.1).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah kurasanu v mg/g (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^6 \cdot A}{A_1 \cdot m}$$

kde A je absorbance naměřená při vlnové délce 361 nm

m alikvotní podíl navážky zkušebního vzorku v g

A₁ absorpční koeficient kurasanu (152,26)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky mg/g.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.16 Stanovení obsahu salinomycinu

Metoda je uvedena v metodách pro zkoušení stimulatorů růstu pod číslem v Příloze č. 10.

2.17 Stanovení obsahu monenzinu

Metoda je uvedena v metodách pro zkoušení stimulátorů růstu v Příloze č. 10.

2.18 Stanovení obsahu dinitolmidu

Tato metoda je překlad z Official Journal no L 108, 22/04/74

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dinitolmidu (3, 5-dinitro-o-toluenamid) v krmivech, premixech a koncentrátech. Stanovení je rušeno nitrofuranovými deriváty. Mez stanovitelnosti je 40 mg/kg.

2. Princip

Dinitolmid se stanoví po extrakci vzorku acetonitrilem, vyčištění extraktu na sloupci oxidu hlinitého, odpaření alikvotního podílu do sucha a rozpuštění odparku v dimethylformamidu. Po vytvoření komplexu reakcí s ethylendiaminem se měří spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm.

3. Chemikálie

3.1 Acetonitril 85 %

Příprava: Před použitím se smíchá 850 ml čistého acetonitrilu a 150 ml vody, destiluje se a jímá se frakce vroucí mezi 75 až 77 °C.

3.2 Oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii

Příprava: Oxid hlinitý se žihá po dobu 2 hod. při teplotě 750 °C, ochladí v exsikátoru a uchovává v nádobce z hnědého skla a se zabroušenou zátkou. Před použitím se ve vhodné nádobce z hnědého skla zvlhčí tak, že se smíchá 10 g oxidu hlinitého a 7 ml vody, nádobka se zazátkuje, zahřívá po dobu 5 minut na vroucí vodní lázni (4.5) za intenzivního třepání a pak se za stálého třepání nechá vychladnout. Aktivita oxidu hlinitého se zkouší stanovením známé koncentrace standardního roztoku dinitolmidu (3.6). Výtěžnost zkoušky musí být 100 ± 2 %.

3.3 N, N-dimethylformamid 95 %

Příprava: Smíchá se 95,0 ml N,N-dimethylformamidu s 5,0 ml vody.

3.4 1,2 diaminoethan s max. obsahem vody 2 %

3.5 Dinitolmid (3,5-dinitro-o-toluamid), standardní substance Bod tání: 177 °C

Absorpční koeficient v N,N-dimethyl- formamidu při vlnové délce 266 nm = $10,1 \cdot 10^3$

3.6 Dinitolmid, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 40 mg standardní substance dinitolmidu (3.5) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v acetonitrilu (3.1), doplní tímtež po rysku a promíchá.

Z tohoto roztoku se odpipetuje přesně 20,0 ml do odměrné baňky na 100 ml, doplní acetonitrilem (3.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 40 µg dinitolmidu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety o optické délce 10 mm)

4.2 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.3 Kelímek filtrační skleněný s fritou, průměr 60 mm, porosita S_3

4.4 Zařízení na filtraci za sníženého tlaku

4.5 Lázeň vodní s termostatem na 50 °C

5. Postup

Do kuželové baňky se zabroušenou zátkou, obsahu 250 ml, se odváží pro koncentráty a premixy asi 1 g a pro krmiva asi 10 g zhomogenizovaného zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,1 mg, přidá se 65 ml acetonitrilu (3.1), promíchá, nasadí zpětný chladič (4.2) a vloží na vodní lázeň (4.4) 50 °C teplou. Zahřívá se po dobu 30 minut za stálého třepání, potom se ochladí pod proudem studené vody, přidá se 20 g oxidu hlinitého (3.2), protřepává se po dobu 3 minut a nechá ustát.

Roztok s oxidem hlinitým (3.2) se filtruje za sníženého tlaku tak, že se nejdříve slijí čirý roztok, pak se převede na kelímek i oxid hlinitý pomocí několika ml acetonitrilu (3.1) a kapalina se z kelímku odsaje do připojené baňky. Po uvolnění sníženého tlaku se suspenduje filtrační koláč několika ml acetonitrilu (3.1) a znovu odsaje do téže baňky. Tato operace se opakuje tolikrát, dokud obsah v baňce nedosáhne asi 90 ml. Obsahu baňky se pomocí acetonitrilu kvantitativně převede do odměrné baňky na 100 ml (V_1). Potom se obsah baňky doplní acetonitrilem (3.1) po rysku a promíchá. Jestliže je třeba roztok ředit, pak se odpipetuje potřebný alikvotní podíl (V_3) obsahující, s ohledem na očekávaný obsah dinitolmidu ve zkoušeném vzorku, 5 až 15 mg dinitolmidu v 1 ml a ředí se acetonitrilem (3.1) - zásobní roztok (V_4).

Ze zásobního roztoku (V_1 nebo V_4) se odpipetuje do tří kádinek (a,b,c) po 4 ml (V_2). Do jedné z kádinek (c) se přidá 1 ml standardního roztoku dinitolmidu (3.6), pak se všechny tři kádinky umístí na vodní lázeň (4.5), ohřátou na 50 °C, tato se umístí pod dobře táhnoucí odtah a roztoky se odpaří do sucha v proudu suchého vzduchu. Pak se tyto kádinky ochladí na teplotu laboratoře. Do jedné kádinky (a) se přidá přesně 10,0 ml dimethylformamidu (3.3), do ostatních dvou (b, c) pak přesně po 2,0 ml dimethylformamidu (3.3), ponechají se po několik minut reagovat, při mírném promíchávání až do úplného rozpuštění sedimentu. Potom se přidá do kádinek (b, c) přesně 8,0 ml diaminoethanu (3.4) a obsahy se promíchají. Přesně za 5 minut po přidání diaminoethanu se měří absorbance všech tří roztoků na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 560 nm proti dimethylformamidu (3.3).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah dinitolmidu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{(A_b - A_a) \cdot C \cdot V_1 \cdot V_4}{2 \cdot (A_c - A_b) \cdot m \cdot V_2 \cdot V_3}$$

kde A_a je absorbance roztoku a (blank)

A_b absorbance roztoku b (vzorek)

A_c absorbance roztoku c (s přidavkem standardu)

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

V_1 objem zásobního roztoku v ml

V_2 pipetovaný objem zásobního roztoku v ml

V_3 pipetovaný objem pro ředění v ml

V_4 objem ředěného zásobního roztoku v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při teoretickém obsahu dinitolmidu hodnotu:

pod 100 mg/kg	10 mg/kg
od 100 do 5 000 mg/kg	10 % relat.
od 5 000 do 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat.

2.19 Stanovení halofuginonu v krmných směsích

1. ÚČEL A ROZSAH

Tento postup specifikuje podmínky pro stanovení halofuginonu v krmných směsích a premixech. Halofuginon je vysoce účinné kokcidistatikum, které se používá v chovech brojlerů, kuřic a krůt. Účinná látka halofuginon je dodávána firmou Hoechst-Roussel Vet pod komerčním názvem Stenorol, který obsahuje 0,6% halofuginonu. Doporučená dávka je 3 mg účinné látky halofuginonu/kg krmné směsi, tj. 500g Stenorolu/tunu krmné směsi.

2. PRINCIP

Halofuginon je po chemické stránce 7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidiny)-2-oxopropyl]-4(3H)-quinazolinon. Sumární vzorec $C_{16}H_{17}BrClN_3O_3$

$M_r = 414,7 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Halofuginon je extrahován přímo do mobilní fáze a stanoven metodou HPLC s UV detekcí, při vlnové délce $\lambda = 241 \text{ nm}$.

3. CHEMIKÁLIE

3.1 Acetonitril HPLC grade

3.2 0,5 M octanový pufr. Příprava octanového pufru: 38,8 g octanu amonného se rozpustí v 800 ml vody, přidá se 60 ml kyseliny octové (3.6) a po vytemperování se doplní do 1000 ml vodou

3.3 Mobilní fáze: acetonitril (3.1) + octanový pufr (3.2) + voda (220+390+390, V+V+V)

3.4 Halofuginon bromid, standardní substance No.7SL0047, 99,97% účinné látky

Halofuginon-základní roztok: Do odměrné baňky na 50 ml se naváží 0,051 g halofuginonu, rozpustí se v octanovém pufru, doplní po značku a promíchá se.

1 ml obsahuje 1,02 mg halofuginonu

3.5 Octan amonný p.a.

3.6 Kyselina octová, $\rho = 1,05 \text{ g.cm}^{-3}$, HPLC grade

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s UV detekcí

4.2 Ultrazvuková lázeň

4.3 Laboratorní třepačka

5. PRACOVNÍ POSTUP

Při zpracování vzorku (mechanické úpravě) je nutné se vyhnout přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice 1,0 mm a menší. Homogenizace a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo případným ztrátám halofuginonu.

5.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží 1 až 25 g zkušebního vzorku (minimálně 0,3mg účinné látky), přidá se 100 ml mobilní fáze (3.3), baňka se uzavře zátkou se zábrusem. Obsah baňky se promíchá a extrahuje na laboratorní třepačce po dobu 30 minut. Po této extrakci následuje další extrakce, a to po dobu 10 minut při 65° C v ultrazvukové lázni. Obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu, nechá se ustát a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu

se nepoužije. Po případném naředění filtrátu na koncentraci halofuginonu asi 5 - 50 µg/ml (podle kalibrační křivky), se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 5 minut při 5000 ot/min a použije se k nástřiku na chromatografickou kolonu.

5.2 Kalibrace

Připraví se řada kalibračních roztoků naředěním základního roztoku halofuginonu na koncentrace např. 2,0 – 4,0 – 10,0 – 20,0 – 40,0 µg/ml. Kalibrační roztoky halofuginonu se po ekvilibraci nástřikují na chromatografickou kolonu a ze získaných průměrných ploch jim odpovídajícím píkům se sestrojí kalibrační křivka.

5.3 Stanovení metodou HPLC

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona: C18 – reverzní fáze, Hypersil ODS, 5µm, 4,0 x 125 mm (Hewlett Packard)

Mobilní fáze: viz 3.3

Teplota: 30°C

Průtok: 1,7 ml/min

UV detektor, vlnová délka λ = 241nm

Objem nástřiku: 25µl

RetTime: cca 4,9 min (pro uvedenou kolonu)

RunTime: cca 8,0 min (pro uvedenou kolonu)

6. VÝPOČET

Obsah halofuginonu (X) v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = c.V.R / m$$

kde:

c - je koncentrace halofuginonu odečtená z kalibrační křivky v µg/ml

V - je objem extrakčního činidla v ml

R - je ředění

m - je hmotnost zkušební vzorku v g

7. STATISTICKÉ ÚDAJE

opakovatelnost analytické metody: 10,67 mg/kg, při obsahu 600mg/kg

mez detekce (z kalibrační křivky): 1,6676 µg/ml

mez stanovitelnosti (z kalibrační křivky): 3,00367 µg/ml

2.20 Stanovení obsahu decoquinatu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 969.55

Účel, rozsah a princip

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu decoquinátu v premixech a krmných směsích.

Vzorek se extrahuje methanolickým roztokem chloridu vápenatého a obsah decoquinatu se stanoví fluorometricky.

2.21 Stanovení obsahu arprinocidu

Tato metoda je uvedena v Merck Sharp and Dohme Research Laboratories.

Účel, rozsah a princip

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu arprinocidu v premixech a krmných směsích.

Vzorek se extrahuje chloroformem a obsahu arprinocidu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí při 254 nm.

2.22 Stanovení obsahu ethopabátu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 964.29

Účel, rozsah a princip

Postup specifikuje podmínky pro stanovení ethopabátu v krmivech.

Obsah ethopabátu se stanoví po extrakci vzorku směsí methylalkohol-voda a přečištěním chromatografií na pevné fázi metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím UV detekce při 280 nm.

2.23 Stanovení obsahu lasalocidu

1. ÚČEL A ROZSAH

Postup specifikuje podmínky pro stanovení lasalocidu v premixech a krmných směsích.

Jde o ionophorní antibiotikum (antikokcidikum) produkované *Streptomyces lasaliensis*.

2. PRINCIP

Lasalocid je extrahován extrakčním směsným rozpouštědlem (pro obsah větší než 10 mg/kg) nebo směsným rozpouštědlem hexan-octan ethylnatý (pro obsah menší než 10 mg/kg). V případě obsahu menšího než 10 mg/kg je extrakt přečištěn na pevné fázi (silica) a takto přečištěný extrakt je rozpuštěn v definovaném objemu mobilní fáze. Lasalocid je separován na chromatografické koloně s reverzní fází C₁₈ a detekován

na fluorescenčním detektoru při excitační vlnové délce 310 nm a emisní vlnové délce

$\lambda = 419 \text{ nm}$.

3. CHEMIKÁLIE

- 3.1 Octan sodný trihydrát, CH₃COONa.3H₂O, M_r = 136,08 g.mol⁻¹
- 3.2 Kyselina octová, $\rho = 1,05 \text{ g.cm}^{-3}$, HPLC grade
- 3.3 Methanol, HPLC grade
- 3.4 Kyselina fosforečná p.a., H₃PO₄ 85 %, $\rho = 1,71 \text{ g.cm}^{-3}$
- 3.5 Octan ethylnatý p.a., čistoty > 99,5 %, C₄H₈O₂, M_r = 88,11 g.mol⁻¹
- 3.6 n-hexan p.a., čistoty > 90 %, C₆H₁₄, M_r = 86,18 g.mol⁻¹
- 3.7 Dichlormethan p.a, CH₂Cl₂, M_r = 84,93 g.mol⁻¹, $\rho = 1,32 \text{ g.cm}^{-3}$
- 3.8 Extrakční roztok I: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 200 ml octanu ethylnatého (3.5), doplní n-hexanem (3.6) po značku a promíchá.

- 3.9 Extrakční roztok II: Do odměrné baňky na 1000 ml se odměří 10 ml kyseliny fosforečné (3.4), přidá se 150 ml vody a doplní se methanolem po značku a promíchá.
- 3.10 Pufr octanový: Do kádinky na 1 000 ml se naváží 3,402 g octanu sodného trihydrátu (3.1), přidá se 900 ml vody a 5,0 ml kyseliny octové (3.2) na pH-metru se upraví kyselinou fosforečnou (3.4) na pH = 2,0, převede se do odměrné baňky na 1000 ml, doplní vodou po značku a promíchá.
- 3.11 Mobilní fáze: V odměrné baňce na 1000 ml se smíchá 200,0 ml pufru (3.10) a přidá se asi 700 ml methanolu (3.3), vytemperuje se na laboratorní teplotu a doplní methanolem po značku.
- 3.12 Lasalocid A, natriumsalz, $C_{34}H_{53}O_8Na$, $M_r = 612,78 \text{ g.mol}^{-1}$, Riedel-deHaën, VETRANAL, Cat.No.46371, čistota min. 98 %
- 3.12.1 Základní standardní roztok lasalocidu: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 0,0255 g standardní substance lasalocidu (3.12), doplní methanolem po značku a promíchá se.
- 1 ml obsahuje 0,1 mg lasalocidu
- 3.13 Eluční roztok pro SPE: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 50,0 ml methanolu (3.3), doplní dichlormethanem (3.7) po značku a promíchá se.

4. PŘÍSTROJE A POMŮCKY

4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s FF detekcí

4.2 Laboratorní třepačka

4.3 Koncentrátor vzorků

4.4 Ultrazvuková lázeň

4.5 Patrony Silica pro SPE, např. Waters-Seppak Plus Cartridges Silica WAT020520

5. POSTUP

Vzorek se upravuje homogenizací a mletím na částice o velikosti 1,0 až 0,5 mm tak, aby se zabránilo přehřátí vzorku během homogenizace a šrotování a úprava vzorku

se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám lasalocidu. Roztoky a extrakty lasalocidu se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem. Za umělého osvětlení jsou roztoky stabilní.

5.1 Extrakce

5.1.1 Extrakce při obsahu lasalocidu > 10 mg/kg (krmné směsi a premixy)

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku, aby obsahoval asi 1 až 20 mg lasalocidu s přesností na 0,001 g – 5 g pro trituráty a premixy doplňkových látek, 25 g pro krmné směsi. Zkušební vzorek se přelije podle obsahu lasalocidu 100,0 ml až 200 ml extrakčního roztoku II (3.9; viz tabulka č.1, 2), baňka se uzavře zátkou a třepa se na laboratorní třepačce 30 minut. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

5.1.2 Extrakce při obsahu lasalocidu < 10 mg/kg

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží 45 g zkušební vzorku. Zkušební vzorek se přelije 150,0 ml extrakční směsi I (3.8), baňka se uzavře zátkou a třepa se na laboratorní třepačce 30 minut. Poté se filtruje suchým skládaným filtrem do suché podložené nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

5.2 Ředění extraktů

5.2.1 Krmné směsi

Podle tabulky č. 1 se extrakt zkušební vzorku získaný podle čl. 5.1.1 naředí mobilní fází (3.11) na požadovanou výslednou koncentraci a před nástřikem

na chromatografickou kolonu se roztok odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 5000 ot/min.

Tab. č. 1 Ředění extraktu krmných směsí

Obsah (mg/kg)	Objem extrakčního činidla (ml)	Ředění R	Způsob ředění (ml/ml)	Faktor ředění F
od 10 do 50	100	1	-	0,25
od 50 do 150	100	2,5	10/25	0,1
od 150 do 300	100	5	5/25	0,05

5.2.2 Premixy doplňkových látek

Podle deklarovaného obsahu lasalocidu se extrakt získaný podle čl. 5.1.1 naředí mobilní fází (3.11) na výslednou koncentraci asi 10 mg/l podle tab. č. 2.

Tab. č. 2. Ředění extraktu premixů doplňkových látek

Obsah (mg/kg)	Objem extrakčního činidla (ml)	Ředění R	Způsob ředění (ml/ml)	Faktor ředění F
od 300 do 1 000	100	5	5/25	0,01
od 1 000 do 5 000	100	25	1/25	0,002
od 5 000 do 10 000	100	50	1/50	0,001
od 10 000 do 20 000	200	50	1/50	0,0005
od 20 000 do 100 000	200	250	1/25 à 1/10	0,0001
od 100 000 do 150 000	250	625	1/25 à 1/25	0,000032
> 150 000	250	-	na koncentraci 10 mg/l	-

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 5000 ot/min.

5.2.3 Stanovení obsahu lasalocidu pro obsahy < 10 mg/kg

Na extrakční jednotku se nasadí patrona Silica pro SPE (4.5), kondicionuje se 5 ml extrakčního roztoku I (3.8) a poté se na patronu nanese 10,0 ml hexan-octan ethylnatého extraktu získaného podle čl. 5.1.2. Extrakt se nechá vsáknout tak, aby nedošlo k vyschnutí patrony, promyje se 3krát 5 ml dichlormethanu (3.7) a poté se lasalocid eluuje do 10 ml vialky 3krát 3 ml elučního roztoku (3.13). Eluát se odpaří na koncentrátoru vzorků pod proudem dusíku při teplotě 55 °C, odparek se rozpustí ve 2,0 ml mobilní fáze (3.11), promíchá, rozpustí na ultrazvuku (30 s) a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se extrakt odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 3 minut při 5000 ot/min.

5.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 25 ml se pipetuje 0,5 - 1,0 - 2,0 a 4,0 ml základního standardního roztoku lasalocidu (3.12.1), doplní mobilní fází (3.11) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci 2,0 - 4,0 - 8,0 a 16,0 mg/l. Na chromatografickou kolonu se nanáší 5 µl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

5.4. Chromatografické podmínky HPLC stanovení

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona: Nova-Pak C18, 4 µm, 150 x 3,9 mm , nebo Symmetry Shield RP 18 5µm,
4,6 x 250 mm fy Waters

Mobilní fáze: viz 3.11

Průtok: 1 ml/min

Teplota: 38 °C nebo okolí

FL-detektor: EX: 310 nm EM: 419 nm

Objem nástřiku: 5 µl

Retenční čas: 6,2 min, resp. 19,0 min (pro uvedené kolony a teplotu okolí)

Run Time: 10,0 min resp. 25,0 min (pro uvedené kolony a teplotu okolí)

6. VÝPOČET

Obsah lasalocidu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot R}{m_a}$$

kde c je koncentrace lasalocidu odečtená z kalibrační křivky v mg/l

m_a hmotnost zkušební vzorku v g

V objem extrakčního činidla v ml

R ředění, resp. zakoncentrování

7. STATISTICKÉ ÚDAJE

Validační parametr	Validační hodnota	
	do 200 mg/kg (krmné směsi)	<i>Nad 200 mg/kg</i> (premixy)
Opakovatelnost	6,7 % relat.	5,3 % relat
Správnost	Správnost metody prokázána	

Linearita	Linearita metody prokázána	
Rozsah	0,9 – 10 000 mg/kg	
Mez detekce	0,4 mg/kg	
Mez stanovitelnosti	0,9 mg/kg	
Citlivost	7459,91	
Nejistota	8,2 % relat.	6,3 % relat

3.1 Stanovení dimetridazolu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dimetridazolu v premixech a krmných směsích.

Dimetridazol se používá jako chemotherapeutikum. Po chemické stránce se jedná o 1,2-dimethyl-5-nitro-imidazol (sumárního vzorce $C_5H_7N_3O_2$, $M_r = 141,1$).

2. Princip

Obsah dimetridazolu se stanoví po extrakci ze vzorku směsným rozpouštědlem methylalkohol-voda (v premixech doplňkových látek) a přečištěním extraktu metodou SPE (v krmných směsích), metodou RP-HPLC na C_{18} s UV detekcí při vlnové délce 309 nm.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční roztok, methylalkohol + voda (9+1)

3.2 Eluční roztok, voda + acetonitril (7+3)

3.3 Dimetridazol (dále jen DMT), základní látka

3.3.1 Dimetridazol, základní roztok:

Příprava Do odměrné baňky na 200 ml se naváží asi 100 mg dimetridazolu (2.3), rozpustí v asi 180 ml extrakčního roztoku (2.1) na ultrazvukové lázni a po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,5 mg DMT.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolona-reverzní fáze, injekční dávkovací zařízení, UV detektor, popř. i datastanice s integračním softwarem a tiskárna či jiné registrační zařízení

4.2 Kolona reverzní fáze C_{18} , NovaPak 4 μm , 150 x 3,9 mm

4.3 Kolonka SPE, Alumina B Cartridges

4.4 Laboratorní třepačka

4.5 Membránový filtr 0,45 μm

4.6 Laboratorní odstředivka

5. Postup

5.1 Extrakce a separace na pevné fázi

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku (nejméně 2 g zkušební vzorku, nejvíce 20 g), aby po extrakci a následným ředěním byla koncentrace dimetridazolu 10 až 25 mg/l (pro premixy doplňkových látek 2 g, pro krmné směsi 15 g). Pak se přidá přesně 100,0 ml extrakční směsi (2.1) a kónická baňka se uzavře zátkou se zábrusem. Obsah se promíchá a extrahuje na laboratorní třepačce (4.4) po dobu 60 minut. Poté se obsah baňky nechá ustát, a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Je-li třeba, extrakt se naředí na požadovanou koncentraci extrakčním roztokem (2.1) podle tabulky 1.

Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na pevné fázi. Kolonka SPE (4.3) se připojí k polyetylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlije asi 3 ml extraktu získaného podle prvního odstavce čl. 5.1. Na kolonku se nadávkuje asi 1 ml extraktu se nechá 20 sekund kondicionovat a pak se extrakt pomalu protlačí připojenou kolonkou. První podíl extraktu (0,1 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu (4.2).

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se vlastní extrakt (3.1) filtruje přes membránový filtr (4.5) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.6) při 3000 ot/min. Na chromatografickou kolonu se nástřikuje objem 10 µl extraktu.

Tabulka A. Ředění premixů doplňkových látek

Obsah [mg/kg]	Ředění	Způsob ředění [ml/ml]
do 1500	2,5	10/25
od 1500 do 7500	12,5	2/25
od 7500 do 15 000	25	1/25
od 15 000 do 30 000	50	0,5/25
více jak 30 000	100	1/50

3.2 Vlastní měření

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Průtok	0,75 ml/min
Teplota	okolí
UV-detektor	309 nm
AUFS	1,000
Objem nástřiku	10 µl
Retenční čas	asi 2,4 min (pro uvedenou kolonu)

5.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se postupně pipetuje 1,0 - 1,5 - 2,0 a 2,5 ml základního roztoku DMT (2.3.1), odměrné baňky se doplní extrakční směsí (2.1) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci 10 - 15 - 20 a 25 mg/l DMT.

Pracovní roztoky dimetridazolu (10 µl) se po ustavení rovnováhy na koloně nastříkují na chromatografickou kolonu (4.2) a ze získaných průměrných ploch jim odpovídajícím píkům se sestrojí kalibrační graf.

6. Výpočet

Obsah dimetridazolu (X) v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot R \cdot V}{m \cdot R_c}$$

kde C je koncentrace dimetridazolu odečtená z kalibrační křivky v mg/l

V objem extraktu v ml

R ředění

R_e recovery (0,99)

m hmotnost zkušebního vzorku v g

7. Opakovatelnost

Nebyla zatím stanovena

3.2 Stanovení obsahu dimetridazolu

Tato metoda je uvedena v LUFA č. 14.6.1

Účel, rozsah a princip

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dimetridazolu v krmných směsích.

Obsah dimetridazolu se stanoví po extrakci vzorku methylalkoholem a přečištění chromatografií na pevné fázi spektrofotometricky

4.1 Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu A a vitamínu E vedle sebe a to jak v krmných směsích, tak v premixech.

Vitamin A patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. V premixech je dávkován ve formě stabilního esteru palmitátu nebo acetátu. Pracovním postupem je vitamin A převeden na volný alkohol, který se v podobě all-trans (izomer s nejvyšší biologickou účinností) + cis izomeru stanoví metodou HPLC.

Vitamin E patří rovněž do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Do premixů je dávkován ve formě alfa-tokoferol acetátu, který se pracovním postupem převede na alfa-tokoferol, který se stanoví metodou HPLC.

2. Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a uvolněné vitamíny A a E se extrahují na pevné fázi.

Eluát z pevné fáze se přímo dávkuje do systému HPLC a stanoví na přímé fázi metodou externího standardu pomocí UV detekce (vitamin A) nebo FF detekce (vitamin E).

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol, absolutní (poznámka 8.1)

3.2 Ethylalkohol, denaturovaný 1% hexanu (poznámka 8.1)

3.3 Cyklohexan (poznámka 8.1)

3.4 Hydroxid draselný (KOH), roztok 500 g/l

3.5 Kyselina askorbová (poznámka 8.2)

3.5.1 Kyselina askorbová, 20% roztok. Roztok je třeba připravovat denně čerstvý

3.6 Sulfid sodný dekahydrát ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (poznámka 8.2)

3.7 Alkalický roztok sulfidu sodného

Příprava: 112 g sulfidu sodného (3.6) se rozpustí v 1000 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4)

3.8 Butylhydroxytoluen (dále jen BHT) (poznámka 8.2)

3.9 Standard vitamínu A (all-trans-retinol palmitát)

3.10 Standard vitamínu E (DL-alfa-tokoferol)

3.11 Mobilní fáze

Příprava : směs 96,5 % cyklohexan + 3,5 % ethylalkohol absolutní (V/V)

3.12 Příprava základních standardních roztoků

3.12.1 Základní standardní roztok vitamínu A

Naváží se tolik standardní substance vitamínu A (3.9), aby se do práce vzalo 50000 m.j. Toto množství se zmýdelní a extrahuje podle postupu 5.1 Získá se základní standardní roztok vitamínu A o koncentraci cca 66 m.j./ml.

