

1	2	3	4	5
101	Wenezuela	USD	39	120
102	Węgry	USD	40	90
103	Wielka Brytania	GBP	32	140
104	Wietnam	USD	42	95
105	Włochy	EUR	42	105
106	Wybrzeże Kości Słoniowej	USD	43	90
107	Zimbabwe	USD	42	120
108	Zjednoczone Emiraty Arabskie	USD	38	110
109	Pozostałe państwa pozaeuropejskie	USD	42	120

Przy podróżach do:

- Gibraltaru dieta i limit hotelowy jak w Wielkiej Brytanii,
- Hongkongu dieta wynosi 46 USD, a limit hotelowy 160 USD,
- Tajwanu dieta wynosi 45 USD, a limit hotelowy 100 USD.

2688

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI¹⁾

z dnia 2 grudnia 2004 r.

w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych²⁾

Na podstawie art. 44 ust. 10 pkt 2 ustawy z dnia 23 sierpnia 2001 r. o środkach żywienia zwierząt (Dz. U. Nr 123, poz. 1350, z 2003 r. Nr 122, poz. 1144 i Nr 208, poz. 2020 oraz z 2004 r. Nr 91, poz. 877) zarządza się, co następuje:

§ 1. Ustala się metodykę postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokar-

mowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych, stanowiącą załącznik do rozporządzenia.

§ 2. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 7 dni od dnia ogłoszenia.³⁾

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi: *W. Olejniczak*

¹⁾ Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rolnictwo, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 1 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 11 czerwca 2004 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 134, poz. 1433).

²⁾ Przepisy niniejszego rozporządzenia wdrażają postanowienia:

1) dyrektywy Komisji 71/250/EWG z dnia 15 czerwca 1971 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 155 z 12.07.1971, z późn. zm.);

2) dyrektywy Komisji 71/393/EWG z dnia 18 listopada 1971 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 279 z 20.12.1971, z późn. zm.);

3) dyrektywy Komisji 72/199/EWG z dnia 27 kwietnia 1972 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 223 z 29.05.1972, z późn. zm.);

4) dyrektywy Komisji 73/46/EWG z dnia 5 grudnia 1972 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 083 z 30.03.1973, z późn. zm.);

5) dyrektywy Komisji 76/372/EWG z dnia 1 marca 1976 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 102 z 15.04.1976, z późn. zm.);

6) dyrektywy Komisji 78/633/EWG z dnia 15 czerwca 1978 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 232 z 24.08.1978, z późn. zm.);

Załącznik do rozporządzenia Ministra Rolnictwa
i Rozwoju Wsi z dnia 2 grudnia 2004 r. (poz. 2688)

METODYKA POSTĘPOWANIA ANALITYCZNEGO W ZAKRESIE OKREŚLANIA ZAWARTOŚCI SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH I DODATKÓW PASZOWYCH W MATERIAŁACH PASZOWYCH, PREMIKSACH, MIESZANKACH PASZOWYCH I PASZACH LECZNICZYCH

Spis treści

- ROZDZIAŁ 1** Postanowienia ogólne dotyczące metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych
- 1.1. Przygotowanie próbek do badań
 - 1.2. Wytyczne dotyczące odczynników i aparatury używanej w metodyce postępowania analitycznego
 - 1.3. Stosowanie metodyki postępowania analitycznego i wyrażanie wyników
- ROZDZIAŁ 2** Badanie podstawowych składników pokarmowych
- 2.1. Oznaczanie białka surowego metodą Kjeldahla
 - 2.2. Oznaczanie surowych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym
 - 2.2.1. Oznaczanie aktywności pepsyny
 - 2.3. Oznaczanie wilgotności
 - 2.4. Oznaczanie wilgotności olejów i tłuszczów
 - 2.5. Oznaczanie popiołu surowego
 - 2.6. Oznaczanie popiołu nierozpuszczalnego w kwasie chlorowodorowym
 - 2.7. Oznaczanie włókna surowego
 - 2.8. Oznaczanie surowego oleju i tłuszczu
 - 2.9. Oznaczanie skrobi metodą polarymetryczną
 - 2.10. Oznaczanie cukrów
 - 2.11. Oznaczanie laktozy

-
- 7) dyrektywy Komisji 81/715/EWG z dnia 31 lipca 1981 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 257 z 10.09.1981);
 - 8) dyrektywy Komisji 84/425/EWG z dnia 25 lipca 1984 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 238 z 6.09.1984);
 - 9) dyrektywy Komisji 93/70/EWG z dnia 28 lipca 1993 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 234 z 17.09.1993);
 - 10) dyrektywy Komisji 93/117/WE z dnia 17 grudnia 1993 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 329 z 30.12.1993);
 - 11) dyrektywy Komisji 98/64/WE z dnia 3 września 1998 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analiz do oznaczenia aminokwasów, surowych olejów i tłuszczów oraz olaquindoksu w paszach i zmieniającej dyrektywę 71/393/EWG (Dz. Urz. WE L 275 z 10.10.1998);
 - 12) dyrektywy Komisji 1999/27/WE z dnia 20 kwietnia 1999 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analiz dotyczących oznaczania amprolium, diklaurilu i karbadoksu w paszach oraz zmieniającej dyrektywy 71/250/EWG, 73/46/EWG i uchylającej dyrektywę 74/203/EWG (Dz. Urz. WE L 118 z 6.05.1999);
 - 13) dyrektywy Komisji 1999/76/WE z dnia 23 lipca 1999 r. ustanawiającej wspólnotową metodę analizy w celu oznaczania lasalocidu-soli sodowej w paszach (Dz. Urz. WE L 207 z 6.08.1999);
 - 14) dyrektywy Komisji 2000/45/WE z dnia 6 lipca 2000 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analizy do celów oznaczania witaminy A, witaminy E i tryptofanu w paszach (Dz. Urz. WE L 174 z 13.07.2000);
 - 15) dyrektywy Komisji 2002/70/WE z dnia 26 lipca 2002 r. ustanawiającej wymagania dotyczące oznaczania poziomów dioksyn i dioksynopodobnych PCB w paszach (Dz. Urz. WE L 209 z 6.08.2002);
 - 16) dyrektywy Komisji 2003/126/WE z dnia 23 grudnia 2003 r. w sprawie analitycznej metody określania składników pochodzenia zwierzęcego do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 339 z 24.12.2003).
- Dane dotyczące ogłoszenia dyrektyw dotyczą ich ogłoszenia w Polskim wydaniu specjalnym Dziennika Urzędowego Unii Europejskiej.

³⁾ Niniejsze rozporządzenie było poprzedzone rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 stycznia 2003 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach i mieszankach paszowych (Dz. U. Nr 66, poz. 614).

ROZDZIAŁ 3 Badanie aminokwasów

- 3.1. Oznaczanie aminokwasów
- 3.2. Oznaczanie tryptofanu

ROZDZIAŁ 4 Badanie składników mineralnych

- 4.1. Oznaczanie wapnia
- 4.2. Oznaczanie sodu
- 4.3. Oznaczanie potasu
- 4.4. Oznaczanie chlorków
- 4.5. Oznaczanie magnezu
- 4.6. Oznaczanie całkowitej zawartości fosforu metodą fotometryczną
- 4.7. Oznaczanie węglanów
- 4.8. Oznaczanie zawartości żelaza, miedzi, manganu i cynku

ROZDZIAŁ 5 Badanie witamin

- 5.1. Oznaczanie witaminy A metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej
- 5.2. Oznaczanie witaminy E metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

ROZDZIAŁ 6 Badanie stymulatorów wzrostu

- 6.1. Oznaczanie wirginiamycyny metodą dyfuzji w żelu agarowym
- 6.2. Oznaczanie Zn-bacytracyny metodą dyfuzji w żelu agarowym
- 6.3. Oznaczanie flawomycyny metodą dyfuzji w żelu agarowym
- 6.4. Oznaczanie spiramycyny metodą dyfuzji w żelu agarowym
- 6.5. Oznaczanie awoparcyny metodą dyfuzji w żelu agarowym
- 6.6. Oznaczanie soli sodowej monenzyny metodą dyfuzji w żelu agarowym
- 6.7. Oznaczanie soli sodowej lasalocidu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej
- 6.8. Oznaczanie tylozyny metodą dyfuzji w żelu agarowym

ROZDZIAŁ 7 Badanie kokcydiostatyków i innych produktów leczniczych

- 7.1. Oznaczanie metylobenzoquatu
- 7.2. Oznaczanie halofuginonu
- 7.3. Oznaczanie robenidyny
- 7.4. Oznaczanie amprolium metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej
- 7.5. Oznaczanie diklazurilu
- 7.6. Oznaczanie karbadoksu
- 7.7. Oznaczanie olaquindoksu

ROZDZIAŁ 8 Badanie substancji i materiałów niepożądanych i szkodliwych

- 8.1. Oznaczanie aflatoksyny B₁ metodą jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej
- 8.2. Oznaczanie aflatoksyny B₁ metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej
- 8.3. Oznaczanie kwasu cyjanowodorowego
- 8.4. Szacowanie aktywności ureazy w produktach sojowych
- 8.5. Oznaczanie gossypolu
- 8.6. Wytyczne do mikroskopowej identyfikacji i oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego
- 8.7. Oznaczanie lotnych związków azotowych
- 8.8. Oznaczanie poziomów dioksyn i dioksynopodobnych PCB

ROZDZIAŁ 9 Badanie niebiałkowych związków azotowych

- Oznaczanie mocznika

ROZDZIAŁ 1

POSTANOWIENIA OGÓLNE DOTYCZĄCE METODYKI POSTĘPOWANIA ANALITYCZNEGO W ZAKRESIE OKREŚLANIA ZAWARTOŚCI SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH I DODATKÓW PASZOWYCH W MATERIAŁACH PASZOWYCH, PREMIKSACH, MIESZANKACH PASZOWYCH I PASZACH LECZNICZYCH

1.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO BADAŃ

1. CEL I ZAKRES

W rozdziale opisano tryb postępowania dotyczący przygotowania próbki do badań ze średniej próbki laboratoryjnej, przesyłanej do laboratorium upoważnionego do prowadzenia badań w ramach kontroli urzędowej.

Próbkę do badań przygotowuje się, tak aby odważone ilości, zgodnie z metodyką postępowania analitycznego, były jednorodne i reprezentatywne w odniesieniu do średniej próbki laboratoryjnej.

2. ZALECANE ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Wszystkie konieczne czynności powinny być wykonywane w taki sposób, aby zapobiec zanieczyszczeniu i zmianie składu próbki do badań. Rozdrabnianie, mieszanie, przesiewanie powinno być wykonywane możliwie szybko, przy ograniczonym dostępie powietrza i światła do próbki do badań. Młynki i rozdrabniacze powodujące nagrzewanie próbki podczas pracy nie powinny być stosowane. W przypadku środków żywienia zwierząt szczególnie wrażliwych na ciepło należy zalecać ręczne rozdrabnianie. Należy ponadto zwrócić uwagę, czy zastosowany sprzęt nie stanowi źródła zanieczyszczenia środka żywienia zwierząt mikroelementami.

W przypadku gdy przygotowanie próbki do badań nie może być przeprowadzone bez znacznych zmian zawartości wilgotności średniej próbki laboratoryjnej, należy oznaczyć zawartość jej wilgotności przed i po przygotowaniu próbki do badań, zgodnie z metodą dotyczącą oznaczania wilgotności.

3. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Średnia próbka laboratoryjna jest dokładnie mieszana mechanicznie albo ręcznie, a następnie dzielona, na dwie równe części (tam gdzie to jest wymagane, stosuje się metodę dzielenia na ćwiartki). Jedną z uzyskanych części średniej próbki laboratoryjnej umieścić w odpowiednim, czystym i suchym pojemniku, wyposażonym w hermetyczny korek, a pozostałą lub reprezentatywną część średniej próbki laboratoryjnej o masie co najmniej 100 g przygotować w sposób opisany poniżej.

3.1. Pasze, które mogą być zmielone

W przypadku gdy w metodyce postępowania analitycznego nie ustalono inaczej, po zmieleniu, jeżeli to konieczne, całą próbkę przesiać przez 1 mm oczko sita (zgodnie z zaleceniem ISO R565). Należy unikać nadmiernego rozdrobnienia.

Przesianą próbkę zamieszać i umieścić w odpowiednim, czystym i suchym pojemniku wyposażonym w hermetyczny korek. Bezpośrednio przed odważeniem próbki do analizy, zamieszać ponownie.

3.2. Pasze, które mogą być zmielone po wysuszeniu

W przypadku gdy w metodyce postępowania analitycznego nie ustalono inaczej, wysuszyć próbkę w celu obniżenia poziomu wilgotności od 8 do 12%, zgodnie ze wstępną procedurą suszenia opisaną w ramach metody oznaczania wilgotności. Dalej postępować zgodnie z (3.1).

3.3. Pasze płynne lub półpłynne

Próbkę umieścić w odpowiednim, czystym i suchym pojemniku wyposażonym w hermetyczny korek. Bezpośrednio przed odważeniem próbki do analizy, dokładnie zamieszać.

3.4. Inne pasze

Próbki, które nie mogą być przygotowane w jeden z wyżej opisanych sposobów, powinny być przygotowane w inny sposób, który zapewni, że odważone ilości wymagane do metodyki postępowania analitycznego są jednorodne i reprezentatywne dla średniej próbki laboratoryjnej.

4. PRZECHOWYWANIE PRÓBEK DO BADAŃ

Próbki przechowuje się w temperaturze, która nie spowoduje zmiany ich składu. Próbki przeznaczone do badania witamin lub substancji, które są szczególnie wrażliwe na światło, przechowuje się w brązowych, szklanych pojemnikach.

1.2. WYTYCZNE DOTYCZĄCE ODCZYNNIKÓW I APARATURY UŻYWANEJ W METODYCE POSTĘPOWANIA ANALITYCZNEGO

1.2.1. Jeżeli nie zaznaczono inaczej w metodyce postępowania analitycznego, wszystkie stosowane odczynniki powinny posiadać stopień czystości do analizy. W przypadku oznaczania mikroelementów, czystość odczynników sprawdza się przez wykonywanie ślepej próby. Zależnie od uzyskanych wyników, dalsze oczyszczanie odczynników może być konieczne.

1.2.2. Czynności wymagające przygotowania roztworów, rozcieńczanie, spłukiwanie lub przemywanie wykazywane w metodyce postępowania analitycznego bez podawania nazwy stosowanego rozpuszczalnika, odnoszą się do wody. Jako

podstawową należy przyjąć zasadę, że stosowana woda powinna być destylowana lub dejonizowana. W szczególnych przypadkach, wymienianych w metodach oznaczania, mogą być zalecane specjalne sposoby oczyszczania wody.

1.2.3. W laboratorium należy stosować urządzenia lub aparaty, których stosowanie jest zalecane w metodyce postępowania analitycznego. Urządzenia te powinny być czyste zwłaszcza wtedy, gdy są oznaczane bardzo małe ilości substancji.

1.3. STOSOWANIE METODYKI POSTĘPOWANIA ANALITYCZNEGO I WYRAŻANIE WYNIKÓW

1.3.1. Generalnie jedna metoda oznaczania jest zalecana do analizy zawartości każdej substancji w środku żywienia zwierząt. Gdy może być zastosowanych kilka metod oznaczania tej samej substancji, metoda, przy użyciu której wykonywano oznaczenie, powinna być wymieniona w sprawozdaniu z badań.

1.3.2. Wynik podany w sprawozdaniu z badań powinien stanowić średnią wartość, z co najmniej dwóch oznaczeń, wykonanych z tej samej próbki do badań.

1.3.3. Wynik powinien być wyrażony w sposób podany w metodyce postępowania analitycznego, zawierać odpowiednią liczbę cyfr znaczących i – jeżeli to konieczne – powinien być odniesiony do średniej próbki laboratoryjnej przed przygotowaniem.

ROZDZIAŁ 2

BADANIE PODSTAWOWYCH SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH

2.1. OZNACZANIE BIAŁKA SUROWEGO METODĄ KJELDAHLA

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości białka surowego w paszach na podstawie zawartości azotu oznaczonego metodą Kjeldahla.

2. ZASADA METODY

Próbka jest mineralizowana kwasem siarkowym w obecności katalizatora. Kwaśny roztwór jest alkalizowany za pomocą wodorotlenku sodu. Amoniak oddestylowany z zasadowego roztworu jest zbierany w znanej ilości roztworu kwasu siarkowego, którego nadmiar jest z kolei miareczkowany roztworem wodorotlenku sodu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Siarczan potasu.

3.2. Katalizator: tlenek miedzi(II) CuO lub siarczan miedzi(II) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pentahydrat.

3.3. Granulowany cynk.

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

3.5. Kwas siarkowy $c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4) = 0,5 \text{ mol/l}$.

3.6. Kwas siarkowy $c(1/2 \text{ H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$.

3.7. Czerwień metylowa, wskaźnik:

Rozpuścić 300 mg czerwieni metylowej w 100 ml etanolu, $s = 95 - 96\% \text{ (V/V)}$.

3.8. Wodorotlenek sodu (może być o czystości technicznej), roztwór o stężeniu $v = 40 \text{ g/100ml (m/V : 40\%)}$.

3.9. Wodorotlenek sodu, roztwór o stężeniu $c = 0,25 \text{ mol/l}$.

3.10. Wodorotlenek sodu, roztwór o stężeniu $c = 0,1 \text{ mol/l}$.

3.11. Granulowany pumeks, przemyty kwasem chlorowodorowym i wyprażony.

3.12. Acetanilid (temperatura wrzenia = 114°C , $N = 10,36\%$).

3.13. Sacharoza (niezawierająca azotu).

4. APARATURA I SPRZĘT

Aparatura i sprzęt odpowiedni do przeprowadzenia mineralizacji, destylacji i miareczkowania według metody Kjeldahla.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Mineralizacja

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, 1 g próbki i przenieść do kolby aparatu do mineralizacji. Dodać 15 g siarczanu potasu (3.1), odpowiednią ilość katalizatora (3.2) (0,3 do 0,4 g tlenku miedzi(II) lub 0,9 do 1,2 g pentahydratu siarczanu miedzi(II)), 25 ml kwasu siarkowego (3.4), kilka granul pumeksu (3.11) i zamieszać. Początkowo ogrzewać kolbę ostrożnie, w razie konieczności mieszając od czasu do czasu, aż do zwęglenia substancji organicznej i zaniku piany; następnie zwiększyć intensywność ogrzewania aż do trwałego wrzenia roztworu. Ogrzewanie jest właściwe, jeżeli wrzący kwas kondensuje na ściankach kolby. Należy zapobiegać miejscowemu przegrzewaniu się materiału i przylepianiu organicznych cząstek do tych miejsc. Od chwili, gdy roztwór stanie się klarowny i przyjmie jasnozieloną barwę, należy kontynuować ogrzewanie przez 2 godziny, a następnie pozostawić celem schłodzenia.

5.2. Destylacja

Ostrożnie dodać do kolby ilość wody wystarczającą do całkowitego rozpuszczenia siarczanów. Pozostawić do schłodzenia, a następnie dodać kilka granulek cynku (3.3).

Umieścić w odbieralniku aparatu destylacyjnego dokładnie odmierzone 25 ml kwasu siarkowego (3.5) lub (3.6), zależnie od przewidywanej zawartości azotu. Dodać kilka kropli wskaźnika czerwieni metylowej (3.7).

Podłączyć kolbę mineralizacyjną do chłodnicy aparatu do destylacji i zanurzyć koniec chłodnicy w cieczy znajdującej się w kolbie odbieralnika na głębokość co najmniej 1 cm (w przypadku analizy produktów o niskiej zawartości azotu należy zmniejszyć objętość kwasu siarkowego (3.6) dodawanego do kolby odbieralnika do 10 lub 15 ml i uzupełnić wodą do objętości 25 ml). Ostrożnie wlać 100 ml roztworu wodorotlenku sodu (3.8) do kolby mineralizacyjnej, nie dopuszczając do strat amoniaku. (Do oznaczania można stosować prosty sprzęt laboratoryjny, urządzenia półautomatyczne lub całkowicie

zautomatyzowane. Jeżeli zastosowane urządzenie wymaga przeniesienia roztworu po mineralizacji do kolby destylacyjnej, czynność ta powinna być wykonana bez jakichkolwiek strat. Jeżeli kolba aparatu destylacyjnego nie jest wyposażona we wkraplacz, dodać wodorotlenek sodu i natychmiast podłączyć kolbę do chłodnicy, pozwalając, aby ciecz spływała powoli po ściankach). Ogrzewać kolbę aż do całkowitego oddestylowania amoniaku.