Skutečná koncentrace vitamínu A v základním standardním roztoku se zjistí spektrofotometricky proměřením absorbance proti cyklohexanu při vlnové délce 325 nm. (v cyklohexanu má koncentrace vitamínu A 33333 m.j./ml absorbanci 1735, tedy koncentrace 10 m.j./ml by měla vykazovat absorbanci 0,5205).

Získaný základní standardní roztok se uchovává v odměrce z tmavého skla v ledničce (poznámka 8.11).

3.12.2 Základní standardního roztoku vitamínu E

Naváží se přesně cca 50 mg DL alfa-tokoferolu (3.10) do 100 ml odměrky a doplní po značku cyklohexanem. Tento základní standardní roztok má koncentraci cca 500 µg/ml.

Skutečnou koncentraci vitamínu E v zásobním roztoku, lze kontrolovat spektrofotometrickým měřením při vlnové délce 292 nm proti cyklohexanu. (v cyklohexanu má koncentrace vitamínu E 50 µg/ml absorbanci 0,420).

Získaný základní standardní roztok se uchovává v odměrce z tmavého skla v ledničce (poznámka 8.11).

3.12.3 Pracovní standardní roztoky vitaminů A a E

Pracovní standardní roztoky se připravují ředěním základního standardního roztoku (3.12.1 nebo 3.12.2 tak, aby z nich připravené kalibrační koncentrace pro nástřik do HPLC systému dosahovaly přibližně hodnot, které odpovídají koncentracím vzniklým zpracováním vzorku.

Koncentrace pracovních standardních roztoků se doporučují pro:

vitamin A 0,045 až 10 m.j./ml (max. 15 m.j./ml)

vitamin E: 1,5 až 50 µg/ml (max. 80 µg/ml).

Při současném stanovení vitamínu A a E v jednom nástřku je možno připravit směsný pracovní standardní roztok.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf [čerpadlo, kolona přímá fáze Si, např. Tessek 150 x 3, 5 µm, injektážní dávkovací zařízení (autosampler, rheodyne), UV nebo FF detektor (poznámka 8.10), data stanice s integračním software, tiskárna nebo jiné registrační zařízení]

4.2 Wagnerovo kolo nebo vodní lázeň s mícháním

4.3 kolony EXTRELUT (MERCK, kat.č. 11737)

5. Postup (poznámka 8.4)

5.1 Příprava vzorku

Podle předpokládaného obsahu vitamínu A se naváží dobře rozemletý a zhomogenizovaný zkušební vzorek podle následující tabulky :

deklarované množství vitamínu A (m.j./kg)	navážka vzorku (g)
4 000- 50 000	30
50 000- 200 000	20
200 000 - 1 000 000	10
1000 000 - 5 000 000	5

(poznámka 8.6)

Mletí se provede těsně před zpracováním a to tak, aby při něm nedošlo k zahřátí vzorku.

5.2 Zmýdelnění :

K naváženému vzorku ve zmýdelňovací baňce se přidá 130 ml ethylalkoholu (3.1), 30 ml roztoku (3.7), dále 1 g kyseliny askorbové (3.5) a na špičku nože BHT (3.8) (poznámka 8.2).

Zmýdelňování probíhá za stálého míchání pod zpětným chladičem v atmosféře dusíku při teplotě 80 °C po dobu 30 minut (poznámka 8.7). Po uplynutí této doby se baňka vyjme z vodní lázně a nechá se pod zpětným chladičem ochladit na laboratorní teplotu. V případě potřeby se vychladlý obsah baňky zfiltruje přes skládaný filtr (prvních 10 ml vylijeme do odpadu).

5.3 Extrakce :

Pipetuje se 40 ml filtrátu a doplní do 50 ml odměrné baňky roztokem kyseliny askorbové (3.5.1). Po řádném promíchání eventuálně vzniklé emulze se pipetuje 15 ml na kolonu EXTRELUT. Po 15 minutách se zakotvená organická fáze vymyje cyklohexanem. Eluát se jímá do 50 ml odměrné baňky po rysku a takto připravený vzorek se přímo dávákuje do HPLC systému. (Všechny operace je nutné provádět za omezeného přístupu světla).

5.4 Vlastní postup

Z pracovních standardních roztoků se naředěním asi na 70, 100 a 130% vypočtené nástřikové koncentrace vzorku sestrojí tříbodový kalibrační graf, kde plocha píků je úměrná koncentraci standardů.

Předpokládaná nástřiková koncentrace vitamínu A (E) ve (ze) vzorku se vypočte podle vztahu:

$$C = 1,510^{-3} \cdot D \cdot m$$

kde C je předpokládaná nástřiková koncentrace (vit A - m.j./ml, vit E - $\mu\text{g/ml}$)

D deklarovaná hodnota (vit A - m.j./g, vit E - $\mu\text{g/g}$)

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Do kapalinového chromatografu se po ustavení rovnováhy kolony nastříkuje standard i vzorek dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích příslušných nástřiků se nesmí lišit o více než 2 %.

Doporučené podmínky pro analýzu :

teplota kolony	teplota okolí
průtok mobilní fáze	0.9 ml/min
injektovaný objem	20 μl
kolona	např. Tessek 150 x 3, 5 μm (přímá fáze Si)
retenční čas	při popsané koloně vitamin A=3,7 min,
retenční čas	vitamin E = 1,6 min)

detekce :

	UV	š.p.	FF exc.	š.p.	FF em.	š.p.
vit A	325 nm	2-5 nm	325 nm	20 nm	480 nm	40 nm
vit E	292 nm	2-5 nm	292 nm	2 nm	330 nm	40 nm

(poznámka 8.8)

6. Výpočet

Obsah vitaminu A a vitaminu E (poznámka 8.5) se ve zkoušeném vzorku se v m.j./kg resp. mg/kg se vypočte podle vzorce :

$$X = \frac{666,667 \cdot C_1}{m}$$

kde C_1 je koncentrace příslušného solutu zjištěná z kalibrace metodou vnějšího standardu (m.j./l, resp. $\mu\text{g/ml}$)

m hmotnost navážky zkoušeného vzorku v g

Výsledek analýzy je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti.

7. Opakovatelnost

Nebyla zatím stanovena

8. Poznámky

8.1 Cyklohexan, ethylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Kyselina askorbová a BHT se přidávají jako antioxidanty a Na_2S pro vázání těžkých kovů.

8.3 Uvedený vzorec platí, pouze pokud se použitý pracovní postup neliší od popsané metody.

Další příklad volby navážky a výpočtu nástríkových koncentrací pro : a) krmné směsi

Vzorek má deklarovanou hodnotu vitamínu A 5 000 m.j./kg a vitamínu E 30 000 mg/kg. Podle tabulky (5.1) se naváží 30 g vzorku. Dosazením do vzorce pro C (5.3), se získá pro vitamin A hodnota nástríkové koncentrace $C = 0,225 \text{ m.j./ml}$ a pro vitamin E hodnota nástríkové koncentrace $C = 1,35 \mu\text{g/ml}$.

b) premixy

Vzorek má deklarovanou hodnotu vitamínu A 1400 000 m.j./kg a vitamínu E 3 000 000 mg/kg. Podle tabulky (5.1) se naváží 5 g vzorku. Dosazením do vzorce pro C (5.3), se získá pro vitamin A hodnota nástríkové koncentrace $C = 10,05 \text{ m.j./ml}$ a pro vitamin E hodnota nástríkové koncentrace $C = 22,5 \mu\text{g/ml}$.

8.4 Všechny operace je nutné provádět za omezeného přístupu světla.

8.5 Výsledek stanovení obsahu vitamínu A je třeba interpretovat jako obsah all-trans a cis izomeru.

Výsledek stanovení obsahu vitamínu E je třeba interpretovat jako celkový obsah alfa-tokoferolu. Kromě této modifikace se ještě může vitamin E v přírodních materiálech (tj. surovinách) vyskytovat v podobě beta, gama i delta tokoferolu, nebo i alfa, beta, gama, delta tokotrienolu. Tyto nativní obsahy jsou však velmi nízké a jejich zastoupení je v různých materiálech různé. Z teoretického hlediska však je nutno na tento fakt upozornit.

8.6 Jestliže se při deklarované hodnotě 1 000 - 4 000 m.j./kg vitamínu A paralelní výsledky liší navzájem o více jak 2 %, je doporučeno zvýšit navážku na 60 g vzorku a zdvojnásobit množství všech použitých chemikálií při zmýdelňování vzorku.

8.7 Saponifikaci je možné provádět přes noc (min. 12 hod.) za normální teploty v uzavřených Erlenmayrových baňkách uchycených v rotační míchačce (tzn. Wagnerovo kolo). Dosáhneme tím menšího rozptylu výsledků.

8.8 BHT (butylhydroxytoluen) má velmi podobné podmínky FF detekce jako alfa - tokoferol (excitační vln. délka 283 nm, emisní vln. délka 310 nm). Při správných podmínkách chromatografie (především kvalita kolony) je peak BHT separován (retenční čas je nižší než u vitamínu E). V případě špatné separace může nastat stav, kdy retenční časy BHT a vitamínu E jsou shodné, což samozřejmě vede k nesprávným výsledkům.

8.10 UV detektor a FF detektor jsou zapojeny v sérii, což umožňuje stanovení vit. A i vit. E na jeden nástrík.

8.11 Základní standardní roztok není třeba vždy připravovat čerstvý, protože "slábnutí" standardu lze spektrofotometricky sledovat. S aktualizovanou hodnotou se počítá ve výpočtu.

4.2 Stanovení obsahu vitaminu A a vitaminu E.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje postup stanovení obsahu vitaminu A a E v premixech a krmných směsích. Metodou se stanoví vitamin A v kompletních krmivech i premixech doplňkových látek od obsahu nad 800 m.j./kg a vitamin E v kompletních krmivech i premixech doplňkových látek od obsahu nad 2,5 mg/kg.

Účinnou formou vitaminu A obecného vzorce $C_{16}H_{23} - R$ je retinol a neoretinol ($R = CH_3 - C=CH - CH_2OH$), kdy retinol je all-trans isomer a neoretinol je cis,trans-isomer a jsou esterově vázány na mastné kyseliny (tyto dvě formy převažují jako nativní vitamin A). Obsah vitaminu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách, ve zkratce m.j.(international unit I.U.) retinolu (vitamin A) na kg. Mezinárodní jednotka vitaminu A (m.j., IU) odpovídá aktivitě 0,3 μg retinolu (all-trans-vitamin -A-alkoholu) což odpovídá 0,344 μg acetátu vitaminu A což odpovídá 0,550 μg palmitátu vitaminu A.

Vitamin E je DL- α -tokoferol sumárního vzorce $C_{29}H_{50}O_2$. Obsah vitaminu E se vyjadřuje v mg/kg, přičemž 0,91 mg DL- α -tokoferolu odpovídá 1,0 mg DL-acetátu tokoferolu (poměr rel. molekulových hmotností tokoferolu/acetátu tokoferolu = 430,7/472,8).

2. Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní alkalickým hydroxidem a vitamin A a vitamin E se extrahuje do organického rozpouštědla. Extrakt se zakoncentruje a odparek se rozpustí v methylalkoholu, je-li nutné, naředí se na požadovanou koncentraci. Obsah vitaminu A se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 325 nm nebo fluorescenční detekcí při vlnových délkách Ex: 325 nm, Em: 480 nm. Separální podmínky (průtok mobilní fáze a síla elučního roztoku) se nastaví takové, aby nedocházelo dělení cis a trans isomerů vitaminu A. Obsah vitaminu E se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 292 nm nebo fluorescenční detekcí při vlnových délkách Ex: 295 nm, Em: 330 nm. V případě použití programovatelného UV detektoru se zjišťuje obsah vitaminu A i vitaminu E v jediném nástřiku.

3. Chemikálie

3.1 Hexan, p.a. (poznámka 8.1)

3.2 Methylalkohol, HPLC grade (poznámka 8.1)

3.3 Ethylalkohol, denaturovaný hexanem 1 % (poznámka 8.1)

3.3.1 Ethylalkohol, vodný roztok 35 %

3.4 Hydroxid draselný

3.4.1 Hydroxid draselný, ethylalkoholický roztok (35 % ethylalkohol) 100 g/l

3.4.2 Hydroxid draselný, ethanolický roztok (35 % ethylalkohol) 200 g/l

3.5 Kyselina askorbová,

3.6 Hydrochinon pevný, $C_6H_6O_2$, $M_r = 110,11$

3.7 Síran sodný, bezvodý

3.8 Indikátor fenolftalein, roztok 0,1 %

Příprava: 1 g fenolftaleinu se rozpustí v 80 ml ethylalkoholu a doplní vodou na 100 ml. Takto připravený roztok se zředí 10krát.

3.9 Eluční roztok

Příprava: methylelalkohol - voda (98 + 2), poměr se musí upravit tak, aby odpovídal použité koloně a aby nedocházelo k separaci cis- a trans - isomerů vitamínu A.

3.10 Dusík, žárovkárenský, prostý kyselých látek a plynů

3.11 All-trans-vitamin-A-acetát

3.12 All-trans-vitamin-A-palmitát, asi 500 000 IU/g

3.13 DL- α - tokoferol-acetát, asi 1360 IU/g

3.14 Chlorid sodný, nasycený roztok v 35 % ethylalkoholu (3.3.1)

3.15 Kyselina chlorovodíková, zředěná, $c(HCl)=1$ mol/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (čerpadlo, kolona: C_{18} Nova-Pak 4 μm , 150x3,9 mm (Waters) nebo Nova-Pak 4 μm , 250x4,6 mm (Waters), UV nebo FF-detektor, časově programovatelný s programovatelnou vlnovou délkou: retinol - 325 nm tokoferol - 292 nm, dávkovací zařízení, datastanice s integračním software)

4.2 Vodní lázeň s regulovatelnou teplotou

4.3 Rotační vakuová odparka

4.4 Membránový filtr 0,45 μm

4.5 Laboratorní odstředivka

5. Postup

5.1 Příprava vzorku a práce se vzorky

Roztoky vitamínu A i vitamínu E se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem, jsou citlivé na oxidační a kyselé látky (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření). Při zpracování vzorku je nutno se vyhnout přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Pokud možno, vzorek se nemele, ale

pouze se roztírá v porcelánové misce. Homogenizace a úprava vzorku se děje těsně před jeho zmýdlením a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám retinolu a tokoferolu.

5.2 Zmýdlení vzorku

Podle obsahu vitamínu A a vitamínu E se do kulaté baňky s plochým dnem na 250 nebo 500 ml se zábrusem naváží 1 až 5 g (premixy doplňkových látek) nebo 15 až 20 g (krmné směsi) zkušební vzorku s přesností na 0,01 g a zalije se 25 ethylalkoholu (3.3). V případě, že vzorek není dostatečně smočený, přidá se ještě 5 ml ethylalkoholu (3.3.1). Postupně se přidá 750 mg kyseliny askorbové (3.5), 500 mg pevného hydrochinonu (3.6) a 75 ml roztoku hydroxidu draselného (pro premixy doplňkových látek 3.4.1, pro krmné směsi 3.4.2). Na baňku se nasadí zpětný chladič a po pětiminutovém odstraňování rozpuštěného kyslíku proudem dusíku (3.10) se baňka ponoří do vodní lázně (4.2) a obsah baňky se zmýdľuje po dobu 30 minut (premixy doplňkových látek) nebo 60 minut (krmné směsi) při teplotě 80 °C za stálého míchání. Po ukončení zmýdlení se zpětný chladič opláchne 30 ml roztoku ethylalkoholu (3.3.1), přidá se 34 ml vody a obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu.

5.3 Extrakce

Do dělicí nálevky na 500 ml se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.14) a zmýdlený roztok se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Pevný podíl v baňce se vypláchne 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.14) a kapalina se převede do dělicí nálevky. K pevnému podílu ve zmýdľovací baňce se přidá 60 ml hexanu (3.1) a krouživým pohybem se promíchá. Po usazení sedimentu se hexanový podíl převede do dělicí nálevky k vodno-ethanické fázi, dělicí nálevky se uzavře a třepe po dobu 30 sekund. Obě fáze se nechají asi 2 - 5 minut rozdělit. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml roztoku ethylalkoholu (3.3.1) k rozrušení vzniklé emulze. Extrakce vodné fáze s hexanem se provádí ještě dvakrát a to tak, že se vodná fáze extrahuje nejprve s 50 ml hexanu (3.1) a poté opět s 50 ml hexanu, přičemž po rozdělení fází (viz výše) se hexanové extrakty spojují v dělicí nálevce na 250 ml. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá roztok ethylalkoholu (3.3.1). V případě obsahu tuku nad 30 g/kg se extrakce opakuje 4krát, pro obsahy tuku nad 70 g/kg se extrakce opakuje 5krát a hexanové extrakty se spojují v dělicí nálevce na 500 ml. Spojené extrakty se propláchnou 50 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propláchne 2krát 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží, tak dlouho, až je promývací voda neutrální (po přidání roztoku fenolftaleinu (3.8) zůstává roztok bezbarvý).

5.4 Úprava hexanového extraktu

5.4.1 Krmné směsi a premixy doplňkových látek (varianta A)

Extrakt se filtruje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml nebo 500 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (3.7). Nálevka i filtr se propláchnou 50 ml hexanu (3.1). Obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce (4.3) za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10). Odparek se rozpustí v definovaném množství methylalkoholu (3.2), viz tabulka 1 a tabulka 2.

Tabulka B Hmotnost zkušební vzorku a objem methylalkoholového extraktu

Zkušební vzorek	Hmotnost (g)	Objem extraktu (ml)
Mléčné krmné směsi	10	25
Krmné směsi s obsahem retinolu do 8000 m.j./kg	15	10
Krmné směsi s obsahem retinolu od 8000 do 12 000 m.j./kg včetně	15	15
Krmné směsi s obsahem retinolu nad 12 000 m.j./kg	15	25
Premixy doplňkových látek	5	25

Tabulka C Ředění premixů doplňkových látek z methylalkoholického extraktu

Obsah vitamínu A (1000 m.j./kg)	Ředění	Způsob ředění (ml/ml)
do 250	1	-
od 250 do 600	2,5	10/25
od 600 do 1500	5	5/25
od 1500 do 2750	12,5	2/25
od 2750 do 6000	25	1/25
více jak 6000	50	1/50

5.4.2 Premixy doplňkových látek (varianta B)

Extrakt se filtruje do odměrné baňky na 200 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (3.7). Nálévka i filtr se propláchnou 20 ml hexanu (3.1) a odměrná baňka se doplní hexanem po značku a promíchá. Podle tabulky 3 se obsah odměrné baňky naředí na požadovanou koncentraci tak, že hexanový extrakt se pipetuje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml a obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10). Odparek se rozpustí ve 25 ml methylalkoholu.

Tabulka D Ředění (zakoncentrování) premixů doplňkových látek hexanového extraktu

Obsah vitamínu A (1000 m.j./kg)	Ředění /Zakoncentrování	Způsob ředění /zakoncentrování (ml/ml)
do 250	0,25	100/25

Tabulka E Ředění (zakoncentrování) premixů doplňkových látek hexanového extraktu - pokračování

od 250 do 1200	0,5	50/25
od 1200 do 2800	1	25/25
od 2800 do 8000	2,5	10/25
od 8000 do 14 000	5	5/25
od 14 000 do 55 000	12,5	2/25
od 55 000 do 100 000	25	1/25
více jak 100 000	50	0,5/25

5.4.3 Krmné směsi a premixy doplňkových látek v přítomnosti robenidinu

V případě obsahu robenidinu v premixech doplňkových látek se robenidin extrahuje kyselinou chlorovodíkovou (3.15). Podle tabulky 3 se do dělicí nálevky na 250 ml pipetuje definované množství hexanového extraktu, v případě nutnosti se objem hexanové fáze upraví na cca 10 ml hexanem (pro obsahy vitamínu A nad 8 000 000 m.j./kg) a přidá se 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15). Obsah se protřepe, po rozdělení fází se vodná fáze odpustí a extrakce se provede ještě 2krát s 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15). Po odpuštění posledního podílu vodné fáze se obsah dělicí nálevky promyje 3krát 100 ml vody do odstranění kyselé reakce, hexanová fáze se přefiltruje přes vrstvu síranu sodného. (3.7) do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml, přičemž filtr s vrstvou síranu sodného i dělicí nálevky se propláchnou 20 ml hexanu, obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10). Odparek se rozpustí ve 25 ml methyllalkoholu.

V případě obsahu robenidinu v krmných směsích se postupuje podle čl. 5.3, přičemž se extrakt filtruje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml nebo 500 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (3.7). Nálevka i filtr se propláchnou 50 ml hexanu (3.1). Obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C na objem asi 10 ml extraktu, obsah se hexanem kvantitativně převede zpět do dělicí nálevky na 250 ml a dále se postupuje podle prvního odstavce čl. 5.4.3. Odparek se rozpustí v definovaném množství methyllalkoholu podle tabulky 1.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (4.4) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.5) po dobu 2 minut při 2000 ot/min. Objem nástřiku methyllalkoholového extraktu na chromatografickou kolonu pro krmné směsi je 50 µl, pro premixy doplňkových látek 10 µl.

5.5 Stanovení metodou HPLC

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok	1 ml/min
Kolona	C ₁₈ a) Nova-Pak 4 μm, 150x3,9 mm (Waters) nebo b) Nova-Pak 4 μm, 250x4,6 mm (Waters)
Injektovaný objem	krmné směsi 50 μl premixy 10 μl
Detektor	UV a FF (poznámka 8.2)
AUFS	1,000
Retenční čas	pro kolonu a) Retinol 2,1 min Tokoferol 5,6 min pro kolonu b) Retinol 4,3 min Tokoferol 13,6 min

Tabulka F Časové změny vlnových délek UV-detektoru

Chromatografická kolona 250 mm		Chromatografická kolona 150 mm	
Čas (min)	Vlnová délka (nm)	Čas (min)	Vlnová délka (nm)
0,0	325	0,0	325
6,0	292	4,0	292

FF-detektor, časově programovatelný s programovatelnou vlnovou délkou:

Tabulka G Časové změny vlnových délek FF-detektoru

Chromatografická kolona 250 mm		Chromatografická kolona 150 mm	
Čas (min)	Vlnová délka (nm) <i>Ex/Em</i>	Čas (min)	Vlnová délka (nm) <i>Ex/Em</i>
0,0	325/480	0,0	325/480
6,0	295/330	4,0	295/330

5.6 Kalibrace

5.6.1 Příprava pracovního roztoku

5.6.1.1 Příprava pracovního roztoku pro krmné směsi

Do kulaté baňky s plochým dnem na 250 ml se zábrusem naváží asi 75 mg vitaminu A (3.11 nebo 3.12) a 50 mg vitaminu E (3.13), přičemž se dbá na ustanovení čl. 5.1, standard se převrství 10 ml ethylalkoholu (3.3) a dále se postupuje podle čl. 5.2 a 5.3. Konečný objem methylalkoholového extraktu je 250 ml.

1 ml tohoto roztoku obsahuje vitamin A (retinol)- 150 IU, vitamin E (tokoferol) - 0,2 mg.

5.6.1.2 Příprava pracovního roztoku pro premixy doplňkových látek

Do kulaté baňky s plochým dnem na 250 ml se zábrusem naváží asi 100 mg vitaminu A (3.11 nebo 3.12) a 150 mg vitaminu E (3.13), přičemž se dbá na ustanovení čl. 5.1, standard se převrství 10 ml ethylalkoholu (3.3) a dále se postupuje podle čl. 5.2 a 5.3. Konečný objem methanolového extraktu je 250 ml.

1 ml tohoto roztoku obsahuje vitamin A (retinol) - 200 IU, vitamin E (tokoferol) - 0,6 mg.

5.6.2 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibračního grafu

5.6.2.1 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibračního grafu pro krmné směsi

Do sady odměrných baněk na 50 ml se odpipetuje postupně 1,0 - 2,5 - 5,0 - 7,5 a 10 ml methanolového extraktu vitaminu A a vitaminu E, získaného podle čl. 5.5.1.1., doplní se methylalkoholem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní roztoky odpovídají koncentraci 3000 - 7500 - 15000 - 22500 a 30000 IU/l vitaminu A (retinol) a 4,0 - 10 - 20 - 30 a 40 mg/l vitaminu E (tokoferol). Takto připravený roztok se nastříkuje postupně na kolonu HPLC o objemu nástřiku 50 μ l .

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační graf.

5.6.2.2 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibračního grafu pro premixy doplňkových látek

Do sady odměrných baněk na 25 ml se odpipetuje postupně 1,0 - 2,0 - 5,0 - 7,5 a 10 ml methanolového extraktu vitaminu A a vitaminu E, získaného podle čl. 5.5.1.2., doplní se methylalkoholem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní roztoky odpovídají koncentraci 16000 - 40000 - 60000 a 80000 IU/l vitaminu A (retinol) a 24 - 48 - 120 - 180 a 240 mg/l vitaminu E (tokoferol). Takto připravený roztok se nastříkuje postupně na kolonu HPLC o objemu nástřiku 10 μ l .

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační graf.

5.6.2.3 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibračního grafu pro krmné směsi a suroviny s nízkým obsahem vitaminů

Do sady odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje postupně 0,25 - 0,5 - 1,0 a 2,0 ml methanolového extraktu vitaminu A a vitaminu E, získaného podle čl. 5.5.1.1., doplní se methylalkoholem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní roztoky odpovídají koncentraci 250 - 500 - 1500 a 3000 IU/l vitaminu A (retinol) a 0,5 - 1,0 - 2,0 a 4,0 mg/l vitaminu E (tokoferol). Takto připravený roztok se nastříkuje postupně na kolonu HPLC o objemu nástřiku 50 μ l .

6. Výpočet

Obsah vitaminu A vyjádřený v IU/kg (X) a obsah vitaminu E v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$X(Y) = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace vitaminu odečtená z kalibrační křivky v IU/l (retinol) nebo mg/l (tokoferol)

m hmotnost zkušební vzorku v g

F ředění (zakoncentrování) v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, methylalkohol i ethylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Fluorescenční detekce je vhodné používat u vzorků, obsahují úsušky píce a přidávaná barviva (carophyll). V tomto případě je nutné konečné koncentrace methylalkoholových extraktů upravit na kalibrační křivku pro FF-detektor.

4.3 Stanovení obsahu vitamínu E

Stanovení vitamínu E se provádí podle metody 4.1, kde je popsáno stanovení vitamínu A i E

4.4 Stanovení obsahu přidaného vitaminu E

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitaminu E v premixech a v krmných směsích.

Pro účely této metody se používá definice: Vitamin E je po chemické stránce tokoferol (2,5,7,8-tetra-methyl-2)4,8,12-trimethyltridecyl (-6-chromatol), sumární vzorec $C_{29}H_{50}O_2$.

2. Princip

Přidaný vitamin E (octan tokoferolu) se stanoví po extrakci vzorku diethyletherem resp. hexanem přímo, resp. po přečištění na sloupci oxidu hlinitého, metodou plynové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.2 Diethylether (poznámka 8.1)

3.3 Oxid hlinitý, aktivity I, (deaktivovaný 7 % vody) (např. Woelm N)

3.4 Octan tokoferolu, standardní substance vitaminu E se známou účinností

3.5 Vnitřní standard (Squalan) pro premixy: přesně 350 mg squalanu se rozpustí ve 250 ml odměrné baňce v n-hexanu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

3.6 Vnitřní standard (Squalan) pro krmné směsi: přesně 62,5 mg squalanu se rozpustí ve 250 ml odměrné baňce v n-hexanu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf plynový s příslušenstvím

4.2 Trubice chromatografická o průměru 10 mm

4.3 Sušárna laboratorní elektrická s termostatem

4.4 Zařízení extrakční (např. typu Soxhlet nebo Soxtec)

4.5 Lázeň vodní s termostatem

4.6 Třepačka laboratorní

4.7 Odparka vakuová, rotační

4.8 Kolona chromatografická skleněná s nepolární stacionární fází

4.8.1 Předepsané parametry:

- náplň kolony: SE-30, OV 1, OV 101, DC 200, SP 2 100
- nosič: Inerton pro plynovou chromatografii., nebo Chromosorb WAW-DMCS 100 /120 mesh nebo SUPELCOPORT 100/120 mesh a stacionární fáze % SP 2 100
- nosný plyn: dusík, průtok 50 ml/min
- detektor: plameno-ionizační FID
- teploty: nástřik 270 °C až 275 °C
termostat 245 °C až 270 °C
detektor 270 °C až 295 °C

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se 10,00 g zkušební vzorku do extrakční tuby, extrahuje na extrakčním přístroji (4.4) (postup viz Příloha 9, část 3.1) diethyletherem (3.2) po dobu 4 hod, u poloautomatu Soxtec (4.4) 20 minut extrakce a 40 minut promývání. Extrakt se odpaří na odparce (4.7) do sucha a odparek se rozpustí ve 4,00 ml roztoku vnitřního standardu (3.5).

5.1.2 Do nastaveného chromatografického přístroje (4.1) s předepsanými parametry (4.8.1) se dává 1 µl připraveného extraktu a pořídí se chromatografický záznam.

5.1.3 Vedle toho se provede stanovení korekčního faktoru K:

Do odměrné baňky na 25 ml se přesně odváží 100,00 mg standardní substance octanu tokoferolu (3.4) a 25 až 30 mg vnitřního standardu squalanu (3.5), rozpustí v n-hexanu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá. Do chromatografického přístroje (4.1) se dává 1 µl tohoto roztoku a pořídí se chromatografický záznam za naprosto stejných podmínek jako u zkoušeného vzorku. Stanovení korekčního faktoru se provede 2 x a to vždy před stanovením každého vzorku.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Podle předpokládaného obsahu vitamínu E ve zkoušeném vzorku se do zábrusové baňky na 250 ml odváží s přesností nejméně na 0,001 g takové množství zkušební vzorku, aby navážený vzorek obsahoval cca 1 mg vitamínu E. Do baňky se přidá přesně 150 ml n- hexanu (3.1), uzavře zátkou, umístí do vodní lázně (4.5) vyhřáté na 50 °C až 60 °C na dobu 30 minut, pak se 10 minut vytřepává na třepačce (4.6). Obsah baňky se přefiltruje středně hustým filtrem do vhodné nádoby.

5.2.2 Chromatografická trubice (4.2) se naplní do výšky asi 6 cm až 7 cm oxidem hlinitým (3.3) na smotek obvazové vaty umístěný na spodku sloupce. Na sloupec se převede přesně 50 ml filtrátu vzorku, eluuje se 2krát po 10 ml n-hexanu (3.1) do kulaté zábrusové baňky na 250 ml a eluát se odpaří na vakuové odparce (4.7) do sucha. Odparek se rozpustí v 1 ml vnitřního standardu (3.6) a do připraveného chromatografického přístroje (4.1) na předepsané parametry se dává 1 µl.

5.2.3 Vedle toho se provede stanovení korekčního faktoru K:

Do zábrusové odměrné baňky na 25 ml se přesně odváží 6,25 mg vnitřního standardu squalanu (3.5) a 6,25 mg standardní substance octanu tokoferolu (3.4), doplní hexanem po rysku a promíchá. Dávkuje se 1 µl tohoto roztoku a pořídí chromatografický záznam za naprosto stejných podmínek jako u zkoušeného vzorku. Stanovení korekčního faktoru se provede 3 x a to vždy před každým stanovením ve vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Premixy

Obsah vitamínu E v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot K \cdot p_T \cdot m_s}{p_S \cdot m_0}$$

kde p_T je plocha píku standardu octanu tokoferolu (vitaminu E) ve zkoušeném vzorku v mm^2

p_S plocha píku vnitřního standardu squalanu (3.5) v mm^2

m_s množství vnitřního standardu squalanu přidaného k odparku v mg

m_0 navážka zkušební vzorku v g

K korekční faktor

Korekční faktor (K) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{100 \cdot p_s \cdot c_T}{p_T \cdot C_s \cdot E_T}$$

kde C_T je koncentrace standardu octanu tokoferolu v mg/ml

C_S koncentrace vnitřního standardu squalanu v mg/ml

E_T účinnost standardní substance octanu tokoferolu v %

p_S, p_T viz legenda výše

Ze tří určení korekčního faktoru se vypočítá aritmetický průměr, který se dosadí do výpočtového vzorce obsahu vitamínu E.

6.2 Krmné směsi

Obsah vitamínu E v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{3000 \cdot K \cdot p_T \cdot m_2}{p_S \cdot m_0}$$

kde m_2 je množství vnitřního standardu squalanu přidaného k odparku v mg

m_0 navážka zkušební vzorku v g

p_T , p_S , K viz legenda v 6.1, výpočet K viz 6.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Premixy

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí při teoretickém obsahu vitamínu E $1,5 \cdot 10^5$ mg/kg překročit hodnotu $R_p = 88,2$ mg

7.2 Krmné směsi

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí při teoretickém obsahu vitamínu E 20 mg/kg překročit hodnotu $R_p = 2,15$ mg

8. Poznámky

8.1 Diethylether a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavinami třídy, proto je nutno při jakékoli manipulaci dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

4.5 Stanovení obsahu vitaminu E

Stanovení vitaminu E se provádí podle metody 4.2 kde je popsáno stanovení vitaminu A i E.

4.6 Stanovení obsahu cholinu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě rovnocenné metody, dosud rozhodčí metoda spektrofotometrická a perspektivní izotachoforetická.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení cholinu v premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Cholin je vitagen blízký vitaminům skupiny B. Jako přídavek pro fortifikaci krmiv se používá ve formě chloridu cholinu, což je po chemické stránce hydroxyethyltrimethyl-amonium hydroxid, sumárního vzorce $C_5H_{14}ClNO$.

2. Princip

Cholin se stanoví spektrofotometricky po extrakci vzorku ethylalkoholem na základě reakce acetonového komplexu s reineckátem amonným v prostředí roztoku fosforečnanu sodného, nebo na základě rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli metodou kapilární izotachoforézy.

3. Chemikálie

3.1 Pro metodu spektrofotometrickou

3.1.1 Reineckát amonný (diamo-tetrakis-isothiokyanátochromitan amonný), roztok 20 g/l v ethylalkoholu (3.1.4)

3.1.2 Fosforečnan trisodný dodekahydrát ($Na_3PO_4 \cdot 12 H_2O$), nasycený roztok (cca 298 g/l)

3.1.3 Aceton (zcela čirý nebo přefiltrovaný středně hustým filtrem) (poznámka 8.1)

3.1.4 Ethylalkohol 96 %, 2krát destilovaný (poznámka 8.1)

3.1.5 Chlorid cholinu, standardní substance

3.1.6 Chlorid cholinu, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,2000 g standardní substance chloridu cholinu (3.1.5) se 100 % účinnosti (nebo přepočtené množství na účinnost 100 %), rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 2 mg chloridu cholinu. Uchovaný při teplotě 4 °C je stálý po dobu jednoho týdne.

3.1.7 Chlorid cholinu, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku chloridu cholinu (3.1.6), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 0,2 mg chloridu cholinu. Přípravuje se vždy čerstvý.

3.2 pro metodu izotachoforetickou

3.2.1 Chlorid cholinu, standardní substance s účinností nejméně 95 %, na minerálním nosiči.

3.2.2 Chlorid cholinu, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,3000 g standardní substance chloridu cholinu (3.2.1) 100 % účinnosti (nebo množství přepočtené na 100 % účinnost), rozpustí v redestilované vodě (3.2.6), doplní touto po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 3 mg chloridu cholinu a při uchování za teploty 4 °C je stálý jeden týden.

3.2.3 Chlorid cholinu, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje tolik základního standardního roztoku chloridu cholinu (3.2.2), aby 1 ml tohoto roztoku obsahoval takové množství cholinu, jako je předpokládaný obsah v 1 ml výluhu ze zkoušeného vzorku.

Přípravuje se vždy čerstvý.

3.2.4 Kyselina octová , roztok $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}) = 0,1 \text{ mol/l}$, izotermicky predestilovaná (poznámka 8.2)

3.2.5 Octan draselný, pevný

3.2.6 Voda redestilovaná

3.2.7 Vedoucí elektrolyt

Příprava: Do kádinky vhodného objemu se odváží 0,491 g octanu draselného (3.2.5), rozpustí v 950 ml redestilované vody (3.2.6), roztokem kyseliny octové (3.2.4) se upraví pH na hodnotu 5,0 , kvantitativně převede do odměrné baňky na 1 000 ml, doplní se redestilovanou vodou (3.2.6) po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce při teplotě 4 °C.

3.2.8 Koncový elektrolyt

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří přesně 100 ml roztoku kyseliny octové (3.2.4), doplní redestilovanou vodou (3.2.6) po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce při teplotě 4 °C.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Pro metodu spektrofotometrickou

4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce

4.1.2 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.1.3 Kelímek filtrační skleněný s fritou S_3

4.1.4 Třepačka (horizontální) laboratorní

4.2 Pro metodu izotachoforetickou

4.2.1 Analyzátor izotachoforetický se zapisovačem

4.2.2 Třepačka laboratorní vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Metoda spektrofotometrická

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1.1 Do kuželových baněk asi na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 2,5 ; 5,0 ; 7,5 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku chloridu cholinu (3.1.7), každá z baněk se doplní na objem asi 10 ml vodou, přidá se pipetou 10 ml roztoku fosforečnanu sodného (3.1.2), 5 ml roztoku reineckátu amonného (3.1.1), důkladně se promíchá a nechá ustát na chladném místě po dobu 30 minut.

5.1.1.2 Vzniklá sraženina se odfiltruje za sníženého tlaku (4.1.2) filtračním kelímkem (4.1.3) a promyje se 2krát promývacím roztokem reineckátu amonného, připraveného odpipetováním 2 ml roztoku reineckátu amonného (3.1.1) do 1 000 ml vody. Po úplném odsátí vody se sraženina na filtru rozpustí max. 20 ml acetonu (3.1.3), filtrát se jímá do připojené baňky a potom se kvantitativně převede do odměrné baňky na 25 ml (V_3). Nakonec se odměrná baňka doplní po rysku acetonem (3.1.3) s promíchá.

5.1.1.3 Absorbance roztoků se měří na spektrofotometru (4.1.1) v kyvetách o optické délce 10 mm, při vlnové délce 525 nm proti čistému acetonu (3.1.3).

5.1.1.4 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní provedení

5.1.2.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží, s přesností nejméně na 0,001 g, tolik zkušební vzorku, aby navážka vzorku obsahovala asi 120 mg chloridu cholinu, provlhčí se přesně 10 ml ethylalkoholu (3.1.4) a vytřepává se na (horizontální) třepačce (4.1.4) po dobu 10 minut. Pak se přidá přesně 50 ml vody, zahřáté na 50 °C a vytřepává se dalších 10 minut. Po přidání dalších přesně 140 ml vody se vytemperuje, promíchá a obsah baňky se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z čirého filtrátu se odpipetuje 20 ml (V_2) do kuželové baňky na 50 ml, přidá 20 ml roztoku fosforečnanu sodného (3.1.2), 10 ml roztoku reineckátu amonného (3.1.1), důkladně se promíchá a ponechá ustát po dobu 30 minut na chladném místě.

5.1.2.2 Dále se postupuje podle 5.1.1.2 a 5.1.1.3. Naměřené množství chloridu cholinu se zjistí z kalibračního grafu.

5.2 Metoda izotachoforetická

5.2.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží přesně 5,000 g zkušební vzorku, přidá se přesně 250 ml redestilované vody (V_1) (3.2.6) a vytřepává se po dobu 30 minut na třepačce (4.2.2). Filtruje se suchým hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Filtrát se ředí dále na pracovní koncentrace následovně:

Při předpokládaném obsahu cholinu chloridu v mg /g	Způsob ředění	Stupeň ředění
do 30	20 ml (V_2) do 100 ml (V_3)	5
nad 30	10 ml (V_2) do 100 ml (V_3)	10

Ředění se provádí redestilovanou vodou (3.2.6).

Vlastní analýza se provede na předseparační koloně pro izotachoforetickou metodu obvyklou technikou, pořídí se záznam a vyhodnotí.

Vedle toho se provede analýza vhodně naředěného pracovního standardního roztoku cholinu chloridu (3.2.3) analogickým způsobem, jak výše uvedeno.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah chloridu cholinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot C}{m \cdot V_2}$$

kde C je množství chlorid cholinu zjištěné z kalibračního grafu v mg

m navážka zkušební vzorku v g

V_1 celkový objem extrakčního činidla v ml (200)

V_2 pipetovaný objem extraktu v ml

V_3 objem, ve kterém je rozpuštěna sraženina v ml

6.2 Metoda izotachoforetická (poznámka 8.3)

Obsah chloridu cholinu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{10^3 \cdot C \cdot L_V \cdot V_1 \cdot V_3}{L_S \cdot V_2 \cdot m}$$

kde C je koncentrace chloridu cholinu v pracovním standardním roztoku v mg

L_V délka zóny zkoušeného vzorku v mm

L_S délka zóny standardního roztoku cholinu v mm

m	navážka zkušební vzorku v g
V_1	objem extrakčního činidla v ml
V_2	pipetovaný objem filtrátu
V_3	konečný objem v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na celé jednotky v mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Spektrofotometrická metoda

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Izotachoretické metody

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aceton a ethylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Izotermická destilace se provádí tak, že do větší nádoby (např. prázdného exsikátoru) s látkou, která se má izotermicky predestilovat se vloží menší nádoba s redestilovanou vodou, větší nádoba se hermeticky uzavře a nechá volně stát asi 6 týdnů. Potom se menší nádoba, obsahující již izotermicky predestilovanou látku, vyjme a stanoví se koncentrace pro další použití.

8.3 Pro vyhodnocení a výpočet obsahu cholinu lze, v případě připojení analyzátoru na počítač, použít vhodného programu.

4.7 Stanovení obsahu pantothenanu vápenatého

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení pantothenanu vápenatého v premixech.

2. Princip

Pantothenan vápenatý se stanoví na základě růstové odpovědi testovacího mikroorganismu *Saccharomyces carlsbergensis* 4288 (ATCC 9080) difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Pantothenan vápenatý, standardní substance o účinnosti 100 %

3.2 Pantothenan vápenatý, základní standardní roztok

Příprava: 0,100 g standardní substance pantothenanu vápenatého (3.1) se odváží do 100 ml odměrné baňky, rozpustí se v tlumivém roztoku (3.4), doplní tímž po rysku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 000 µg pantothenanu vápenatého.

3.3 Pantothenan vápenatý, pracovní standardní roztok

Příprava: 10 ml základního standardního roztoku pantothenanu vápenatého (3.2) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml, doplní tlumivým roztokem (3.4) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 100 µg pantothenanu vápenatého.

3.4 Tlumivý roztok octanový o pH = 4,5 (Extrakční činidlo)

Příprava: Do 1 000 ml odměrné baňky se odváží 5,0 g octanu sodného, přidá 5 ml kyseliny octové ledové, doplní redestilovanou vodou po rysku a promíchá.

3.5 Testovací mikroorganismus, kultura kmene *Saccharomyces carlsbergensis* 4228

Příprava: Jednou za 14 dní se kultura přeočkovává na šikmou udržovací půdu (3.9.1), inkubuje se při teplotě 30 °C po dobu 24 hod a uchovává se při teplotě 4 °C.

3.6 Inokulum

Příprava: Čerstvá, maximálně 24 hod stará kultura uchovávaná na šikmé ploše se v množství jedné kličky naočkuje do 10 ml inokulační půdy (3.9.3) a inkubuje se 4 hod. při teplotě 30 °C. Z vyrostlé suspenze se používá 1 ml jako inokulum k naočkování 80 ml testovací půdy, předem rozvařeného a zchlazeného na teplotu 40 °C. Suspenze se uchovává při teplotě 4 °C a je stálá po dobu dvou dnů.

Reaktivace kmene: Při dlouhodobém pasážování na pevných půdách kvasinky ztrácejí svou specifickou citlivost na daný vitamin, proto se provádí jejich aktivace.

K reaktivaci kmene se používá inokulační půdy, do které se přidává pantothenan vápenatý (3.1). Půda se rozlije po 20 ml do kuželových baněk na 100 ml a očkuje jednou kličkou kvasinky. Několikrát opakovaným přeočkováním získá kmen opět původní vlastnosti; reaktivuje se 1krát měsíčně.

3.9 Živné půdy

3.9.1 Udržovací půda

Příprava: Sušená půda Malt-Extrakt-Agar "Oxoid" nebo polotuhá agarová půda Sladinkový agar "SEVAC" se připraví podle návodu výrobce.

3.9.2 Testovací půda

Příprava: Sušená půda pro stanovení kyseliny pantothenové "SEVAC" v množství 80,0 g se rozpustí ve 150 ml vařící (redestilované) vody (3.10). Vedle toho se v 850 g sušené půdy rozvaří 30,0 g agaru. Roztoky se smíchají, filtrují řídkým filtrem pH se upraví na 5,5 a filtrát se rozdělí do baněk na 100 ml. Sterilizuje se v autoklávu 15 minut při 0,05 MPa. Půda se uchovává při teplotě 4 °C.

3.9.3 Inokulační půda

Příprava: Sušená půda pro stanovení kyseliny pantothenové "SEVAC" se v množství 12,0 g rozpustí v redestilované vodě (3.10) a doplní ji na 1 000 ml. Půda se dále rozlije do baněk po 10 ml, přidá se pantothenan vápenatý (3.1) v množství 0,3 µg na 10 ml půdy a sterilizuje se v autoklávu po dobu 15 minut při 0,05 MPa.

Půda se uchovává při teplotě 4 °C a její pH má být 4,5.

3.9.4 Reaktivační půda

Příprava: Inokulační půda s přídavkem 0,1 ml pantothenanu vápenatého (3.1) na 1 ml se rozlije po 20 ml do baněk.

3.10 Redestilovaná voda

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotny skleněné 250 mm x 250 mm

4.2 Rámy kovové čtvercové

4.3 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.4 Vodováha

4.5 Korkovrt

4.6 Autokláv

4.7 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.8 Termostat vhodné konstrukce

4.9 Pipeta podle Pasteura

5. Postup

5.1 Odváží se 1,000 g zkušební vzorku do kuželové baňky na 200 ml, suspenduje se 30 ml extrakčního činidla - tlumivého octanového roztoku (3.4) a potom se sterilizuje v autoklávu (4.6) po dobu 15 minut při 0,11 MPa. Po ochlazení se přidá 70 ml redestilované vody (3.10) a promíchá. Po případné úpravě pH na 5,5 se odstředí (4.7). S ohledem na předpokládaný obsah pantothenanu vápenatého ve zkoušeném vzorku a navážku zkušební vzorku se provede další ředění tak, aby vznikly testované koncentrace 4 : 2 : 1 s teoretickými obsahy pantothenanu vápenatého 2,500; 1,250; 0,625 µg/ml.

5.2 Vedle toho se připraví z pracovního standardního roztoku (3.3) testační koncentrace 2,500; 1,250 a 0,625 µg pantothenanu vápenatého v 1 ml, přičemž se k ředění použije redestilovaná voda (3.10).

5.3 Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) opatřenou kovovým rámem (4.2) a umístěnou ve vodorovné poloze (vodováha - 4.4) se vylije 100 ml testovací půdy (3.9.2) naočkované testovací kulturou. Po ztuhnutí agarové vrstvy se vyhloubí korkovrtem (4.5) důlky ve vzdálenostech 25 až 30 mm od sebe a do nich se vnáší Pasteurovou pipetou jednotlivá ředění standardu (testační koncentrace) a zkoušeného vzorku (testované koncentrace). Ředění standardů se plní do tří řad ve středu plotny, ředění zkoušeného vzorku odpovídající příslušnému ředění standardu se plní do tří řad po obou stranách testačních koncentrací standardů. Plotna (4.1) se inkubuje v termostatu (4.8) po dobu 16 až 18 hod při teplotě 30 °C.

5.4 Vzniklé růstové zóny se měří ve dvou vzájemně kolmých rovinách posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah pantothenanu vápenatého v mg/g se vypočte podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/g.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

4.8 Stanovení vitaminů B₁, B₂ a B₆

1. Účel a rozsah

Pro stanovení vitaminů B₁, B₂ a B₆ jsou uvedeny dvě metody a to metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení vitaminů B v krmných směších a samostatná metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení vitaminů B v premixech.

2. Princip

Vitaminy B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin) a B₆ (pyridoxin) (poznámka 8.1) se extrahují ze vzorku krmné směsi vodou a po hydrolýze kyselinou chloristou se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) s využitím iontových párů na reverzní fázi. Detekce vitaminu B₂ a B₆ se provádí přímo fluorimetricky, zatímco vitamin B₁ se před detekcí nejprve oxiduje derivatizačním činidlem v reakční smyčce postkolonové derivatizace.

V premixech se stanoví komplex vitaminů B po extrakci zkušebního vzorku za studena extrakčním roztokem, metodou iontových párů na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3. Chemikálie

3.1 Hexakynoželezitan draselný [K₃Fe(CN)₆], pevný

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 0,1 mol/l

3.3 Kyselina chloristá 70 %

3.4 Kyselina fosforečná, koncentrovaná

3.5 Acetonitril, čistoty HPLC

3.6 Amoniak, roztok 25 %

3.7 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 6 mol/l

3.8 Hydroxid sodný, roztok 150 g/l

3.9 Činidlo iontových párů - roztok sodné soli kyseliny hexansulfonové (dále jen HSA Na)

3.10 Vitaminy B₁, B₂ a B₆, standardní substance

3.11 Vitamin B₁, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 25 mg standardní substance vitaminu B₁ (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,1 mg vitaminu B₁. Roztok uchovaný v chladničce je stálý po dobu několika měsíců.

3.12 Vitamin B₂, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 10 mg standardní substance vitamínu B₂ (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,02 mg vitamínu B₂. Roztok uchovaný v chladničce je stálý po dobu několika měsíců.

3.13 Vitamin B₆, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 25 mg standardní substance vitamínu B₆ (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,1 mg vitamínu B₆. Roztok uchovaný v chladničce je stálý po dobu několika měsíců.

3.14 Směsný pracovní standardní roztok vitaminů B₁, B₂ a B₆

Příprava: Do kuželové baňky na 250 ml se odpipetuje:

2 ml základního standardního roztoku vitamínu B₁ (3.11)

10 ml základního standardního roztoku vitamínu B₂ (3.12)

2 ml základního standardního roztoku vitamínu B₆ (3.13)

přidá se asi 50 ml vody a za míchání 2 ml kyseliny chloristé (3.3).

Baňka se zazátkuje, umístí na třepačku (4.4) a protřepává se po dobu 30 minut. Pak se za stálého míchání přidává postupně roztok hydroxidu draselného (3.7) až roztok dosáhne pH 3,2 (poznámka 8.2), obsah baňky se kvantitativně převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní mobilní fází (3.15) po rysku a promíchá. Dále se roztok odstaví v chladničce do druhého dne, aby se kvantitativně vysrážel chloristanový iont ve formě chloristanu draselného, tento se odfiltruje suchým hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se odpipetuje 5 ml do odměrné baňky na 10 ml, doplní se mobilní fází (3.15) po rysku a promíchá.

Konečná koncentrace tohoto směsného standardního roztoku je pro:

vitamin B₁ 1,0 µg/ml

vitamin B₂ 1,0 µg/ml

vitamin B₆ 1,0 µg/ml

3.15 Mobilní fáze (poznámka 8.7)

Příprava: V odměrné baňce na 1 000 ml se smíchá 95 ml acetonitrilu (3.5), 0,5 ml amoniaku (3.6) a 800 ml vody, doplní toutéž po rysku a promíchá. Po rozpuštění se přidá 950 mg HSA Na (3.9) a po jeho rozpuštění se pH roztoku upraví kyselinou fosforečnou (3.4) na hodnotu 2,85. 930 ml tohoto roztoku se doplní vodou na 1 000 ml, promíchá a filtruje přes filtr 0,45 µm.

3.16 Derivatizační roztok

Příprava: Do kádinky vhodného objemu se odváží 0,5 g hexakynoželezitanu

draselného (3.1), rozpustí v 50 ml vody a 6 ml tohoto roztoku se přidá do 100 ml roztoku hydroxidu sodného (3.8).

3.17 Methylalkohol, HPLC grade

3.18 Kyselina octová, HPLC grade ($\rho = 1,05 \text{ g/cm}^3$)

3.19 Diethylamin, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$, $M_r = 73,14$ (dále jen DEA)

3.20 Extrakční roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 2000 ml se odlije 500 ml vody, naváží se 2,84 g 1-HSA Na (3.4), přidá se 40 ml kyseliny octové (3.2), 8 ml DEA (3.5) a po rozpuštění se přidá 500 ml methylalkoholu. Doplní se vodou po značku a promíchá. Pod pH metrem se upraví pH roztoku na hodnotu pH 3,70 kyselinou fosforečnou.

3.21 Mobilní fáze

Příprava: V odměrné baňce na 2000 ml se v 500 ml vody rozpustí 2,84 g 1-HSA Na (3.4), přidá se 300 ml methanolu, 40 ml kyseliny octové (3.2) a 8 ml DEA (3.5). Doplní se vodou po značku a promíchá. Pod pH metrem se upraví pH na hodnotu $(3,70 \pm 0,025)$ kyselinou fosforečnou.