5.3. Miareczkowanie

Odmiareczkować nadmiar kwasu siarkowego w kolbie odbieralnika roztworem wodorotlenku sodu (3.9) lub (3.10), w zależności od stężenia zastosowanego kwasu siarkowego, do uzyskania punktu końcowego.

5.4. Ślepa próba

Celem potwierdzenia, że zastosowane odczynniki nie zawierają azotu, należy przeprowadzić ślepa próbę (mineralizacja, destylacja i miareczkowanie), stosując 1 g sacharozy (3.13) zamiast próbki.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość białka surowego w procentach wagowych obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{(V_o - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

gdzie:

V_o – objętość (ml) NaOH (3.9) lub (3.10) zużytego do miareczkowania ślepej próby,

V_1 – objętość (ml) NaOH (3.9) lub (3.10) zużytego do miareczkowania próbki,

c – stężenie (mol/l) roztworu wodorotlenku sodu (3.9) lub (3.10),

m – masa (g) próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność

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

– 0,2% wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego poniżej 20%,

– 1,0% najwyższego wyniku, dla zawartości białka surowego od 20% do 40%,

– 0,4% wartości bezwzględnej, dla zawartości białka surowego powyżej 40%.

7.2. Dokładność

Przeprowadzić analizę (mineralizacja, destylacja i miareczkowanie) od 1,5 do 2,0 g acetanilidu (3.12) w obecności 1 g sacharozy (3.13); 1 g acetanilidu odpowiada 14,80 ml kwasu siarkowego (3.5). Stopień odzysku powinien wynosić co najmniej 99%.

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Do oznaczania można stosować prosty sprzęt laboratoryjny, urządzenia półautomatyczne lub całkowicie zautomatyzowane. Jeżeli zastosowane urządzenie wymaga przeniesienia roztworu po mineralizacji do kolby destylacyjnej, czynność ta powinna być wykonana bez jakichkolwiek strat. Jeżeli kolba aparatu destylacyjnego nie jest wyposażona we wkraplacz, dodać wodorotlenek sodu i natychmiast podłączyć kolbę do chłodnicy, pozwalając, aby ciecz spływała powoli po ściankach.

8.2. Jeżeli roztwór po mineralizacji przechodzi w postać stałą, należy przeprowadzić oznaczanie, stosując większe ilości kwasu siarkowego (3.4), niż podano wyżej.

8.3. W przypadku analizy produktów o niskiej zawartości azotu należy zmniejszyć objętość kwasu siarkowego (3.6) dodawanego do kolby odbieralnika do 10 lub 15 ml i uzupełnić wodą do objętości 25 ml.

2.2. OZNACZANIE SUROWYCH BIAŁEK ROZPUSTCZONYCH PEPSYNĄ I KWASEM CHLOROWODOROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania frakcji surowych białek rozpuszczonych, w określonych warunkach, pepsyną i kwasem chlorowodorowym. Metodę stosuje się do analizowania wszystkich pasz.

Wartości otrzymane tą metodą nie mają bezpośredniego związku z przyswajalnością *in vivo*.

2. ZASADA METODY

Próbkę ogrzewa się przez 48 godzin w temperaturze 40°C w roztworze chlorowodoru pepsyny. Zawiesinę filtruje się, a następnie oznacza zawartość azotu w filtracie, zgodnie z metodą oznaczania białka surowego metodą Kjeldahla.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, $d = 1,125$.

3.2. Kwas chlorowodorowy 0,075 N.

3.3. Pepsyna o aktywności 2,0 jednostek na mg (U/mg), zgodnie z objaśnieniem zawartym w Rozdziale 2, 2.2.1. Aktywność pepsyny określić metodą opisaną w Rozdziale 2, 2.2.1.

3.4. Roztwór 0,2% (m/V) pepsyny w kwasie chlorowodorowym (3.2) o aktywności około 400 jednostek na litr (U/l).

3.5. Emulsja zapobiegająca spienieniu (np. silikon).

3.6. Wszystkie odczynniki i roztwory, o których mowa w metodzie oznaczania białka surowego metodą Kjeldahla.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Łaźnia wodna lub inkubator nastawiona na 40°C ± 1°C.

4.2. Kolba Kjeldahla.

4.3. Zestaw do destylacji.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie roztworu

Produkty o zawartości oleju lub tłuszczu przekraczającej 10% należy poddać odfuszczeniu poprzez ekstrakcję za pomocą eteru ropy naftowej.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2 g próbki i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 450 ml roztworu pepsyny (3.4) uprzednio podgrzanego do 40°C i zawartość wstrząsnąć, aby uniknąć zbrylenia. Sprawdzić, czy pH zawiesiny jest mniejsze niż 1,7. Kolbę umieścić w łaźni wodnej lub w inkubatorze (4.1) i pozostawić na 48 godzin. Wstrząsnąć po 8 godzinach, 24 godzinach i 32 godzinach.

Po upływie 48 godzin dodać 15 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i ostudzić do 20°C. Uzupełnić wodą do kreski i przesączyć.

5.2. Mineralizacja

Odmierzyć 250 ml filtratu i umieścić w kolbie Kjeldahla (4.2). Dodać niezbędnych odczynników do mineralizacji podanych w metodzie Kjeldahla (Rozdział 2, 2.1, (5.1)). Zamieszać i doprowadzić do wrzenia. Jeżeli pojawi się piana, dodać kilka kropli emulsji zapobiegającej spienieniu (3.5). Kontynuować wrzenie aż do niemal całkowitego odparowania wody. Ostrożnie usunąć resztki wody, zmniejszając intensywność grzania.

Od momentu, kiedy roztwór stanie się klarowny i bezbarwny lub jasnozielony w przypadku użycia katalizatora miedziowego, kontynuować ogrzewanie jeszcze przez 1 godzinę, a następnie pozostawić do ostygnięcia.

5.3. Destylacja i miareczkowanie

Postępować według metody Kjeldahla (Rozdział 2, 2.1, (5.2) i (5.3)).

5.4. Ślepa próba

Przeprowadzić ślepa próbę według tego samego postępowania, lecz bez odważki analitycznej.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Odjąć objętość kwasu chlorowodorowego użytego w ślepej próbie od objętości zużytej przez badaną próbkę. 1 ml kwasu chlorowodorowego 0,1 N odpowiada 1,4 mg azotu.

Pomnożyć ilość uzyskaną dla azotu przez współczynnik 6,25. Wyniki przedstawić jako zawartość procentową próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność

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

- 0,4 wartości bezwzględnej, dla zawartości surowych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym do 20%,
- 2,0% wartości względnej, dla zawartości surowych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym powyżej 20% do 40%,
- 0,8 wartości bezwzględnej, dla zawartości surowych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym powyżej 40%.

2.2.1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI PEPSYNY

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania aktywności pepsyny wykorzystywanej w oznaczaniu frakcji surowych białek rozpuszczonych, w określonych warunkach, pepsyną i kwasem chlorowodorowym.

2. OBJAŚNIENIA

Jednostka aktywności pepsyny - to taka ilość tego enzymu, która uwalnia w ciągu minuty, w warunkach tej metody, taką ilość grup hydroksyarylowych, która po zabarwieniu odczynnikami Folin-Ciocalteu ma gęstość optyczną odpowiadającą 1 μmol tyrozyny potrakтованей w ten sam sposób.

3. ZASADA METODY

Hemoglobinę traktuje się roztworem pepsyny w rozcieńczonym kwasie chlorowodorowym. Niezhydrolizowaną frakcję protein strąca się kwasem trichlorooctowym, przesącza, a następnie dodaje wodorotlenku sodu i odczynnika Folin-Ciocalteu. Pomiaru absorbancji roztworu dokonuje się przy długości fali 750 nm. Odpowiadającą mu ilość tyrozyny odczytuje się z krzywej kalibracyjnej.

4. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Stosować wyłącznie odczynniki o znanej czystości analitycznej i destylowaną lub dejonizowaną wodę lub wodę o równoważnej czystości.

4.1. Kwas chlorowodorowy, $c(\text{HCl}) = 0,2 \text{ N}$.

4.2. Kwas chlorowodorowy, $c(\text{HCl}) = 0,06 \text{ N}$.

4.3. Kwas chlorowodorowy, $c(\text{HCl}) = 0,025 \text{ N}$.

4.4. Roztwór 5% (M/V) kwasu trichlorooctowego.

4.5. Roztwór wodorotlenku sodu, $c(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ N}$.

4.6. Odczynnik Folin-Ciocalteu:

Umieścić 100g dwuhydratu wolframanu(VI) sodu ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 25g dwuhydratu molibdenianu(VI) sodu ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 700 ml wody w kolbie okrągłodennej ze szlifem o pojemności 2 litrów. Dodać 50 ml kwasu ortofosforowego(V) [$d(\text{H}_3\text{PO}_4) = 1,71$] i 100 ml stężonego kwasu chlorowodorowego [$d(\text{HCl}) = 1,19$]. Kolbę podłączyć do chłodnicy zwrotnej, doprowadzić roztwór do wrzenia i delikatnie gotować przez 10 godzin. Pozostawić do ostygnięcia, odłączyć chłodnicę zwrotną, dodać 175 g dwuhydratu siarczanu(VI) litu ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 50 ml wody, 1 ml bromu. Aby usunąć nadmiar bromu, roztwór gotować przez 15 minut.

Pozostawić do ostygnięcia, następnie roztwór zdekantować do kolby miarowej o pojemności 1 litra. Uzupełnić zawartość kolby wodą do kreski, zamieszać i przesączyć. Dopuszczalny jest każdy kolor roztworu z wyjątkiem zielonkawego.

Przed użyciem jedną objętość odczynnika rozcieńczyć dwoma objętościami wody.

4.7. Roztwór hemoglobiny.

Odważyć taką ilość hemoglobino-białkowego substratu (około 2 g według metody Ansona), która odpowiada 354 mg azotu, a następnie umieścić w kolbie o pojemności 200 ml z dopasowanym szlifem.

W razie potrzeby oznaczyć zawartość azotu w substracie, stosując półmikrometodę Kjeldahla. Teoretyczna zawartość azotu wynosi 17,7%.

Dodać kilka ml rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego (4.2), połączyć kolbę z pompą próżniową i wstrząsać zawartość aż do zupełnego rozpuszczenia hemoglobiny. Odłączyć pompę i ciągle wstrząsając, rozcieńczać kwasem chlorowodorowym (4.2) do uzyskania objętości 100 ml. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

4.8. Roztwór wzorcowy tyrozyny, $c(C_9H_{11}NO_3)$.

W celu uzyskania podstawowego roztworu wzorcowego, w kolbie miarowej o pojemności 1 litra rozpuścić 181,2 mg tyrozyny w rozcieńczonym kwasie chlorowodorowym (4.1) i uzupełnić zawartość kwasem do kreski.

Następnie pobrać pipetą 20,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozcieńczyć zawartość kwasem chlorowodorowym (4.1) i uzupełnić kwasem do kreski. Stężenie tyrozyny w roztworze wzorcowym wynosi 0,2 $\mu\text{mol/ml}$.

5. APARATURA I SPRZĘT

Stosować aparaturę laboratoryjną, a w szczególności podaną poniżej:

5.1. Łaźnia wodna, ustawiona na $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$.

5.2. Spektrometr, ustawiony na pomiar przy długości fali 750 nm.

5.3. Chronometr z odczytem co 1 sekunda.

5.4. Pehametr z dokładnością odczytu 0,1 jednostki pH.

5.5. Szklana bagietka z jednej strony wyciągnięta.

6. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

6.1. Przygotowanie roztworu

Rozpuścić 150 mg pepsyny (lub ilość niezbędną do otrzymania wartości absorbancji $0,35 \pm 0,035$) w 100 ml rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego (4.2). Odpipetować 2 ml roztworu do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełnić do kreski rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym (4.3). pH roztworu powinno wynosić $1,6 \pm 0,1$. Kolbę zanurzyć w łaźni wodnej (5.1) ustawionej na 25°C .

6.2. Hydroliza

Odpipetować 5,0 ml roztworu hemoglobiny (4.7) do probówki, podgrzać do temperatury $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ w łaźni wodnej (5.1). Dodać 1 ml roztworu pepsyny otrzymanego według (6.1) i wymieszać bagietką (5.5) około 10 razy w obydwie strony. Probówkę umieścić w łaźni wodnej ustawionej na $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ i trzymać przez 10 minut ± 1 s, licząc od momentu dodania roztworu pepsyny. Temperaturę należy koniecznie utrzymywać na stałym poziomie. Dodać 10 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (4.4) uprzednio podgrzanego do temperatury 25°C , wymieszać i przesączyć przez suchy sączek.

6.3. Wywołanie barwy i pomiar absorbancji

Odpipetować 5,0 ml filtratu do kolby stożkowej o pojemności 50 ml, dodać 10,0 ml roztworu wodorotlenku sodu (4.5) i wstrząsając dodać 3 ml rozcieńczonego odczynnika Folin-Ciocalteu (4.6). Po upływie od 5 do 10 minut zmierzyć absorbancję roztworu względem wody przy długości fali 750 nm, używając spektrometru (5.2) i 1 cm kuwet.

6.4. Ślepa próba

Dla każdego oznaczania przeprowadzić ślepa próbę w następujący sposób:

Odpipetować 5,0 ml roztworu hemoglobiny (4.7) do probówki. Podgrzać do temperatury $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ w łaźni wodnej (5.1), dodać 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego (4.4) uprzednio ogrzanego do temperatury $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$, wymieszać i dodać 1,0 ml roztworu pepsyny otrzymanego według (6.1). Wymieszać szklaną bagietką i wstawić probówkę do łaźni wodnej (5.1) o temperaturze $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ na 10 minut ± 1 s. Wymieszać i przesączyć przez suchy sączek. Dalej postępować jak w (6.3).

6.5. Krzywa kalibracyjna

Do kolb Erlenmeyera o pojemności 50 ml odmierzyć kolejno 1,0 ml, 2,0 ml, 3,0 ml, 4,0 ml i 5,0 ml wzorcowego roztworu tyrozyny (4.8), co odpowiada kolejno 0,2 μmol , 0,4 μmol , 0,6 μmol , 0,8 μmol i 1,0 μmol tyrozyny. Uzupełnić serię roztworem odniesienia wolnym od tyrozyny. Sporządzić z kwasem chlorowodorowym (4.1) roztwór o pojemności 5,0 ml. Do każdej kolby dodać po 10,0 ml roztworu wodorotlenku sodu (4.5) i ciągle wstrząsając po 3,0 ml odczynnika Folin-Ciocalteu (4.6). Zmierzyć absorbancję każdego roztworu według (6.3). Wykreślić krzywą w układzie zależności absorbancji od zawartości tyrozyny wyrażonej w μmolach .

7. OBLICZANIE WYNIKÓW

Z krzywej kalibracyjnej odczytać, w μmolach , ilość tyrozyny, która odpowiada absorbancji wybarwionego roztworu i skorygować o wynik ślepej próby. Aktywność pepsyny w temperaturze $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$, wyrażoną w μmolach tyrozyny na mg i na minutę, obliczyć według następującego wzoru:

$$\text{Jednostki w mg (U/mg)} = \frac{0,32 \cdot a}{P}$$

gdzie:

a – jest ilością tyrozyny odczytaną z krzywej kalibracyjnej w μmol ,

P – jest masą w mg użytej pepsyny w (6.2).

Ilość rozpuszczonej pepsyny powinna być tak dobrana, aby podczas ostatecznego pomiaru fotometrycznego otrzymać natężenie optyczne $0,35 \pm 0,035$.

Dwie jednostki aktywności pepsyny na mg otrzymane z użyciem tej metody odpowiadają 3,64 milijednostkom Ansona na mg (μmol tyrozyny na mg na minutę w temperaturze 35,5°C) lub 36 400 handlowym jednostkom na g (μmol tyrozyny na g w ciągu 10 minut w temperaturze 35,5°C).

2.3. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania wilgotności pasz. Metody nie stosuje się do badania produktów mlecznych występujących jako pasze jednoskładnikowe, substancji mineralnych i mieszanin składających się głównie z substancji mineralnych oraz nasion i owoców roślin oleistych.

2. ZASADA METODY

Próbka jest suszona w warunkach dostosowanych do właściwości pasz. Obniżenie masy jest określane poprzez ważenie. Konieczne jest przeprowadzenie wstępnego suszenia, w przypadku gdy pasze zawierają duże ilości wilgoci.

3. APARATURA I SPRZĘT

3.1. Rozdrabniacz wykonany z materiałów niepochłaniających wilgoci, łatwy do czyszczenia, pozwalający na szybkie rozdrobnienie materiału bez nadmiernego ogrzewania, ograniczający do minimum kontakt z powietrzem, spełniający wymagania wymienione w (4.1.1) i (4.1.2) (np. chłodzony wodą mikrorozdrabniacz młotkowy, składany stożkowy młynek, rozdrabniacze wolnoobrotowe lub wyposażone w koło zębate).

3.2. Waga analityczna, dokładność 0,5 mg.

3.3. Suche pojemniki z nierdzewnego metalu lub szkła z nakrywkami umożliwiającymi hermetyczne zamknięcie, o powierzchni roboczej umożliwiającej równomierne rozsypanie badanej próbki w warstwie 0,3 g/cm².

3.4. Suszarka elektryczna z termostatem ($\pm 1^\circ\text{C}$), dobrze wentylowana i pozwalająca na szybką regulację temperatury.¹⁾

3.5. Termostатовana suszarka próżniowa zaopatrzona w pompę olejową oraz mechanizm umożliwiający nawiew gorącego powietrza lub wprowadzenie czynnika suszącego (np. tlenu wapnia).

3.6. Eksykator z płytką z grubego perforowanego metalu lub porcelany, zawierający efektywny czynnik suszący.

4. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Czynności opisane w tej części powinny być wykonywane szybko po otworzeniu opakowania próbki. Analiza powinna być wykonana co najmniej w dwóch powtórzeniach.

4.1. Przygotowanie

4.1.1. Pasje inne niż wymienione w (4.1.2) i (4.1.3) pobrać w ilości co najmniej 50 g. Jeżeli to konieczne, rozdrobnić lub podzielić w taki sposób, aby zapobiec jakimkolwiek zmianom w zawartości wilgoci (7).

4.1.2. Zboża i kasze

Pobrać co najmniej 50 g próbki. Rozdrobnić na cząstki, które przechodzą przez 0,5 mm oczko sita co najmniej w 50% i pozostają w ilości nie większej niż 10% na sicie o boku oczka kwadratowego 1 mm.

4.1.3. Pasje ciekłe lub w postaci pasty, pasze z przewagą olejów lub tłuszczów

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

4.2. Suszenie

4.2.1. Pasje inne niż wymienione w (4.2.2) i (4.2.3)

Zważyć naczynko (3.3) z przykrywką z dokładnością do 0,5 mg. Odważyć do naczynka, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki i równo rozmieścić. Wstawić naczynko bez przykrywki do suszarki podgrzanej do temperatury 103°C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, należy umieścić naczynko w suszarce tak szybko jak to możliwe. Suszyć przez 4 godziny od czasu, gdy suszarka osiągnie ponownie temperaturę 103°C. Nałożyć przykrywkę na naczynko, wyjąć je z suszarki, pozostawić do schłodzenia w eksykatorze (3.6) na 30 do 45 minut i zważyć z dokładnością do 1 mg. Pasje z przeważającym udziałem oleju lub tłuszczu suszyć ponownie w suszarce przez 30 minut w temperaturze 130°C. Różnica pomiędzy dwoma ważeniami nie powinna przekraczać 0,1% wilgotności.

4.2.2. Zboża, maki, kasze i mączki

Zważyć naczynko (3.3) z przykrywką, z dokładnością do 0,5 mg. Odważyć do naczynka, z dokładnością do 1 mg, około 5 g rozdrobnionej próbki i równo rozmieścić. Wstawić naczynko bez przykrywki do suszarki podgrzanej do temperatury 130°C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić naczynko w suszarce tak szybko jak to możliwe. Suszyć przez 2 godziny, licząc od czasu, gdy suszarka ponownie osiągnie temperaturę 130°C. Nałożyć przykrywkę na naczynko, wyjąć je z suszarki, pozostawić w eksykatorze (3.6) na 30 do 45 minut celem schłodzenia i zważyć z dokładnością do 1 mg.

4.2.3. Mieszanki paszowe zawierające ponad 4% sacharozy lub laktozy; surowce paszowe takie jak, chleb świętojański, hydrolizowane produkty zbożowe, słód jęczmienny, susz buraczany, hydrolizaty rybne i cukrowe, mieszanki z ponad 25% udziałem soli mineralnych zawierających wodę krystalizacyjną.

Zważyć naczynko (3.3) z dokładnością do 0,5 mg. Odważyć do naczynka, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki i równo rozmieścić. Wstawić naczynko bez przykrywki do suszarki próżniowej (3.5) podgrzanej do temperatury od 80 do 85°C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić naczynko w suszarce tak szybko jak to możliwe. Zmniejszyć ciśnienie do 100 Torr i pozostawić na 4 godziny pod działaniem tego ciśnienia, osuszając powietrze przy użyciu czynnika suszącego (około 300 g na 20 próbek). Po uzyskaniużądanego ciśnienia odłączyć pompę próżniową. Czas suszenia należy liczyć od chwili, gdy suszarka osiągnie ponownie temperaturę od 80 do 85°C. Ostrożnie zrównać ciśnienie w suszarce

¹⁾ W celu suszenia ziarna zbóż, maki, kasz i mączek należy stosować suszarki, które osiągają temperaturę 131°C w czasie poniżej 45 minut, przy maksymalnej liczbie próbek poddawanych równoczesnemu suszeniu. Suszarka powinna być wentylowana w taki sposób, aby po 2 godzinach suszenia maksymalnej liczby próbek wyniki nie różniły się więcej niż o 0,15% w porównaniu do wyników uzyskanych po 4 godzinach suszenia.

z ciśnieniem atmosferycznym. Otworzyć suszarkę, szybko nałożyć przykrywkę na naczynko i usunąć je z suszarki. Pozostawić do schłodzenia w eksykatorze (3.6) przez 30 do 45 minut i zważyć z dokładnością do 1 mg. Suszyć ponownie w suszarce próżniowej przez 30 minut w temperaturze od 80 do 85°C i zważyć powtórnie. Różnica pomiędzy dwoma ważeniami nie powinna przekraczać 0,1% wilgotności.

4.3. Suszenie wstępne

4.3.1. Pasze inne niż wymienione w (4.3.2)

Pasze o wysokiej wilgotności, trudne do rozdrabniania, należy poddać wstępnemu suszeniu w następujący sposób:

Odważyć 50 g nierozdrobnionej próbki (pasze sprasowane lub zbrylone mogą być z konieczności wstępnie rozdrobnione), z dokładnością do 10 mg do odpowiedniego naczynia (np. na płytkę aluminiową o wymiarach 20 cm x 12 cm z obwódką o wysokości 0,5 cm). Suszyć w suszarce w temperaturze 60 do 70°C, aż zawartość wilgoci obniży się do 8 – 12%. Wyjąć próbkę z suszarki, pozostawić na powietrzu do schłodzenia i zważyć z dokładnością do 10 mg. Szybko rozdrobnić, postępując jak podano w (4.1.1), i suszyć według opisu w (4.2.1) lub (4.2.3) w zależności od rodzaju paszy.

4.3.2. Zboża

Ziarno zbóż o wilgotności wyższej niż 17% należy poddać wstępnemu suszeniu, jak następuje:

Odważyć 50 g nierozdrobnionego, ziarna z dokładnością do 10 mg, do odpowiedniego naczynia (np. na płytkę aluminiową o wymiarach 20 cm x 12 cm z obwódką o wysokości 0,5 cm). Suszyć w suszarce przez 5 do 7 minut w temperaturze 130°C. Wyjąć próbkę z suszarki, pozostawić przez 2 godziny na powietrzu celem schłodzenia i zważyć z dokładnością do 10 mg. Szybko rozdrobnić, postępując, jak podano w (4.1.2), i suszyć zgodnie z opisem podanym w (4.2.2).

5. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość wilgoci, w procentach wagowych, obliczyć według następujących wzorów:

5.1. Suszenie bez wstępnego podsuszania

$$(E - m) \times 100 / E$$

gdzie:

E – początkowa masa badanej próbki, w g,

m – masa badanej próbki po wysuszeniu, w g.

5.2. Suszenie z podsuszaniem

$$[(M' - m) M / M' + E - M] \times 100 / E = 100 (1 - Mm / EM')$$

gdzie:

E – początkowa masa badanej próbki, w g,

M – masa badanej próbki po wstępnym podsuszaniu, w g,

M' – masa badanej próbki po rozdrobnieniu, w g,

m – masa badanej próbki po wysuszeniu, w g.

6. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,2% wilgoci.

7. OBJAŚNIENIA

Gdy rozdrabnianie próbki okazuje się konieczne i jeżeli ten proces wpływa na zawartość wilgoci w produkcie, wyniki analizy komponentów paszowych powinny być skorygowane o zawartość wilgoci w początkowym stanie.

2.4. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI OLEJÓW I TŁUSZCZÓW

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości wody i substancji lotnych w tłuszczach i olejach pochodzenia zwierzęcego oraz roślinnego.

2. ZASADA METODY

Próbka jest suszona do stałej masy w temperaturze 103°C. Ubytek masy jest określany metodą wagową.

3. APARATURA I SPRZĘT

3.1. Naczynie z płaskim dnem wykonane z materiału nierdzewnego, o średnicy od 8 do 9 cm i wysokości 3 cm.

3.2. Termometr rtęciowy z wzmocnionym zbiornikiem i nadmiarową rurką w górnym końcu, z podziałką od około 80°C do 110°C i o długości około 10 cm.

3.3. Łaźnia piaskowa lub elektryczna płyta grzewcza.

3.4. Eksykator zawierający efektywny środek suszący.

3.5. Waga analityczna.

4. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 20 g homogennej próbki do suchego, zważonego naczynia (3.1) zawierającego termometr (3.2). Ogrzewać na łaźni piaskowej lub płycie grzewczej (3.3), ciągle mieszając termometrem, tak aby uzyskać wzrost temperatury do 90°C w czasie około 7 minut.

Zmniejszyć ogrzewanie, obserwując częstotliwość odrywania się pęcherzyków powietrza od dna naczynia. Temperatura nie może przekroczyć 105°C. Kontynuować mieszanie, pocierając dno naczynia do czasu, aż przestaną się tworzyć pęcherzyki.

Aby być pewnym całkowitego odparowania wilgoci, ogrzewać próbkę kilka razy do temperatury 103°C ± 2°C, schładzając do 93°C pomiędzy kolejnymi ogrzewaniami. Następnie schłodzić próbkę do temperatury pokojowej w eksykatorze (3.4) i zważyć. Powtarzać ogrzewanie, dopóki ubytek masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie będzie większy od 2 mg.

Wzrost masy próbki po powtórным ogrzewaniu wskazuje na utlenienie się tłuszczu. W takim przypadku do obliczenia wyniku należy wziąć ostatnią masę próbki sprzed jej wzrostu.

5. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wilgotność, w procentach wagowych, obliczyć według następującego wzoru:

$$(M_1 - M_2) \times 100 / M_0$$

gdzie:

M_0 – masa badanej próbki, w g,

M_1 – masa naczynia z zawartością przed ogrzewaniem, w g,

M_2 – masa naczynia z zawartością po ogrzewaniu, w g.

Wyniki oznaczania niższe od 0,05% należy zapisać jako „niższe od 0,05%”.

6. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność:

Różnica wilgotności pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,05 % wartości bezwzględnej.

2.5. OZNACZANIE POPIOŁU SUROWEGO**1. CEL I ZAKRES**

Metoda służy do oznaczania zawartości popiołu surowego w paszach.

2. ZASADA METODY

Spopielenie próbki w temperaturze 550°C i ważenie uzyskanego popiołu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Azotan amonu, roztwór 20 % (m/V).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Płyta grzejna.

4.2. Elektryczny piec do spalań z termostatem.

4.3. Tygły do spalań platynowe lub ze stopu platyny i złota (10 % Pt, 90 % Au), prostokątne (60 x 40 x 25 mm) lub okrągłe (średnica 60 – 75 mm, wysokość 20 – 25 mm).

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki (2,5 g w przypadku substancji pęczniejących) i umieścić w tyglu do spalań, wyprażonym i o stałej masie. Tygiel postawić na płycie grzewczej i ogrzewać stopniowo aż do zwęglania. Następnie wstawić go do pieca ustawionego na 550°C ± 5°C. Utrzymywać w tej temperaturze aż do uzyskania popiołu o barwie białej, jasnoszarej lub jasnoczerwonej, świadczącej o nieobecności cząstek węglowych. Umieścić tygiel w eksykatorze, pozostawić do ochłodzenia i zważyć.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość popiołu surowego X obliczyć w procentach według następującego wzoru:

$$X (\%) = \frac{(a - b) \times 100}{m}$$

gdzie:

a – masa tygla z próbką po spalaniu, w g,

b – masa tygla, w g,

m – masa próbki, w g.

Różnica zawartości popiołu surowego pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych w tej samej próbce nie może przekraczać 5% wartości względnej.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Substancje, które trudno się spopielają, należy spopielać wstępnie przez 3 godziny. Następnie po ochłodzeniu i dodaniu kilku kropli 20% roztworu azotanu amonu (dodawać ostrożnie, tak aby nie spowodować strat popiołu i tworzenia się zbryleń). Po wysuszeniu kontynuować zwęglanie w piecu. Powtarzać czynność aż do całkowitego spopielenia.

7.2. W przypadku gdy badane produkty trudno poddają się postępowaniu opisanemu w (7.1), należy przyjąć poniższą procedurę.

Po spopieleniu przez 3 godziny umieścić popiół w ciepłej wodzie i przesączyć przez mały, bezpopiołowy sączonek. Spalić sączonek z zawartością w tyglu. Filtrat umieścić w schłodzonym tyglu, odparować do sucha, spopielić i zważyć.

7.3. W przypadku olejów i tłuszczów odważka powinna wynosić 25 g. Zwęglać w tyglu odpowiedniej wielkości, przenosząc płomień na substancję skrawkiem bezpopiołowej bibuły filtracyjnej. Po spalaniu pozostałość zwilżyć małą ilością wody. Wysuszyć i spopielać, jak opisano w (5).

2.6. OZNACZANIE POPIOŁU NIEROZPUSZCZALNEGO W KWASIE CHLOROWODOROWYM**1. CEL I ZAKRES**

Metoda służy do oznaczania zawartości substancji mineralnych nierozpuszczalnych w kwasie chlorowodorowym w paszach. W zależności od rodzaju tych substancji stosuje się dwie metody:

1.1. Metoda A – mająca zastosowanie do pasz organicznych i do większości materiałów paszowych.

1.2. Metoda B – mająca zastosowanie do pasz mineralnych, ich mieszanin oraz do materiałów paszowych zawierających substancje nierozpuszczalne w kwasie chlorowodorowym w ilości powyżej 1%, co sprawdza się, stosując wcześniej metodę A.

2. ZASADA METODY

2.1. Metoda A: próbka jest spopiellana, popiół gotowany w kwasie chlorowodorowym, a nierozpuszczalna pozostałość jest sączona i ważona.

2.2. Metoda B: próbkę zadaje się kwasem chlorowodorowym, roztwór sączy, pozostałość spopiela i otrzymany popiół traktuje jak w metodzie A.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, roztwór 3 N.

3.2. Kwas trichlorooctowy, 20% roztwór (m/V).

3.3. Kwas trichlorooctowy, 1% roztwór (m/V).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Płyta grzejna.

4.2. Elektryczny piec do spalań z termostatem.

4.3. Tygły do spalań platynowe lub ze stopu platyny i złota (10% Pt, 90% Au) prostokątne (60 x 40 x 25 mm) lub okrągłe (średnica 60 – 75 mm, wysokość 20 – 25 mm).

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Metoda A

Spopielić próbkę metodą opisaną przy oznaczaniu popiołu surowego. Popiół uzyskany z tej analizy może być także wykorzystany.

Przenieść popiół do zlewki o pojemności od 250 do 400 ml przy pomocy 75 ml kwasu chlorowodorowego 3 N (3.1). Powoli doprowadzić do wrzenia i gotować ostrożnie przez 15 minut. Przesączyć gorący roztwór przez bibułę bezpopiołową i przemywać pozostałość gorącą wodą. Osad przemywać do zaniku kwaśnego odczynu. Wysuszyć sączek z osadem i spopielić w uprzednio zważonym tygłu w temperaturze nie niższej od 550°C i nie wyższej od 700°C. Ostudzić w ekzykatorze i zważyć.

5.2. Metoda B

Odważyć 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w zlewce o pojemności od 250 do 400 ml. Dodać kolejno 25 ml wody i 25 ml kwasu chlorowodorowego 3 N (3.1), wymieszać i odczekać, aż roztwór przestanie się burzyć. Dodać kolejne 50 ml kwasu chlorowodorowego 3 N (3.1). Odczekać do ulotnienia się gazu, umieścić zlewkę we wrzącej łaźni wodnej i trzymać ją tam przez 30 minut lub w razie potrzeby dłużej w przypadku całkowitej hydrolizy skrobi obecnej w próbce.

Gorący roztwór przesączyć przez sączek bezpopiołowy i przemyć 50 ml gorącej wody (gdy sączenie przebiega trudno, zaleca się w toku analizy zastąpienie 50 ml kwasu chlorowodorowego 3 N (3.1) 50 ml kwasu trichlorooctowego (3.2) i przemyć sączka ciepłym roztworem kwasu trichlorooctowego (3.3)). Sączek z osadem umieścić w tygłu do spalań, wysuszyć i spopielać w temperaturze nie niższej od 550°C i nie wyższej od 700°C. Umieścić popiół w 250 do 400 ml zlewce za pomocą 75 ml kwasu chlorowodorowego 3 N (3.1). Powoli doprowadzić do wrzenia i gotować ostrożnie przez 15 minut. Przesączyć gorący roztwór przez bibułę bezpopiołową i przemywać pozostałość gorącą wodą. Osad przemywać do zaniku kwaśnego odczynu. Wysuszyć sączek z osadem i spopielić w uprzednio zważonym tygłu w temperaturze nie niższej od 550°C i nie wyższej od 700°C. Ostudzić w ekzykatorze i zważyć.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość popiołu nierozpuszczalnego w kwasie chlorowodorowym X obliczyć w procentach według następującego wzoru:

$$X (\%) = \frac{(a - b) \times 100}{m}$$

gdzie:

a – masa tygla z pozostałością po wyprażeniu osadu, w g,

b – masa tygla, w g,

m – masa próbki, w g.

Różnica zawartości popiołu nierozpuszczalnego w kwasie chlorowodorowym pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych w tej samej próbce nie może przekraczać 10% wartości względnej.

7. OBJAŚNIENIA

Gdy sączenie przebiega trudno, zaleca się w toku analizy zastąpienie 50 ml kwasu chlorowodorowego 3 N (3.1) 50 ml kwasu trichlorooctowego (3.2) i przemyć sączka ciepłym roztworem kwasu trichlorooctowego (3.3).

2.7. OZNACZANIE WŁÓKNA SUROWEGO**1. CEL I ZAKRES**

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

2. ZASADA METODY

Próbkę, w razie konieczności odtłuszczone, gotuje się w roztworach kwasu siarkowego i wodorotlenku potasu o odpowiednim stężeniu. Osad oddziela się na filtrze ze szklanym spiekem, przemywa, suszy i spopiela w temperaturze od 475 do 500 °C. Ubytek masy po spopieleniu odpowiada zawartości włókna surowego w badanej próbce.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas siarkowy, c = 0,13 mol/l.

3.2. Odczynnik przeciwpieniący (np. n-oktanol).

3.3. Materiał wspomagający sączenie (Celit 545 lub podobny), wyprażony w temperaturze 500°C przez 4 godziny (8.6).

3.4. Aceton.

3.5. Eter naftowy, temperatura wrzenia od 40 do 60°C.

3.6. Kwas chlorowodorowy, $c = 0,5$ mol/l.

3.7. Roztwór wodorotlenku potasu, $c = 0,23$ mol/l.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Zestaw grzewczy do gotowania w roztworach kwasu siarkowego lub wodorotlenku potasu, wyposażony w podstawkę mocującą tygiel filtracyjny (4.2), rurkę odprowadzającą ciecz z kranem i pompę próżniową, jeżeli to możliwe na sprężone powietrze. Przed użyciem przemywać zestaw wrzącą wodą przez 5 minut.

4.2. Szklany tygiel filtracyjny ze spiekami o porach 40 – 90 μm . Przed pierwszym użyciem ogrzewać przez 5 minut w temperaturze 500°C i schłodzić (8.6).

4.3. Cylinder o pojemności co najmniej 270 ml z chłodnicą zwrotną, przystosowany do gotowania.

4.4. Suszarka z termostatem.

4.5. Piec muflowy z termostatem.

4.6. Zestaw do ekstrakcji składający się z podstawki mocującej tygiel filtracyjny (4.2) i z odłączanej rurki z kranem z wylewką, podłączanej do pompy próżniowej.

4.7. Pierścienie łączące do połączenia zestawu grzewczego (4.1), tygla filtracyjnego (4.2), cylindra (4.3) i zestawu ekstrakcyjnego do ekstrakcji na zimno (4.6) z tygłem.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, 1 g przygotowanej próbki do tygla (4.2), uwzględniając informacje podane w (8.1), (8.2), (8.3), i dodać 1 g materiału wspomagającego sączenie (3.3). Zestaw grzewczy (4.1) połączyć z tygłem filtracyjnym (4.2), a następnie przyłączyć cylinder (4.3) do tygla. Wlać 150 ml wrzącego kwasu siarkowego (3.1) do cylindra połączonego z tygłem i, w razie potrzeby, dodać kilka kropli odczynnika przeciwpieniącego (3.2). Doprowadzić ciecz do wrzenia w przeciągu 5 ± 2 minut i energicznie gotować przez 30 minut. Otworzyć kran w rurce odprowadzającej (4.1), przesączyć, pod zmniejszonym ciśnieniem, kwas siarkowy przez tygiel filtracyjny i przemyć pozostałość trzykrotnie 30 ml porcjami wrzącej wody, upewniając się, że pozostałość przesączono do sucha po każdym przemyciu.

Zamknąć kurek i wlać 150 ml wrzącego roztworu wodorotlenku potasu (3.7) do cylindra połączonego z tygłem i dodać kilka kropli odczynnika przeciwpieniącego (3.2). Doprowadzić ciecz do wrzenia w przeciągu 5 ± 2 minut i gotować energicznie dokładnie przez 30 minut. Przesączyć i powtórzyć przemycanie jak po gotowaniu w kwasie siarkowym.

Po ostatnim przemyciu i wysuszeniu odłączyć tygiel z zawartością i zamocować go w zestawie do zimnej ekstrakcji (4.6). Podłączyć pompę próżniową i przemycać pozostałość w tyglu trzema kolejnymi porcjami 25 ml acetonu (3.4), upewniając się, że po każdym przemyciu osad został odsączony do sucha. Wysuszyć tygiel do stałej masy w suszarce ustawionej na temperaturę 130°C. Po każdym suszeniu schłodzić w eksykatorze i niezwłocznie zważyć. Umieścić tygiel w piecu i spopielać do stałej masy w temperaturze od 475 do 500°C przez co najmniej 30 minut. Przed ważeniem tygla, po każdym spopielaniu należy najpierw schłodzić tygiel w piecu, a następnie w eksykatorze.