3.22 Základní roztok komplexu vitamínu B

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 50,0 mg vitamínu B₁, B₂ a B₆ a rozpustí se ve vodě mírně zalkalizované hydroxidem draselným, po rozpuštění se doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,2 mg/ml vitamínu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolona - reverzní fáze C18, 300 x 4,4 μm , injektážní dávkovací zařízení např. Rheodyne, UV detektor nebo fluorimetrický detektor - mřížkový typ s excitačním a emisním monochromátorem, popř. datastanice s integračním software, tiskárna či jiné registrační zařízení

4.2 Pumpa derivatizační

4.3 Smyčka reakční derivatizační (doporučené parametry: délka 6 m, průměr kapiláry 0,254 mm, materiál PEEK)

4.4 Třepačka laboratorní

4.5 Termostat vhodné konstrukce

4.6 pH metr

4.7 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.8 Membránový filtr (0,45 μm)

5. Postup (poznámka 8.3)

5.1 Premixy

Při zpracování vzorku se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Vzorek se nemele, ale pouze se roztírá v porcelánové misce. Homogenizace a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám vitamínu B. Roztoky vitamínu B se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření).

5.1.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se naváží 5 g zkušebního vzorku s přesností 0,001 g, přidá se 100,0 ml extrakčního roztoku (3.20), baňka se uzavře zátkou a extrahuje se na laboratorní třepačce (4.4) po dobu 65 minut. Po extrakci se upraví pH směsi na hodnotu 3,7 pod pH-metrem (4.6) kyselinou fosforečnou (3.4) nebo DEA (3.19) (poznámka 8.2). Roztok se filtruje přes suchý hustý skládaný filtr do suché podložené zkumavky, přičemž první podíl (asi 5 ml) se nepoužije.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu (4.1) se roztok filtruje přes membránový filtr (4.8) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.7) po dobu 2 minut při 3500 ot/min.

5.1.2 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se pipetuje postupně 1,0 - 2,0 - 5,0 a 10,0 ml základního roztoku vitamínu B (3.22) a doplní se extrakčním roztokem (3.20) po značku a promíchá, čímž se získají kalibrační roztoky o koncentraci vitamínu B v mg/l 4,0 - 8,0 - 20,0 a 40,0. pH tohoto roztoku se upraví pod pH metrem (4.6) na hodnotu pH 3,7 kyselinou fosforečnou (poznámka 8.3).

Takto připravené roztoky se nástřikují postupně na chromatografickou kolonu vysoúčinného kapalinového chromatografu (4.1) o objemu nástřiku 25 µl.

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační graf.

5.1.3 Vlastní stanovení

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Teplota	okolí
Průtok	1,2 ml/min
Detekce	UV-programovatelný
Objem nástřiku	25 µl
AUFS	1,000

Pořadí eluce jednotlivých píků a podmínky detekce

	Vlnová délka (nm)	Čas eluce (min)
Vitamin B ₆	291 nm	4,3
Vitamin B ₁	273 nm	8,2
Vitamin B ₂	267 nm	18,5

(poznámka 8.8)

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Kalibrace a kontrola lineární odezvy instalované instrumentace

Do odměrných baněk na 10 ml se diferencovaně odpipetuje 1, 2, 4 a 5 ml směsného pracovního roztoku (3.14), doplní mobilní fází (3.15) po rysku a promíchá. Takto připravené kalibrační roztoky vitaminů B₁, B₂ a B₆ představují koncentrace 0,2, 0,4 a 0,8 a 1,0 µg/ml.

Kalibrační roztoky se použijí pro kalibraci systému a pro kontrolu linearity odezev instalované instrumentace.

Pracovní podmínky:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min.
Detekce	fluorimetrická (poznámka 8.6)
Objem nástřiku	125 µl
Průtok derivatizačního roztoku v derivatizační smyčce	0,3 ml/min. (při stanovení vitaminu B ₁)

Pořadí eluce jednotlivých píků a podmínky detekce:

	Vlnová délka (nm)		šterbina (nm)		čas eluce (min)
vitamin B ₁	excitace 360	emise 435	excitace 20	emise 60	23
vitamin B ₂	excitace 440	emise 565	excitace 20	emise 60	28
vitamin B ₆	excitace 295	emise 395	excitace 20	emise 60	8

Při detekci vitaminu B₁ je nutno uvést v činnost derivatizační smyčku (4.3), která musí být termostatována na teplotu 50 °C.

Kolona se nejprve uvede do rovnováhy až dosáhne ustálení základní linie při daném průtoku mobilní fáze (3.15) a pak se nástřikují jednotlivé roztoky a to v tomto doporučeném pořadí:

kalibrační standardní roztoky (viz 5.1.1), roztoky zkoušeného vzorku. Na jeden nástřik se stanoví vitaminy B₂ a B₆. Vitamin B₁ se stanoví na další nástřik, kdy je v činnosti derivatizační smyčka (4.3). Každý nástřik, jak kalibračního tak i roztoku zkoušeného vzorku, musí být proveden dvakrát, přičemž příslušné odezvy musí být v toleranci nejvýše 2 %. Za popsaných podmínek (viz 5.1.2) se pořídí chromatografický záznam.

Z naměřených hodnot ploch píků a jim odpovídajících koncentrací kalibračních roztoků se sestrojí kalibrační graf (poznámka 8.4).

5.2.2 Vlastní provedení

Do odměrné kuželové baňky na 250 ml se odváží tolik zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, aby po extrakci, úpravě pH a doplnění mobilní fáze (3.15) na objem 100 ml, bylo dosaženo deklarovaných koncentrací přibližně v polovině rozsahu pro všechny tři stanovované složky (poznámka 8.5). K navážce vzorku se přidá asi 60 ml vody, za promíchávání ještě 2 ml kyseliny chloristé (3.3), baňka se uzátkuje, umístí na třepačku (4.4) a protřepává po dobu 30 minut. Pak se opatrně, za stálého míchání, přidává roztok hydroxidu draselného (3.8) až do dosažení hodnoty pH 3,2. Obsah baňky se převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní mobilní fázi po rysku a promíchá. Baňka s roztokem se umístí do druhého dne v chladničce, za účelem kvantitativního vysrážení chloristanového iontu jako chloristan draselný, potom se filtruje suchým, hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se doplní odměrná baňka na 10 ml po rysku. Dále se postupuje podle 5.2.1.

Naměřená koncentrace se zjistí z kalibračního grafu (poznámka 8.4).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah jednotlivých vitaminů vyjádřených jako hydrochloridy v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce (poznámky 8.1 a 8.4):

$$X = \frac{C_i \cdot F}{m}$$

kde C_i je koncentrace jednotlivých vitaminů zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

F faktor ředění

m navážka zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Vitamin B₆ je v nativní formě přítomen v podobě pyridoxinu, pyridoxalu a pyridoxaminu. Uvedené složky jsou v přírodním materiálu zastoupeny v různém poměru, přičemž všechny formy jsou biologicky aktivní. Uvedená metoda stanoví pouze vitamin B₆ v podobě pyridoxinu. Výsledek je nutno interpretovat jako součet obsahů přidaného vitaminu B₆, který je přítomen ve formě pyridoxin hydrochloridu a nativního obsahu přítomného ve formě pyridoxinu a hydrolýzou je na hydrochlorid převeden.

8.2 Chromatografický systém tvorby iontových párů je velmi citlivý na pH, které ovlivňuje disociaci především vitaminu B₁ a který se ve vodném roztoku chová jako báze.

8.3 Doporučuje se pracovat při tlumeném světle, protože všechny tři formy stanovovaných látek jsou na světle nestabilní.

8.4 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítá se obsah jednotlivých vitaminů přímo z naměřených koncentrací.

8.5 Doporučuje se odvažovat nejméně 1 g zkušební vzorku. U vzorků s vyšším obsahem stanovovaných složek je tedy třeba koncentrace v polovině rozsahu kalibračního grafu dosáhnout přiměřeným naředěním filtrátu (viz 5.2) před nástřikem do kolony.

8.6 Detekční limity uvedené metody jsou: 0,05 µg/ml pro vitaminy B₁ i B₂
0,01 µg/ml pro vitamin B₆.

Výsledky stanovení obsahu vitaminu B₁ a B₆ jsou uváděny jako hydrochloridy.

8.7 Hodnota pH mobilní fáze závisí na použité chromatografické koloně.

8.8 Pořadí a retenční časy závisí na podmínkách chromatografického dělení a použité koloně.

4.9 Stanovení obsahu vitamínu B₂

1. Účel a rozsah

Jsou uváděny dvě metody stanovení vitamínu B₂ v premixech - fluorimetrická a difúzní plotnová a jedna metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) pro stanovení vitamínu B₂ v premixech i krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Vitamin B₂ je po chemické stránce riboflavin, je jedním z vitaminů B-komplexu. Tvoří žlutou, ve vodném roztoku silně žlutozeleně fluoreskující látku a je velmi fotolabilní.

2. Princip

Vitamin B₂ v premixech se stanoví fluorimetricky v mírně okyseleném prostředí na základě fluorescence při vlnové délce 440 nm nebo difúzní plotnovou metodou na základě růstové odpovědi testovacího mikroorganismu *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (CCM 1825).

Vitamin B₂ v premixech i krmných směsích se stanoví po extrakci zkušebního vzorku za tepla zředěnou kyselinou chloristou, její neutralizací hydroxidem draselným, a následnou enzymatickou hydrolýzou (takadiastasa), metodou iontových párů na reverzní fázi s použitím fluorifotometrické detekce.

3 Chemikálie

3.1 Metoda fluorimetrická

3.1.1 Kyselina octová, ledová (CH₃COOH) (h=1.05 g/ml)

3.1.2 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 0,1 mol/l

3.1.3 Manganistan draselný (KMnO₄), roztok 30 g/l

3.1.4 Hydroxylamin hydrochlorid, roztok 30 g/l

3.1.5 Dithioničitan sodný, pevný

3.1.6 Octan sodný, trihydrát, roztok 100 g/l

3.1.7 Riboflavin, standardní substance vitamínu B₂ se známou (ověřenou) účinností

3.1.8 Vitamin B₂ (riboflavin), základní standardní roztok

Příprava: Do kádinky se odváží se přesně 40 mg standardní substance riboflavínu (3.1.7), o účinnosti 100 % nebo vypočítané množství nižší účinnosti, předem vysušené (3 hod při teplotě 100 °C) a v exsikátoru ochlazené. Přidá se asi 800 ml vody a 10 ml ledové kyseliny octové (3.1.1). Po promíchání se směs zahřívá na vroucí vodní lázni

(4.1.2) až do úplného rozpuštění, potom se ochladí a kvantitativně převede do odměrné baňky na 1 000 ml. Doplní se vodou po rysku a promíchá.

Tento roztok standardu je stálý několik měsíců za předpokladu jeho uložení ve tmě a chladu.

Před vlastním stanovením se připraví pracovní standardní roztok riboflavinu zředěním základního standardního roztoku na koncentraci 2 µg riboflavinu v 1 ml.

3.2 Metoda difúzní plotnová

3.2.1 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$

3.2.2 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.2.3 Octan sodný, roztok $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 2,5 \text{ mol/l}$

3.2.4 Kyselina octová, roztok 10%

3.2.5 Voda redestilovaná

3.2.6 Riboflavin (vitamin B₂) standardní substance se známou či ověřenou účinností

3.2.7 Vitamin B₂ (riboflavin), základní standardní roztok

Příprava: Odváží se přesně 0,05 g standardní substance riboflavinu (3.2.6) o účinnosti 100 % nebo vypočtené množství nižší účinnosti do odměrné baňky na 500 ml, rozpustí se v 10 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2.2), po jeho rozpuštění se přidá 8,5 ml roztoku kyseliny octové (3.2.4), doplní roztokem kyseliny sírové (3.2.1) po rysku a promíchá.

Tento základní standardní roztok má koncentraci 0,1 mg riboflavinu v 1 ml. Je stálý v chladničce po dobu 1 měsíce.

Těsně před použitím se ředí na testační roztoky o koncentracích 2,1 a 0,5 µg vitamínu B₂ v 1 ml.

3.2.8 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě, doplní vodou na 1000 ml, promíchá a sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.2.9 Testovací organismus *Lactobacillus rhamnosus* 7469 (CCM 1825)

Příprava: Kultura se uchovává na šikmé udržovací agarové půdě při teplotě 4 °C, nejméně jednou za 2 týdny se přeočkovává a inkubuje 48 hod při teplotě 37 °C.

3.2.10 Inokulum

Příprava: Ze šikmého agaru se suspendují 1 až 2 kličky nátěrů testovacího mikroorganismu (3.2.9) do sterilního inkubačního roztoku a inkubuje se 24 hod. při teplotě 37 °C. Před použitím se kultura vyrostlá v inkubačním roztoku odstředí, supernatant se slijí a kultura se převede 5 ml izotonického roztoku (3.2.8) do zkumavky. Tím se vyloučí vliv standardní substance vitamínu B₂ přidaného do inkubačního roztoku.

3.2.11 Živné půdy

3.2.11.1 Udržovací půda - sušená půda Lactoagar Sevac

Příprava: Proveďte se buď podle návodu výrobce nebo 5,7 g Lactoagaru se nechá botnat 15 minut ve vodě a potom se za varu rozpustí. Při teplotě 60 °C se doplní horkou vodou na objem 100 ml, promíchá, rozdělí do zkumavek a připraví se šikmé agarové půdy. Hodnota pH po sterilizaci je 6,5 až 6,9

Rehydratovaný agar lze uchovávat v chladničce po dobu 3 měsíců.

3.2.11.2 Inokulační půda

Příprava: Proveďte se buď podle návodu výrobce, nebo 20 g sušené půdy se rozpustí v 500 ml vody, přidá se standardní roztok vitamínu B₂ (3.2.7) tak, aby koncentrace vitamínu B₂ v 1 ml byla 0,1 µg, rozdělí se po 40 ml do kuželových baněk a sterilizuje.

3.2.11.3 Testovací půda

Příprava: Proveďte se podle návodu výrobce nebo 46 g sušené půdy se rozpustí v malém množství horké vody, promíchá se s 20 mg rozvařeného agaru a doplní vodou na 1 000 ml. Rozděluje se do kuželových baněk na 100 ml sterilizuje 10 minut při tlaku 0,05 MPa, pH po sterilizaci má být 6,2 až 6,8.

3.3 Metoda HPLC

3.3.1 Kyselina chloristá (HClO₄), koncentrovaná 70 %

3.3.1.1 Kyselina chloristá, zředěná 0,2 mol/l

Příprava: V odměrné baňce na 2000 ml se v 1000 ml vody rozpustí 33,5 ml kyseliny chloristé (3.1), promíchá, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní se vodou po značku a promíchá.

3.3.2 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 2 mol/l

Příprava: V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí v 500 ml vody 112 g hydroxidu za stálého chlazení. Po rozpuštění se obsah odměrné baňky doplní po značku a promíchá.

3.3.3 Kyselina fosforečná (H₃PO₄), koncentrovaná 85 % (h=1,7 g/cm³)

3.3.4 Amoniak, vodný roztok (NH₄OH), koncentrovaný, (h=0,91 g/cm³)

3.3.5 Hydroxid sodný, zředěný roztok c(NaOH)=0,005 mol/l

3.3.6 Reagent iontových párů (dále jen 1-HSA Na) - sodná sůl kyseliny hexansulfonové, CH₃(CH₂)₅SO₃Na, M_r = 188,22

3.3.7 Acetonitril, HPLC grade

3.3.8 Methylalkohol, HPLC grade

3.3.9 Kyselina octová, (h=1,05 g/cm³), HPLC grade

3.3.10 Diethylamin, (C₂H₅)₂NH, M_r = 73,14 (dále jen DEA)

3.3.11 Vitamin B₂ (riboflavin) , C₁₇H₂₀N₄O₆, M_r = 376,4

3.3.11.1 Základní roztok vitaminu B₂

Příprava: V odměrné baňce na 250 ml se rozpustí v asi 150 ml hydroxidu sodného (3.5) 50,0 mg riboflavinu, doplní roztokem hydroxidu sodného po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,2 mg/ml vitaminu B₂

3.3.11.2 Pracovní roztok pro krmné směsi

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se pipetuje 2 ml základního roztoku vitaminu B₂, doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,004 mg vitaminu B₂

3.3.12 Zředovací roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se nalije 200 ml vody, přidá se 400 ml acetonitrilu (3.7), 0,5 ml roztoku amoniaku (3.4), rozpustí se 100 mg 1-HSA-Na (3.6), doplní vodou po značku a promíchá. pH tohoto roztoku se upraví kyselinou fosforečnou (3.3) na hodnotu ($3,5 \pm 0,05$) (pH-metr).

3.3.13 Mobilní fáze

Příprava: V odměrné baňce na 1000 ml se ve 250 ml vody rozpustí 1,42 g 1-HSA Na (3.6), přidá se 150 ml methanolu (3.8), 20 ml kyseliny octové (3.9) a 4 ml DEA (3.10). Doplní se vodou po značku a promíchá. pH se upraví na hodnotu ($3,70 \pm 0,05$) kyselinou fosforečnou (3.3).

3.3.14 Takadiastasa, 1,4 IU/mg, uchovávat do teploty 4 °C

3.3.15 Takadiastasa, 40 IU/mg, uchovávat do teploty 4 °C

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Metoda fluorimetrická

4.1.1 Fluorimetr opatřený žlutozeleným filtrem

4.1.2 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.1.3 Chladič zpětný vodní

4.2 Metoda difúzní plotnová

4.2.1 Plotny skleněné 360 mm x 360 mm nebo 250 mm x 250 mm

4.2.2 Rámy čtvercové kovové 340 mm x 340 mm nebo 200 mm x 200 mm

4.2.3 Odstředivka vhodné konstrukce

4.2.4 Korkovrt o průměru (8 ± 1)mm

4.2.5 Vodováha

4.2.6 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.2.7 Autokláv

4.2.8 Mikropipeta podle Pasteura

4.3 Metoda HPLC

4.3.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf [čerpadlo, kolona C₁₈ - Nova-Pak 4 µm, 250x4,6 mm (Waters), 20 µm, injektážní dávkovací zařízení (autosampler, Rheodyne), FF detektor, data stanice s integračním software, tiskárna nebo jiné registrační zařízení]

4.3.2 membránový filtr (0,45 µm)

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Metoda fluorimetrická

5.1.1 Do kuželové baňky na 200 ml se zábrusem se odváží přesně 2,000 g zkušebního vzorku, přidá přesně 50 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2) vyluhuje na vodní lázni (4.1.2) 85 °C teplé pod zpětným chladičem (4.1.3) po dobu 30 minut za častého míchání, pak se baňka ochladí a opatrným přidáváním roztoku octanu sodného (3.1.6) se upraví na pH = 4,5. Přidá se do obsahu přesně 100 ml vody, promíchá a ponechá asi 1 hod. sedimentovat. Po usazení pevného podílu se obsah baňky filtruje suchým hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do další odměrné baňky na 50 nebo 100 ml se odpipetuje takový objem filtrátu, aby výsledná koncentrace vitamínu B₂ byla 0,15 až 30 µg v 1 l. Tento roztok se pipetuje do dvou zkumavek (kádinek) v množství po 10 ml, do první z nich se přidá přesně 1 ml vody, do druhé se přidá přesně 1 ml pracovního standardního roztoku riboflavinu (3.1.8), do obou pak 0,5 ml roztoku kyseliny octové (3.1.1), po promíchání dále 0,25 ml roztoku manganistanu draselného (3.1.3) a znovu promíchá. Přesně za 2 min se přidá 0,15 ml roztoku hydroxylamin hydrochloridu (3.1.4) a promíchá, přičemž roztok se musí do 15 sekund odbarvit. jinak je nutné přidat více hydroxylaminu hydrochloridu (3.1.4).

5.1.2 Intenzita fluorescence roztoků se proměří na fluorimetru (4.1.1). Primární záření je při vlnové délce 440 ± 5 nm, sekundární při 520 nm. Potom se do obou roztoků přidá malé množství (nejvýše 20 mg) dithioničitanu sodného (3.1.5), promíchá se a za 20 sekund se měří fluorescence. Naměřená hodnota se odečte od hodnoty naměřené před přidáním dithioničitanu sodného (3.1.5).

5.2 Metoda difúzní plotnová

5.2.1 Do kuželové baňky na 200 ml se zábrusem se odváží 1 až 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 75 ml roztoku kyseliny sírové (3.2.1) a extrahuje se na vodní lázni (4.1.2) pod zpětným chladičem (4.2.8) při 60 až 70 °C po dobu 30 minut. Po vychlazení se přidá přesně 5 ml roztoku octanu sodného (3.2.3), 20 ml vody, promíchá a filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Koncentrace výluhu se má pohybovat od 4 do 12 µg vitamínu B₂. Výluh se dále ředí vodou na teoretické koncentrace testovacích roztoků 2,1 a 0,5 µg v 1 ml.

5.2.2 Na skleněnou plotnu (4.2.1) vyrovnanou do vodorovné polohy (vodováha (4.2.5)) opatřenou kovovými rámy (4.2.2) utěsněnými agarem se rozlije 75 ml rozehřátého a na teplotu 40 °C zchlazeného testovacího agaru (3.2.11.3), který se naočkoval 1 - 2 ml inokula (3.2.10). Po ztuhnutí se vyhloubí korkovrtem (4.2.4) jamky vzdálené od sebe 25 až 30 mm. Do dvou jamek ve středu plotny se plní mikropipetou (4.2.8) testační roztoky standardu (3.2.7), příslušné naředěné testované roztoky zkoušeného vzorku se plní po obou stranách rovněž do 2 jamek. Pak se plotna lehce zakryje děrovaným alobalem a inkubuje se 20 až 24 hod při teplotě 37 °C.

5.2.3 Vzniklé zóny se měří ve dvou na sebe kolmých rovinách posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm a z naměřených hodnot se zjistí průměrné hodnoty růstových zón standardu i zkoušeného vzorku.

5.3 Metoda HPLC

5.3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se naváží 5 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g, přidá se 100,0 ml kyseliny chloristé (3.3.1.1) a extrahuje se za občasného míchání na topném hnízdě za varu pod vodním chladičem po dobu 60 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidá 10,0 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3.2) tak, aby výsledné pH leželo v oblasti pH 4,5 až 5,4 (poznámka 8.3), popřípadě se pH upraví na tuto hodnotu kyselinou fosforečnou (3.3.3) nebo amoniakem (3.3.4), přidá se 5 g takadiastasy (3.3.14) nebo 250 mg takadiastasy (3.3.15), uzavře se zátkou a hydrolyzuje se při teplotě 45 °C po dobu 16 hodin za občasného promíchání. Poté se obsah baňky vytemperuje na laboratorní teplotu, přidá se 90,0 ml zředovacího roztoku (3.3.12), obsah baňky se promíchá a kyselinou fosforečnou (3.3.3) se upraví pH na hodnotu pH (3,7 ± 0,05) (poznámka 8.1). Nechá se stát asi dvě hodiny v chladničce aby se vysrážel nerozpustný chloristan draselný (KClO₄). Ještě studený roztok se filtruje přes suchý hustý filtr do suché podložené zkumavky, přičemž první podíl (asi 5 ml) se nepoužije.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu (4.3.1) se roztok filtruje přes membránový filtr (4.3.2) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.2.3) po dobu 2 minut při 3500 ot/min.

5.3.2 Vlastní stanovení

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Teplota	okolí
Průtok	1,2 ml/min
Detektor	Fluorescenční ($\lambda_{\text{EXC}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{EM}} = 530 \text{ nm}$)
Objem nástřiku	20 μl
GAIN	1000
Retenční čas	18,5 min

5.3.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se pipetuje postupně 1,0 - 2,0 - 3,0 a 5,0 ml pracovního roztoku vitamínu B₂ (3.3.11.2), přidá se 25,0 ml kyseliny chloristé (3.3.1.1), 2,5 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3.2) a zřed'ovacím roztokem (3.3.12) se doplní po značku a promíchá, čímž se dostane kalibrační křivka o koncentraci vitamínu B₂ 0,08 - 0,16 - 0,24 - 0,4 mg/l. pH kalibračních roztoků se upraví kyselinou fosforečnou (3.3.3) nebo hydroxidem draselným (3.3.2) na hodnotu pH = (3,70 ± 0,05) (poznámka 8.1) a roztoky se nechají v lednici asi 2 hodiny, aby se vysrážel chloristan draselný.

Takto připravený roztok se nastříkuje postupně na chromatografickou kolonu HPLC (4.3.1) o objemu nástřiku 20 µl.

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační graf.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda fluorimetrická

Obsah vitamínu B₂ (X) v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C.F.I_v}{(I_s - I_v).m};$$

kde I_v je intenzita fluorescence zkoušeného vzorku

I_s intenzita fluorescence zkoušeného vzorku s přidaným standardem

C koncentrace srovnávacího standardního roztoku v µg/ml (= 2)

F faktor ředění zkoušeného vzorku

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

6.2 Metoda difúzní plotnová

Obsah vitamínu B₂ v mg/g (Y) se vypočte podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

6.3 Metoda HPLC

Obsah vitamínu B₂ vyjádřený v mg/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{C.F}{m}$$

kde C je koncentrace riboflavinu odečtená z kalibračního grafu v mg
 m hmotnost zkušebního vzorku v g
 F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Chromatografický systém tvorby iontových párů je velmi citlivý na pH, které ovlivňuje disociaci iontového páru. pH roztoku má vliv na retenční čas riboflavinu, se stoupajícím pH roste retenční čas riboflavinu.

8.2 Doporučuje se pracovat při tlumeném světle, protože riboflavin je na světle nestabilní.

8.3 Přídavek 10,0 ml hydroxidu draselného k neutralizaci kyseliny chloristé se musí být v rozmezí $10,0 \pm 0,2$ ml. Přídavek hydroxidu draselného se předem ověří titrací 100 ml roztoku kyseliny chloristé (3.3.1.1) do hodnoty pH 5,0. V případě, že je spotřeba menší nebo větší než 10 ml, musí se koncentrace hydroxidu draselného upravit tak.

4.10 Stanovení obsahu vitamínu B₆

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu B₆ v premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice : Vitamin B₆ je po chemické stránce směs pyridoxinu, pyridoxalu a pyridoxaminu. Protože jako standardní substance je používán hydrochlorid pyridoxinu , což je (3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyridin

hydrochlorid, sumárního vzorce C₈H₁₂ClNO₃, je celkový obsah vitamínu B₆ vyjadřován jako hydrochlorid pyridoxinu. Vitamin B₆ je značně fotolabilní.

2. Princip

Vitamin B₆ ve všech jeho formách se stanoví na základě stimulačního účinku na růst testovacího mikroorganismu kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 (ATCC 9080) difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Redestilovaná voda

3.2 Vitamin B₆, pyridoxin hydrochlorid, standardní substance o známé účinnosti

3.3 Vitamin B₆, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 0,01 g standardní substance hydrochloridu pyridoxinu (3.2), rozpustí se v redestilované vodě (3.1), doplní toutéž porysku a promíchá.

Tento standardní roztok obsahuje 100 µg vitamínu B₆ vyjádřeného jako hydrochlorid pyridoxinu v 1 ml a je stálý nejvýše po dobu jednoho týdne uchovaný v tmavé láhvi při 4 °C.

Při testování se připraví testační koncentrace 0,500; 0,250 a 0,125 µg hydrochloridu pyridoxinu (vitamínu B₆) v 1 ml.

3.4 Hydroxid sodný, roztok 30 g/200 ml.

3.5 Kyselina sírová, koncentrovaná (h = 1,84 g/ml)

3.6 Kyselina sírová, roztok c(H₂SO₄) = 0,22 mol/l

3.7 Testovací mikroorganismus - kultura kmene *Saccharomyces carlsbergensis*. Kultura se uchovává na šikmé agarové půdě při teplotě 4 °C a jednou za 14 dní se přeočkovává a následně inkubuje 24 hod při teplotě 30 °C.