Przeprowadzić test ślepej próby. Ubytek masy po spopielaniu nie może przekraczać 4 mg.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość włókna surowego w próbce obliczyć w procentach według następującego wzoru:

$$(b - c) \times 100$$

a

gdzie:

a – masa próbki, w g,

b – ubytek masy po spopieleniu, w g,

c – ubytek masy ślepej próby po spopieleniu, w g.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

– 0,3% wartości bezwzględnej, dla zawartości włókna surowego poniżej 10%,

– 3% najwyższego wyniku, dla zawartości włókna surowego 10% i więcej.

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Pasze zawierające ponad 10% tłuszczu surowego należy przed oznaczaniem odtłuścić eterem naftowym (3.5). W tym celu połączyć tygiel filtracyjny (4.2) z zawartością do zestawu ekstrakcyjnego do zimnej ekstrakcji (4.6) i za pomocą pompy próżniowej przemyć zawartość trzykrotnie 30 ml porcjami eteru naftowego, upewniając się, że pozostałość jest sucha. Połączyć tygiel z zestawem grzewczym (4.1) i kontynuować, jak opisano w (5).

8.2. Pasy zawierające tłuszcze, które nie ekstrahują się bezpośrednio eterem naftowym (3.5), należy odtłuścić, jak podano w (8.1), i ponownie odtłuścić po gotowaniu w kwasie.

Po gotowaniu w kwasie i przemyciu podłączyć tygiel z zawartością do zestawu do zimnej ekstrakcji (4.6) i przemyć trzykrotnie 30 ml acetonu, a następnie trzykrotnie 30 ml porcjami eteru naftowego. Odsączyć pod próżnią do sucha i kontynuować sposób postępowania, jak to opisano w (5), rozpoczynając od dodania wodorotlenku potasu.

8.3. W przypadku gdy pasze zawierają ponad 5% węglanów, w przeliczeniu na węglan wapnia, podłączyć tygiel (4.2) z odważoną próbką do zestawu grzewczego (4.1). Przemycić próbkę trzykrotnie 30 ml porcjami kwasu chlorowodorowego (3.6). Po dodaniu każdej porcji kwasu pozostawić próbkę na około minutę przed sączeniem. Przemycić 30 ml wody i kontynuować sposób postępowania, jak opisano w (5).

8.4. Jeżeli kilka tygli może być podłączonych do jednego zestawu grzewczego, nie należy wykonywać dwóch pojedynczych oznaczeń próbki w tej samej serii.

8.5. Jeżeli po gotowaniu w kwasie i zasadzie roztwory trudno się sączą, przepuścić sprężone powietrze przez rurkę dołączaną do zestawu grzewczego i następnie kontynuować sączenie.

8.6. Temperatura spopielenia nie powinna przekraczać 500°C ze względu na wytrzymałość szklanego tygla. Należy zachować ostrożność, aby uniknąć nagłego szoku termicznego podczas ogrzewania i schładzania.

2.8. OZNACZANIE SUROWEGO OLEJU I TŁUSZCZU

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości surowych olejów i tłuszczów w paszach. Metody nie stosuje się do analizy nasion i owoców roślin oleistych.

Zastosowanie dwóch sposobów postępowania opisanych poniżej zależy od natury i składu paszy oraz celu prowadzenia oznaczeń.

1.1. Postępowanie A – Bezpośrednio ekstrahowane oleje i tłuszcze.

Postępowanie ma zastosowanie do surowców paszowych pochodzenia roślinnego, z wyjątkiem tych, które zostały objęte zakresem postępowania B.

1.2. Postępowanie B – Całkowite surowe oleje i tłuszcze.

Postępowanie ma zastosowanie do materiałów paszowych pochodzenia zwierzęcego i wszystkich mieszanek paszowych. Jest stosowane do tych wszystkich materiałów, z których oleje i tłuszcze nie mogą być w całości wyekstrahowane bez uprzedniej hydrolizy (np. gluten, drożdże, białka ziemniaczane i produkty poddane przetwarzaniu, np. poprzez ekstruzję, płatkowanie i ogrzewanie).

1.3. Interpretacja wyników

We wszystkich przypadkach kiedy wynik otrzymany przy zastosowaniu postępowania B jest wyższy od otrzymanego przy zastosowaniu postępowania A, należy traktować wynik otrzymany według postępowania B jako rzeczywisty.

2. ZASADA METODY

2.1. Postępowanie A

Próbka jest poddawana ekstrakcji eterem naftowym. Roztwór jest odparowywany, a pozostałość jest suszona i ważona.

2.2. Postępowanie B

Próbka jest ogrzewana kwasem chlorowodorowym. Mieszanina jest oziębianą i sączoną. Pozostałość jest przemywana i suszona, a następnie poddawana oznaczaniu zgodnie z postępowaniem A.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Eter naftowy o zakresie temperatur wrzenia od 40 do 60°C. Wartość bromowa powinna być mniejsza niż 1, a pozostałość po odparowaniu mniejsza od 2 mg/100ml.

3.2. Siarczan sodu bezwodny.

3.3. Kwas chlorowodorowy, $c = 3 \text{ mol HCl/l}$.

3.4. Materiał wspomagający sączenie, np. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Aparat do ekstrakcji. Jeżeli jest wyposażony w syfon (aparat Soxhleta), szybkość skraplania powinna być taka, aby liczba powrotów (przelewania kropli) wynosiła 10 cykli na 1 godzinę. Jeżeli aparat nie ma syfonu, to objętość kropli powinna wynosić około 10 ml na 1 minutę.

4.2. Gilzy do ekstrakcji, niezawierające substancji rozpuszczalnych w eterze naftowym i o porowatości odpowiadającej wymaganiom zawartym w (4.1).

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

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Postępowanie A

Uwzględnić (7.1)

Odważyć 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, przenieść do gilzy ekstrakcyjnej (4.2) i przykryć tamponem z beztłuszczowej waty bawełnianej. Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji (4.1) i ekstrahować przez 6 godzin eterem naftowym (3.1). Zebrać ekstrakt eterowy do suchej, zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu.²⁾

Oddestylować rozpuszczalnik. Suszyć pozostałość, umieszczając kolbę w suszarce (4.3) na 1,5 godziny. Ochłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut do stałej masy (straty masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie mogą przekraczać 1 mg).

5.2. Postępowanie B

Odważyć 2,5 g próbki, z dokładnością do 1 mg (dla produktów o niskiej zawartości olejów i tłuszczów próbkę analityczną można zwiększyć do 5 g), umieścić w zlewce o pojemności 400 ml lub w kolbie stożkowej o pojemności 300 ml i dodać 100 ml kwasu chlorowodorowego (3.3) oraz kawałki pumeksu. Przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym, a kolbę chłodnicą zwrotną. Doprowadzić mieszaninę do spokojnego wrzenia w małym płomieniu palnika lub na płytce grzejnej i utrzymywać wrzenie przez 1 godzinę. Nie dopuszczać do osadzania się produktu na ścianach naczynia.

Ochłodzić i dodać materiał filtracyjny (3.4) w ilości zapobiegającej jakimkolwiek stratom oleju i tłuszczu podczas sączenia. Przesączyć przez zwilżony, beztłuszczowy podwójny sączek papierowy. Przemywać pozostałość zimną wodą do uzyskania obojętnego przesączu. Sprawdzić, czy przesącz nie zawiera śladów olejów lub tłuszczów. Ich obecność wskazuje na konieczność przeprowadzenia przed hydrolizą ekstrakcji zgodnie z postępowaniem A.

²⁾ W przypadkach gdy tłuszcz lub olej powinien być poddany dalszym badaniom jakościowym, należy zastąpić pumeks kuleczkami szklanymi.

Umieścić na szkiełku zegarkowym podwójną bibułę filtracyjną z pozostałością i suszyć przez 1,5 godziny w suszarce nawiewnej (4.3) w temperaturze $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Umieścić podwójny sączek z suchą pozostałością w gilzie ekstrakcyjnej (4.2) i przykryć beztłuszczowym zwitkiem waty. Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji (4.1) i postępować zgodnie z opisem podanym w (5.1).

5.3. Wyrażenie wyników

W przypadku postępowania A i B masę pozostałości wyrazić jako procent wagowy próbki.

6. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 0,2% wartości bezwzględnej, dla zawartości oleju i tłuszczu poniżej 5%,
- 4,0% najwyższego wyniku, dla zawartości oleju i tłuszczu od 5 do 10%,
- 0,4% wartości bezwzględnej, dla zawartości oleju i tłuszczu powyżej 10%.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Dla produktów o wysokiej zawartości olejów i tłuszczów, które są trudne do rozdrobnienia lub osiągnięcia homogenności próbki badanej, postępować, jak podano poniżej.

Odważyć 20 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i wymieszać z 10 g lub więcej bezwodnego siarczanu sodu (3.2). Ekstrahować eterem naftowym (3.1), jak podano w (5.1). Uzupełnić eterem (3.1) otrzymany ekstrakt do objętości 500 ml i zamieszać. Pobrać 50 ml roztworu i przenieść do małej, suchej i zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu.²⁾

Odparować rozpuszczalnik, suszyć i postępować dalej, jak podano w (5.1).

Usunąć rozpuszczalnik z pozostałości po ekstrakcji w gilzie, rozdrobnić pozostałość na cząstki 1 mm, ponownie umieścić w gilzie (nie dodawać siarczanu sodu). Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji (4.1) i postępować, jak podano w (5.1.).

Zawartość oleju i tłuszczu, obliczyć w procentach wagowych według następującego wzoru:

$$(10 a + b) \times 5$$

gdzie:

a – masa, w g, pozostałości po pierwszej ekstrakcji (część ekstraktu),

b – masa, w g, pozostałości po drugiej ekstrakcji.

7.2. Dla produktów o niskiej zawartości olejów i tłuszczów próbkę analityczną można zwiększyć do 5 g.

7.3. W przypadku karmy dla zwierząt domowych o wysokiej zawartości wody może być konieczne dodanie przed hydrolizą i ekstrakcją bezwodnego siarczanu sodu przed postępowaniem B.

7.4. W postępowaniu B (5.2) do przemywania pozostałości po przesączeniu może być bardziej efektywne użycie wody gorącej zamiast zimnej.

7.5. W przypadku niektórych pasz czas suszenia 1,5 godziny może być przedłużony. Należy jednak unikać nadmiernego suszenia, gdyż może to prowadzić do zaniżania wyników. Można również stosować kuchenki mikrofalowe.

7.6. Jeżeli zawartość surowego oleju lub tłuszczu jest większa niż 15%, zaleca się zastosowanie wstępnej ekstrakcji według postępowania A przed hydrolizą i powtórna ekstrakcją według postępowania B. W niektórych przypadkach zależy to od natury paszy i natury oleju lub tłuszczu w paszy.

2.9. OZNACZANIE SKROBI METODĄ POLARYMETRYCZNĄ

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do polarymetrycznego oznaczania zawartości skrobi i wysokocząsteczkowych produktów jej rozkładu w paszach.

2. ZASADA METODY

Metoda składa się z dwóch oznaczeń. W pierwszym próbka jest traktowana gorącym rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym. Po sklarowaniu i przesączeniu mierzy się polarymetrycznie skręcalność optyczną światła spolaryzowanego. W drugim próbka jest ekstrahowana 40% etanolem. Po zakwaszeniu filtratu kwasem chlorowodorowym, sklarowaniu i przesączeniu mierzona jest ponownie płaszczyzna skręcania światła spolaryzowanego jak w pierwszym oznaczeniu. Różnica pomiędzy dwoma pomiarami, pomnożona przez znany współczynnik, daje zawartość skrobi w próbce.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, 25% (w/w) $d = 1,126 \text{ g/ml}$.

3.2. Kwas chlorowodorowy, o stężeniu 1,128% (m/V).

Stężenie należy sprawdzić, miareczkując kwas roztworem wodorotlenku sodowego 0,1 mol/l w obecności czerwieni metylowej 0,1% (m/V) w 94% (V/V) etanolu. $10 \text{ ml} = 30,94 \text{ ml NaOH}$ o stężeniu 0,1 mol/l.

3.3. Roztwór Carreza I:

Rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.4. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Uzupełnić do 100 ml wodą.

3.5. Etanol, 40% (V/V), $d = 0,948 \text{ g/ml}$ w temperaturze 20°C .

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Kolba Erlenmeyera o pojemności 250 ml ze szlifem i chłodnicą zwrotną.

4.2. Polarymetr lub sacharymetr.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbki

Rozdrobnić próbkę, tak aby przesiewała się przez 0,5 mm oczka sita.

5.2. Oznaczanie całkowitej skręcalności optycznej (P lub S) (jeżeli próbka zawiera więcej niż 6% węglanów, w przeliczeniu na węglan wapniowy, należy je rozłożyć rozcieńczonym kwasem siarkowym przed określeniem skręcalności optycznej).

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2,5 g rozdrobnionej próbki i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml.

Dodać 25 ml kwasu chlorowodorowego (3.2), wstrząsnąć do równomiernego rozprowadzenia próbki i dodać następną porcję 25 ml kwasu chlorowodorowego (3.2). Kolbę zanurzyć we wrzącej łaźni wodnej. Aby zapobiec aglomeracji, przez pierwsze 3 minuty nieprzerwanie wstrząsać kolbą. Systematycznie uzupełniać wodę w łaźni, ale tak aby woda ciągle się gotowała, gdy jest w niej zanurzona kolba. Nie wyjmować kolby z wody w trakcie wstrząsania. Dokładnie po 15 minutach wyjąć kolbę z wody, dodać 30 ml zimnej wody i natychmiast schłodzić do 20°C.

Dodać 5 ml roztworu Carreza I (3.3) i wstrząsać przez 1 minutę. Następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.4) i ponownie wstrząsać przez 1 minutę. Uzupełnić wodą do kreski, wymieszać i przesączyć. W przypadku gdy przesącz nie jest idealnie klarowny (co zdarza się rzadko), powtórzyć oznaczanie z większą ilością roztworów Carreza I i II, np. pobierając po 10 ml.

Zmierzyć skręcalność optyczną roztworu w 200 mm rurce za pomocą polarymetru lub sacharymetru.

5.3. Oznaczanie skręcalności optycznej (P' lub S') produktów rozpuszczonych w 40% etanolu.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki, umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml i dodać około 80 ml etanolu (3.5) (w przypadku produktów o wysokiej zawartości laktozy, takich jak sproszkowana serwatka lub mleko w proszku, po dodaniu 80 ml etanolu (3.5) postępować w następujący sposób: dołączyć do kolby chłodnicę zwrotną i zanurzyć kolbę w łaźni o temperaturze 50°C na 30 minut. Pozostawić do ochłodzenia i kontynuować analizę tak jak podano poniżej).

Pozostawić kolbę na 1 godzinę w temperaturze pokojowej, wstrząsając w tym czasie sześciokrotnie kolbą, tak aby próbka została dobrze wymieszana z etanolem. Uzupełnić etanolem (3.5) do kreski, wymieszać i przesączyć. Pobrać pipetą 50 ml przesączu (= 2,5 g próbki) do kolby Erlenmeyera o pojemności 250 ml, dodać 2,1 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i energicznie wstrząsnąć. Dołączyć do kolby Erlenmeyera chłodnicę zwrotną i zanurzyć we wrzącej łaźni wodnej. Dokładnie po 15 minutach wyjąć kolbę Erlenmeyera z łaźni, przenieść zawartość do kolby miarowej o pojemności 100 ml, spłukać kolbę Erlenmeyera niewielką ilością zimnej wody i schłodzić do 20°C. Sklarować roztworem Carreza I (3.3) i II (3.4), uzupełnić wodą do kreski, wymieszać, przesączyć i zmierzyć skręcalność optyczną, jak podano w (5.2).

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość skrobi obliczyć w procentach według następujących wzorów:

6.1. Pomiary przy użyciu polarymetru

$$\text{Zawartość skrobi (\%)} = 2000 (P - P') / [\alpha]^{20}_D$$

gdzie:

P – całkowita skręcalność optyczna w stopniach katowych,

P' – skręcalność optyczna w stopniach katowych substancji rozpuszczonych w 40% (V/V) etanolu,

$[\alpha]^{20}_D$ – skręcalność właściwa czystej skrobi. Wartości liczbowe przyjęte dla skręcalności właściwej są następujące:

+ 185,9° : skrobia ryżowa

+ 185,4° : skrobia ziemniaczana

+ 184,6° : skrobia kukurydziana

+ 182,7° : skrobia pszenna

+ 181,5° : skrobia jęczmienna

+ 181,3° : skrobia owsiana

+ 184,0° : inne typy skrobi i jej mieszanin w mieszkankach paszowych.

6.2. Pomiary przy użyciu sacharymetru

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

gdzie:

S – całkowita skręcalność optyczna w stopniach sacharymetru,

S' – skręcalność optyczna w stopniach sacharymetru substancji rozpuszczonych w 40% (V/V) etanolu,

N – masa (g) sacharozy w 100 ml wody powodująca skręcalność 100 stopni sacharymetru, mierzona przez rurkę o długości 200 mm:

16,29 – dla sacharymetrów francuskich,

26,00 – dla sacharymetrów niemieckich,

20,00 – dla sacharymetrów pozostałych,

$[\alpha]^{20}_D$ – skręcalność właściwa czystej skrobi.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

– 0,4% wartości bezwzględnej, dla zawartości skrobi poniżej 40%

– 1,1% wartości względnej, dla zawartości skrobi 40% i więcej.

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Jeżeli próbka zawiera więcej niż 6% węglanów, w przeliczeniu na węglan wapniowy, należy je rozłożyć rozcieńczonym kwasem siarkowym przed określeniem skręcalności optycznej.

8.2. W przypadku produktów o wysokiej zawartości laktozy, takich jak sproszkowana serwatka lub mleko w proszku, po dodaniu 80 ml etanolu (3.5) postępować w następujący sposób: dołączyć do kolby chłodnicę zwrotną i zanurzyć kolbę w łaźni o temperaturze 50°C na 30 minut. Pozostawić do ochłodzenia i kontynuować analizę jak w (5.3).

8.3. Następujące materiały paszowe, w przypadku gdy są obecne w znacznych ilościach w paszy, powodują interferencje podczas określania zawartości skrobi metodą polarymetryczną i mogą wpływać na otrzymywanie nieprawidłowych wyników:

- cukier, produkty pochodne buraków cukrowych takie, jak miazga, melasa,
- miazga cytrusowa,
- siemię lniane, wyciąg z siemienia lnianego, siemię lniane ekstrahowane,
- nasiona rzepaku, wyciąg rzepakowy, śruta rzepakowa, łuska rzepakowa,
- nasiona słonecznika, ekstrahowane, częściowo odłuszczone,
- wyciąg z kopry, pozostałość po ekstrakcji,
- miazga ziemniaczana,
- drożdże odwodnione,
- produkty bogate w inulinę (chipsy i inne produkty z karczochów),
- skwarki.

2.10. OZNACZANIE CUKRÓW

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości cukrów redukujących i całkowitej zawartości cukrów po inwersji wyrażonych jako glukoza lub w razie potrzeby w przeliczeniu na sacharozę. W tym ostatnim przypadku do przeliczania stosuje się współczynnik 0,95. Metoda jest stosowana do mieszanek paszowych. Dla innych pasz stosuje się specjalne metody. Laktozę mierzy się oddzielnie, uwzględniając w końcowych obliczeniach.

2. ZASADA METODY

Cukry wyekstrahowane rozcieńczonym etanolem klaruje się roztworami Carreza I i II. Po wyeliminowaniu etanolu zawartość cukrów przed i po inwersji oznacza się metodą Luff-Schoorla.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Etanol, 40% (V/V), $d = 0,949$ g/ml przy 20°C , obojętny wobec fenoloftaleiny.

3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Uzupełnić do 100 ml wodą.

3.4. Roztwór 0,1% (m/V) oranżu metylowego.

3.5. Kwas chlorowodorowy 4 N.

3.6. Kwas chlorowodorowy 0,1 N.

3.7. Roztwór wodorotlenku sodu 0,1 N.

3.8. Odczynnik Luff-Schoorla. Dodać roztwór kwasu cytrynowego (3.8.2) do roztworu węglanu sodu (3.8.3), ostrożnie mieszając podczas dodawania. Następnie dodać roztwór siarczany miedzi (3.8.1) i uzupełnić wodą do 1 litra. Zostawić na noc i przesączyć. Sprawdzić normalność otrzymanego odczynnika (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2N). pH roztworu powinno wynosić około 9,4.