3.8 Inokulum

Příprava: 20 ml inokulační půdy (3.9.3) se naočkuje jednou kličkou kultury testovacího mikroorganismu (3.7) z udržovacího agaru a inkubuje se při teplotě 30 °C. Z vyrostlé suspenze se použijí 2 ml jako inokulum k naočkování 100 ml testovací půdy (3.9.2), která byla předem rozvařena a zchlazena na teplotu 40 °C.

Suspensi nutno uchovávat při teplotě 4 °C, použitelnost je jeden týden od přípravy.

3.9 Živé půdy

3.9.1 Půda udržovací Saccharomyces agar, sušená

Příprava: Postupuje se podle návodu výrobce, nebo 9,8 g půdy se nechá botnat 15 minut v 80 ml redestilované vody (3.1) a pak se mírným vařením rozpustí. Při teplotě 60 °C se doplní redestilovanou vodou (3.1) na objem 100 ml, promíchá a rozdělí do zkumavek. Sterilizuje se 15 minut při teplotě 12 °C a po sterilizaci se nechá utuhnout v šikmé poloze. pH po sterilizaci má být 5 až 6.

3.9.2 Půda testovací

Příprava: Postupuje se podle návodu výrobce.

Např. 70 g sušené půdy Sevac pro stanovení vitamínu B₆ se rozpustí v malém množství vařící redestilované vody (3.1), slijí a promíchá s 25 až 30 g rozvařeného agaru, zfiltruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 1 000 ml, doplní po rysku redestilovanou vodou (3.1) a promíchá. Upraví se pH na 5,5 a obsah se rozdělí po 100 ml do baněk. Sterilizuje se po dobu 10 minut při tlaku 0,05 MPa.

Půda se uchovává při teplotě 4 °C.

3.9.3 Půda inokulační

Příprava: Postupuje se podle návodu výrobce nebo stejně jako u půdy testovací (3.9.2), avšak bez agaru a s přidavkem hydrochloridu pyridoxinu, který se přidá v množství 0,06 µg na 1 ml půdy ze standardního roztoku vitamínu B₆ (3.3). pH půdy má být 5,5. Inokulační půda se rozpipetuje po 20 ml do baněk na 200 ml a sterilizuje se po dobu 10 minut při tlaku 0,05 MPa.

Uchovává se při teplotě 4 °C.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 250 mm x 250 mm

4.2 Rám čtvercový 200 mm x 200 mm

4.3 Baňka odměrná na 100 ml podle Kohlrausche nebo Stifta

4.4 Korkovrt o průměru 8 ± 0,1 mm

4.5 Autokláv

4.6 Vodováha

4.7 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.8 Termostat vhodné konstrukce

4.9 Lázeň vodní s termostatem

4.10 Mikropipeta podle Pasteura

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Do 250 ml extrakční baňky se odváží 5,000 g zkušební vzorku (poznámka 8.1) a suspenduje se v 75 ml roztoku kyseliny sírové (3.6). Potom se extrahuje na vodní lázni (4.9) při teplotě 60 °C až 70 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení se doplní redestilovanou vodou (3.1) na přesně 100 ml, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.2 Koncentrace vitamínu B₆ v tomto filtrátu výluhu je asi 2,5 až 5,0 µg na 1 ml. Výluh je možno uchovávat při teplotě 4 °C nejvýše po dobu jednoho týdne.

5.3 Ředění roztoku vzorku se provádí redestilovanou vodou (3.1) na testované koncentrace 0,500; 0,250 a 0,125 µg vitamínu B₆ v 1 ml.

5.4 Na dno plotny (4.1) opatřené kovovým rámem (4.2) a vodorovně (4.6) umístěné se vylije 75 ml testovací půdy (3.9.2) naočkované kulturou. Po ztuhnutí agarové vrstvy se korkovrtem (4.4) vyhloubí jamky, vzdálené od sebe navzájem 2,5 až 3 cm. Do těchto jamek se mikropipetou (4.10) vnáší jednotlivá testovaná koncentrace roztoku vzorku a testační koncentrace standardního roztoku vitamínu B₆ v množství asi 0,04 ml, ale ve všech případech naprosto shodně.

5.5 Testační roztoky standardu vitamínu B₆ se plní do tří jamek ve středu plotny, po obou stranách se pak plní naředěné roztoky zkoušeného vzorku (testované koncentrace) odpovídající přibližně koncentracím standardního testovacího roztoku. Plotna (4.1) se inkubuje při teplotě 30 °C po dobu 16 až 18 hodin. Vzniklé zóny se odměří odpichovátkem ve dvou po sobě kolmých rovinách.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vitamínu B₆ v mg/kg se stanoví podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah vitamínu B₆ ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace vitamínu B₆ ve výluhu byla v rozmezí 2,5 až 5 µg/ml.

8.2 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

4.12 Stanovení obsahu vitamínu A - metoda EU

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 083, 30/03/73.

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dva rovnocenné způsoby stanovení, pro nižší obsahy do 2 000 mg/kg a modifikace pro obsahy vyšší než 2 000 mg/kg. Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení vitamínu A (retinolu) v krmivech, koncentrátech a premixech. Mez stanovitelnosti metody je 10 000 m.j./kg pro vysoce pigmentovaná krmiva a 4 000 m.j./kg pro ostatní (poznámka 8.1).

2. Princip

Vzorek je hydrolyzován za tepla hydroxidem draselným v ethylalkoholu za přítomnosti antioxidantu, směs je extrahována 1,2 dichlorethanem, extrakt odpařen do sucha a po rozpuštění odparku je roztok čištěn přes chromatografický sloupec oxidu hlinitého (poznámka 8.2).

Pro krmiva s obsahem do 200 000 m.j./kg je vitamin A stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 610 nm po převedení na barevný komplex, pro krmiva s obsahem nad 200 000 m.j./kg spektrofotometricky přímo v UV oblasti spektra při vlnové délce 325 nm.

3. Chemikálie

3.1 Obecně

3.1.1 Ethylalkohol 96 % (poznámka 8.3)

3.1.2 Askorban sodný, roztok 100 g/l

3.1.3 Dusík kyslíku prostý

3.1.4 Hydroxid draselný, roztok 500 g/l

3.1.5 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.1.6 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.1.7 1,2-Dichlorethan

3.1.8 Petrolether (poznámka 8.3), bodu varu 30 až 50 °C, je-li třeba přečištěný následovně:

100 ml petroletheru se v dělicí nálevce míchá s dávkami koncentrované kyseliny sírové a odděluje až kyselina zůstane zcela bezbarvá. Po odstranění kyseliny se petrolether promývá postupně 500 ml vody, dvakrát po 250 ml roztoku hydroxidu sodného (100 g/l) a pak ještě 3 x po 500 ml vody. Po posledním odpuštění vodné vrstvy se přidá

aktivní uhlí a bezvodý síran sodný, ponechá stát 1 hod, zfiltruje se a predestiluje (poznámka 8.3).

3.1.9 Oxid hlinitý, standardizovaný podle Brockmanna

Příprava: Oxid hlinitý se žihá po dobu 8 hod v muflové peci (4.6) při teplotě 750 °C, ochladí v exsikátoru a uchovává v nádobce z hnědého skla uzavřené zabroušenou zátkou. Před použitím se 10 g oxidu hlinitého ve vhodné nádobce zvlhčí přesně 0,7 ml vody, nádobka se uzátkuje a na vroucí vodní lázni (4.1) se zahřívá po dobu 5 minut za stálého míchání. Po ochlazení se přezkouší aktivita takto upraveného oxidu hlinitého pomocí známého množství retinolu (3.1.17) (asi 500 m.j.) podle postupu 5.3 a 5.4 kontrolním testem.

3.1.10 Oxid hlinitý, basický - stupeň aktivity I (např. od fy Woelm, Merck či srovnatelné kvality)

3.1.11 Diethylether (poznámka 8.3), peroxidů i stop vody zbavený na sloupci s basickým oxidem hlinitým (3.1.10). Na 250 ml diethyletheru se použije 25 g oxidu hlinitého.

3.1.12 Petrolether - diethylether, směsi (96+4), (92+8), (88+12), (84+1) a (80+20) (poznámka 8.3)

3.1.13 Sulfid sodný, roztok $c(\text{Na}_2\text{S}) = 0,5 \text{ mol/l}$ v 70% glycerinu

3.2 Pro krmiva s obsahem vitamínu A pod 200 000 m.j./kg, navíc

3.2.1 Benzen (poznámka 8.3)

3.2.2 Chloroform, speciálně čištěný

Úprava: Na sloupec asi 50 g basického oxidu hlinitého (3.1.10) se převede 200 ml chloroformu v dávkách po 50 ml, prvních 50 ml se doporučuje znovu vrátit na průtok kolonou.

3.2.3 Chlorid antimonitý, roztok - komplexotvorné činidlo

Příprava: Asi 25 g chloridu antimonitého (SbCl_3), předem uchovaného v exsikátoru (tedy vysušeného) se smíchá se 100 ml chloroformu (3.2.2) a v míchání se pokračuje až je chlorid antimonitý téměř zcela rozpuštěn (malý nerozpuštěný zbytek nevadí). Do této směsi se přidá 2 ml acetanhydridu, promíchá a uloží do chladničky uzavřený v nádobce z hnědého skla zabroušenou zátkou. Takto uchované činidlo je stabilní po dobu několika týdnů.

3.2.4 Retinol, standardní substance vitamínu A o známé aktivitě, ověřené spektrofotometricky

3.2.5 Indikátor fenolftalein

3.3 Pro krmiva (premixy, koncentráty) s obsahem nad 200 000 m.j. v 1 kg

3.3.1 Isopropylalkohol pro chromatografii

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Spektrofotometr pro měření ve viditelné i UV oblasti spektra s příslušenstvím (kyvety optické délky 10 mm, skleněné i křemenné), popřípadě registrační typ
- 4.2 Odparka vakuová s příslušenstvím (baňky s kulatým dnem různého obsahu)
- 4.3 Trubice chromatografická, skleněná vnitřní průměr asi 13 mm, délka 300 mm
- 4.4 Lázeň vodní s termostatem
- 4.6 Chladič zpětný vodní, se zábrusem
- 4.7 Nálevky dělicí vhodných obsahů

5. Postup (poznámka 8.4)

5.1 Navážky zkušební vzorku (s přesností nejméně na)

Koncentráty (obsahy nad 20 000 m.j./kg)	0,1 až 1,0 g (0,001g)
Premixy (obsahy mezi 400 až 20 000 m.j./kg)	3 až 5 g (0,001g)
Minerální směsi	10 až 20 g (0,01 g)
Krmiva (obsahy pod 400 m.j./kg)	30 g (0,1 g)

Navažuje se ve všech případech do kuželové baňky se zábrusem obsahu 500 ml.

5.2 Hydrolýza a extrakce (poznámka 8.5)

Do kuželové baňky s odváženým vzorkem se přidá postupně 40 ml ethylalkoholu (3.1.1), 2 ml roztoku askorbanu sodného (3.1.2) (poznámka 8.6), 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3.1.4) a 2 ml roztoku sirníku sodného (3.1.13), zahřívá se na vodní lázni (4.4) při teplotě 70 až 80 °C pod zpětným chladičem (4.6) po dobu 30 minut. Potom se rychle ochladí proudem studené vody. K hydrolyzátu se přidá 50 ml ethylalkoholu (3.1.1) a přesně 100,0 ml 1,2 dichlorethanu (3.1.7), směs se intenzivně protřepe a po usazení se kapalná část dekantuje do dělicí nálevky. Po přidání 150 ml roztoku hydroxidu draselného (3.1.5) se vytřepává po dobu 30 sekund a po oddělení vrstev se spodní dichlorethanová vrstva odpustí do jiné dělicí nálevky, přidá 40 ml roztoku hydroxidu draselného (3.1.6) a vytřepává opět po dobu 10 sekund. Po oddělení vrstev se spodní dichlorethanová vrstva opět odpustí do další dělicí nálevky a postupně promývá 6 až 8 x po 40 ml vody, přičemž vždy po oddělení vrstev a odpuštění se vodní vrstva zkouší na alkalickou reakci indikátorem fenolftalein. Po zjištění negativní reakce vodné vrstvy se extrakt zbaví posledních zbytků vody pomocí ponoření proužku filtračního papíru. Alikvotní část filtrátu se odpaří na odparce (4.2) za sníženého tlaku při teplotě 40 °C do sucha, odparek se rozpustí ihned v 5 ml petroletheru (3.1.8).

Dále se postupuje podle obsahu vitamínu A ve zkoušeném vzorku.

5.2.1 Krmiva s obsahem vitamínu A vyšším než 20 000 m.j./kg

Roztok připravený podle 5.2 se převede do odměrné baňky na 50 ml, doplní petroletherem (3.1.8) po rysku a promíchá. Alikvotní podíl obsahující, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu A ve zkoušeném vzorku, asi 200 m.j. vitamínu A se odpipetuje

do odpařovací baňky a na odparce (4.2) se odpaří za sníženého tlaku do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 25,0 ml isopropylalkoholu (3.3.1) a roztok se měří na spektrofotometru (4.4) v křemenných kyvetách při vlnových délkách 310, 325 a 334 nm (u registračního typu se pořídí záznam spektra od 310 do 334 nm). Maximum absorpce by mělo být při vlnové délce 325 nm.

Poměr absorbancí $A_{310} : A_{325}$ a $A_{334} : A_{325}$ musí být 6 : 7 t.j. 0,857 s maximální odchylkou 0,830 až 0,880. Není-li tato podmínka splněna, přečistí se extrakt připravený podle 5.2 na chromatografickém sloupci podle 5.4 a postupuje se podle 5.2.2 jako u krmiv s obsahem vitamínu A nižším než 20 000 m.j./kg (poznámka 8.7).

5.2.2 Krmiva s obsahem vitamínu A nižším než 20 000 m.j./kg

5.2.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady vhodných nádobek se diferencovaně odváží množství odpovídající 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 a 15,0 m.j. standardní substance retinolu (3.2.4) s přesností nejméně na 0,001 g. Do každé nádobky se přidá přesně 0,3 ml benzenu (3.2.1), po rozpuštění promíchá, přidá dále přesně 3,0 komplexotvorného činidla (3.2.3) a po promíchání se každý roztok proměří na spektrofotometru (4.1) ve skleněných kyvetách při vlnové délce 610 nm.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících množství se sestojí kalibrační graf. Kalibrační graf se pravidelně ověřuje s čerstvě připravenými kalibračními roztoky i komplexotvorného činidla (3.2.3).

5.2.2.2 Vlastní provedení

Z chromatografické trubice (4.3), umístěné vertikálně, se připraví chromatografický sloupec, do něhož se převede 10 g oxidu hlinitého (3.1.9), předběžně rozmíchaného s petroletherem (3.1.8) na kaši tak, aby sloupec byl asi 200 mm vysoký.

Na takto připravenou kolonu se převede roztok připravený podle 5.2 (poznámka 8.4) a okamžitě se dávkuje na kolonu 20 ml petroletheru (3.1.8). Eluce se provádí postupně přidávanými 10 ml dávkami směsi petrolether-diethylether (3.1.12) v pořadí stoupajícího obsahu diethyletheru t.j. (96 + 4), (92 + 8), (88 + 12), (84 + 16) a (80 + 20) a to buď pod tlakem shora kolony nebo snížením tlaku na spodu kolony tak, aby průtok roztoku sloupcem byl 2 až 3 kapky za sekundu. Při eluci se sloupec v krátkých intervalech osvětluje rtuťovou lampou (4.5). První je eluován karotén (poznámka 8.8), retinol je úplně eluován směsí (3.1.12) 80 + 20. Fluoreskující zóna retinolu je zcela čistě oddělena od následující žluté zóny xanthofylu. Frakce ve kterých je obsažen retinol se shromáždí do odpařovací baňky a roztok se na odparce (4.2) za sníženého tlaku odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 2,0 ml benzenu (3.2.1), po rozpuštění a promíchání se z tohoto odpipetuje přesně 0,3 ml do vhodné nádobky, přidá přesně 3,0 ml komplexotvorného činidla (3.2.3), přičemž se roztok zbarví modře. Přesně 30 sekund po přidání komplexotvorného činidla promíchání se měří absorbance roztoku na spektrofotometru (4.1) ve skleněných kyvetách při vlnové délce 610 nm. Množství vitamínu A v měřeném roztoku se zjistí z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Krmiva s obsahem vitamínu A vyšším než 20 000 m.j./kg (měření v UV oblasti - viz 5.2.1)

Obsah vitamínu A v m.j./g (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{A_{325} \cdot A_0 \cdot F}{m} \quad (\text{poznámka 8.4})$$

kde A_{325} je maximální absorbance, která se nachází mezi 323 nm až 327 nm vlnové délky

A_0 absorpční koeficient pro vitamin A (retinol) (1 830)

F zředovací koeficient

m hmotnost navážky zkušební vzorku

6.2 Krmiva s obsahem vitamínu A nižším než 20 000 m.j./kg (měření ve viditelné oblasti)

Obsah vitamínu A v m.j./kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{1000 \cdot F \cdot m_1}{m}$$

kde m_1 je množství vitamínu A v m.j. zjištěné z kalibračního grafu

F zředovací koeficient

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, kter splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé m.j./kg.

7. Opakovatelnost

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

do 75 000 m.j./kg	20 % relat.
od 75 000 do 150 000 m.j./kg	15 000 m.j.
od 150 000 do 250 000 m.j./kg	10 % relat.
od 250 000 do 500 000 m.j./kg	25 000 m.j.
nad 500 000 m.j./kg	5 % relat.

8. Poznámky

8.1 1 m.j. = 0,3 µg retinolu

8.2 Pro krmiva s obsahem vitamínu A nad 20 000 m.j./kg je tento krok vyžadován jen v určitých případech (viz poznámka 8.7)

8.3 Ethylalkohol, petrolether, diethylether, benzen a isopropylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné dodržovat bezpečnostní pravidla. Zejména případná destilace (regenerace) těchto látek se provádí zahřívacím médiem v bezpečnostním provedení.

8.4 Všechny operace se provádějí při tlumeném světle, pokud možno v nádobkách z hnědého skla, nebo vhodně uzpůsobených proti průniku světla.

8.5 U mléčných krmných směsí nebo v krmivech obsažených surovin, které mají sklon ke shlukování či botnání se dávky činidel uvedené v 5.2.1 zdvojnásobují.

8.6 Pokud se hydrolýza provádí v dusíkové atmosféře, roztok askorbátu sodného není nutné přidávat.

8.7 U krmiv s vitamínem A vyšším než 20 000 m.j./kg se dělení na chromatografickém sloupci provede jen v případě, pokud měření podle 5.2.1 nesplňuje tam uvedené požadavky. Jestliže se chromatografické dělení ukáže nezbytné, odebere se z roztoku připraveného podle 5.2 alikvotní podíl obsahující, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu A ve zkoušeném vzorku, 500 m.j. vitamínu A a postupuje podle 5.2.2.2.

8.8 Obsah karoténu může být stanoven měřením absorpance při vlnové délce 450 nm.

5.1 Stanovení obsahu manganu, zinku, železa a mědi

Metoda je uvedena v metodických postupech laboratorního zkoušení k příloze č. 9 vyhlášky č. 124/2001 Sb., část 8. Mikroelementy

5.2 Stanovení obsahu kobaltu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu kobaltu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Vzorek se zpopelní při 550 °C, popel se rozpustí v kyselině chlorovodíkové a obsah kobaltu se stanoví metodou atomové absorpční spektrometrie.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková ($\rho=1,17 \text{ g/cm}^3$) koncentrovaná

3.2 Kyselina chlorovodíková ($\rho=1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 0,45 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina chlorovodíková ($\rho=1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.4 Kyselina chlorovodíková ($\rho=1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$

3.5 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($\rho=1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.6 Kyselina dusičná ($\rho=1,4 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 1)

3.7 Kobalt, kov 99,9 % (Co), $M_r = 58,93$ (např. Fluka No.60784)

3.7.1 Základní roztok kobaltu

Příloha: Ve vysoké kádince na 800 ml se v minimálním objemu kyseliny dusičné (3.6) rozpustí 0,500 g kovového kobaltu (3.7), po rozpuštění se roztok zahustí k suchu, odparek se rozpustí ve vodě a převede kvantitativně vodou do odměrné baňky na 500 ml, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.2) po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 1,0 mg Co.

3.7.2 Pracovní roztok kobaltu: Do odměrné baňky na 250 ml se pipetuje 10,0 ml základního roztoku kobaltu (3.7.1), doplní se kyselinou chlorovodíkovou (3.2) po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,04 mg Co.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Atomový absorpční spektrometr

4.2 Topná deska s regulovatelnou teplotou

4.3 Muflová pec s regulovatelnou teplotou

4.4 Vodní lázeň

4.5 Ultrazvuková lázeň

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibrační křivky

Do sady odměrných baněk na 100 ml se postupně pipetuje 0,0 - 2,0 - 5,0 - 10,0 - 15,0 - 20,0 a 25,0 ml pracovního roztoku kobaltu (3.7.2), doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.2) po značku a promíchá. Takto připravená sada kalibračních roztoků odpovídá koncentraci 0,0 - 0,8 - 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 a 10,0 mg Co/l.

Podle typu použitého atomového absorbčního spektrometru (4.1) s příslušně nastavenými parametry se proměří absorbance jednotlivých kalibračních roztoků při vlnové délce doporučených parametrů proti kontrolnímu roztoku. Ze získaných údajů se sestrojí kalibrační graf. Při sestrojování kalibračního grafu se vyjadřují hodnoty obsahu v mg/l.

Doporučené parametry:

žhavení lampy	5 - 6 mA
plamen	acetylen-oxid dusný
	acetylen-vzduch
stechiometrie plamene	oxidační plamen

vlnová délka (nm)	šířka štěrbin (nm)	optimální rozsah (mg/l)
240,7	0,1-0,2	2,5 - 10
304,4	0,1-0,2	30 - 160
346,6	0,1-0,2	95 - 380
347,4	0,1-0,2	180 - 710

5.2 Vlastní stanovení

5.2.1 Organická krmiva

5 až 10 g zkušební vzorku se naváží s přesností 0,001 g do spalovací misky předem vyžíhané po dobu 30 minut a v exsikátoru ochlazené.

Spalovací miska se zahřívá na topné desce (4.2) nebo na plynovém kahanu do zuhelnatění vzorku tak, aby se zabránilo vzplanutí vzorku a úniku jednotlivých částic. Potom se spalovací miska se vzorkem vloží do muflové pece (4.3) předem vyhřáté na 550 °C a vzorek se spaluje po dobu 5 hodin a dále tak dlouho, dokud popel neobsahuje černé uhlíkaté částice.

Může také postupovat tímto způsobem: spalovací miska se vloží do studené muflové pece (4.3) a teplota se postupně zvyšuje na teplotu 550 °C tak, aby se tato teplota dosáhla během

2 hodin a pak se popel spaluje po dobu 5 hodin. Obsahuje-li po této době popel černé uhlíkaté částice, po vychladnutí se zkropí asi 2 ml vody, vysuší se v sušárně a dále se spaluje 1 hodinu.

K vychladlému popelu se přidá 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), odpaří se na vodní lázni (4.4) k suchu a vysuší 1 hodinu v sušárně. Vychladlý odparek se pomocí 15 ml kyseliny chlorovodíkové (3.4) a horké vody převede do odměrné baňky na 100 ml a rozpouští se na ultrazvukové lázni (4.5) po dobu 30 minut při teplotě cca 50 °C, potom se obsah odměrné baňky vytemperuje, doplní vodou po značku a promíchá. Obsah odměrné baňky se filtruje středně hustým filtrem do podložené suché nádoby, přičemž první podíl filtrátu (asi 10 ml) se nepoužije.

Dále se postupuje podle druhého odstavce čl. 5.1.

5.2.2 Minerální krmiva

Do odměrné baňky na 100 ml se naváží asi 2 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g, stěny se spláchnou vodou (asi 5 ml) a přidá se 80 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a 5 ml kyseliny dusičné (3.5) a rozpouští se na ultrazvukové lázni (4.5) po dobu asi 30 minut při teplotě 50 °C. Po rozpuštění se obsah odměrné baňky vytemperuje na laboratorní teplotu a doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.2) a promíchá. Obsah odměrné baňky se filtruje středně hustým filtrem do podložené suché nádoby, přičemž první podíl filtrátu (asi 10 ml) se nepoužije. Dále se postupuje podle druhého odstavce čl. 5.1.

6. Výpočet

Obsah kobaltu vyjádřený v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1 \cdot F}{m}$$

kde m_1 je koncentrace kobaltu odečtená z kalibrační křivky vyjádřená v mg/l

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena

8. Poznámky

8.1 Kalibrační graf je v horní části zakřiven v důsledku autoabsorpce a některých rušivých vlivů v plameni. Neruší mnohonásobné obsahy Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Si a W. Pro analýzu

v plameni acetylen-vzduch se doporučuje extrakce Co z prostředí $\text{pH} = 2 - 4$ do methylisobutylketonu.

5.3 Stanovení obsahu selenu.

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 986.15

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení selenu v krmivech.

2. Princip

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

5.4 Stanovení obsahu jódu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody stanovení jódu v premixech - polarografická a titrační jodometrická.

2. Princip

Celkový obsah jódu se stanoví po suché mineralizaci buď oxidací v alkalickém prostředí bromnanem metodou diferenčně pulzní polarografie na visící rtuťové kapkové elektrodě

nebo po oxidaci na jodičnany manganistanem draselným a reakci s jodidem se uvolněný jód stanoví titrací thiosíranem draselným.

3. Chemikálie

3.1 Hydroxid draselný, alkoholický roztok, 10 %, vždy čerstvý

3.2 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = \text{cca } 0,01 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = \text{cca } 0,5 \text{ mol/l}$

3.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = \text{cca } 0,005 \text{ mol/l}$

3.5 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = \text{cca } 5 \text{ mol/l}$

3.6 Bromová voda, nasycený roztok, ne starší 30 dnů

3.7 Bromnan sodný, roztok: 50 ml hydroxidu sodného (3.5) se smíchá s 50 ml bromové vody (3.6)

3.8 Siřičitan sodný bezvodý, nasycený roztok

3.9 Želatina, 0,25 % roztok

3.10 Siřičitan sodný s želatinou: 50 ml roztoku siřičitanu sodného (3.8) se smíchá s 50 ml roztoku želatiny (3.9). Přípravuje se vždy čerstvý.

3.11 Jodid draselný (KI), standard

3.11.1 Základní roztok jódu

Příprava: V odměrné baňce na 1000 ml se rozpustí ve 750 ml vody 1,3082 g jodidu draselného (3.11), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg jódu.

3.11.2 Pracovní roztok jódu

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se pipetuje 5,0 ml základního roztoku jódu (3.11.1), doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,05 mg jódu.