3.8.1. Roztwór siarczany miedzi: rozpuścić 25 g siarczany miedzi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ w 100 ml wody.

3.8.2. Roztwór kwasu cytrynowego: rozpuścić 50 g kwasu cytrynowego $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ w 50 ml wody.

3.8.3. Roztwór węglanu sodu: rozpuścić 143,8 g bezwodnego węglanu sodu w 300 ml gorącej wody. Ochłodzić.

3.9. Roztwór tiosiarczany(VI) sodu 0,1 N.

3.10. Roztwór skrobi: do 1 litra wrzącej wody dodać mieszaninę składającą się z 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody. Gotować 3 minuty, pozostawić do ochłodzenia, a jeśli to konieczne dodać 10 mg jodku rtęci jako środka konserwującego. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Kwas siarkowy 6 N.

3.12. 30% (m/V) roztwór jodku potasu.

3.13. Granulki pumeksu oczyszczone przez gotowanie w kwasie chlorowodorowym, przemyte wodą i wysuszone.

3.14. 3-metylobutanol.

4. APARATURA I SPRZĘT

Mieszarka obrotowa od 35 do 40 obr/min.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Ekstrakcja próbek

Odważyć 2,5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 200 ml etanolu (3.1), mieszać w mieszarce bębnowej przez 1 godzinę. Dodać 5 ml roztworu Carreza I (3.2) i mieszać przez 1 minutę. Dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.3) i ponownie mieszać przez 1 minutę. Uzupełnić kolbę etanolem (3.1) do kreski, wymieszać i przesączyć. Pobrać 200 ml filtratu i odparować do połowy objętości w celu usunięcia większości etanolu. Przenieść ilościowo pozostałość po odparowaniu do kolby miarowej o pojemności 200 ml przy użyciu gorącej wody, schłodzić, uzupełnić wodą do kreski, wymieszać i, jeżeli zajdzie potrzeba, przesączyć. Roztwór ten będzie następnie użyty do oznaczenia zawartości cukrów redukujących i, po inwersji, całkowitej zawartości cukrów.

5.2. Oznaczanie cukrów redukujących

Pobrać pipetą nie więcej niż 25 ml roztworu zawierającego mniej niż 60 mg cukrów redukujących w przeliczeniu na glukozę. Jeżeli zajdzie potrzeba, uzupełnić wodą destylowaną do 25 ml i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luff-Schoorla. Wynik wyrazić jako procentową zawartość glukozy w próbce.

5.3. Oznaczenie całkowitej zawartości cukrów po inwersji

Przenieść pipetą 50 ml roztworu do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Dodać kilka kropli roztworu oranżu metylowego (3.4) i następnie, ostrożnie mieszając, dodawać kwas chlorowodorowy 4 N (3.5) aż do zmiany barwy cieczy na czerwoną. Dodać 15 ml kwasu chlorowodorowego 0,1 N (3.6), zanurzyć kolbę w wrzącej łaźni wodnej i pozostawić przez 30 minut. Szybko schłodzić do 20°C i dodać 15 ml roztworu 0,1 N wodorotlenku sodu (3.7). Uzupełnić wodą do 100 ml i wymieszać. Pobrać nie więcej niż 25 ml roztworu zawierającego mniej niż 60 mg cukrów redukcyjnych w przeliczeniu na glukozę. Jeżeli zajdzie konieczność, uzupełnić do 25 ml destylowaną wodą i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luff-Schoorla. Wynik wyrazić jako procentową zawartość glukozy lub, mnożąc przez współczynnik 0,95, przeliczyć na sacharozę.

5.4. Miareczkowanie metodą Luff-Schoorla

Odmierzyć pipetą 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (3.8) i umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 300 ml, dodać dokładnie 25 ml klarownego roztworu cukru. Dodać 2 granulki pumeksu (3.13), ogrzewać nad płomieniem, ręcznie mieszając i doprowadzić ciecz do wrzenia w ciągu około 2 minut. Natychmiast postawić kolbę na siatce azbestowej o średnicy 6 cm i zapalić pod nią płomień. Płomień powinien być tak ustawiony, aby ogrzewane było tylko dno kolby. Należy na kolbę chłodnicę zwrotną. Gotować dokładnie 10 minut. Schłodzić zimną wodą i po 5 minutach miareczkować.

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

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie, odmierzając dokładnie 25 ml mieszaniny odczynnika Luff-Schoorla (3.8) i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasu (3.12) i 25 ml kwasu siarkowego 6 N (3.11) bez gotowania.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wykorzystując tabelę 1, określić ilość glukozy w mg, która odpowiada różnicy między wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonych w mg zużytego roztworu tiosiarczanu(VI) sodu 0,1 N. Wynik wyrazić w procentach wagowych.

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. W przypadku pasz bogatych w melasę i innych pasz, zwłaszcza niejednorodnych, odważyć 20 g próbki i umieścić z 500 ml wody w kolbie miarowej o pojemności 1 litra. Mieszać przez 1 godzinę w mieszarce bębnowej. Sklarować odczynnikami Carreza I (3.2) i Carreza II (3.3), zgodnie z (5.1) przy zastosowaniu czterokrotnie większych ilości każdego odczynnika. Uzupełnić do kreski 80% etanolem (V/V). Wymieszać i przesączyć. Odparować etanol, zgodnie z (5.1). Jeżeli w roztworze nie ma dekstrynowanej skrobi, uzupełnić do kreski wodą destylowaną.

7.2. W przypadku melasy i materiałów paszowych bogatych w cukier i prawie wolnych od skrobi (strąki drzewa *Ceratonia siliqua*, suszone końcówki buraków cukrowych) odważyć 5 g próbki. Próbkę umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml, dodać 200 ml wody destylowanej, mieszać w mikserze przez 1 godzinę lub dłużej w razie konieczności. Roztwór klarować odczynnikami Carreza I (3.2) i Carreza II (3.3), zgodnie z (5.1). Uzupełnić kolbę do kreski zimną wodą, wymieszać i przesączyć. Aby określić całkowitą zawartość cukrów, postępować dalej zgodnie z (5.3).

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Aby zapobiec powstawaniu piany, wskazane jest dodanie (niezależnie od objętości roztworu) około 1 ml 3-metylobutanolu (3.14) przed gotowaniem z odczynnikami Luff-Schoorla.

8.2. Różnica pomiędzy zawartością całkowitą cukrów po inwersji, w przeliczeniu na glukozę, a zawartością cukrów redukujących, w przeliczeniu na glukozę, pomnożona przez 0,95 daje procentową zawartość sacharozy.

8.3. W przypadku oznaczania zawartości cukrów redukujących, z wyłączeniem laktozy, można zastosować dwie następujące metody:

8.3.1. Dla szacunkowych obliczeń pomnożyć zawartość laktozy oznaczoną inną metodą przez 0,675 i odjąć od wyniku oznaczania zawartości cukrów redukujących.

8.3.2. Aby dokładnie obliczyć zawartość cukrów redukujących, z wyłączeniem laktozy, ta sama próbka powinna być użyta do dwóch końcowych oznaczeń. Jedną analizę przeprowadza się na części roztworu otrzymanego w (5.1), drugą na części roztworu otrzymanego podczas oznaczania laktozy metodą służącą do jej oznaczania (po fermentacji innych rodzajów cukrów i sklarowaniu).

W obu przypadkach ilość cukru jest oznaczana metodą Luff-Schoorla i przeliczana na 1 mg glukozy. Jedna wartość jest odejmowana od drugiej i różnica jest wyrażana w procentach wagowych.

Przykład.

Dwie pobrane objętości roztworu do dwóch oznaczeń odpowiadają masie próbki 250 mg.

W pierwszym przypadku 17 ml 0,1 N roztworu tiosiarczanu(VI) sodu odpowiada 44,2 mg zużytej glukozy, w drugim 11 ml odpowiada 27,6 mg glukozy.

Różnica wynosi 16,6 mg glukozy.

Zawartość cukrów redukujących (z wyłączeniem laktozy), w przeliczeniu na glukozę, wynosi:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64\%$$

Tabela 1. Wartości dla 25 ml odczynnika Luff-Schoorla,
ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N, 2 minuty ogrzewania, 10 minut gotowania

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N	Glukoza, fruktoza, cukry inwertowane $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N
ml	mg	różnica	mg	różnica	mg	różnica	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

2.11. OZNACZANIE LAKTOZY

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości laktozy w paszach zawierających ponad 0,5% laktozy.

2. ZASADA METODY

Cukry są rozpuszczane w wodzie, a roztwór poddawany jest fermentacji w obecności drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które nie rozkładają laktozy. Po sklarowaniu i przesączeniu zawartość laktozy w filtracie oznaczana jest metodą Luff-Schoorla.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Suspensja drożdży *Saccharomyces cerevisiae*: 25 g świeżych drożdży rozprowadzić w 100 ml wody. Zawiesinę przechowywać w lodówce nie dłużej niż przez 1 tydzień od jej sporządzenia.

3.2. Roztwór Carreza I:

Rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $Zn(CH_3COOH)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.3. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g trihydratu heksacyjanożelazianu(II) tetrapotasu $[K_4Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.4. Odczynnik Luff-Schoorla. Ostrożnie mieszając, dodać roztwór kwasu cytrynowego (3.4.2.) do roztworu węglanu sodu (3.4.3). Następnie dodać roztwór siarczany miedzi (3.4.1) i uzupełnić wodą do 1 litra. Zostawić na noc do osadzenia i przesączyć. Sprawdzić normalność otrzymanego odczynnika (Cu (II) 0,1 N, Na_2CO_3 2 N). pH roztworu powinno wynosić około 9,4.

3.4.1. Roztwór siarczany miedzi:

Rozpuścić 25 g siarczany miedzi $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ wolnego od żelaza w 100 ml wody.

3.4.2. Roztwór kwasu cytrynowego:

Rozpuścić 50 g kwasu cytrynowego $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ w 50 ml wody.

3.4.3. Roztwór węglanu sodu:

Rozpuścić 143,8 g bezwodnego węglanu sodu w 300 ml gorącej wody. Pozostawić do schłodzenia.

3.5. Granulki pumeksu gotowane w kwasie chlorowodorowym, przemyte wodą i wysuszone.

3.6. Jodek potasu, roztwór 30% (m/V).

3.7. Kwas siarkowy o stężeniu 6 N.

3.8. Tiosiarczan sodu, roztwór 0,1 N.

3.9. Roztwór skrobi:

Dodać mieszaninę składającą się z 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody do 1 litra wrzącej wody. Gotować przez 3 minuty, pozostawić do ochłodzenia, a jeśli to konieczne dodać 10 mg jodku rtęci jako środka konserwującego.

4. APARATURA I SPRZĘT

Łaźnia wodna z termostatem ustawiona na temperaturę od 38 do 40°C.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Odważyć 1 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml. Dodać od 25 do 30 ml wody.

5.2. Umieścić kolbę na wrzącej łaźni wodnej i utrzymywać przez 30 minut, a następnie schłodzić do około 35°C. Dodać 5 ml zawiesiny drożdży (3.1) i wymieszać. Pozostawić kolbę na 2 godziny na łaźni wodnej o temperaturze od 38 do 40°C. Schłodzić do około 20°C. Dodać 2,5 ml roztworu Carreza I (3.2) i mieszać przez 30 sekund, następnie dodać 2,5 ml roztworu Carreza II (3.3) i ponownie mieszać przez 30 sekund. Uzupełnić do 100 ml wodą, wymieszać i przesączyć. Pobrać pipetą ilość filtratu nie większą niż 25 ml, która zawiera od 40 do 80 mg laktozy, i umieścić ją w kolbie stożkowej o pojemności 300 ml. W miarę potrzeby uzupełnić wodą do 25 ml. Przeprowadzić test ślepej próby z 5 ml zawiesiny drożdżowej (3.1).

5.3. Oznaczyć zawartość laktozy według Luff-Schoorla, w następujący sposób:

Dodać dokładnie 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (3.4) i dwie granulki pumeksu (3.5). Wstrząsnąć ręcznie podczas ogrzewania nad płomieniem, doprowadzić do wrzenia i gotować przez około 2 minuty. Natychmiast odstawić kolbę Erlenmeyera na siatkę azbestową o średnicy 6 cm. Zapalić płomień pod siatką i zwiększać go stopniowo, tak aby tylko dno kolby Erlenmeyera było ogrzewane. Następnie nałożyć na kolbę Erlenmeyera chłodnicę zwrotną i gotować dokładnie przez 10 minut. Szybko schłodzić w zimnej wodzie i po około 5 minutach miareczkować w następujący sposób:

Dodać 10 ml roztworu jodku potasu (3.6) i natychmiast po tej czynności (zachowując ostrożność ze względu na ryzyko powstania piany) dodać 25 ml kwasu siarkowego (3.7). Miareczkować roztworem tiosiarczany sodowego (3.8), dopóki nie pojawi się błądy żółty kolor, następnie dodać kilka kropel wskaźnika skrobiowego (3.9) i dokończyć miareczkowanie.

5.4. Przeprowadzić takie samo miareczkowanie z dokładnie sporządzoną mieszaniną 25 ml odczynnika Luff-Schoorla (3.4), 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasu (3.6) i 25 ml kwasu siarkowego (3.7), bez doprowadzania roztworu do wrzenia.

5.5. Test ślepej próby

Przy użyciu tej samej metody wykonać analizę bez próbki.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Odczytać z tabeli 1 zawartość laktozy w mg, która odpowiada różnicy pomiędzy wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonych w ml roztworu tiosiarczany sodu 0,1 N.

Wynik przedstawić w procentach wagowych laktozy w próbce.

7. OBJAŚNIENIA

Dla produktów zawierających ponad 40% fermentujących cukrów dodać więcej niż 5 ml zawiesiny drożdży (3.1).

ROZDZIAŁ 3**BADANIE AMINOKWASÓW****3.1. OZNACZANIE AMINOKWASÓW****1. CEL I ZAKRES**

Metoda służy do oznaczania zawartości wolnych (syntetycznych i naturalnych) oraz całkowitych (związanych jako peptydy i wolnych) aminokwasów w paszach przy użyciu analizatora aminokwasów. Metoda ma zastosowanie do następujących aminokwasów: cystyny (cysteiny), metioniny, lizyny, treoniny, alaniny, argininy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, histydyny, izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny, proliny, seryny, tyrozyny i waliny. Metoda nie pozwala odróżnić soli aminokwasów, a także form D i L aminokwasów. Nie można jej stosować do oznaczania tryptofanu i hydroksy analogów aminokwasów.

2. ZASADA METODY**2.1. Wolne aminokwasy**

Wolne aminokwasy są ekstrahowane rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym. Wyekstrahowane jednocześnie makrocząsteczki związków azotowych są wytrącane kwasem sulfosalicylowym i usuwane przez filtrowanie. Filtrowany roztwór jest doprowadzany do pH 2,20. Aminokwasy są oddzielane w drodze chromatografii jonowymiennej i po reakcji z ninhydriną, oznaczane poprzez fotometryczną detekcję przy 570 nm.

2.2. Aminokwasy całkowite

Wybór sposobu postępowania zależy od oznaczanych aminokwasów. Cystynę (cysteinę) i metioninę należy przed hydrolizą poddać utlenianiu, odpowiednio do kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny. Tyrozyna powinna być oznaczana w hydrolizatach niepoddanych utlenieniu. Wszystkie inne aminokwasy wymienione w (1) mogą być oznaczane w próbce utlenionej lub niepoddanej utlenianiu.

Utlanie jest przeprowadzane w temperaturze 0°C przy użyciu mieszaniny kwasu nadmanganowego i fenolu. Nadmiar odczynnika utleniającego jest rozkładany za pomocą dwusiarczku sodu. Utleniona lub niepoddana utlenianiu próbka jest hydrolizowana kwasem chlorowodorowym ($c = 6 \text{ mol/l}$) przez 23 godziny. Hydrolizat jest doprowadzany do pH 2,20. Aminokwasy są oddzielane w drodze chromatografii jonowymiennej i, po reakcji z ninhydriną, oznaczane poprzez fotometryczną detekcję przy 570 nm (440 nm w przypadku proliny).

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Należy stosować wodę redestylowaną lub podobnej czystości (przewodność $< 10 \mu\text{S}$).

3.1. Nadtlenek wodoru, $w = 30\%$.

3.2. Kwas mrówkowy, $w = 98 - 100\%$.

3.3. Fenol.

3.4. Dwusiarek sodu.

3.5. Wodorotlenek sodu.

3.6. Kwas 5-sulfosalicylowy dwuhydrat.

3.7. Kwas chlorowodorowy, gęstość około 1,18 g/ml.

3.8. Cytrynian trisodu, dwuhydrat.

3.9. 2,2' Tiodwuetanol (tiodwuglikol).

3.10. Chlorek sodu.

3.11. Ninhydryna.

3.12. Eter naftowy, temperatura wrzenia 40 – 60°C.

3.13. Norleucyna lub inny związek odpowiedni do stosowania jako wzorzec wewnętrzny.

3.14. Azot ($< 10 \text{ ppm}$ tlenu).

3.15. 1-oktanol.

3.16. Aminokwasy.

3.16.1. Substancje wzorcowe wymienione w (1). Czyste związki, niezawierające wody krystalizacyjnej, suszone pod próżnią w obecności P_2O_5 lub H_2SO_4 przez okres 1 tygodnia przed użyciem.

3.16.2. Kwas cysteinowy.

3.16.3. Sulfon metioniny.

3.17. Roztwór wodorotlenku sodu, $c = 7,5 \text{ mol/l}$:

Rozpuścić 300 g NaOH (3.5) w wodzie i uzupełnić do objętości 1 litra.

3.18. Roztwór wodorotlenku sodu, $c = 1 \text{ mol/l}$.

Rozpuścić 40 g NaOH (3.5) w wodzie i uzupełnić do objętości 1 litra.

3.19. Roztwór wodny kwasu mrówkowego i fenolu:

Zmieszać 889 g kwasu mrówkowego (3.2) z 111 g wody i dodać 4,73 g fenolu (3.3).

3.20. Mieszanina hydrolizująca, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, zawierająca 1 g fenolu/l:

Dodać 1 g fenolu (3.3) do 492 ml HCl (3.7) i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.21. Mieszanina ekstrakcyjna, $c = 0,1 \text{ mol HCl/l}$, zawierająca 2% tiodwuglikolu:

Pobrać 8,2 ml HCl (3.7), rozpuścić w około 900 ml wody, dodać 20 ml tiodwuglikolu (3.9) i uzupełnić do 1 litra wodą (nie mieszać bezpośrednio odczynników (3.7) i (3.9)).

3.22. Kwas 5-sulfosalicylowy, $\beta = 6\%$:

Rozpuścić 60 g kwasu 5-sulfosalicylowego (3.6) w wodzie i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.23. Mieszanina utleniająca (kwas nadmanganowy – fenol):

Zmieszać w małej zlewce 0,5 ml nadtlenu wodoru (3.1) z 4,5 ml wodnego roztworu kwasu mrówkowego i fenolu (3.19). Utrzymywać w temperaturze od 20 do 30°C przez 1 godzinę w celu utworzenia kwasu nadmanganowego, następnie ochłodzić w wodnej łaźni lodowej (15 minut) przed dodaniem do próbek.

Unikać kontaktu ze skórą i nosić odzież ochronną.

3.24. Bufor cytrynianowy, $c = 0,2 \text{ mol Na}^+ / \text{l}$, pH 2,20:

Rozpuścić 19,61 g cytrynianu sodowego (3.8), 5 ml tiowoduglikolu (3.9), 1 g fenolu (3.3) i 16,50 ml HCl (3.7) w około 800 ml wody. Doprowadzić do pH 2,20. Uzupełnić do 1 litra wodą.

3.25. Bufor wymywający, przygotowany zgodnie z warunkami stosowanego analizatora (4.9).

3.26. Odczynnik ninhydrynowy, przygotowany zgodnie z warunkami stosowanego analizatora (4.9).

3.27. Wzorcowe roztwory aminokwasów. Roztwory należy przechowywać w temperaturze poniżej 5°C.

3.27.1. Podstawowy wzorcowy roztwór aminokwasów (3.16.1), każdy o stężeniu $c = 2,5 \text{ } \mu\text{mol/ml}$, w kwasie chlorowodorowym. Mogą być stosowane gotowe wzorce.

3.27.2. Podstawowe wzorcowe roztwory kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny, $c = 1,25 \text{ } \mu\text{mol/l}$.

Rozpuścić 0,2115 g kwasu cysteinowego (3.16.2) i 0,2265 sulfonu metioniny (3.16.3) w buforze cytrynianowym (3.24) w kolbie miarowej o pojemności 1 litra i uzupełnić do kreski buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze poniżej 5°C przez okres nie dłuższy niż 12 miesięcy. Tego roztworu nie należy przygotowywać, gdy podstawowy wzorcowy roztwór (3.27.1) zawiera kwas cysteinowy i sulfon metioniny.

3.27.3. Podstawowy wzorcowy roztwór wzorca wewnętrznego, np. norleucyna, $c = 20 \text{ } \mu\text{mol/l}$.

Rozpuścić 0,6560 g norleucyny (3.13) w buforze cytrynianowym (3.24) w kolbie miarowej i uzupełnić do 250 ml buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze poniżej 5°C przez okres nie dłuższy niż 6 miesięcy.

3.27.4. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do użycia z hydrolizatami, $c = 5 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny i $c = 10 \text{ nmol/50 } \mu\text{l}$ w przypadku innych aminokwasów.

Rozpuścić 2,2 g chlorku sodu (3.10) w zlewce o pojemności 100 ml z 30 ml buforu cytrynianowego (3.24). Dodać 4,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego aminokwasów (3.27.1), 4,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny (3.27.2) i, jeżeli jest stosowany, 0,50 ml podstawowego roztworu wzorcowego wzorca wewnętrznego aminokwasów (3.27.3). Doprowadzić do pH 2,20 za pomocą wodorotlenku sodu (3.18). Przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do kreski buforem cytrynianowym (3.24) i wymieszać. Przechowywać w temperaturze poniżej 5°C przez okres nie dłuższy niż 3 miesiące.

Z powodu różnic pomiędzy analizatorami aminokwasów podawane tu końcowe stężenia roztworów wzorcowych kalibracyjnych aminokwasów (3.27.4) i (3.27.5) i hydrolizatu (5.3.4) należy traktować jako przykładowe.

Zakres liniowej odpowiedzi aparatu powinien zostać sprawdzony dla wszystkich aminokwasów.

Roztwór wzorcowy jest rozcieńczany buforem cytrynianowym, tak aby otrzymać pik o średniej powierzchni.

3.27.5. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do stosowania z hydrolizatami przygotowanymi zgodnie z (5.3.3.1) i do użycia z ekstraktami (5.2). Roztwór kalibracyjny przygotowywać zgodnie z (3.27.4) z pominięciem chlorku sodu. Przechowywać w temperaturze poniżej 5°C przez okres nie dłuższy niż 3 miesiące.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Kolba okrągłodenna o pojemności 100 lub 250 ml z chłodnicą zwrotną.

4.2. Butelka ze szkła borokrzemowego o pojemności 100 ml z nakrętką pokrytą gumą/teflonem (np. Duran, Schott) do stosowania w suszarce.

4.3. Suszarka z silnym nawiewem i możliwością regulacji temperatury z dokładnością powyżej $\pm 2^\circ\text{C}$.

4.4. Pehametr (dokładność trzy miejsca dziesiętne po przecinku).

4.5. Filtr membranowy (0,2 μm).

4.6. Wirówka.

4.7. Obrotowa wyparka próżniowa.

4.8. Mieszadło magnetyczne lub mechaniczne wytrząsarka.

4.9. Analizator aminokwasów lub wyposażenie do HPLC z kolumną jonowymienną, z przystawką do ninhydryny, postkolumnową derywatyzującą i detektorem fotometrycznym.

Kolumna jest wypełniona sulfonowaną żywicą polistyrenową mającą zdolność rozdziału aminokwasów od siebie i od innych składników reagujących z ninhydryną. Przepływ buforu i ninhydryny przyprowadzany jest przez pompy o stabilności przepływu $\pm 0,5\%$ w czasie testowania roztworów kalibracyjnych, jak i analizy próbek.

W niektórych analizatorach aminokwasów mogą być stosowane metody hydrolizy, w których hydrolizat zawiera stężenie sodu $c = 0,8 \text{ mol/l}$ i zawiera całą pozostałość kwasu mrówkowego z etapu utleniania. Inne analizatory nie dają zadowalającego rozdziału niektórych aminokwasów, jeżeli hydrolizat zawiera nadmiar kwasu mrówkowego lub wysokie stężenie jonów sodowych. W tym przypadku objętość kwasu jest zmniejszana przez odparowanie próbki po hydrolizie do objętości około 5 ml, przed ustawieniem pH. Odparowywanie powinno być prowadzone pod próżnią w temperaturze nie wyższej niż 40°C.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbek

Rozdrobnić próbkę, tak aby przesiewała się przez 0,5 mm oczko sita. Próbki o dużej zawartości wilgoci należy przed rozdrobnieniem wysuszyć w temperaturze nieprzekraczającej 50°C lub przez liofilizację. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu poddać ekstrakcji eterem naftowym (3.12) przed rozdrobnieniem.

5.2. Oznaczanie wolnych aminokwasów w paszach i premiksach

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, odpowiednią ilość (1 – 5 g) przygotowanej próbki (5.1) do kolby stożkowej i dodać 100,0 ml mieszaniny ekstrakcyjnej (3.21). Wstrząsać zawartość przez 60 minut, używając wytrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego (4.8). Odstawić do sedimentacji osadu i pobrać pipetą 10,0 ml roztworu z nad osadu do zlewki o pojemności 100 ml. Dodać, mieszając, 5,0 ml roztworu kwasu sulfosalicylowego (3.22) i kontynuować mieszanie przy

użyciu mieszadła magnetycznego przez 5 minut. Przesączyć lub odwirować roztwór w celu usunięcia osadu. Umieścić 10,0 ml otrzymanego roztworu w zlewce o pojemności 100 ml, doprowadzić pH do 2,20 za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (3.18), przenieść ilościowo do kolby o odpowiedniej objętości, używając buforu cytrynianowego (3.24) i uzupełnić do kreski buforem cytrynianowym (3.24). Jeżeli stosowany jest wzorec wewnętrzny, należy dodać 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (3.27.3) na każde 100 ml końcowego roztworu i uzupełnić do kreski roztworem buforowym (3.24). Przeprowadzić rozdział chromatograficzny zgodnie z (5.4). Jeżeli ekstrakty nie będą oznaczane tego samego dnia, należy je przechowywać w temperaturze poniżej 5°C.

5.3. Oznaczanie całkowitej zawartości aminokwasów

5.3.1. Utlenianie

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 g do 1 g przygotowanej próbki (5.1) do:

- kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml (4.1) do hydrolizy otwartej (5.3.2.3) lub
- kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml (4.1) w przypadku gdy wymagana jest niska koncentracja sodu (5.3.3.1), lub
- butelki o pojemności 100 ml z nakrętką (4.2) (do hydrolizy zamkniętej (5.3.2.4)).

Odważona próbka analityczna powinna zawierać około 10 mg azotu, a zawartość wilgoci nie powinna przekraczać 100 mg.

Umieścić kolbę lub butelkę na łaźni lodowej i oziębić do 0°C, dodać 5 ml mieszaniny utleniającej (3.2.3), mieszając szklaną bagietką z wygiętym końcem. Uszczelnić kolbę lub butelkę wraz bagietką za pomocą obciskającej folii nieprzepuszczającej powietrza, umieścić wraz z łaźnią lodową w lodówce o temperaturze 0°C i pozostawić na 16 godzin. Po 16 godzinach wyjąć z lodówki i rozłożyć nadmiar odczynnika utleniającego przez dodanie 0,84 g dwusiarczku sodu (3.4). Postępować jak w (5.3.2.1).

5.3.2. Hydroliza

5.3.2.1. Hydroliza próbek utlenionych

Do utlenionej próbki, przygotowanej zgodnie z (5.3.1), dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej (3.20), zwracając uwagę, aby zmyć pozostałości próbki przywierające do bocznych ścianek naczynia lub bagietki. W zależności od sposobu hydrolizy, postępować zgodnie z (5.3.2.3) lub (5.3.2.4).

5.3.2.2. Hydroliza próbek nieutlenionych

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 g do 1 g przygotowanej próbki (5.1) do kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml lub 250 ml (4.1) lub do butelki z nakrętką o pojemności 100 ml (4.2). Odważona próbka analityczna powinna zawierać około 10 mg azotu. Ostrożnie dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej (3.20) i wymieszać z próbką. Postępować zgodnie z (5.3.2.3) lub (5.3.2.4).

5.3.2.3. Hydroliza otwarta

Dodać 3 szklane perełki do mieszaniny w kolbie, przygotowanej zgodnie z (5.3.2.1) lub (5.3.2.2), i gotować pod chłodnicą zwrotną przez 23 godziny. Po zakończonej hydrolizie przemyć chłodnicę od góry 5 ml buforu cytrynianowego (3.24). Odłączyć kolbę i oziębić na łaźni lodowej. Postępować zgodnie z (5.3.3).

5.3.2.4. Hydroliza zamknięta

Umieścić butelkę zawierającą mieszaninę, przygotowaną zgodnie z (5.3.2.1) lub (5.3.2.2), w suszarce (4.3) w temperaturze 110°C. W czasie pierwszej godziny hydrolizy, w celu uniknięcia gwałtownego wzrostu ciśnienia (z powodu powstawania substancji gazowych) i wybuchu, umieścić nakrętkę na naczyniu. **Nie zamykać naczynia.** Po 1 godzinie zakręcić nakrętkę i pozostawić w suszarce (4.3) przez 23 godziny. Po zakończeniu hydrolizy wyjąć butelkę z suszarki, ostrożnie odkręcić nakrętkę i umieścić butelkę na łaźni lodowej. Pozostawić do ochłodzenia.

W zależności od sposobu ustawiania pH (5.3.3), przenieść ilościowo zawartość butelki do zlewki o pojemności 250 ml lub kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml, stosując bufor cytrynianowy (3.24). Postępować zgodnie z (5.3.3).

5.3.3. Ustawianie pH

W zależności od tolerancji analizatora aminokwasów (4.9) na sól, ustawiać pH zgodnie z (5.3.3.1) lub (5.3.3.2).

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

Wskazane jest zastosowanie roztworu podstawowego wzorca wewnętrznego (3.27.3), gdy analizator aminokwasów wymaga niskiego stężenia sodu (gdy objętość kwasu należy zredukować). W tym przypadku dodać 2,00 ml roztworu podstawowego wzorca wewnętrznego (3.27.3) do hydrolizatu przed odparowaniem. Dodać 2 krople 1-oktanolu (3.15) do hydrolizatu otrzymanego zgodnie z (5.3.2.3) lub (5.3.2.4). Stosując wyparkę próżniową (4.7), zmniejszyć objętość do 5 – 10 ml, odparowując roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Jeżeli objętość roztworu zostanie niechcący zredukowana poniżej 5 ml, należy wyrzucić hydrolizat i powtórzyć analizę. Doprowadzić do pH 2,20 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu (3.18) i postępować zgodnie z (5.3.4).

5.3.3.2. Dla wszystkich innych analizatorów aminokwasów (4.9)

Hydrolizaty otrzymane zgodnie z (5.3.2.3) lub (5.3.2.4) wstępnie zneutralizować, ostrożnie dodając, mieszając 17 ml roztworu wodorotlenku sodu (3.17), zwracając uwagę, aby temperatura roztworu nie przekraczała 40°C.

Doprowadzić pH do 2,20 w temperaturze pokojowej, dodając roztwór wodorotlenku sodu (3.17), a pod koniec roztwór wodorotlenku sodu (3.18). Dalej postępować jak w (5.3.4).

5.3.4. Przygotowanie roztworu próbki do analizy chromatograficznej

Przenieść ilościowo hydrolizaty o pH ustalonym według (5.3.3.1) lub (5.3.3.2) za pomocą buforu cytrynianowego (3.24) do kolby miarowej o pojemności 200 ml i uzupełnić do kreski buforem (3.24).

Jeżeli wcześniej nie dodawano wzorca wewnętrznego, dodać 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (3.27.3) i uzupełnić do kreski buforem cytrynianowym (3.24). Dokładnie wymieszać. Przejsz do etapu analizy chromatograficznej (5.4).

Jeżeli roztwory próbek nie będą analizowane tego samego dnia, należy je przechowywać w temperaturze poniżej 5°C.

5.4. Chromatografia

Przed analizą chromatograficzną doprowadzić ekstrakt (5.2) lub hydrolizat (5.3.4) do temperatury pokojowej. Wymieszać i przesączyć odpowiednią ilość roztworu przez sączonej membranowy 0,2 µm (4.5). Otrzymany klarowny roztwór jest przeznaczony do chromatografii jonowymiennej przy wykorzystaniu analizatora aminokwasów (4.9).

Dozowanie może być dokonane ręcznie lub automatycznie. Ważne jest, aby nanosić na kolumnę takie same ilości roztworów z dokładnością $\pm 0,5\%$ zarówno w przypadku analizy roztworu wzorca, jak i roztworu badanej próbki, z wyjątkiem analizy roztworów z wzorcem wewnętrznym, oraz aby stosunek sodu do aminokwasu w roztworze badanej próbki był podobny jak w roztworze wzorcowym.

Częstość przeprowadzania kalibracji zależy od stabilności odczynnika ninhydrynowego i od całego systemu analitycznego. Wzorec lub próbka są wymywane buforem cytrynianowym (3.24), tak aby powierzchnia pików wzorca odpowiadała 30 – 200% powierzchni pików badanej próbki aminokwasów.

Analiza chromatograficzna aminokwasów różni się nieznacznie w zależności od typu stosowanego analizatora i żywicy. Wybrany system powinien mieć zdolność rozdzielu każdego aminokwasu od siebie oraz od innych substancji dających z ninhydryną barwne reakcje. W badanym zakresie stosowany system chromatograficzny powinien dawać liniową odpowiedź na zmiany ilości aminokwasów dozowanych na kolumnę.

W czasie analizy chromatograficznej należy sprawdzać, aby stosunek doliny do wysokości pików przy badaniu równomolowych roztworów (oznaczanych aminokwasów) odpowiadał podanym poniżej. Równomolowy roztwór powinien zawierać co najmniej 30% maksymalnej zawartości każdego aminokwasu, który można prawidłowo oznaczyć z użyciem danego analizatora aminokwasów (4.9).

Dla rozdzielenia treoniny od seryny stosunek doliny do wysokości pików niższego z pokrywających się aminokwasów nie powinien przekraczać 2:10 (jeżeli tylko cystyna (cysteina), metionina, treonina i lizyna są oznaczane, niepełne rozdzielanie sprzężonych pików będzie ujemnie wpływać na oznaczenie). Dla wszystkich innych aminokwasów rozdział powinien być lepszy niż 1:10.

System powinien zapewniać rozdział lizyny od artefaktów lizyny i od ornityny.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Powierzchnię pików próbki i wzorca mierzy się dla każdego pojedynczego aminokwasu. Zawartość aminokwasu obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{A \times E \times MW \times F}{B \times W \times 1000} = \text{g aminokwasu na kg próbki}$$

Jeżeli stosowany jest wzorec wewnętrzny, wyrażenie mnożymy przez D/C.

gdzie:

A – powierzchnia pików hydrolizatu lub ekstraktu,

B – powierzchnia pików wzorcowego roztworu kalibracyjnego,

C – powierzchnia pików wzorca wewnętrznego w hydrolizacie lub ekstrakcie,

D – powierzchnia pików wzorca wewnętrznego w roztworze wzorcowym kalibracyjnym,

MW – masa cząsteczkowa oznaczanego aminokwasu,

E – stężenie wzorca w $\mu\text{mol/ml}$,

W – masa próbki (g) (przeliczyć na masę oryginalnej próbki w przypadku odfuszczenia lub podsuszania),

F – całkowita ilość ml hydrolizatu (5.3.4) lub ilość ml hydrolizatu obliczona przy uwzględnieniu rozcieńczenia ekstraktu.

Cystyna i cysteina są oznaczane jako kwas cysteinowy w hydrolizatach utlenionej próbki, lecz są przeliczane na cystynę ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$, MW 240,30) przez zastosowanie MW 120,15 ($= 0,5 \times 240,30$).

Metionina jest oznaczana jako sulfon metioniny w hydrolizatach utlenionej próbki, ale przeliczana na metioninę przez zastosowanie MW metioniny: 149,21.

Dodana wolna metionina jest oznaczana po ekstrakcji jako metionina, dla obliczeń stosowana jest taka sama masa cząsteczkowa MW.

Całkowitą objętość rozcieńczenia ekstraktów (F) w przypadku oznaczania zawartości wolnych aminokwasów (5.2) obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

V – objętość końcowego ekstraktu.

7. PRECYZJA METODY

Po odrzuceniu wyników krańcowych, średnią i wyniki odchylenia standardowego podaje tabela 2.

Tabela 2. Średnia w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna / cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	6,94 n = 15	3,01 n = 17	3,27 n = 17	9,55 n = 13
Komponent dla brojlerów	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Koncentrat białkowy	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiks	58,42 n = 16	—	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

7.1. Powtarzalność

Powtarzalność wyrażona jako „odchylenie standardowe wewnątrz laboratorium” omawianego powyżej porównawczego badania podaje tabela 3 i 4.

Tabela 3. Laboratoryjna norma odchylenia standardowego (S_i) w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna / cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	0,13 n = 15	0,10 n = 17	0,11 n = 17	0,26 n = 13
Komponent dla brojlerów	0,20 n = 16	0,11 n = 18	0,16 n = 18	0,28 n = 16
Koncentrat białkowy	0,48 n = 16	0,13 n = 17	0,27 n = 17	0,99 n = 15
Premiks	1,30 n = 16	—	2,19 n = 16	2,06 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

Tabela 4. Współczynnik zmienności (%) dla odchylenia standardowego (S_i) wewnątrz laboratorium

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna / cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	1,9 n = 15	3,3 n = 17	3,4 n = 17	2,8 n = 13
Komponent dla brojlerów	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Koncentrat białkowy	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiks	2,2 n = 16	—	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

7.2. Odtwarzalność

Tabela 5. Odchylenie standardowe między laboratoriami (S_R) w g/kg

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna / cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	0,28 n = 15	0,30 n = 17	0,23 n = 17	0,30 n = 13
Komponent dla brojlerów	0,48 n = 16	0,34 n = 18	0,55 n = 18	0,75 n = 16
Koncentrat białkowy	0,85 n = 16	0,62 n = 17	1,57 n = 17	1,24 n = 15
Premiks	2,49 n = 16	—	6,20 n = 16	6,62 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

Tabela 6. Współczynnik zmienności (%) dla odchylenia standardowego między laboratoriami (S_R)

Materiał badany	Aminokwas			
	Treonina	Cystyna / cysteina	Metionina	Lizyna
Mieszanka paszowa dla świń	4,1 n = 15	9,9 n = 17	7,0 n = 17	3,2 n = 13
Komponent dla brojlerów	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Koncentrat białkowy	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 n = 16	—	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

8. SPRAWDZENIE METODY

Prawidłowe stosowanie metody należy weryfikować poprzez wykonywanie powtarzalnych oznaczeń certyfikowanych materiałów odwoławczych, jeżeli takie są dostępne.

Zalecana jest także kalibracja z zastosowaniem certyfikowanych roztworów wzorcowych aminokwasów.

9. OBJAŚNIENIA

9.1. Z powodu różnic pomiędzy analizatorami aminokwasów podawane tu końcowe stężenia roztworów wzorcowych kalibracyjnych aminokwasów zgodnie z (3.27.4) i (3.27.5) i hydrolizatu zgodnie z (5.3.4) należy traktować jako przykładowe.

Zakres liniowej odpowiedzi aparatu powinien zostać sprawdzony dla wszystkich aminokwasów.

Roztwór wzorcowy jest rozcieńczany buforem cytrynianowym, tak aby otrzymać pik o średniej powierzchni.

9.2. Jeżeli do analizy aminokwasów wykorzystywany jest wysokosprawny chromatograf cieczowy HPLC, należy zoptymalizować warunki doświadczalne analizy zgodnie z zaleceniami producenta.