3.12 Ethylalkohol, 96%

3.13 Manganistan draselný, nasycený roztok

3.14 Chlorid amonný, roztok 10 g/l

3.15 Hydroxid sodný, roztok 40 g/l

3.16 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.17 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,01 \text{ mol/l}$

3.18 Indikátor fenolftalein, ethanolický roztok 0,1%

3.19 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$, roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$)

3.20 Jodid draselný, krystalický nebo roztok 100 g/l

3.21 Škrobový indikátor

Příprava: V 10 ml vody se rozpustí 2,0 g chloridu sodného, 2 g rozpustného škrobu a suspenze se vlije do 80 ml vody a za míchání se ochladí. Uchovává se v chladničce a je stálý po dobu 10 dní.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Polarograf, vhodné konstrukce

4.2 Vodní lázeň s teplotní regulací

4.3 Muflová pec s regulovatelnou teplotou

5. Postup

5.1 Polarografické stanovení jódu v premixech

5.1.1 Mineralizace

Do platinové misky se naváží 0,5 až 10 g zkušební vzorku (tj. takové množství, aby se množství jódu pohybovalo v rozmezí 0,1 až 0,4 mg) s přesností na 0,001 g, rozmíchá se s 5 až 10 ml čerstvě připraveného alkoholického roztoku hydroxidu draselného (3.1). Množství roztoku hydroxidu draselného musí být takové, aby byl vzorek dokonale smočen a dobře se promíchal. Zkušební vzorek se dokonale vysuší na vodní lázni (4.2) při teplotě 90 až 95 °C (lázeň nesmí vařit) asi 30 minut. Po vysušení vzorku se platinová miska se zkušebním vzorkem umístí do studené muflové pece (4.3) a pozvolna se spaluje při teplotě 300 °C asi 30 minut. Poté se teplota zvýší na 520 °C a spaluje se ještě 1 hodinu.

K vychladlému popelu se přidá 15 až 20 ml horké vody, řádně se promíchá a případné kruty se rozeprou tyčinkou a popel se nechá neiterovat asi 30 minut. Výluh s nespáleným zbytkem se převede kvantitativně do odměrné baňky na 25 ml (objem mineralizátu lze upravit odpařením na vodní lázni při teplotě 90 až 95 °C v platinové misce), po vytemperování na laboratorní teplotu se odměrná baňka doplní vodou po značku a promíchá. Nespálený zbytek se nechá sedimentovat do druhého dne. Pro další postup se použije pouze čirý mineralizát.

5.1.2 Vlastní měření

Do dvou vysokých kádinek na 25 ml se pipetuje takové množství mineralizátu, které obsahuje asi 0,03 až 0,04 mg jódu a do jedné kádinky se přidá asi 0,6 až 0,8 ml pracovního roztoku jódu (3.11.2) a objem v obou kádinkách se upraví na 10 ml. Hodnota pH v obou kádinkách se upraví (kontrola pH-metrem nebo na vodný roztok methylové červeně) pomocí roztoku (3.2, 3.3 nebo 3.4) na hodnotu pH 6,3. Objem v obou kádinkách se upraví na stejný objem vodou podle spotřeby neutralizačních roztoků. Objem v obou kádinkách musí být vždy stejný. Pak se přidá do každé kádinky 1 ml roztoku bromnanu sodného (3.7) a míchá se 2 až 3 minuty. Pak se přidá 1 ml roztoku siřičitanu sodného (3.10) a po promíchání se roztok převede do polarografické nádoby.

V takto připraveném roztoku se po 10 minutovém probublávání dusíkem a míchání polarografickým míchadlem stanovuje obsahu jódu metodou diferenčně pulzní polarografie na visící rtuťové kapkové elektrodě.

Podmínky metody:

modulační amplituda	50 mV
Referenční elektroda	argentchloridová
pomocná	platinová
stabilizace kapky	2 minuty
potenciál	-800 až -1700 mV

Stejným způsobem se proměří slepý pokus.

5.2 Jodometrické stanovení jódu v premixech

5.2.1 Mineralizace zkušební vzorku se provede podle postupu 5.1.1.

Popel se kvantitativně převede horkou vodou do kádinky na 250 ml a povaří se. Výluh se zfiltruje přes středně hustý papírový filtr do 250 ml kádinky a filtr se důkladně promyje horkou vodou. Filtrát se zneutralizuje roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.19) na indikátor fenoltalein (3.18) a potom zalkalizuje roztokem hydroxidu sodného (3.15). K takto upravenému filtrátu se přidá 1 - 2 ml roztoku manganistanu draselného (3.13) (poznámka 8.2) a ještě 0,5 ml navíc. Roztok se vaří po přidání varných kuliček 5 minut. Potom se přidají 2 ml ethylalkoholu (3.12) a digeruje se na vodní lázni až do vysrážení kysličníku manganičitého. Roztok se zfiltruje do titrační baňky (poznámka 8.3), zbytek na filtru se promyje 3 x 2 ml horkého roztoku chloridu amonného (3.14). Po ochlazení se přidají 2 g jodidu draselného

(3.20), 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.19) a titruje se odměrným thiosíranu sodného (poznámka 8.4) na škrobový indikátor (poznámka 8.5).

6. Výpočet

6.1 Polarografické stanovení

Obsah jódu vyjádřený v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce

$$X = \frac{C_{STD} \cdot H_X \cdot V \cdot V_{STD}}{(H_S - H_X) \cdot V_P \cdot m}$$

kde H_X je výška polarografického píku zkušební vzorku v mm

H_S výška polarografického píku zkušební vzorku po přidavku standardu v mm

V_{STD} objem přidaného standardu v ml

C_{STD} koncentrace standardu v mg/l

V_P pipetovaný objem mineralizátu do polarografické nádoby v ml

V konečný objem mineralizátu v ml

m hmotnost zkušební vzorku v g

Výsledek je aritmetický průměr dvou paralelních stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 mg/kg.

6.2 Titrační jodometrické stanovení

Obsah jódu vyjádřený v mg/kg (Y) se vypočítá z množství spotřebovaného odměrného roztoku thiosíranu sodného podle následujících vztahů:

1 ml 0,1 mol/l thiosíranu sodného (3.16) odpovídá 2,77 mg KI nebo

1 ml 0,1 mol/l thiosíranu sodného (3.16) odpovídá 2,50 mg NaI nebo

1 ml 0,1 mol/l thiosíranu sodného (3.16) odpovídá 2,12 mg I

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena

8. Poznámky

8.1 Při očekávaném obsahu jódu do 100 mg/kg se volí navážka vzorku 10 g a přidává se 5 ml roztoku hydroxidu draselného. Při očekávaném obsahu jódu od 100 do 1000 mg/kg se navažuje 5 g vzorku a přidává 10 ml hydroxidu draselného. Při očekávaném obsahu jódu nad 1000 mg/kg se navažuje 1 g vzorku a přidává 10 ml hydroxidu draselného.

Pokud vzorek neobsahuje žádný organický materiál nebo ho obsahuje jen velmi malý podíl.

8.2 Množství manganistanu draselného musí být takové, aby se zoxidoval veškerý jodid draselný na jodičnan. Zbarvení typické pro manganistan draselný musí vydržet minimálně 1,5 minuty, v případě, že se objeví zbarvení typické pro kysličník manganičitý, je potřebné zvýšit množství přidávaného manganistanu draselného.

8.3 Filtrát musí být čirý, zákal svědčí o přítomnosti kysličníku manganičitého, který zvyšuje výsledek stanovení.

8.4 Při obsahu jódu do 100 mg/kg se titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.17), při obsahu nad 100 mg/kg odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.16).

8.5 Roztok škrobu je nutné přidat až těsně před koncem titrace.

6.1 Stanovení obsahu oxidu křemičitého

Metoda je uvedena v metodických postupech laboratorního zkoušení k příloze č. 9 vyhlášky č. 124/2001 Sb., část 7. Makroelementy

6.2 Stanovení obsahu oxidu hlinitého

Metoda je uvedena v metodických postupech laboratorního zkoušení k příloze č. 9 vyhlášky č. 124/2001 Sb., část 7. Makroelementy

7.1 Vyhodnocování a výpočet výsledků stanovení doplňkových látek difúzní plotnovou metodou

1. Účel a rozsah

Tato metoda uvádí a specifikuje uzančně závazný způsob pro vyhodnocování a výpočet výsledků při stanovení obsahu doplňkových látek v premixech a krmných směsích plotnovou difúzní metodou.

2. Princip

Průměry inhibičních resp. stimulačních zón, vzniklých při stanovení doplňkových látek difúzní plotnovou metodou, se měří pomocí odpichovátka s přesností nejméně na 0,1 mm.

Ze souboru takto získaných hodnot se vypočítá aritmetický průměr pro každou koncentraci zkoušeného vzorku i standardu.

3. Výpočet

Z průměru délek zón odměřených odpichovátkem se vypočítá aritmetický průměr pro každou koncentraci zkoušeného vzorku i standardu tj. průměrné hodnoty.

Z rozdílu součtu vyšší a nižší průměrné hodnoty délky zón zkoušeného vzorku a vyšší i nižší průměrné hodnoty délky zón standardu se vypočítá parametr (V):

$$V = (V_1 + V_2) - (S_4 + S_2)$$

při ředění 2 : 1 $V = (V_1 + V_2) - (S_4 + S_2)$

při ředění 4 : 1 $V = (V_4 + V_1) - (S_4 + S_1)$

Ze součtu rozdílů vyšší a nižší průměrné hodnoty délky zón zkoušeného vzorku a vyšší i nižší průměrné hodnoty délky zón standardu se vypočítá parametr (W):

při ředění 2 : 1 $W = (V_4 - V_2) + (S_4 - S_2)$

při ředění 4 : 1 $W = (V_4 - V_1) + (S_4 - S_1)$

Z parametrů V a W se vypočítá účinnost v % (X):

a) při ředění 2 : 1 $X_1 = \text{anti log } M_1$

kde $M_1 = 2 + (0,301 \cdot \frac{V}{W})$

kde X_1 je účinnost v % při ředění 2 : 1

V, W parametry vypočtené při ředění 2 : 1

b) při ředění 4 : 1

$$X_2 = \text{anti log } M_2$$

kde

$$M_2 = 2 + (0,602 \cdot \frac{V}{W})$$

kde X_2 je účinnost v % při ředění 4 : 1

V, W parametry vypočtené při ředění 4 : 1

Obsah doplňkové látky (účinnost) v mg/kg X se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{b \cdot X_i}{100}$$

kde b je předpokládaná účinnost v mg/kg

X_i aritmetický průměr X_1 a X_2

8.1 Stanovení ethoxychinu

Tato metoda je překladem z LUFA č. 15.2.1

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení ethoxychinu (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylchinolin) v krmivech.

2. Princip

Ethoxychin je ze vzorku extrahován methylalkoholem a alikvotní podíl extraktu je po zředění vodou reextrahován do petroletheru a ethoxychin je stanoven fluorimetricky.

3. Chemikálie

3.1 Methylalkohol (poznámka 8.1)

3.2 Petrolether, frakce s bodem varu 40 až 60 °C (poznámka 8.1)

3.3 Chlorid sodný (krystalická forma)

3.4 Síran chininu - referenční roztok, 1 µg/ml v roztoku kyseliny sírové c(H₂SO₄) = 0,05 mol/l

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 0,100 g síranu chininu, předem vysušeného při teplotě 120 °C po dobu 3 hod a ochlazeného v exsikátoru, rozpustí se v 0,1 mol/l roztoku kyseliny sírové, doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.5 Ethoxychin, standardní substance

3.6 Ethoxychin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 100,0 mg standardní substance ethoxychinu (3.5), rozpustí se v petroletheru (3.2), doplní tímtež po rysku a promíchá. 1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 1,0 mg ethoxychinu.

3.7 Ethoxychin, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního

8.2 Stanovení obsahu BHA, BHT, galátů

Tato metoda je uvedena v Journal of the Association of Official Analytical Chemists (Vol.66, No.3, 1983)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení BHA, BHT, galátů v tucích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

BHA, BHT, galáty jsou antioxidanty. BHA je chemicky 2,(nebo 3)butyl-4-hydroxyanisol, BHT 2,6-di-terc.butyl-4-methylfenol, dodecylgalát $C_{19}H_{30}O_5$, oktylgalát $C_{15}H_{22}O_5$, propylgalát $C_{10}H_{12}O_5$.

2. Princip

Vzorek se rozpustí v hexanu a BHA, BHT, galáty se extrahují acetonitrilem. Roztok po zakoncentrování se naředí isopropanolem a dávkuje se do vysokoúčinného kapalinového chromatografu (dále jen HPLC) s použitím UV detekce při 280 nm.

roztoku ethoxychinu (3.6), doplní petroletherem (3.2) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku ethoxychinu obsahuje 50 μg ethoxychinu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrální fluorimetr (spektrofotometr s fluorescenčním zařízením) s příslušenstvím (křemenné kyvety 10 mm)

4.2 Vata skelná

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml pracovního standardního roztoku ethoxychinu (3.7), doplní po rysku petroletherem (3.2) a promíchá (kalibrační roztok A). Z tohoto roztoku se odpipetuje do odměrné baňky na 20 ml přesně 10,0 ml (kalibrační roztok B) a do odměrné baňky na 25 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml (kalibrační roztok C), každá z těchto baněk se doplní petroletherem (3.2) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím ethoxychinu, $A = 2,5 \mu\text{g/ml}$, $B = 1,25 \mu\text{g/ml}$ a $C = 0,50 \mu\text{g/ml}$.

5.1.2 Spektrální fluorimetr (4.1) s kyvetou naplněnou petroletherem (3.2) se nastaví na nulovou hodnotu a s kyvetou naplněnou referenčním roztokem (3.4) se nastaví na hodnotu 100. Měří se fluorescence kalibračních roztoků (A + B + C), resp. roztoku zkoušeného vzorku při vlnové délce buzení 365 nm a vlnové délce měření 460 nm.

5.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf μg etoxychinu v 1 ml.

5.2 Vlastní provedení

Do kádinky vhodného objemu se odváží přesně 10,0 g jemně mletého zkušebního vzorku, přidá se 50 ml methylalkoholu (3.1), promíchá a ponechá asi 10 minut ustát. Potom se roztok s pevným podílem dekantuje přes skelnou vat (4.2) a filtrát se jímá do odměrné baňky na 250 ml. Zbytek v kádince se ještě 2 x promyje dekantací 50 ml methylalkoholu (3.1) opět do stejné odměrné baňky, tato se doplní methylalkoholem (3.1) po rysku a promíchá.

Do dělicí nálevky na 250 ml se odpipetuje alikvotní podíl 25 ml extraktu, přidá 100 ml vody a dobře promíchá. Potom se přidá 50 ml petroletheru (3.2) a uzavřená dělicí nálevka se asi 1 minutu mírně protřepává. Po rozdělení fází (poznámka 8.2) se spodní vodná vrstva odpustí do kádinky. Petroletherový extrakt se převede do druhé dělicí nálevky a do první dělicí nálevky se převede vodná vrstva z kádinky. Tato vodná vrstva se znovu extrahuje s 25 ml petroletheru (3.2) a po rozdělení se spodní vodná vrstva odpustí a dále se nepoužije. Ke spojeným petroletherovým extraktům se přidá 50 ml vody a po uzavření se dělicí nálevka lehce protřepe. Po oddělení se spodní vodná vrstva odpustí a dále se nepoužije. Petroletherový extrakt se převede do odměrné baňky na 100 ml, baňka se doplní petroletherem (3.2) po rysku a promíchá. Dále se postupuje podle 5.1.2.

Koncentrace etoxychinu se zjistí z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah etoxychinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{100 \cdot C}{m}$$

kde C je koncentrace etoxychinu zjištěná z kalibračního grafu v $\mu\text{g/ml}$

m alikvotní podíl navážky zkušebního vzorku v g (při přesném dodržení postupu = 1)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg .

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Methylalkohol a petrolether jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, methylalkohol je navíc nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s těmito je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Je-li k dispozici materiál bez detekovatelného obsahu ethoxychinu, potom je lépe provést kalibraci s použitím tohoto materiálu. K tomu se připraví modelové vzorky s obsahy 0 až 250 µg ethoxychinu v 1 g vzorku a postupuje se podle 5.2.

Sestrojení kalibračního grafu podle 5.1 se používá zvláště při kontrole technologie a výsledky se pohybují v přesnosti 97 až 98 %. Nad obsah 100 mg/kg se používá tento způsob výhradně.

9.1 Stanovení kapsatinu v paprice

Tato metoda je překlad z LUFA č. 12.2.1

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu barviva vyjádřeného jako kapsatin, převažujícího barviva papriky.

2. Princip

Kapsatin se stanoví po extrakci vzorku benzenem způsobem podle Benedikta spektrofotometricky.

3. Chemikálie

3.1 Benzen (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr nebo fotokolorimetr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 496 nm s příslušenstvím (kyvety optické délky 10 mm)

4.2 Třepačka vhodné konstrukce

4.3 Sušárna laboratorní pro teploty do 70 °C

4.4 Odstředivka vhodné konstrukce

5. Postup

Malé množství rozemletého zkušební vzorku (papriky) se suší v tenké vrstvě v sušárně (4.3) při 65 až 70 °C po dobu 2 hod a na laboratorní teplotu se ochladí v exsikátoru. Z tohoto vysušeného vzorku se odváží asi 0,25 g s přesností nejméně na 0,001 g do kuželové baňky na 100 ml, přidá se přesně 50,0 ml benzenu (3.1) a na třepačce (4.2) se vytřepává 30 minut. Potom se nechá ustát, popř. odstředí (4.4), a po usazení pevného podílu se z čirého extraktu nebo supernatantu se odpipetuje přesně 5,0 ml do odměrné baňky na 50 ml, doplní benzenem (3.1) po rysku a promíchá. Absorbance extraktu se měří na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetě proti benzenu (3.1) při vlnové délce 496 nm (poznámka 8.2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah celkového obsahu barviva, vyjádřeného jako kapsatin v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 20 \cdot C$$

kde C je koncentrace zjištěná z tabulky č.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg.

Tabulka č.1

Absorbance (k)	Koncentrace kapsatinu v mg/100 ml	k/C
0,2	0,101	1,98
0,3	0,153	1,96
0,4	0,205	1,95
0,5	0,257	1,95
0,6	0,310	1,94
0,7	0,363	1,93
0,8	0,416	1,92
0,9	0,469	1,92
1,0	0,522	1,92
1,1	0,575	1,92

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Benzen je nebezpečnou hořlavinou I.třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Modifikací této metody (André) se lze vyhnout měření ve strmé části absorpční křivky (496 nm) a měří se absorbance v isobestickém bodu karotenoidu papriky při vlnové délce 477 nm. Výsledky se pak počítají s ohledem na specifickou absorbanci kapsatinu v benzenu $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 1826$ a spektrofotometr se kalibruje podle Basslera navrženým roztokem chloridu kobaltnatého a dvojchromanu draselného:

Ve 100 ml odměrné baňce se rozpustí 1,3500 g hexahydrátu chloridu kobaltnatého ($\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) a 0,0125 g dvojchromanu draselného ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) v 5 % kyselině sírové, doplní toutéž po rysku a promíchá. Absorbance tohoto kalibračního roztoku se měří při vlnové délce

477 nm proti 5 % kyselině sírové v 10 mm kyvetách a má být 0,315 s přesností 0,002. Při vyšších odchylkách se zavádí faktor

$$f = \frac{0,315}{A}$$

kde A je naměřená absorbance kalibračního roztoku

Tímto faktorem se výsledky stanovení násobí. Tato modifikace však vykazuje poněkud vyšší výsledky proti nemodifikované metodě.

9.2 Stanovení obsahu nativních a přidaných karotenoidů

Tato metoda je překlad z LUFA č. 12.3.1

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody. Jedna z nich (A) specifikuje podmínky pro stanovení esterů kyseliny apo-karotinové, citranaxantinu a kantaxantinu, druhá (B) specifikuje podmínky pro stanovení karotenů, veškerých xantofylů, luteinu a zeaxantinu.

2. Princip

Metoda A:

Vzorek je fermentován a extrahován chloroformem. V tomto extraktu jsou obsaženy estery kyseliny apo-karotinové, citranaxantin a kantaxantin. Extrakt pro stanovení karotenů, esterů kyseliny apo-karotinové a citranaxantinu je reextrahován do hexanu a dělením na sloupci oxidu hlinitého jsou získány frakce esterů kyseliny apo-karotinové (I) a citranaxantinu (II), v nichž se estery kyseliny apo-karotinové a citranaxantin stanoví spektrofotometricky. Karotenová frakce se nepoužije.

Pro stanovení kantaxantinu v samotných krmivech se chloroformový extrakt zmýdelňuje a na sloupci oxidu hlinitého se oddělí od karotenů. Zbývající přítomné karotenoidy jsou odděleny pomocí chromatografie na tenké vrstvě (dále jen "TLC") a kantaxantin je stanoven spektrofotometricky.

Metoda B:

Vzorek je po zmýdelnění extrahován diethyletherem, alikvotní část extraktu je reextrahována do hexanu a na sloupci oxidu hlinitého je rozdělena do dvou frakcí.

Frakce I obsahuje alfa, beta a gama karoteny, které se stanoví přímo spektrofotometricky.

Mezifrakce obsahující částečně estery kyseliny apo-karotinové a částečně i citranaxantin se dále nepoužije.

Frakce II obsahuje kantaxantin, veškeré xantofily, lutein a zeaxantin. V této frakci se nejprve spektrofotometricky změří karoteny a nekorigované xantofyly, pak se alikvotní část této frakce extrahuje hexanem a po oddělení s Hyflo-supergelem nebo s Dicalit-magnesiem se stanoví lutein a zeaxantin spektrofotometricky. U celkových xantofylů se provede korekce.

3. Chemikálie

3.1 Pepsin (např. od fy Siegfried, Zofingen, Swiss č. kat. 226780)

3.2 Trypsin, aktivity 1 : 3 000 NF XI (např. od fy Serva, Heidelberg č.kat.31855)

3.3 Fermentační směs

Příprava: 5 g pepsinu (3.1) a 5 g trypsinu (3.2) se rovnoměrně rozetře v třecí misce a promíchá.

3.4 Amoniak, zředěný (1 + 1)

3.5 Kyselina chlorovodíková 37%, zředěná (1 + 1)

3.6 Chloroform

3.7 Síran sodný, vyžíhaný

3.8 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.9 Oxid hlinitý 12 % deaktivovaný

Příprava: Oxid hlinitý neutrální (aktivity I) se vyžihá při 750 °C asi 2 až 3 hod., ochladí v exsikátoru. Před použitím se protřepe s 12 % vody a převede do uzavřené nádoby.

3.10 Diethylether (3.22) 2 % v hexanu (3.8) (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odpipetuje 20 ml diethyletheru (3.22), doplní n-hexanem (3.8) po rysku a promíchá.

3.11 Diethylether 5 % v hexanu (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odpipetuje 50 ml diethyletheru (3.22), doplní n-hexanem (3.8) po rysku a promíchá.

3.12 Diethylether 10 % v hexanu (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odpipetuje 100 ml diethyletheru (3.22), doplní n-hexanem (3.8) po rysku a promíchá.

3.13 Chloroform (3.4) - aceton (3.30), směs (1 + 1)

3.14 Cyklohexan (poznámka 8.1)

3.15 Deska pro chromatografii na tenké vrstvě (TLC) s vrstvou sikagelu 60 F₂₅₄, síla vrstvy 0,25 mm

3.16 Citranaxantin (pro kvalitativní použití jako okrajový standard pro TLC)

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odváží 500 mg 10 % koncentráту citranaxantinu (komerční výrobek), přidají se 2 ml zředěného amoniaku (3.4), na špičku nože fermentační směsi (3.3), baňka se promíchá a umístí na 10 minut na vodní lázeň (4.4) vytemperovanou na 50 °C. Po ochlazení se přidá 25 ml chloroformu (3.6), baňka se uzavře, vloží na třepačku (4.2) a vytřepává se po dobu 30 minut. Pak se doplní chloroformem (3.6) po rysku, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky a první podíl filtrátu se nezachycuje. Z filtrátu se odpipetuje 5 ml do odměrné baňky na 50 ml, doplní chloroformem (3.6) po rysku a promíchá.

Tento roztok obsahuje 100 µg citranaxantinu v 1 ml.

3.17 Kantaxantin (pro kvalitativní použití jako okrajový standard pro TLC)

Příprava: shodná s 3.16 - navážka z 10 % koncentráту kantaxantinu.

1 ml roztoku obsahuje 100 µg kantaxantinu.

- 3.18 Ethylalkohol bezvodý (poznámka 8.1)
- 3.19 Hydroxid draselný, roztok 50 g/100 ml
- 3.20 Petrolether, frakce o bodu varu 40 - 60 °C (poznámka 8.1)
- 3.21 Hydrochinon pevný
- 3.22 Diethylether peroxidů prostý (poznámka 8.1)
- 3.23 Voda destilovaná, nasycená diethyletherem
Příprava: Asi 200 ml diethyletheru (3.22) se v dělicí nálevce vytřepává po dobu asi 2 minut se 700 ml destilované vody a spodní fáze se použije k analýze.
- 3.24 Oxid hořečnatý pro chromatografii (např. Serva)
- 3.25 Hyflo-super-gel nebo Dicalit
- 3.26 Aceton 10 % v hexanu (poznámka 8.1)
Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 100 ml acetonu (3.30), doplní po rysku n-hexanem (3.8) a promíchá.
- 3.27 Aceton 20 % v hexanu (poznámka 8.1)
Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 200 ml acetonu (3.30), doplní po rysku n-hexanem (3.8) a promíchá.
- 3.28 Aceton 30 % v hexanu (poznámka 8.1)
Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 300 ml acetonu (3.30), doplní po rysku n-hexanem (3.8) a promíchá.
- 3.29 Vyvíjecí směs dichlormethan-hexan-diethylether (4 + 4 + 2)
- 3.30 Aceton (poznámka 8.1)
- 3.31 Ethylalkohol-benzen, směs (1 + 1) (poznámka 8.1)
- 3.32 Dusík

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Spektrofotometr registrační s příslušenstvím (kyvety o optické délce 10 mm)
- 4.2 Třepačka vhodné konstrukce
- 4.3 Odparka rotační
- 4.4 Lázeň vodní s termostatem
- 4.5 Trubice chromatografická, délka 300 mm, průměr 20 mm, s vytaženou špičkou, fritou a vypouštěcím kohoutem
- 4.6 Kelímek filtrační o pórozitě 4 (S₄)
- 4.7 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.8 Odstředivka laboratorní

4.9 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.10 Vata obvazová

4.11 Baňky odpařovací s kulatým dnem a zábrusem, obsahu 1 000, 250 a 100 ml a se zařízením pro přívod plynu

4.13 Mikrodávkovač

4.14 Lžička malá a úzká

5. Postup

5.1 Metoda A - stanovení esterů kyseliny apo-karotinové, citranaxantinu a kantaxantinu

Do odpařovací baňky (4.12) na 1 000 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, aby s ohledem na deklarovaný obsah obsahovalo asi 25 až 300 µg esterů kyseliny apo-karotinové, citranaxantinu nebo kantaxantinu, přidá se 100 ml vody, na špičku nože fermentační směsi (3.3) a 3 ml zředěného amoniaku (3.4). Po promíchání se baňka umístí na odparku (4.3) a ponechá při mírných otáčkách ve vodní lázni (4.4) vytemperované na 50 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidává zředěná kyselina chlorovodíková (3.5), až směs dosáhne pH=3 (pH papírek). Dále se přidá přesně 200 ml chloroformu (3.6) (V_1), baňka se zazátkuje a po dobu 30 minut se vytřepává na třepačce (4.2). Část této směsi se pak odstředí na odstředivce (4.8), vodní fáze se opatrně odsaje a dále nepoužije, chloroformová fáze (aliquotní podíl) se filtruje středně hustým filtrem, naplněným síranem sodným (3.7) do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.1.1 Pro stanovení esterů kyseliny apo-karotinové a citranaxantinu se odpipetuje přesný aliquotní podíl filtrátu chloroformového extraktu, který obsahuje asi 6 až 50 µg karotenoidů (V_2) (např. 25 ml) do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, tato se umístí na odparku (4.3) a pod přívodem dusíku (3.32) se obsah odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 5,0 ml n-hexanu (3.8).

Chromatografický sloupec se připraví tak, že chromatografická trubice (4.5) se umístí ve vertikální poloze, na výpustní uzávěr se vloží smotek vaty (4.10), trubice se naplní n-hexanem (3.8) a do ní se převede takové množství deaktivovaného oxidu hlinitého (3.9), aby sedimentovalo ve výšce asi 80 mm. Hexan se pak odpustí až k vrcholu sloupce oxidu hlinitého.

Na takto připravený sloupec se převede celý hexanový extrakt vzorku, přičemž baňka, ve které byl extrakt, se nejméně 4 x vypláchne po 10 ml n-hexanu (3.8) a výplach se vždy převede rovněž na sloupec. Ze spodu vytékající kapalina (hexan) se dále pro stanovení nepoužije. Potom se na sloupec převede asi 5 x po 10 ml 2 % diethyletheru v hexanu (3.10), průtok se jímá do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, čímž se citranaxantin a kantaxantin v horní části sloupce pomalu rozdělují, zatímco estery kyseliny apo-karotinové postupují sloupcem dolů. Nyní se na sloupec převede 5 x po 10 ml 5 % diethyletheru v hexanu (3.11). Protože estery kyseliny apo-karotinové musí být kvantitativně eluovány, k čemuž 50 ml 5 % diethyletheru v hexanu někdy nedostačuje, je nutno postup eluce vizuálně kontrolovat.

V případě, že eluce esterů kyseliny apo-karotinové není u konce, přídavky po 10 ml 5 % diethyletheru v hexanu (3.11) se opakují až se tak stane. Průtok se jímá do stále stejné baňky (Frakce I), obsahující kvantitativně estery kyseliny apo-karotinové.

Potom se pod sloupec postaví další odpařovací baňka (4.12) na 250 ml, na sloupec se převádí 5 x po 10 ml 10 % diethyletheru v hexanu (3.12) a jímá se citranaxantin (Frakce II).

Frakce I se na odparce (4.3) a vodní lázni (4.4), vytemperované na 50 °C pod přívodem dusíku (3.32) odpaří do sucha a odparek se ihned rozpustí v přesně 0,5 ml chloroformu (3.6) (V₃), přidá se přesně 50,0 ml cyklohexanu (3.14) (V₄). Při navážce vzorku obsahující 25 až 100 µg esterů kyseliny apo-karotinové se přidá jen 10,0 ml (V₄). Po rozpuštění a promíchání se měří na spektrofotometru (4.1) od 600 do 400 nm v 10 mm kyvetách proti cyklohexanu (3.14) jako slepému pokusu.

Maximum absorbance má být u 446 nm.

5.1.2 Frakce II se rovněž za stejného postupu a podmínek jako Frakce I (viz 5.1.1) odpaří do sucha, odparek se rozpustí v přesně 0,5 ml chloroformu (3.6) (V₃), přidá se přesně 50,0 ml hexanu (3.8) (V₄). Při navážce vzorku obsahující 25 až 100 µg citranaxantinu se přidá jen 10,0 ml (V₄). Po rozpuštění a promíchání se měří koncentrace citranaxantinu na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetách od 600 do 400 nm proti hexanu (3.8) jako slepému pokusu.

Maximum absorbance má být u 468 nm.

5.1.3 Pro stanovení kantaxantinu se odebere přesný alikvotní podíl filtrátu získaného podle 5.1, který obsahuje asi 6 až 50 µg kantaxantinu (V₂) (např. 25 ml) do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, tato se umístí na odparku (4.3) a obsah se pod přívodem dusíku (3.32) odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 60 ml ethylalkoholu (3.18), přidá se 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3.19), 10 ml petroletheru (3.20), na špičku nože hydrochinonu (3.21) a po promíchání se zahřívá pod zpětným chladičem (4.9) na vodní lázni (4.4) při teplotě 70 až 80 °C po dobu 30 minut. Obsah baňky se po vychladnutí převede do dělicí nálevky, baňka se vypláchne 100 ml diethyletheru (3.22) a výplach se převádí rovněž do téže dělicí nálevky. Směs se opatrně promíchá s diethyletherovou fází, přičemž před vlastní extrakcí je nutno dělicí nálevku několikrát odvzdušnit. Když již nevzniká přetlak dělicí nálevkou se silně protřepe. Po úplném oddělení fází se spodní vodná fáze odpustí do druhé dělicí nálevky a znovu se přidá do ní 100 ml diethyletheru (3.22), extrakce se opakuje, jak výše uvedeno a pak ještě jednou. Vodní fáze se potom odpustí a dále se nepoužije.

Diethyletherové fáze se spojí a nejméně 3 x promyjí vždy po 100 ml vody do neutrální reakce (pH papírek). Potom se diethyletherový extrakt převede do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, tato se umístí na odparku (4.3) a obsah se odpaří za přívodu dusíku (3.32) při teplotě 30 °C do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 0,5 ml n-hexanu (3.8).

Chromatografický sloupec se připraví stejně, jak je uvedeno v 5.1.1, na sloupec se převede celý hexanový extrakt vzorku, přičemž baňka, ve které byl rozpuštěn odparek, se 4 x vypláchne po 10 ml n-hexanu (3.8) a výplach se vždy převede na sloupec. Ze spodu vytékající kapalina (hexan) se dále pro stanovení nepoužije. Potom se na sloupec převede 5 x po 10 ml směsi chloroform-aceton (3.13) a eluát se jímá do odpařovací baňky (4.2) na 250 ml. Tato frakce obsahuje veškerý kantaxantin s malým podílem esterů kyseliny apo-karotinové a

citranaxantinu. Odpařovací baňka s chloroform-acetonovým extraktem se umístí na odparku (4.3) a obsah se pod přívodem dusíku (3.32) odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 2,0 ml chloroformu (3.6) (V_3). Při obsahu 6 až 30 μg kantaxantinu v navážce se přidá pouze 1,0 ml chloroformu (V_3). Roztok V_3 má obsahovat 30 až 100 μg kantaxantinu. Z tohoto roztoku se rychle (ztráty odpařením) nanese mikrodávkovačem (4.13) přesně 0,5 ml (V_4) na desku TLC (3.15), nebo aby se zamezilo ztrátám při odpařování je možno odparek rozpustit vždy v 1 ml chloroformu a celé množství převést na desku, přičemž baňku ještě vícekrát vypláchnout malým množstvím chloroformu a všechno převést na desku. Na této desce (3.15) se nanese po 0,02 ml citranaxantinového (3.16) a kantaxantinového (3.17) extraktu, jako okrajové standardy a vyvíjecí směsi (3.29).

Okrajový standard citranaxantinu tvoří dvě zóny cis-citranaxantinu (oranžovou) nad silně rudě zbarvenou zónou trans-citranaxantinu.

Kantaxantin jako okrajový standard ukazuje pod citranaxantinovou zónou slabě žlutou cis-kantaxantinovou a přímo pod ní silně červeně zbarvenou trans-kantaxantinovou zónu.

Zmýdlením vzniká třetí růžová zóna, která leží přes červenou zónu trans-axantinu. Tři kantaxantové zóny se dohromady seškrábou do malé odpařovací baňky (4.12) a rozpustí s 3 x po 10 ml (event. i více - vizuální kontrola) směsi chloroform-aceton (3.13). Eluát se na odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) při teplotě 50 °C pod přívodem dusíku (3.31) odpaří do sucha, rychle se rozpustí v přesně 0,5 ml chloroformu (3.6), přidá se přesně 10 ml popř. 5,0 ml cyklohexanu (3.14) (V_5) a měří se na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetách od 600 do 400 nm proti cyklohexanu (3.14) jako slepému roztoku.

Maximální absorbce má být při vlnové délce 470 nm.

5.2 Metoda B - stanovení karotenů, xantofylů, luteinu a zeaxantinu

Do zmýdelňovací baňky (4.12) na 250 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, který obsahuje s ohledem na očekávaný obsah ve zkoušeném vzorku 200 až 400 μg obsahu celkových xantofylů. Při obsahu celkových xantofylů ve vzorku 1 až 5 mg/kg se navažuje tak, aby množství xantofylů v navážce bylo asi 30 až 150 μg . K navážce vzorku se přidá 60 ml ethylalkoholu (3.18), 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3.19), 10 ml petroletheru (3.20) s přídatkem na špičku nože hydrochinonu (3.21) a zmýdelňuje se pod zpětným chladičem (4.9) na vodní lázni (4.4) vytemperované na 70 - 80 °C pod dusíkem (3.31) a za občasného zamíchání 30 minut. Po ochlazení pod tekoucí vodou se zmýdelněná směs převede pomocí 100 ml vody do dělicí nálevky na 500 ml, přidá se přesně 250 ml diethyletheru (3.22), opatrně promíchává po dobu 5 minut a potom silně protřepe. Objem této směsi se odměří (V). Po oddělení fází se odpipetuje přesně 100 ml čiré diethyletherové fáze (V_{AID}), převede do další dělicí nálevky na 500 ml vodou nasycenou diethyletherem (3.23) a touto se opatrně promývá až do negativní reakce na alkálie (pH papírek). Mezitím se nechá původní uzavřená dělicí nálevka ustát do úplného oddělení vodné fáze a změří se objemy jak vodné (V_{W}), tak i zbývající diethyletherové (V_{RD}) fáze. Nakonec se zjistí objem odebraného alikvotního podílu diethyletherové fáze (V_{AID}) a zbývající objem této fáze (V_{RD}), což se má rovnat celkovému objemu diethyletherové fáze (V_{GD}). Potom musí platit:

$$V = V_{\text{D}} + V_{\text{W}}$$

Alikvotní podíl diethyletherové fáze vymytý do negativní reakce se smísí s 50,0 ml petroletheru (3.20) a asi po 5 minutách se oddělí v dělicí nálevce zbytky oddělené vody. Tento extrakt se převede do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, na rotační odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) vytemperované na 50 °C se pod atmosférou dusíku (3.31) odpaří do sucha. Jsou-li v baňce ještě zřetelné zbytky vody přidá se malé množství směsi ethylalkohol-benzen (3.32) a znovu se odpaří. Odparek se rozpustí v přesně 0,5 ml n-hexanu (3.8).

Chromatografický sloupec se připraví tak, že se do chromatografické trubice (4.4), umístěné ve vertikální poloze, vloží k výtoku z trubice smotek vaty (4.10), při uzavřeném kohoutu se trubice zcela naplní n-hexanem (3.8) a vsype se oxid hlinitý (3.9) tak, aby sloupec po sedimentaci byl do výšky 80 mm. Pak se n-hexan vypustí až po vrch sloupce, přičemž vyteklý hexan se pro další stanovení dále nepoužije.

Na takto připravený sloupec se převede 5,0 ml hexanového extraktu vzorku, pod sloupec se postaví odpařovací baňka (4.12) na 250 ml a eluují se karoteny (Frakce I).

Potom se pod sloupcem vymění odpařovací baňka za kuželovou baňku na 300 ml a na sloupec se dává 5 x po 10 ml 2 % diethyletheru v hexanu (3.10), tím se oddělí zbývající podíly citranaxantinu a kantaxantinu. Podíly neúplně zmýdelněného esteru kyseliny apokarotinové se eluují dávkami 5 x po 10 ml 5 % diethyletheru v hexanu (3.11). Dále se eluují podíly citranaxantinu dávkami 5 x po 10 ml 10 % diethyletheru v hexanu (3.12). Jakmile klesne poslední dávka tohoto k povrchu sloupce, tento podíl eluátu se k dalšímu stanovení nepoužije, pod sloupec se postaví další odpařovací baňka (4.12) na 250 ml a na sloupec se dává 5 x po 10 ml směsi chloroform-aceton (3.13) a pak asi 3 x po 10 ml ethylalkoholu (3.18). Po protečení celého objemu kapaliny se baňka umístí na rotační odparce (4.3) a na vodní lázni (4.4), vytemperované na 50 °C pod přívodem dusíku (3.31) se obsah odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 50 ml ethylalkoholu (3.18) (V_{AIK}) (Frakce II).

5.2.1 Hexanový eluát Frakce I se na rotační odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) vytemperované na 50 °C a pod přívodem dusíku (3.31) odpaří do sucha. Odparek se rozpustí buď v přesně 50 ml (či jiném obsahu) n-hexanu (3.8) (V_4) a měří na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetě od 600 do 400 nm proti n-hexanu (3.8) jako slepému roztoku.

Maximum absorbance má být při 450 nm (alfa a beta karoten).

5.2.2 Frakce II rozpuštěná v přesně 50 ml popř. 20 ml ethylalkoholu (3.18) se měří na spektrofotometru (4.1) od 600 do 400 nm v 10 mm kyvetě proti ethylalkoholu jako slepému roztoku.

Maximum absorbance má být při 450 nm (nekorigované xantofyly).

5.2.3 Z frakce II rozpuštěné v 50 (20) ml ethylalkoholu (3.18) (V_{AIK}) se odpipetuje přesně 25 popř. 10 ml do odpařovací baňky (4.12) na 100 ml, odpaří se na odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) při 50 °C pod přívodem dusíku (3.31) do sucha. Odparek se rozpustí v 5 ml n-hexanu (3.8) (V_{MgO}).

Ke 20 g oxidu hořečnatého (3.23) se přidá 10 g Hyflo-supergelu (3.25) a dobře se promíchá s hexanem (3.8). Tato suspenze se převede do chromatografické trubice (4.5), umístěné ve vertikální poloze, na jejíž dno bylo vloženo malé množství mořského písku (4.11). Po usazení se hexan odpustí až k povrchu sedimentu. Vyteká kapalina se pro stanovení dále nepoužije.

Na tento sloupec se převede hexanový extrakt vzorku (V_{MgO}), pod sloupec se postaví kuželová baňka na 300 ml a otevře výpustní kohout. Po vypuštění hexanového extraktu až k povrchu sloupce se sloupec promyje postupně dávkami 3 x po 10 ml n-hexanu (3.8), 15 ml 10% acetonu v hexanu (3.26), 15 ml 20 % acetonu v hexanu (3.27) a 30 až 40 ml 30% acetonu v hexanu (3.28). Promývání sloupce se přeruší, když od vrcholu sloupce jsou vizuálně zřetelné zóny v pořadí zeaxantin, lutein a kantaxantin. Proteklá kapalina se dále pro stanovení nepoužije.

Potom se sloupec od shora připouštěným dusíkem (3.31) při otevřeném kohoutu trubice zcela vysuší. Na vrchu sloupce se zbytkové zbarvené zóny malou lžičkou (4.14) či vhodným nástrojem odstraní a dále nepoužijí. Pak se pomocí tlaku dusíku (3.31), přiváděného do spodní trubice vytlačí sloupec, ale jen tak daleko až lze lžičkou (4.14) odebrat část sloupce obsahujícího zeaxantin a tato část se přenesení do kádinky na 100 ml. Dále se obdobným způsobem vytlačí část sloupce obsahující lutein do další kádinky na 100 ml. Obsah každé z kádinek se smísí s malým množstvím ethylalkoholu (3.18), promíchá, převede na filtrační kelímek (4.6) usazený v zařízení pro filtraci za sníženého tlaku (4.7) do něhož je vložena odpařovací baňka na 100 ml a obsah každé z kádinek se filtruje za mírně sníženého tlaku, promývá ethylalkoholem (3.18) až již vytéká čirý a bezbarvý promývací roztok. K tomu je zpravidla potřeba 30 až 40 ml.

Oba ethylalkoholové eluáty se odpaří na rotační odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) 50 °C teplé pod přívodem dusíku (3.31) do sucha. Každý odparek se rozpustí v přesně 25 ml popř. 10 ml ethylalkoholu (3.18) (V_A) a měří se na spektrofotometru (4.1) od 600 do 400 nm v 10 mm kyvetě proti ethylalkoholu (3.18) jako slepému roztoku.

Maximální absorbance má být při 445 nm pro lutein a 450 nm pro zeaxantin.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Obsah esteru kyseliny apo-karotinové vyjádřený jako ester kyseliny beta-apo-8-karotinové v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10000 \cdot A \cdot V_1 \cdot (V_3 + V_4)}{2540 \cdot V_2 \cdot m}$$

kde A je absorbance cyklohexanového extraktu vzorku (viz 5.1.1) při vlnové délce 446 nm (v maximu)

V_1 objem chloroformu přidaného k navážce vzorku v ml (200 ml)

V_2 objem odpipetovaného alikvotního podílu chloroformového extraktu v ml (přesně podle postupu 25 ml)

V_3 objem chloroformu v němž byl rozpuštěn odparek v ml (0,5 ml)

V_4 přídavek cyklohexanu k rozpuštěnému odparku v ml (50 nebo 10 ml)

2540 absorpční koeficient esteru kyseliny apo-karotinové

m navážka zkušební vzorku v g

6.2 Obsah citranaxantinu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{10000 \cdot A \cdot V_1 \cdot (V_3 + V_4)}{2745 \cdot V_2 \cdot m}$$

kde A je absorbance hexanového extraktu vzorku při vlnové délce 468 nm (v maximu)

V₁ viz ad 6.1

V₂ viz ad 6.1

V₃ viz ad 6.1

V₄ přídavek hexanu k rozpuštění odparku v ml (50 nebo 10 ml)

2745 absorpční koeficient citranaxantinu

m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.3 Obsah kantaxantinu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{10000 \cdot A \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot (V_5 + V_6)}{2000 \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot m}$$

kde A je absorbance cyklohexanového extraktu vzorku (5.1.3) při vlnové délce 470 nm (v maximu)

V₁ viz ad 6.1

V₂ viz ad 6.1

V₃ objem chloroformu k rozpuštění odparku v ml

V₄ objem přenesený na TLC desku v ml (2 nebo 1)

2000 absorpční koeficient citranaxantinu

V₅ objem k V přidaného cyklohexanu v ml (10 nebo 5 ml)

m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.4 Obsah alfa, beta a gama karotenu v mg/kg (W) se vypočítá podle vzorce:

$$W = \frac{10000 \cdot A \cdot V_H \cdot V_{GD}}{2500 \cdot A_{AD} \cdot m}$$

kde A je absorbance hexanového extraktu vzorku (5.2.1) při vlnové délce 450 nm (v maximu)

V_H objem hexanu, ve kterém byl rozpuštěn odparek po chromatografickém dělení v ml (50 či jiný objem)

V_{GD} celkový objem diethyletherové fáze po zmýdelnění v ml (po úplném oddělení)

V_{AID} alikvotní podíl diethyletherové fáze po zmýdelnění převedeného do dělicí nálevky v ml (100)

2500 absorpční koeficient karotenů

m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.5 Celkový obsah xantofylů v mg/kg (N) se vypočítá podle vzorce:

$$N = \frac{10000 \cdot A \cdot V_{GD} \cdot V_{AIK}}{2500 \cdot A_{AID} \cdot m} - Z \cdot 0,65 \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde A je absorbance ethanolického extraktu vzorku (5.2.2) při vlnové délce 450 nm (v maximu)

V_{GD} viz ad 6.4

V_{AID} viz ad 6.4

V_{AIK} objem ethylalkoholu k rozpuštění frakce II v ml (50 nebo 20)

2500 absorpční koeficient xantofylů

m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

Z obsah kantaxantinu v mg/kg (viz ad 6.3)

6.6 Obsah luteinu v mg/kg (L) se vypočítá podle vzorce:

$$L = \frac{10000 \cdot A \cdot V_A \cdot V_{AIK} \cdot V_{GD}}{2560 \cdot A_{MgO} \cdot V_{AID} \cdot m}$$

kde A je absorbance ethanolického extraktu vzorku (5.2.3) při vlnové délce 445 nm (v maximu)

V_A objem ethylalkoholu na rozpuštění odparku po chromatografickém dělení v ml (25 nebo 10)

V_{AIK} viz ad 6.5

V_{GD} viz ad 6.4

V_{AID} viz ad 6.4

V_{MgO} objem alikvotního podílu z frakce II v ml (25 nebo 10)

2560 absorpční koeficient luteinu

m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.7 Obsah zeaxantinu v mg/kg (C) se vypočítá podle vzorce:

$$C = \frac{10000 \cdot A \cdot V_A \cdot V_{AIK} \cdot V_{GD}}{2350 \cdot A_{MgO} \cdot V_{AID} \cdot m}$$

kde A je absorbance ethanolického extraktu vzorku (5.2.3) při vlnové délce 450 nm (v maximu)

2350 absorpční koeficient zeaxantinu

V_A jako v 6.6

V_{AIK} viz ad 6.5 V_{GD} viz ad 6.4

V_{AID} viz ad 6.4

m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na 0,1 mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Hexan, diethylether, cyklohexan, ethylalkohol, petrolether, aceton a jejich vzájemné směsi jsou nebezpečnými hořlavinami I.třídy, a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Podle první části vzorce se vypočítá celkový obsah xantofylů (nekorigovaný), od něhož se musí odečíst stanovený obsah kantaxantinu, který se vynásobí faktorem 0,65. Tento faktor zohledňuje vztah absorbance kantaxantinu v cyklohexanu při 470 nm k absorbanci v ethylalkoholu při 450 nm.

10.1 Stanovení obsahu kyseliny mravenčí

Tato metoda je uvedena v Methodenbuch- Chemische Untersuchung LUFA (Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungs Anstalten) č. 18.4

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny mravenčí v silážích.

2. Princip

Kyselina mravenčí se stanovuje metodou podle Fuchse. Těkavé kyseliny, vydestilované ze vzorku se podrobí reakci s manganistanem draselným. Kyselina mravenčí je jako jedinná oxidována v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí. Rušivé složky jako aldehydy a aceton, které také přechází do destilátu, jsou odstraněny odpařením neutralizovaného roztoku před titrací manganistanem.

10.2 Stanovení obsahu kysličníku siřičitého

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 987.04

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kysličníku siřičitého v krmivech.

2. Princip

Kysličník siřičitý se uvolní po okyselení vzorku krmiva proudem dusíku a jímá se do roztoku elektrolytu. Obsah kysličníku siřičitého se stanoví metodou diferenční pulzní polarografie.

10.3 Stanovení obsahu formaldehydu

Tato metoda je uvedena v publikaci Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL 1977

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení formaldehydu v krmivech.

2. Princip

Ze vzorku se po okyselení kyselinou fosforečnou izoluje formaldehyd destilací s vodní parou a formaldehyd se v destilátu stanoví po reakci s kyselinou chromotropovou fotometricky při 570 nm.

11.1 Stanovení obsahu sacharinu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 980.18

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení sacharinu v krmivech.

2. Princip

Sacharin se extrahuje z vodného roztoku krmiva, po přečistění na koloně s Celitem 545, chloroformem. Chloroform se odpaří za laboratorní teploty a zbytek po odpaření se zředí roztokem hydroxidu sodného a obsah sacharinu se stanoví metodou diferenční pulzní polarografie.

12.1 Stanovení obsahu bakterií kmene Entorococcus (Streptococcus)

Tato metoda je uvedena v Methode der Bayerischen Landesanstalt für Ernährung MSf - V 4 - 95.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení počtu zárodků streptokoků skupiny D v koncentrátech, premixech, minerálních krmivech a krmných směsích.

2. Princip

Stanovení obsahu bakterií kmene Streptococcus je prováděno na selektivních živných půdách podle Slanetze a Bartleye. Jako referenční půda se při stanovení používá další selektivní půda (např. KF agar) nebo u koncentrátů vhodná neselektivní půda. Naočkované půdy misky jsou kultivovány při $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ a růst a počty kolonií jsou vyhodnocovány po dvou a čtyřdenní kultivaci.

12.1 Stanovení obsahu bakterií kmene Bacillus

Tato metoda je uvedena v Bio Systems, postup 205-08.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení počtu zárodků bakterií kmene Bacillus v krmivech.

2. Princip

Vzorek se homogenizuje ve sterilním zřed'ovacím roztoku, ze kterého se připraví další potřebná ředění. Stanovení počtu zárodků bakterií kmene Bacillus se provádí anaerobní kultivací na krevním agaru při 37 °C. Počty kolonií, charakteristické pro dané mikroorganismy, se odečítají po 18 - 24 hodinách.

Postupy laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

III

Příloha č. 11 až 13 vyhlášky 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

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů fyzikálního zkoušení krmiv

	Název postupu
1	Stanovení odrolu lisovaných krmiv
2	Stanovení zrnitosti
3	Stanovení feromagnetických příměsí
4	Stanovení délky a průměru granulí

1. Stanovení odrolu lisovaných krmiv

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení odrolu u granulovaných krmiv. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Odrol se stanoví jako sypký podíl po oddělení granulí na předepsaném sítu, vážkově.

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Přístroj prosévací horizontální, vhodné konstrukce, s přímočarým pohybem a regulací počtu kmitů a času, opatřený sadou sít o délce rámu 430 mm, šířce 150 mm a výšce 20 mm

3.2 Úředně ověřená síta s drátěnou a plechovou přepážkou, se čtvercovými otvory

průměr granulí v mm	délka strany otvorů v mm
2,1 až 3,5	2,0 (drátěná přepážka)
3,6 až 6,5	3,15 (plechová přepážka)
6,6 až 10,0	6,3 (plechová přepážka)
nad 10,0	8,0 (plechová přepážka)

4. Postup

Odváží se 600 až 700 g konečného vzorku s přesností nejméně na 0,1 g na síto, odpovídající průměru granulí zkoušeného vzorku. Po upevnění síta do prosévacího přístroje se vzorek prosévá po dobu 2 minut při 120 kmitech/min.

Propad sítem se kvantitativně převede na vhodnou podložku a zváží se s přesností nejméně na 0,1 g.

5. Výpočet a vyjádření výsledků

Odrol v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce :

$$X(X_D) = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{n}$$

kde m_1 je hmotnost propadu v g

m hmotnost zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

6. Opakovatelnost

Zatím není stanovena

2. Stanovení zrnitosti.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení zrnitosti sypkých krmiv. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Zrnitost se stanoví jako hmotnostní podíly částic různých velikostí prosévací zkouškou konečného vzorku na předepsaných sítích, vážkově.

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Sada sít

Nejčastěji používaná síta jsou síta o průměru 200 mm, s kruhovými otvory nebo s drátěnou tkaninou se čtvercovými oky, s délkou strany 2,8 mm, 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm a 0,2 mm. Síta musí být úředně ověřená.

3.2 Prosévadlo mechanické, vhodné konstrukce (např. typ AP 2).

4. Postup

Odváží se 100,0 g konečného vzorku na horní síto prosévadla (poznámka 7.1), na které byla předem naskládána potřebná síta v pořadí od síta s největšími otvory (nahore) k sítům s menšími otvory (dolů) a prosévá se 120 sekund při 120 ot/min. Podíly na jednotlivých sítích nebo propad sítím s nejmenšími otvory se kvantitativně přesypou na vhodné podložky a zváží s přesností nejméně na 0,1 g.