9.3. Przy stosowaniu tej metody do pasz zawierających więcej niż 1% chlorków (koncentraty, mieszanki mineralne, pasze uzupełniające) wyniki oznaczania metioniny mogą być zaniżone i należy stosować specjalne postępowanie.

3.2. OZNACZANIE TRYPTOFANU

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości ogólnego i wolnego tryptofanu w paszach. Metoda nie wyróżnienia form D i L.

2. ZASADA METODY

Dla oznaczania całkowitego tryptofanu próbka jest hydrolizowana w środowisku zasadowym nasyconego roztworu wodorotlenku baru i ogrzewana do 110°C przez 20 godzin. Po hydrolizie dodany jest wzorzec wewnętrzny.

Dla oznaczania wolnego tryptofanu próbka jest ekstrahowana w słabym kwasie w obecności wzorca wewnętrznego.

Tryptofan i wzorzec wewnętrzny w hydrolizacie lub w ekstrakcie jest oznaczony metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Należy stosować wodę podwójnie destylowaną lub wodę o porównywalnej jakości (przewodnictwo $< 10 \mu\text{S/cm}$).

3.2. Substancja wzorcowa: tryptofan (czystość / zawartość $\geq 99\%$) suszony w próżni pięciotlenkiem fosforu.

3.3. Substancja wzorcowa wewnętrzna: α -metylo-tryptotan (czystość / zawartość $\geq 99\%$) suszony w próżni pięciotlenkiem fosforu.

3.4. Wodorotlenek baru, oktahydrat

Należy uważać, aby nie wystawiać oktahydratu wodorotlenku baru na nadmierne działanie powietrza dla uniknięcia tworzenia się węglanu baru BaCO_3 , który mógłby utrudniać oznaczenie.

Z czasem wodorotlenek baru jest coraz trudniejszy do rozpuszczenia. W wyniku uzyskujemy nieklarowne roztwory do analizy HPLC, które mogą być przyczyną zaniżania wyników oznaczania tryptofanu.

3.5. Wodorotlenek sodu.

3.6. Kwas ortofosforowy, w = 85%.

3.7. Kwas chlorowodorowy, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.

3.8. Metanol, czystość HPLC.

3.9. Eter naftowy, temperatura wrzenia od 40 do 60°C.

3.10. Roztwór wodorotlenku sodu, c = 1 mol/l:

Rozpuścić 40,0 g NaOH (3.5) w wodzie i uzupełnić wodą (3.1) do 1 litra.

3.11. Kwas chlorowodorowy, c = 6 mol/l:

Odmierzyć 492 ml HCl (3.7.) i uzupełnić wodą do 1 litra.

3.12. Kwas chlorowodorowy, c = 1 mol/l:

Odmierzyć 82 ml HCl (3.7) i uzupełnić wodą do 1 litra.

3.13. Kwas chlorowodorowy, c = 0,1 mol/l:

Odmierzyć 8,2 ml HCl (3.7) i uzupełnić wodą do 1 litra.

3.14. Kwas ortofosforowy, c = 0,5 mol/l:

Odmierzyć 34 ml kwasu ortofosforowego (3.6) i uzupełnić wodą (3.1) do 1 litra.

3.15. Stężony roztwór tryptofanu (3.2), c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2553 g tryptofanu (3.2) w kwasie chlorowodorowym (3.13) i uzupełnić do kreski kwasem chlorowodorowym (3.13). Przechowywać w temperaturze -18°C nie dłużej niż 4 tygodnie.

3.16. Stężony roztwór wzorca wewnętrznego, c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2728 g α -metylo-tryptofanu (3.3) w kwasie chlorowodorowym (3.13) i uzupełnić do kreski kwasem chlorowodorowym (3.13). Przechowywać w temperaturze -18°C nie dłużej niż 4 tygodnie.

3.17. Kalibracyjny roztwór wzorcowy tryptofanu i wzorca wewnętrznego.

Odmierzyć 2,00 ml stężonego roztworu tryptofanu (3.15) i 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α -metylo-tryptofan) (3.16). Rozcieńczyć wodą (3.1) i metanolem (3.8) w przybliżeniu do tej samej objętości i tego samego stężenia metanolu (10 – 30%) w końcowym hydrolizacie. Roztwór należy przygotować tuż przed użyciem. Chronić przed bezpośrednim działaniem światła podczas przygotowywania.

3.18. Kwas octowy.

3.19. 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanol.

3.20. Etanoloamina $> 98\%$.

3.21. Roztwór 1 g 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (3.19) w 100 ml metanolu (3.8)

3.22. Faza ruchoma do HCLP:

3,00 g kwasu octowego (3.18) + 900 ml wody (3.1) + 50,0 ml roztworu (3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (3.19) w metanolu (3.8) (1 g/100 ml). Doprowadzić pH do 5,00 stosując etanoloaminę (3.20). Uzupełnić wodą (3.1) do 1000 ml.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wyposażenie HPLC z detektorem spektrofлуorometrycznym.

4.2. Kolumna do chromatografii cieczowej, 125 mm x 4 mm, C_{18} , wypełnienie 3 μm lub równoważne.

4.3. Pehametr.

4.4. Kolby propylenowe o pojemności 125 ml, z szeroką szyjką i nakrętką.

4.5. Sączek membranowy, 0,45 μm .

4.6. Autoklaw, 110 (± 2)°C, 1,4 ($\pm 0,1$) bar.

4.7. Wyrząsacz mechaniczny lub mieszadło magnetyczne.

4.8. Mieszadło Vortex.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbek

Rozdrobnić próbkę, tak aby przesiewała się przez 0,5 mm oczko sita. Próbki o dużej zawartości wilgoci należy przed rozdrobnieniem wysuszyć w temperaturze nieprzekraczającej 50°C lub przez wymrażanie. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu poddać ekstrakcji eterem naftowym (3.9) przed rozdrobnieniem.

5.2. Oznaczanie wolnego tryptofanu (ekstrakt)

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, odpowiednią ilość (1 – 5 g) przygotowanej próbki (5.1) do kolby stożkowej. Dodać 100,0 ml kwasu chlorowodorowego, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (3.13) i 5,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (3.16). Wstrząsać lub mieszać przez 60 minut przy użyciu wstrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego (4.7). Pozostawić do oddzielenia się osadu i przenieść pipetą 10,0 ml roztworu z nad osadu do zlewki. Dodać 5 ml kwasu ortofosforowego, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Doprowadzić do pH 3,0 za pomocą wodorotlenku sodu, $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (3.10). Dodać odpowiednią ilość metanolu (3.8) do uzyskania stężenia od 10 do 30% metanolu w końcowym roztworze. Przenieść do kolby miarowej o odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do objętości właściwej dla chromatografii (w przybliżeniu taka sama objętość jak kalibracyjnego roztworu wzorcowego (3.17)).

Przesączyć kilka ml roztworu przez sączonek membranowy 0,45 μm (4.5) przed dozowaniem na kolumnę HPLC. Przeprowadzić chromatografię zgodnie z opisem w (5.4).

Chronić roztwór wzorcowy i ekstrakty przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Jeżeli niemożliwe jest dokonanie analizy ekstraktów tego samego dnia, ekstrakty należy przechowywać w temperaturze 5°C nie dłużej niż przez 3 dni.

5.3. Oznaczanie całkowitego tryptofanu (hydrolizat)

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 do 1 g przygotowanej próbki (5.1) do kolby propylenowej (4.4). Próbkę analityczną powinna zawierać około 10 mg azotu. Dodać 8,4 g oktahydratu wodorotlenku baru (3.4) i 10 ml wody. Mieszać przy użyciu mieszadła Vortex (4.8) lub mieszadła magnetycznego (4.7). Pozostawić osłonięty teflonem magnes w mieszaninie. Spłukać ściany naczynia przy użyciu 4 ml wody. Nałożyć nakrętkę i zamknąć luźno naczynie. Przenieść do autoklawu (4.6) i utrzymywać w stanie wrzącej wody i pary przez 30 – 60 minut. Zamknąć autoklaw i autoklawować w temperaturze 110°C (± 2)°C przez 20 godzin.

Przed otwarciem autoklawu obniżyć temperaturę nieco poniżej 100°C. W celu uniknięcia krystalizacji $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ dodać do gorącej mieszaniny 30 ml wody o temperaturze pokojowej. Łagodnie wstrząsać lub mieszać. Dodać 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α -metylo-tryptofan) (3.16). Studzić naczynia na łaźni wodnej lub lodowej przez 15 minut.

Następnie dodać 5 ml kwasu ortofosforowego, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Utrzymując naczynie w zimnej łaźni, zobojętnić za pomocą HCl, $c = 6 \text{ mol/l}$ (3.11), mieszając, i doprowadzić do pH 3,0 za pomocą HCl, $c = 1 \text{ mol/l}$ (3.12). Dodać odpowiednią ilość metanolu dla uzyskania stężenia metanolu między 10 a 30% w końcowym roztworze. Przenieść do kolby miarowej o odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do objętości właściwej dla chromatografii (na przykład do 100 ml). Dodatek metanolu nie powinien powodować wytrącania.

Przesączyć kilka ml roztworu przez sączonek membranowy 0,45 μm (4.5) przed dozowaniem na kolumnę HPLC. Przeprowadzić chromatografię zgodnie z opisem w (5.4).

Chronić roztwór wzorcowy i ekstrakty przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Jeżeli niemożliwe jest dokonanie analizy ekstraktów tego samego dnia, ekstrakty należy przechowywać w temperaturze 5°C nie dłużej niż przez 3 dni.

5.4. Analiza HPLC

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe. Należy także uwzględnić informacje wskazane w (8.1) i (8.2):

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.2):	125 mm x 4 mm, C_{18} , wypełnienie 3 μm lub równoważne
Temperatura kolumny:	temperatura pokojowa
Faza ruchoma (3.22):	3,00 g kwasu octowego (3.18) + 900 ml wody (3.1) + 50,0 ml roztworu (3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (3.19) w metanolu (3.8) (1 g/100 ml). Doprowadzić do pH 5,00 przy użyciu etanoloaminy (3.20). Uzupełnić do 1000 ml wodą (3.1).
Przepływ:	1 ml/min
Czas analizy chromatograficznej:	około 34 minuty
Długość fali przy detekcji:	wzbudzenie: 280 nm, emisja: 356 nm
Dozowana objętość	20 μl

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times MW}{F \times G \times H \times 10000 \times V} = \text{g tryptofanu na 100 g próbki}$$

gdzie:

A – pole piku wzorca wewnętrznego, roztwór wzorcowy kalibracyjny (3.17),

B – pole piku tryptofanu, ekstrakt (5.2) lub hydrolizat (5.3),

C – objętość w ml (2 ml) stężonego roztworu tryptofanu (3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (3.17),

D – stężenie w $\mu\text{mol/ml}$ ($= 2,50$) stężonego roztworu tryptofanu (3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (3.17),

E – objętość w ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (3.16) dodanego przy ekstrakcji (5.2) ($= 5,00$ ml) lub do hydrolizatu (5.3) ($= 2,00$ ml),

F – pole piku wzorca wewnętrznego, ekstrakt (5.2) lub hydrolizat (5.3),

G – pole piku tryptofanu, roztwór wzorcowy kalibracyjny (3.17),

H – objętość w ml ($= 2,00$ ml) stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (3.16) dodanego do roztworu wzorcowego kalibracyjnego (3.17),

W – naważka próbki w g (odniesiona do masy wyjściowej, jeżeli poduszano lub odtłuszczano),

MW – ciężar cząsteczkowy tryptofanu ($= 204,23$).

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10% najwyższego wyniku, dla zawartości tryptofanu.

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Następujące szczególne warunki chromatograficzne mogą dać lepszy rozdział tryptofanu i α -metylo-tryptofanu.

Izokratyczna elucja po gradientowym czyszczeniu kolumny:

Kolumna do chromatografii cieczowej:	125 mm x 4 mm, faza odwrócona C_{18} wypełnienie 5 μm lub równoważne		
Temperatura kolumny:	32°C		
Faza ruchoma:	A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /Metanol, 95 + 5 (V+V). B: Metanol		
Program gradientowy:	0 min	100% A	0% B
	15 min	100% A	0% B
	17 min	60% A	40% B
	19 min	60% A	40% B
	21 min	100% A	0% B
	33 min	100% A	0% B
Przepływ:	1,2 ml/min		
Czas analizy chromatograficznej:	około 33 minuty		

8.2. Analiza chromatograficzna może się różnić w zależności od typu aparatu HPLC i wypełnienia kolumny. Wybrany system powinien umożliwić uzyskanie linii podstawy pomiędzy pikami tryptofanu i wzorca wewnętrznego. Ponadto jest ważne, aby produkty degradacji zostały dobrze oddzielone od tryptofanu i wzorca wewnętrznego. Hydrolizaty bez wzorca wewnętrznego powinny być poddane analizie chromatograficznej w celu określenia linii podstawy i miejsca elucji zanieczyszczeń. Ważne jest, aby czas analizy był wystarczająco długi dla elucji wszystkich produktów degradacji, ponieważ ostatnie piki na chromatogramie mogą zakłócać kolejną analizę. W zakresie badanych stężeń układ chromatograficzny powinien zapewniać liniową odpowiedź. Liniową odpowiedź należy mierzyć przy stałym (normalnym) stężeniu wzorca wewnętrznego i zmieniających się stężeniach tryptofanu. Ważne jest, aby wielkość pików tryptofanu i wzorca wewnętrznego zawierały się w liniowym zakresie układu HPLC z detekcją fluorescencyjną. Jeżeli piki tryptofanu lub wzorca wewnętrznego są zbyt małe lub zbyt duże, analiza powinna być powtórzona, przy zmianie wielkości odważki lub objętości roztworu końcowego.

8.3. Wodorotlenek baru

Z czasem wodorotlenek baru jest coraz trudniejszy do rozpuszczenia. W wyniku uzyskujemy nieklarowne roztwory do analizy HPLC, które mogą być przyczyną zaniżania wyników oznaczania tryptofanu.

ROZDZIAŁ 4**BADANIE SKŁADNIKÓW MINERALNYCH****4.1. OZNACZANIE WAPNIA****1. CEL I ZAKRES**

Metoda służy do oznaczania całkowitej zawartości wapnia w paszach.

2. ZASADA METODY

Próbka jest spopielenia, popiół rozpuszczany w kwasie chlorowodorowym i wapń strącany jako szczawian wapnia. Osad jest rozpuszczany w kwasie siarkowym, a uwolniony kwas szczawiowy miareczkowany roztworem manganianu(VII) potasu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, $d = 1,14$.

3.2. Kwas azotowy, $d = 1,40$.

3.3. Kwas siarkowy, $d = 1,13$.

3.4. Amoniak, $d = 0,98$.

3.5. Zimny nasycony roztwór szczawianu amonu.

3.6. Kwas cytrynowy, 30% roztwór (m/V).

3.7. Chlorek amonu, 5% roztwór (m/V).

3.8. Roztwór zieleni bromokrezolowej, 0,04% (m/V).

3.9. Roztwór manganianu(VII) potasu 0,1 N.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Elektryczny piec do spalań z termostatem i możliwością cyrkulacji powietrza.

4.2. Tygłe do spalań platynowe, kwarcowe lub porcelanowe.

4.3. Szklane tygłe ze spiekami o porowatości G_4 .

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć około 5 g próbki lub więcej, jeżeli to konieczne, z dokładnością do 1 mg, spopielić w temperaturze 550°C i przenieść popiół do 250 ml zlewki.

Dodać 40 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), 60 ml wody i kilka kropli kwasu azotowego (3.2). Doprowadzić do wrzenia i gotować przez 30 minut. Schłodzić i przenieść roztwór do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Splukać zlewkę, przenieść popłuczyny do kolby i uzupełnić kolbę do kreski wodą, wymieszać i przesączyć.

Za pomocą pipety przenieść do zlewki o pojemności 250 ml część roztworu zawierającą od 10 do 40 mg wapnia zgodnie z przewidywaną zawartością. Dodać 1 ml roztworu kwasu cytrynowego (3.6) i 5 ml roztworu chlorku amonu (3.7).

Uzupełnić wodą do około 100 ml. Doprowadzić do wrzenia, dodać 8 do 10 kropli zieleni bromokrezolowej (3.8) i 30 ml gorącego roztworu szczawianu amonu (3.5). Jeżeli pojawi się osad, należy go rozpuścić, dodając kilka kropli kwasu chlorowodorowego (3.1).

Zobojętniać bardzo wolno amoniakiem (3.4), ciągle mieszając, do osiągnięcia pH od 4,4 do 4,6 (tj. gdy wskaźnik zmieni barwę). Umieścić zlewkę we wrzącej łaźni wodnej i utrzymywać przez 30 minut celem strącenia osadu. Usunąć zlewkę z łaźni wodnej. Pozostawić na 1 godzinę celem odstania osadu i przesączyć przez tygiel filtracyjny G_4 (4.3).

Przemycać wodą zlewkę i tygiel z osadem do całkowitego usunięcia nadmiaru szczawianu amonowego (nieobecność chlorków w roztworze po przemyciu świadczy o tym, że osad został zupełnie przemity).

Rozpuścić osad zebrany na tygliku filtracyjnym w 50 ml gorącego kwasu siarkowego (3.3). Splukać tygiel gorącą wodą i rozcieńczyć przesącz do około 100 ml. Podgrzać do temperatury od 70 do 80°C i miareczkować, kroplami, roztworem manganianu(VII) potasu (3.9) do pojawienia się różowego zabarwienia utrzymującego się co najmniej przez 1 minutę.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

1 ml 0,1 N manganianu(VII) potasu odpowiada 2,004 mg wapnia. Wynik wyrazić w procentach wagowych.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Przy małych zawartościach wapnia postępować następująco:

Osad szczawianu wapnia przesączyć przez bibułę bezpopiołową. Po przemyciu wysuszyć sączek z zawartością i spopielić w platynowym tygliku w temperaturze 550°C . Rozpuścić pozostałość w kilku kroplach kwasu siarkowego (3.3), odparować do sucha, wstawić ponownie do pieca o temperaturze 550°C i zważyć. Jeżeli W jest masą otrzymanego siarczanu wapnia, zawartość wapnia w części roztworu próbki pobranego do analizy wynosi $W \times 0,2944$.

7.2. Jeżeli próbka składa się jedynie z substancji mineralnych, należy ją rozpuścić w kwasie chlorowodorowym bez uprzedniego spopielenia. W przypadkach takich produktów jak fosforan(V) glinu i wapnia, który trudno rozpuszcza się w kwasie, należy przed rozpuszczeniem stopić je w środowisku alkalicznym. W tym celu w tygliku platynowym umieścić odważkę próbki i dokładnie wymieszać w stosunku 1 : 5 z mieszaniną zawierającą równoważne ilości węglanu potasu i węglanu sodu. Delikatnie ogrzewać do całkowitego stopienia. Schłodzić i rozpuścić w kwasie chlorowodorowym.

7.3. Gdy próbka zawiera dużo magnezu, należy powtórnie strącić szczawian wapnia.

4.2. OZNACZANIE SODU

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości sodu w paszach.

2. ZASADA METODY

Próbka jest spopiela i popiół rozpuszczany w kwasie chlorowodorowym. Zawartość sodu w roztworze jest oznaczana metodą fotometrii płomieniowej w obecności chlorku cezu i azotanu glinu. Dodatek tych substancji w dużym stopniu eliminuje interferencje przeszkadzających pierwiastków.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, $d = 1,12$.

3.2. Chlorek cezu.

3.3. Azotan glinu $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

3.4. Chlorek sodu, bezwodny.

3.5. Roztwór obciążający:

Rozpuścić w wodzie 50 g chlorku cezu (3.2) i 250 g azotanu glinu (3.3), uzupełnić wodą do 1 litra i wymieszać. Przechowywać w plastikowej butelce.

3.6. Roztwór wzorcowy sodu:

Rozpuścić w wodzie 2,542 g chlorku sodu (3.4) i 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), uzupełnić wodą do 1 litra i wymieszać. Przechowywać w plastikowej butelce. 1 ml tego roztworu zawiera 1,00 mg sodu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Tygle do spaleń platynowe, kwarcowe lub porcelanowe, zalecane z przykrywkami.