5. Výpočet a vyjádření výsledků

Podíl na příslušném síti (propad sítím) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce :

$$X = \frac{10^3 \cdot m_1}{m}$$

kde m_1 je hmotnost podílu vzorku na příslušném síti (propadu příslušným sítím) v g

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení (poznámka 8.2), které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností do hodnoty 20 g/kg na celé jednotky g/kg a nad hodnotu 20 g/kg na desítky g/kg.

6. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena

7. Poznámky

7.1 Pokud jsou v krmivu přítomna celá zrna obilovin nebo jiné abnormálně velké částice, je nutno odebrat ke zkoušení celý, nedělený laboratorní vzorek. V tomto případě se souběžné stanovení neprovádí.

3. Stanovení ferromagnetických příměsí

1 Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení ferromagnetických příměsí. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Ferromagnetické příměsi se stanoví na základě svých magnetických vlastností, separací ze vzorku krmiva magnetem, vážkově.

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Síto s kruhovým rámem a délkou strany ok 0,2 mm (úředně ověřené)

3.2 Prosévadlo mechanické, vhodné konstrukce (např. typ AP 2)

3.3 Magnet permanentní

3.4 Fólie z plastické hmoty, vhodného rozměru + skleněná podložka

3.5 Měřítko s přesností nejméně na 0,2 mm

4. Pracovní postup

Odváží se 100,0 g konečného vzorku (poznámka 7.1) na síto (2.1) a prosévá se buď na prosévače (2.2) asi 120 sekund při 120 ot/min., nebo ručně, za předpokladu, že síto je opatřeno víkem i dnem. Ruční prosévání se provádí krouživým pohybem po dobu rovněž 120 sekund. Zbytek na sítě se nasype na skleněnou podložku, rozhrne do vrstvy výšky asi 10 mm.

Pak se vezme magnet (2.3), obalí se fólií z plastické hmoty (2.4) a ve velmi blízké vzdálenosti od vrstvy vzorku se projíždí magnetem (2.3) nad vrstvou vzorku, a to postupně nad celou její plochou, v obou na sebe kolmých směrech. Při projíždění se magnetem (2.3) lehce pootáčí. V prostoru připravené odvažovačky, zcela suché a zvážené s přesností na 0,1 g, se z magnetu opatrně sejme fólie z plastické hmoty (2.4) tak, aby příměsí z magnetu (2.3) se vysypaly kvantitativně do odvažovačky. Tato se pak zváží s výše uvedenou přesností (poznámka 7.2).

5. Výpočet

Obsah ferromagnetických příměsí v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce :

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_2 - m_1)}{m_0}$$

kde m_0 je hmotnost vzorku v g

m_1 hmotnost prázdné odvažovačky

m_2 hmotnost odvažovačky s příměsí v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

6. Opakovatelnost

Zatím není stanovena

7. Poznámky

7.1 U lisovaných směsí se vzorek nejdříve podrtí na částice velikosti max. 2,0 mm.

7.2 Je-li požadavek na rozměr těchto příměsí, alespoň největších, změří se největší částice (délka, šířka) měřítkem a zjistí se, zda jsou přítomny částice větší než 1,0 mm.

4. Stanovení délky a průměru granulí

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení délky a průměru granulovaných krmiv. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Průměr a délka granulí se zjistí jako průměr měření určitého počtu granulí, které se ve svém průměru výrazně neliší (nejde o směs granulí vyrobených na matricích různých průměrů).

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Posuvné měřítko s přesností měření na 0,1 mm

4. Postup

Ze vzorku se vybere 100 vzhledově neporušených granulí (bez zlomků), které mají tvar válečku a výrazně se neliší ve svém průměru a z těchto se vybere náhodně 20 granulí pro vlastní měření. U vybraných granulí se posuvným měřítkem změří jejich průměr a délka.

5. Výpočet a vyjádření výsledků

Velikost granulí, tj. průměr a délka v mm (X , X_D) se vypočítá jako aritmetický průměr ze součtu naměřených hodnot podle vzorce :

$$X(X_D) = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{n}$$

kde $X_1, X_2, X_3 \dots X_N$ jsou jednotlivé hodnoty průměru nebo délkyměřených granulí v mm
 n je počet měření průměru nebo délky (obvykle 20)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mm.

6. Opakovatelnost

Zatím není stanovena

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů smyslového zkoušení krmiv

	Název postupu
1	Posuzování barvy, struktury a konzistence
2	Posuzování pachu

1. Posuzování barvy, struktury a konzistence

Barva, struktura a konzistence se posuzuje výhradně za dobrého denního světla v konečném vzorku krmiva. Vzorek se rozprostře na bílé podložce (např. filtrační papír), přitlačí do kompaktní vrstvy a prohlíží buď pouhým okem nebo pomocí lupy. Posuzují se zejména odchylky od barvy typické pro dané krmivo. U krmných směsí se posuzuje barva s přihlédnutím k zastoupení obsažených surovin.

U struktury a konzistence se posuzuje zejména neporušení původního stavu a kvalita opracování jednotlivých surovin (ostré slupky, kosti, celá zrna, slepené hrudky aj.), u lisovaných směsí se posuzuje, zda granule jsou stejné barvy a průměru.

2. Posuzování pachu

U celých semen (obiloviny, luštěniny aj.) se pach posuzuje v celém zrně a v jádře (po rozemletí). U ostatních krmiv, doplňkových látek a premixů se pach posuzuje v původním stavu konečného vzorku, který v případě potřeby může být ještě hrubě podrcen v třecí misce. Posuzuje se druh a intenzita pachu v původním stavu a po slabém zahřátí (nejlépe na sušárně) v kádince, přikryté hodinovým sklem.

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů speciálního zkoušení krmiv

Název postupu

- 1 Mikroskopie krmiv
- 2 Stanovení škůdců v obilovinách, luštěninách a olejninách
- 3 Stanovení škůdců v krmných směsích
- 4 Stanovení snětivosti pšenice
- 5 Stanovení druhové čistoty, nečistot a škodlivých nečistot u obilovin, luštěnin a olejnin
6. Podmínky pro mikroskopické stanovení, identifikaci nebo určování složek živočišného původu v krmivech.

1. Mikroskopie krmiv

Slouží k identifikaci jednotlivých druhů krmiv a k určení přítomnosti semen a plodů, uvedených jako nežádoucí látky v příloze č. 3 vyhl. MZ ČR č. 194./1996 Sb., kterou se provádí zákon o krmivech.

Provádí se z konečného vzorku, jemně rozetřeného v třecí misce. Krmiva s vyšším obsahem tuku se před další úpravou musí odtučnit. Do kádinky 400 ml dáme asi 5 g rozetřeného vzorku, přidáme 15 ml 5% H_2SO_4 a 150 ml destilované vody. Za stálého míchání zvolna vaříme 7 minut. Pak doplníme destilovanou vodou po okraj kádinky a necháme ustát. Asi po 60 minutách opatrně slijeme kapalinu nad sedlinou. Přidáme 210 ml 5% KOH a doplníme destilovanou vodou na původní objem. Vaříme opět 7 minut za občasného promíchání. Po ukončení varu doplníme destilovanou vodou a necháme asi 60 minut ustát. Dekantaci provedeme 3x. U živočišných mouček vaříme pouze s 5 ml 5% KOH + 150 ml destilované vody 2 - 5 minut. Vzorek je připraven k mikroskopickému vyšetření (poznámka 1). Nejvhodnější zvětšení je 200 - 300 x.

Poznámka 1

Buněčné struktury se posuzují podle vlastních preparátů, připravených z jednotlivých druhů krmiv, připravených pro tyto účely tak, aby nebyly znečištěny jinými krmivy.

2. Stanovení škůdců v obilovinách, luštěninách a olejninách.

1. Podstata zkoušky

Živí škůdci se zjišťují po prosátí vzorku v propadu, popř. v podílu na síti buď pouhým okem, popř. pomocí lupy nebo stereoskopickým mikroskopem

2. Přístroje a pomůcky

2.1 Síta s drátěnými tkaninami se čtvercovými oky s délkou strany oka 1 mm, popř. 2,8 mm

2.2 Petriho misky průměru nejméně 80 mm

2.3 Pinseta měkká

2.4 Lupa, zvětšující 6x a 10x nebo stereoskopický mikroskop (zvětšení 10x a více)

2.5 Mechanické prosévadlo vhodné konstrukce

2.6 Mikroskop (zvětšení 80x a více)

2.7 Podložní a krycí sklíčka

2.8 Podložka s mezikružními k odečítání počtu škůdců

3. Chemikálie

3.1 Etanol denaturovaný 1 % benzínu

3.2 Konzervační tekutina s obsahem chlorhydrátu ($C_2H_3Cl_3O_2 + CCl_3CHO$)

4. Postup

4.1 Ke zjištění skladištních škůdců se konečný vzorek proseje sítem (2.1) o průměru či délce strany nejméně 30 cm, s kruhovými nebo čtvercovými otvory o průměru či délce strany oka 2,2 mm až 2,5 mm (popř. podle druhu výrobku i s menšími otvory síta).

Vzorek se vysype na síto (2.1) po částech; každá část se prosévá krouživým pohybem asi 1 minutu a z každého dílčího propadu se stanoví počet živých brouků a určí se jejich druh. Jednotlivé druhy se počítají odděleně. K mrtvým broukům se nepřihlíží. Při prosévání se brouci někdy zdají zdánlivě mrtví. Jejich životnost se zjišťuje tak, že se počítá za 15 až 20 sekund po prosetí anebo se na brouky, kteří neprojevují známky života několikrát dýchne. Je-li teplota zrna nižší než 10 °C, ohřívá se získaný propad obsahující brouky po 10 až 20 minut při teplotě 20 až 30 °C. Potom se brouci, kteří projeví známky života připočtou k živým broukům. Zjištěný celkový počet živých brouků ze zkoušeného vzorku se přepočte na 1 kg zrna. Propad se použije také ke stanovení roztočů (podle odstavce 4.5).

4.2 Při zjišťování pilousů se stanoví stupeň napadení podle počtu živých brouků přepočtem ze zkušební vzorku na 1 kg zrna podle tab. 1. Při III. stupni (silné napadení) se musí v rozboru uvést i počet živých pilousů v 1 kg zrna (viz tab. 1).

Tab. 1

Stupeň napadení	Počet živých pilousů na 1 kg
I. výskyt	nejvýše 2 brouci
II. napadení	3 až 5 brouků
III. silné napadení	nad 5 brouků

4.3 Při zjišťování ostatních brouků např.:

lesák skladištní (*Oryzaephilus surinamensis* L.),

lesák moučný (*Laemophloeus ferrugineus* Steph.),

potemník skladištní (*Tribolium confusum* Jacq.),

potemník moučný (*Tenebrio molitor* L.),

kornatec skladištní (*Tenebrioides mauritanicus* L.),

červotoč spízní - chlebový (*Stegeobium paniceum* L.),

vrtavec zhoubný (*Ptinus fur* L.),

korovník obilní (*Rhizopeltha dominica* F.),

popřípadě celé řady dalších druhů, v praxi známé pod názvy písivky, maločlenci, trojatci apod. se neuvádí stupeň napadení, ale jen zjištěný druh a počet živých brouků na 1 kg zrna (semen).

4.4 Při zjišťování napadení zrna (semen) housenkami např.:

zavíječe moučného (*Anogasta kükniella* Scott),

zavíječe skladištního (*Ephestia elutella* Hübner),

zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella* Hübner),

mola obilního (*Tinea granella* L.),

makadlovky obilné (*Sitotroga cerealella* Olivier) aj.

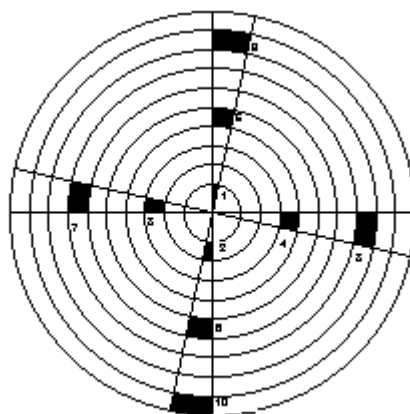
se rozprostře konečný vzorek na stůl, pokrytý hladkým, tmavým, nejlépe černým papírem, do nízké vrstvy a důkladně se prohlédne. Při zjišťování živých housenek se nepřihlíží k jejich druhu, ale jejich celkový počet se přepočte na 1 kg zrna (semen). Zjistí-li se ve vzorku pouze zámoťky molů (smotky), uvede se toto zjištění v rozboru.

4.5 Stupeň napadení zrna (semen) roztoči se stanoví jednak podle množství roztočů ve vzorku a jednak podle pachu zrna nebo semene. Zrna nebo semena silně napadená škodlivými

roztoči mají charakteristický pach. Ke stanovení množství roztočů se rovnoměrně rozprostře propad sítem, získaný při stanovení škůdců (zjišťování roztočů a pilousů je současné), do nízké vrstvy na Petriho misce (2.2) o průměru nejméně 10 cm a ihned se provede stanovení. Petriho miska (2.2) musí být podložena černým papírem.

Pouhým okem nebo lupou (2.4) 6 až 10krát zvětšující je nutno odhadnout, zda pohyblivých stadií roztočů je méně nebo více než 50. V prvním případě se počítají roztoči jednotlivě, ve druhém případě se nahradí černý podkladový papír podložkou (2.8), odpovídající vnějším průměrem průměru Petriho misky, na které se provádí součet. Na této podložce je 10 mezikruží, mezi nimiž je vyznačeno 10 černých políček, tvořících 1/30 obsahu všech mezikruží (viz obr. 1).

obr. 1



Součet roztočů, jejichž počet je větší než 50 a mnohdy nezjistitelně velký, se provádí na těchto černých políčkách a konečný součet všech roztočů, nacházejících se na černých políčkách, se násobí třiceti; tím se vypočítá celkový počet roztočů v propadu vzorku. Roztoče nutno v tomto případě zjišťovat pouze lupou (2.4) alespoň 10krát zvětšující anebo pod mikroskopem, popř. binokulární lupou.

Je-li propadu příliš mnoho, takže se na Petriho misku (2.2) rovnoměrně nedá rozprostřít, je možno použít jen určitou část propadu a výsledek přepočítat na celkové množství propadu. Po zjištění počtu škodlivých roztočů ve vzorku se stanoví stupeň napadení podle tab. 2, přičemž k výskytu dravých roztočů do 500 kusů na 1 kg se nepřihlíží.

Zjistí-li se charakteristický pach po roztočích při nižším výskytu jedinců než 50 na 1 kg, zařadí se dodávka do III. stupně.

Výsledek se uvádí počtem škůdců na 1 kg a to v celých číslech.

Tab. 2

Stupeň napadení	Znaky
-----------------	-------

I. výskyt	počet škodlivých roztočů do 50 na 1 kg	zrno bez pachu
II. napadení	počet škodlivých roztočů nad 50 na 1 kg	zrno bez pachu
III. silné napadení	počet škodlivých roztočů nad 50 na 1 kg	zrno s charakteristickým pachem po roztočích

Rozeznávání roztočů - viz obr. 2a), 2b), 2c).

Obr. 2a) - roztoč moučný (*Acarus siro* L.)

Obr. 2b) - roztoč ničivý (*Glycyphagus destructor* Schr.)

Obr. 2c) - roztoč dravý (*Cheyletus eruditus* Schr.)

3. Stanovení škůdců v krmných směsích

1. Podstata zkoušky

Živí škůdci se zjišťují po prosátí vzorku v propadu, popř. v podílu na síti buď pouhým okem, popř. pomocí lupy nebo stereoskopickým mikroskopem

2. Přístroje a pomůcky

2.1 Síta s drátěnými tkaninami se čtvercovými oky s délkou strany oka 1 mm, popř. 2,8 mm

2.2 Petriho misky průměru nejméně 80 mm

2.3 Pinseta měkká

2.4 Lupa, zvětšující 6x a 10x nebo stereoskopický mikroskop (zvětšení 10x a více)

2.5 Mechanické prosévadlo vhodné konstrukce

2.6 Mikroskop (zvětšení 80x a více)

2.7 Podložní a krycí sklíčka

3. Chemikálie

3.1 Etanol denaturovaný 1 % benzínu

3.2 Konzervační tekutina s obsahem chlorhydrátu ($C_2H_3Cl_3O_2 + CCl_3CHO$)

4. Postup zkoušky

4.1 Obecně

Při rozbalení konečného vzorku je třeba věnovat pozornost typickému sladkoštiplavému, nasládlé dusivému pachu, typickému po roztočích. Při vysypání vzorku je nutno dbát na to, že např. roztoči a celá řada ostatních škůdců (brouci) se obvykle hromadí pod uzávěrem obalu. Při silnějším napadení, hlavně brouky, je možno zjistit jejich přítomnost při rozbalení vzorku.

Při podezření na přítomnost větších škůdců (housenky molů, které vytvářejí typické zámotky, nebo některé větší druhy brouků) se vysype postupně vzorek na tmavou podložku a pinsetou (2.3) se vybírají housenky a zámotky. Jinak lze vzorek přesít 2,8 mm sítí (2.1), na kterém tyto zámotky zůstanou. Prosévá se ručně. U lisovaných směsí je nutno se nejdříve přesvědčit, zda nejsou jednotlivé granule vyhlodány, popř. zda uvnitř neobsahují larvy.

4.2 Sypké směsi

100 g konečného vzorku se proseje sítí (2.1) o délce strany oka 1 mm a pátrá se v propadu i

v podílu na sítě po škůdcích. Některé druhy se staví zpočátku mrtvými, proto je nutné pátrání po krátké době opakovat. Pinsetou (2.3) se tyto škůdci vybírají a vhazují do kádinky s etanolem (3.1).

4.3 Lisované směsi

Po vizuálním přešetření se prosévá 100 g konečného vzorku na mechanickém prosévadle 120 sekund sítím 1 mm (2.1) a v propadu se pátrá po škůdcích jako ve vzorku sypké směsi. Zjištění dvou jedinců téhož druhu škůdců ve vzorku se považuje za výskyt. Totéž platí v případě zjištěných housenek nebo zámotků. Toto stanovení je shodné pro směsi sypké a lisované.

4.4 Zjišťování roztočů

Typický pach po roztočích prokazuje přítomnost více než 2. stupně napadení. Přítomnost roztočů se zjišťuje v propadu konečného vzorku sítím o průměru oka 1 mm (2.1) tak, že se vysype na Petriho misku (2.2), kde se urovná do tenkých vrstev. Naplněné misky se opatrně nahřejí na teplotu 20 až 30 °C a pomocí lupy (2.4) zvětšující 10x nebo stereoskopickým mikroskopem (2.4) se zjišťuje přítomnost roztočů (pohyb). Po ověření zjištěných nálezů se propad vysype na víčka Petriho misky (2.2), urovná a přikryje dnem této misky (2.2) a po více než 1 hodině, jsou-li tyto misky uchovány při výše uvedené teplotě, zjistí se v případě přítomnosti roztočů typické cestičky, patrné pouhým okem. Stanovení se provádí čtyřikrát; nejvyšší a nejnižší hodnota nálezu se neuvažuje. Součet dvou zbývajících stanovení se přepočítá na 1 kg směsi.

Zjištění roztočů ve 100 g vzorku v počtu do 200 jedinců odpovídá výskytu 1. stupně. Zjištění méně než 3 jedinců se nepokládá za výskyt. Nález dravých roztočů zjištěný výsledek neovlivňuje.

Pro určení druhů roztočů je nutno zhotovit mikroskopické preparáty přenesením malého množství směsi s roztoči do kapky vhodné konzervační tekutiny (3.2) na podložní sklíčka (2.7).

Preparát se pozoruje pod mikroskopem (2.6) při zvětšení 80násobném a vyšším.

4. Stanovení snětivosti pšenice

Za snětivou se považuje pšenice, která obsahuje zrna napadená snětí, snětivé kuličky, případně vykazuje pach po snětí.

Konečný vzorek se vysype na světlou podložku a smyslově se posuzuje zamazání zrn spórami snětí, výskyt snětivých kuliček a pachu po snětí. Jestliže vzorek vykazuje kterýkoliv z uvedených znaků, označí se pšenice za snětivou.

5. Stanovení druhové čistoty, nečistot a škodlivých nečistot u obilovin, luštěnin a olejnin

1. Podstata zkoušky

Mechanicky a ručně nebo jenom ručně se oddělí z neupraveného vzorku nečistoty, škodlivé nečistoty a zrna jiných druhů kulturních plodin.

Pro účely této metody se rozumí :

Druhov $\acute{a}$ čistota - procentický podíl hmotnosti zrn, zbavených nečistot, z celkové hmotnosti zkušebního vzorku (mimo zrna, která patří do nečistot),

Nečistoty - nepoužitelné nebo nežádoucí složky zkušebního vzorku např. :

- části stébel, lodyh, stonků, listů, klasů, klásků, lat, lichoklasů, oklasků, okolíků, plev, slupek, lusků, tobolek, úborů, makovic, štetin, osin, částice dřeva, papíru, umělých hmot apod.,
- semena plevelů,
- zelená nebo nevyzrálá zrna nebo zrna v mléčné zralosti obilovin, luštěnin a olejnin,
- zrna se zcela porušeným endospermem zapařením, zuhelnatěním, ztrouchnivěním (endosperm je drobivý) nebo zrna bez endospermu
(vyžraná, zaschlá) nebo zrna hluchá,
- anorganické nečistoty (zemina, kaménky, prach, kovové nebo skleněné částice aj.),
- propad sítem s kruhovými otvory o průměru 2 mm u obilovin a kukuřice
- zrna zjevně smyslově posouditelná jako plesnivá
- škodlivé nečistoty

Škodlivé nečistoty - jedovatá a zdraví škodlivá semena plevelů, zejména koukol polní (*Agrostemma githago* L.), hlaváček letní (*Adonis aestivalis* L.), černýš rolní (*Melampyrum arvense* L.), kokrhel (*Rhinanthus* L.), sveřep stoklasa (*Bromus secalinus* L.), jílek mámivý (*Lolium temulentum* L.), skočec obecný (*Ricinus* L.), svízele (zejména *Galium mollugo* L., *Galium verum* L., *Galium cruciata* L., *Galium verum scop.* a *Galium aparine*), dále rozmnožovací cibulky planě rostoucích česneků - česnek kulovitý (*Allium rotundum* L.), česnek kulatohlavý (*Allium sphaerocephalum* L.), česnek polní (*Allium vineale* L.), dále námel, zrna napadená háďátkem pšeničným (*Tylenchus tritici* Bauer), chlamydospóry sněti mazlavé (rod *Tilletia*), hlízenky - sklerocie bílé hniloby (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.) San.et.Tod.

2. Zkušební pomůcky

2.1 Prosévací přístroj s upínací plochou a třmeny pro jedno síto se dnem a víkem o vnějších rozměrech (mimo víko) 170 x 450 x 50 mm s přípustnou odchylkou ± 10 mm. Pohyb upínací desky a síto musí být přímočarý s vratným pohybem a amplitudou 25 mm ± 5 mm a frekvencí 310 kmitů za minutu ± 10 kmitů.

2.2 Oddělovací přepážka (třídící síto) je o rozměrech 150 x 430 mm s přípustnou odchylkou u obou rozměrů $\pm 0,4$ mm. Doporučený materiál je plech z korozivzdorné oceli nebo tvrzené mosazi o tloušťce 0,8 až 1,2 mm. Vzdálenost rovnoběžných stran (tečen) otvorů od podélných stran oddělovací přepážky je 6 mm (přípustná odchylka $\pm 0,2$ mm), od kratších stran 10 mm (přípustná odchylka $\pm 0,2$ mm). Vzdálenost mezi otvory v řadách a mezi řadami je rovnoměrná po celé ploše oddělovací přepážky.

Oddělovací přepážka má kruhové otvory o průměru 2 mm s přípustnou odchylkou $\pm 0,06$ mm, s počtem otvorů v řadě 17 a počtem řad 104. Uspořádání otvorů mezi řadami je v podélných řadách střídavé.

Luby (rámeček) třídícího síta musí být z hliníku nebo tvrdého dřeva s povrchovou úpravou.

3. Postup zkoušky

3.1 Hmotnost navážky zkušební vzorku

Materiál	navážka
kukuřice, bob koňský	200 g
pšenice, žito, ječmen, čirok, soja, slunečnice, tritikale, oves nahý, hrách, lupina sladká, peluška jarní, vikev jarní	100 g
oves setý, pohanka obecná, světlice barvířská	50 g
proso, mohár, čumíza, konopí, krambe, lesknice	25 g
lněné semeno, řepka	10 g
mák	2 g

3.2 Vlastní zkouška

Děličem vzorků se z upraveného konečného vzorku vydělí část, ze které se naváží zkušební vzorky s přesností na 0,1 g.

Je-li pro stanovení nečistot určeno užití síťového třídění (propad sítem 2 mm), prosévá se zkušební vzorek mechanicky prosévacím přístrojem (2.1) po dobu 2 minut. Potom se ze zbytku na síti oddělují nečistoty a samostatně zrna jiných druhů kulturních plodin.

Pokud není stanoveno pro třídění užití síta, vybírají se z celého zkušební vzorku nečistoty a samostatně zrna jiných druhů kulturních plodin. Oddělené podíly nečistot a kulturních plodin se váží.

Po odvážení nečistot se z celé hmotnosti vybírají jednotlivé druhy škodlivých nečistot, a to každý druh odděleně. Po oddělení jednotlivých druhů škodlivých nečistot se podíly zvažují.

Z celkového obsahu nečistot se uvádí zvlášť obsah škodlivých nečistot celkem, z toho jednotlivých druhů.

4. Výpočet

4.1 Druhá čistota v % (X) se vypočte podle vzorce :

$$X = \frac{m_0 - (m_1 + m_2)}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušební vzorku v g

m_1 hmotnost nečistot celkem v g

m_2 hmotnost jiných druhů kulturních plodin v g

4.2 Obsah nečistot v % (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušební vzorku v g

m_1 hmotnost nečistot celkem v g

4.3 Obsah škodlivých nečistot v % (Z) se vypočte podle vzorce:

$$Z = \frac{m_1 + m_2 + m_3 + m_x}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušební vzorku v g

m_1 až m_x hmotnost jednotlivých druhů škodlivých nečistot v g

4.4 Obsah jednotlivých druhů škodlivých nečistot (Q) v % se vypočte podle vzorce:

$$Q = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušební vzorku v g

m_1 hmotnost jednoho druhu škodlivých nečistot v g

Výsledky se zaokrouhlují a uvádějí na jedno desetinné místo.

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

Účel, rozsah a princip

Tyto podmínky jsou určeny 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.

Postupy prováděné podle této Přílohy jsou používány k provádění odborného dozoru a zkoušení krmiv. Ke zlepšení určení 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 postupy za předpokladu, že tyto analýzy budou provedeny jako doplněk k analýzám 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 uvedený postup je vhodný 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, štětín, krve, peří, vaječných skořápek, rybích kostí, šupin). Identifikace musí být provedena jak v sítové frakci, tak v koncentrovaném sedimentu vzorku.“.