4.2. Elektryczny piec do spaleń z termostatem.

4.3. Fotometr płomieniowy.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Analiza próbki

Odważyć 10 g próbki, z dokładnością do 10 mg, umieścić w tyglu (4.1) i spopielać przez 3 godziny w temperaturze 450°C . Nie dopuścić do zapalenia się próbki. Po schłodzeniu przenieść popiół ilościowo do kolby miarowej o pojemności 500 ml używając od 250 do 300 ml wody, a następnie dodać 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.1). Po całkowitym uwolnieniu dwutlenku węgla roztwór ogrzać i utrzymywać przez 2 godziny w temperaturze 90°C , od czasu do czasu mieszając. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej uzupełnić kolbę do kreski wodą, wstrząsnąć i przesączyć. W kolbie miarowej o pojemności 100 ml umieścić taką ilość przesączu, która będzie zawierała nie więcej niż 1,0 mg sodu, dodać 10,0 ml roztworu obciążającego (3.5), uzupełnić do kreski wodą i wymieszać. W przypadku wyższej zawartości sodu rozcieńczyć analizowany roztwór przed dodaniem roztworu obciążającego.

Tabela 7. Przykład dla próbki o masie 10 g

Zawartość sodu w próbce (% Na)	Rozcieńczenie	Pobrana do oznaczania część roztworu, w ml	Współczynnik rozcieńczenia l/k
do 0,1	—	50	10
powyżej 0,1 do 0,5	—	10	50
powyżej 0,5 do 1,0	—	5	100
powyżej 1,0 do 5,0	1 : 10	10	500
powyżej 5,0 do 10,0	1 : 10	5	1000
powyżej 10,0 do 20,0	1 : 20	5	2000

Dokonać pomiaru fotometrycznego przy długości fali 589 nm. Obliczyć wynik, korzystając z krzywej kalibracyjnej.

5.2. Krzywa kalibracyjna

Odmierzyć dokładnie 10 ml roztworu wzorcowego (3.6) i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Uzupełnić kolbę do kreski wodą i wymieszać. W kolbach miarowych o pojemności 100 ml odmierzyć kolejno 5, 10, 15, 20 i 25 ml tego roztworu, co odpowiada 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 mg sodu. Dodać dodatkową kolbę niezawierającą roztworu wzorcowego. Dodać 10 ml roztworu obciążającego (3.5) do każdej kolby, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Przeprowadzić oznaczenie zgodnie z opisem w (5.1). Krzywa kalibracyjna ma przebieg liniowy w zakresie do 1 mg Na w 100 ml roztworu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość sodu X obliczyć w procentach według następującego wzoru:

$$X(\%) = \frac{A \times R}{m \times 10}$$

gdzie:

A – ilość sodu odczytana z krzywej kalibracyjnej, w mg,

R – współczynnik rozcieńczenia l/k , wskazujący, jaką część roztworu próbki k pobrano do oznaczeń w końcowym roztworze pomiarowym,

m – masa próbki, w g.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Produkty zawierające ponad 4% sodu można spopielać przez 2 godziny pod przykryciem. Po ochłodzeniu dodać wody, utworzyć zawiesinę za pomocą drucika platynowego, wysuszyć i ponownie spopielać przez 2 godziny w tyglu z przykrywką.

7.2. Próbkę zawierającą wyłącznie substancje mineralne należy rozpuścić bez spopielenia.

4.3. OZNACZANIE POTASU

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości potasu w paszach.

2. ZASADA METODY

Próbka jest spopielaana, a popiół rozpuszczany w kwasie chlorowodorowym. Zawartość potasu w roztworze jest oznaczana metodą fotometrii płomieniowej w obecności chlorku cezu i azotanu glinu. Dodatek tych substancji w dużym stopniu eliminuje interferencje przeszkadzających pierwiastków.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, $d = 1,12$.

3.2. Chlorek cezu.

3.3. Azotan glinu $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$.

3.4. Chlorek potasu, bezwodny.

3.5. Roztwór obciążający:

Rozpuścić w wodzie 50 g chlorku cezu (3.2) i 250 g azotanu glinu (3.3), uzupełnić wodą do 1 litra i wymieszać. Przechowywać w plastikowej butelce.

3.6. Roztwór wzorcowy potasu:

Rozpuścić 1,907 g chlorku potasu (3.4) i 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), uzupełnić wodą do 1 litra i wymieszać. Przechowywać w plastikowej butelce. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg potasu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Tygłe do spalań platynowe, kwarcowe lub porcelanowe, zalecane z przykrywkami.

4.2. Elektryczny piec do spalań z termostatem.

4.3. Fotometr płomieniowy.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Analiza próbki.

Odważyć 10 g próbki, z dokładnością do 10 mg, umieścić w tyglu (4.1) i spopielać przez 3 godziny w temperaturze $450^\circ C$. Po ochłodzeniu przenieść popiół ilościowo do kolby miarowej o pojemności 500 ml używając od 250 do 300 ml wody, a następnie dodać 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.1). Po uwolnieniu całego dwutlenku węgla ogrzać roztwór i utrzymywać przez 2 godziny w temperaturze $90^\circ C$, od czasu do czasu mieszając. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej uzupełnić kolbę do kreski wodą, wstrząsnąć i przesączyć. W kolbie miarowej o pojemności 100 ml umieścić taką ilość przesączu, która będzie zawierała nie więcej niż 1 mg potasu, dodać 10,0 ml roztworu obciążającego (3.5), uzupełnić do kreski wodą i wymieszać. W przypadku wyższej zawartości potasu rozcieńczyć odpowiednio roztwór analizowany przed dodaniem roztworu obciążającego.

Tabela 8. Przykład dla próbki o masie 10 g

Zawartość potasu w próbce (% K)	Rozcieńczenie	Pobrana do oznaczania część roztworu, w ml	Współczynnik rozcieńczenia l/k
do 0,1	—	50	10
powyżej 0,1 do 0,5	—	10	50
powyżej 0,5 do 1,0	—	5	100
powyżej 1,0 do 5,0	1 : 10	10	500
powyżej 5,0 do 10,0	1 : 10	5	1000
powyżej 10,0 do 20,0	1 : 20	5	2000

Dokonać pomiaru fotometrycznego przy długości fali 768 nm. Obliczyć wynik, korzystając z krzywej kalibracyjnej.

5.2. Krzywa kalibracyjna.

Odmierzyć dokładnie 10 ml roztworu wzorcowego (3.6) i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Uzupełnić kolbę do kreski wodą i wymieszać. W kolbach miarowych o pojemności 100 ml odmierzyć kolejno 5, 10, 15, 20 i 25 ml tego roztworu, co odpowiada 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 mg potasu. Dodać dodatkową kolbę niezawierającą roztworu wzorcowego.

Dodać 10 ml roztworu obciążającego (3.5) do każdej kolby, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Przeprowadzić oznaczenie zgodnie z opisem w (5.1). Krzywa kalibracyjna ma przebieg liniowy w zakresie do 1 mg K na 100 ml roztworu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość potasu X obliczyć w procentach według następującego wzoru:

$$X(\%) = \frac{A \times R}{m \times 10}$$

gdzie:

A – ilość potasu odczytana z krzywej kalibracyjnej, w mg,

R – współczynnik rozcieńczenia $1/k$ wskazujący, jaka część roztworu próbki k znajduje się w końcowym roztworze pomiarowym,

m – masa próbki, w g.

7. OBJAŚNIENIA

Nie zawsze jest konieczne dodawanie roztworu obciążającego (3.5) w celu wyeliminowania interferencji pierwiastków przeszkadzających.

4.4. OZNACZANIE CHLORKÓW

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości chlorków rozpuszczalnych w wodzie, w przeliczeniu na chlorek sodowy, w paszach.

2. ZASADA METODY

Chlorki są rozpuszczane w wodzie. Jeżeli badany produkt zawiera substancje organiczne, roztwór jest klarowany. Po zakwaszeniu kwasem azotowym chlorki strąca się w postaci chlorku srebra po traktowaniu roztworem azotanu srebra. Nadmiar azotanu srebra jest miareczkowany roztworem tiocyjanianu amonu według metody Volharda.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Tiocyjanian amonu, roztwór 0,1 N.

3.2. Azotan srebra, roztwór 0,1 N.

3.3. Nasycony roztwór siarczanu(VI) amonu i żelaza.

3.4. Kwas azotowy, $d = 1,38$.

3.5. Eter dwuetylowy.

3.6. Aceton.

3.7. Roztwór Carreza I:

Rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $Zn(CH_3COOH)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.8. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.9. Węgiel aktywny, bez domieszki chlorków.

4. APARATURA I SPRZĘT

Mikser (tumbler), od 35 do 40 obr/min.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie roztworu

Zależnie od rodzaju próbki, przygotować roztwór, według jednej z podanych metod: (5.1.1), (5.1.2) lub (5.1.3). W tym samym czasie przeprowadzić ślepą próbę pomijając analizowaną próbkę.

5.1.1. Próbki niezawierające substancji organicznej

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, nie więcej niż 10 g próbki zawierającej nie więcej niż 3 g chlorków. Odważkę umieścić z 400 ml wody w kolbie miarowej o pojemności 500 ml w temperaturze około 20°C. Mieszać przez 30 minut w mikserze bębnowym, uzupełnić do kreski, wymieszać i przesączyć.

5.1.2. Próbki zawierające substancje organiczne, z wyłączeniem przypadków opisanych w (5.1.3).

Odważyć około 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i wraz z 1 g węgla aktywnego umieścić w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 400 ml wody o temperaturze około 20°C i 5 ml roztworu Carreza I (3.7), wymieszać i dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.8). Mieszać przez 30 minut w mikserze, uzupełnić do kreski, wymieszać i przesączyć.

5.1.3. Pasze po obróbce cieplnej, wyłoki lniane, mąka, produkty bogate w mączkę lnianą i inne bogate w klej roślinny lub substancje koloidalne (np. skrobia częściowo zdekstrynowana).

Przygotować roztwór tak jak opisano w (5.1.2), ale nie sączyć. Zdekantować (jeżeli zajdzie potrzeba odwirować). 100 ml cieczy umieścić w kolbie miarowej o pojemności 200 ml. Wymieszać z acetonem (3.6) i uzupełnić kolbę do kreski tym samym rozpuszczalnikiem, wymieszać i przesączyć.

5.2. Miareczkowanie

Przy użyciu pipety przenieść do kolby Erlenmeyera od 25 do 100 ml przesącza (w zależności od przewidywanej zawartości chlorków), otrzymanego jak opisano w (5.1.1), (5.1.2) lub (5.1.3). Pobrana porcja cieczy nie może zawierać więcej niż 150 mg chlorków. Rozcieńczyć w razie potrzeby wodą do objętości nie mniejszej niż 50 ml, dodać 5 ml kwasu azotowego (3.4), 20 ml nasyconego roztworu siarczanu(VI) żelaza i amonu (3.3) i 2 krople roztworu tiocyjanianu amonu (3.1) z biurety ustawionej na zero. Za pomocą biurety wprowadzić roztwór azotanu srebra (3.2), tak aby nadmiar wyniósł 5 ml. Dodać 5 ml eteru dwuetylowego (3.5) i mocno wstrząsać do skoagulowania się osadu.

Nadmiar azotanu srebra miareczkować roztworem tiocyjanku amonu (3.1) aż do uzyskania czerwono-brązowej barwy utrzymującej się przez 1 minutę.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Ilość chlorków (W), w przeliczeniu na chlorek sodowy, znajdujących się w określonej objętości przesącza pobranego do miareczkowania, obliczyć według następującego wzoru:

$$W = 5,845 (V_1 - V_2) \text{ mg}$$

gdzie:

V_1 – objętość dodanego 0,1 N roztworu azotanu srebra, w ml,

V_2 – objętość 0,1 N roztworu tiocyjanku amonu zużyta do miareczkowania.

Jeżeli ślepa próba wykaże, że 0,1 N roztwór azotanu srebra jest zużywany, należy odjąć tę wartość od objętości ($V_1 - V_2$).

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Można zastosować miareczkowanie potencjometryczne.

7.2. W przypadku produktów bogatych w oleje i tłuszcze najpierw należy je odtłuścić eterem dwuetylowym lub eterem naftowym.

7.3. W przypadku analizy mączek rybnych, miareczkowanie można prowadzić metodą Mohra.

4.5. OZNACZANIE MAGNEZU

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości magnezu w paszach. Metoda jest szczególnie odpowiednia do oznaczania zawartości magnezu poniżej 5%.

2. ZASADA METODY

Próbka jest spopiela i rozpuszczana w rozcieńczonym kwasie chlorowodorowym. Jeżeli próbka nie zawiera substancji organicznych, jest rozpuszczana bezpośrednio w rozcieńczonym kwasie chlorowodorowym. Roztwór jest rozcieńczany, a zawartość magnezu oznaczana metodą spektrofotometrii absorpcji atomowej przy 285,2 nm przez porównanie z roztworami wzorcowymi.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, $d = 1,16$.

3.2. Stężony kwas chlorowodorowy, $d = 1,19$.

3.3. Drut lub wstążka magnezowa, lub heptahydrat siarczynu magnezu wysuszony w temperaturze pokojowej.

3.4. Roztwór soli strontu (chlorek lub azotan), 2,5% strontu (m/V), ($76,08 \text{ g SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ lub $60,38 \text{ g Sr(NO}_3)_2$).

3.5. Roztwór wzorcowy magnezu:

Odważyć 1 g magnezu oczyszczonego z tlenku, z dokładnością do 1 mg (3.3) lub równoważną ilość ($10,143 \text{ g}$) heptahydratu siarczynu magnezu (3.3). Odważyć umieścić w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml, dodać 80 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), pozostawić do rozpuszczenia i uzupełnić wodą do kreski. 1ml tego roztworu zawiera 1000 mg magnezu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Platynowe, kwarcowe lub porcelanowe tygle do spalań.

4.2. Elektryczny piec do spalań z termostatem.

4.3. Spektrofotometr absorpcji atomowej.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie roztworu próbki

5.1.1. Pasze składające się wyłącznie z substancji mineralnych

Odważyć 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 500 ml zawierającej od 250 do 300 ml wody. Dodać 40 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), doprowadzić do wrzenia i łagodnie gotować przez 30 minut. Schłodzić, uzupełnić wodą do kreski, wymieszać i przesączyć przez suchy karbowany sącdek do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml przesącza. W przypadku obecności krzemu, 5 g próbki zalać odpowiednią ilością (od 15 do 30 ml) kwasu chlorowodorowego (3.2), odparować do sucha na łaźni wodnej i przenieść do suszarki ustawionej na temperaturę 105°C na około 1 godzinę.

Do osadu dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml za pomocą ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia i uzupełnić wodą do kreski. Wymieszać i przesączyć przez suchy karbowany sącdek do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml przesącza.

5.1.2. Pasze składające się głównie z substancji mineralnych

Odważyć 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w tyglu, spopielać w temperaturze 550°C w piecu muflowym aż do uzyskania popiołu bez cząsteczek węglowych, a następnie schłodzić. W celu usunięcia krzemu dodać do popiołu od 15 do 30 ml kwasu chlorowodorowego (3.2), odparować do sucha na łaźni wodnej i umieścić na 1 godzinę w suszarce w temperaturze 105°C .

Do osadu dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml za pomocą ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia i uzupełnić wodą do kreski. Wymieszać i przesączyć przez suchy karbowany sącdek do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml przesącza.

5.1.3. Pasze składające się głównie z substancji organicznych

Odważyć 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w tyglu, spopielać w temperaturze 550°C w piecu muflowym aż do uzyskania popiołu bez cząsteczek węglowych. W celu wytrącenia nierozpuszczalnej krzemionki dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.2), odparować do sucha na łaźni wodnej i umieścić na 1 godzinę w suszarce w temperaturze 105°C . Do popiołu dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 ml za pomocą ciepłej wody, doprowadzić do wrzenia, pozostawić do ochłodzenia i uzupełnić wodą do kreski. Wymieszać i przesączyć przez suchy karbowany sącdek do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml przesącza.

5.2. Pomiar metodą absorpcji atomowej

Rozcieńczając roztwór wzorcowy (3.5) wodą, przygotować co najmniej 5 roztworów o wzrastających stężeniach odpowiadających optymalnemu zakresowi pomiaru na spektrofotometrze. Do każdego roztworu dodać po 10 ml roztworu soli strontu (3.4) i uzupełnić wodą do 100 ml. Rozcieńczyć wodą jedną część przesącza otrzymanego w (5.1.1), (5.1.2) lub (5.1.3), tak aby otrzymać stężenie magnezu mieszczące się w zakresie roztworów odniesienia. Stężenie kwasu chlorowodorowego tego roztworu nie może przekraczać 0,4 mol/l. Dodać 10 ml roztworu soli strontu (3.4) i następnie uzupełnić objętość wodą do 100 ml. Zmierzyć absorpcję roztworu badanego i roztworów odniesienia przy 285,2 nm.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość magnezu w próbce obliczamy przez porównanie z roztworami odniesienia. Wynik wyrazić w procentach próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 5% wartości względnej, dla zawartości magnezu.

4.6. OZNACZANIE CAŁKOWITEJ ZAWARTOŚCI FOSFORU METODĄ FOTOMETRYCZNĄ

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości całkowitego fosforu w paszach. Metoda jest szczególnie użyteczna do analizy pasz o niskiej zawartości fosforu. W niektórych przypadkach (produkty bogate w fosfor) dopuszcza się stosowanie metody wagowej.

2. ZASADA METODY

Próbka jest mineralizowana poprzez spalanie (w przypadku pasz organicznych) lub przez rozpuszczenie w kwasach (w przypadku związków mineralnych i pasz ciekłych), a następnie wprowadzona do kwaśnego roztworu. Roztwór jest poddawany barwnej reakcji z odczynnikami molibdenowanadowym. Absorbancja utworzonego żółtego roztworu mierzona jest w spektrofotometrze przy 430 nm.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Węglan wapnia.

3.2. Kwas chlorowodorowy, $d = 1,1$ (około 6 N).

3.3. Kwas azotowy, $d = 1,045$.

3.4. Kwas azotowy, od $d = 1,38$ do 1,42.

3.5. Kwas siarkowy, $d = 1,84$.

3.6. Odczynnik molibdenowanadowy:

Zmieszać 200 ml roztworu heptamolibdenianu amonu (3.6.1), 200 ml roztworu wanadanu amonu (3.6.2) i 134 ml kwasu azotowego (3.4) w kolbie miarowej o pojemności 1 litra. Uzupełnić do kreski wodą.

3.6.1. Roztwór heptamolibdenianu(VI) amonu:

Rozpuścić w gorącej wodzie 100 g heptamolibdenianu(VI) amonu $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Dodać 10 ml amoniaku ($d = 0,91$) i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.6.2. Roztwór wanadanu(V) amonu:

2,35 g wanadanu(V) amonu NH_4VO_3 rozpuścić w 400 ml gorącej wody. Stale mieszając, dodawać powoli 20 ml rozcieńczonego kwasu azotowego (7 ml HNO_3 (3.4) + 13 ml H_2O) i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.7. Roztwór wzorcowy fosforu o stężeniu 1 mg/ml:

Rozpuścić 4,387 g dwuwodorofosforanu(V) potasu KH_2PO_4 w wodzie. Uzupełnić do 1 litra wodą.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Tygłe kwarcowe lub porcelanowe.

4.2. Piec muflowy z termostatem nastawianym na 550°C.

4.3. Kolby Kjeldahla o pojemności 250 ml.

4.4. Kolby i pipety miarowe.

4.5. Spektrofotometr.

4.6. Probówki o średnicy 16 mm z korkiem o średnicy 14,5 mm i o pojemności od 25 do 30 ml.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie roztworu

W zależności od rodzaju próbki, przygotować roztwór według (5.1.1) lub (5.1.2).

5.1.1. Typowy tok postępowania

Odważyć co najmniej 1 g próbki z dokładnością do 1 mg. Umieścić próbkę w kolbie Kjeldahla, dodać 20 ml kwasu siarkowego (3.5), zamieszać w celu zwilżenia próbki i niedopuszczenia do przyklejania cząstek paszy do ścianek kolby, podgrzać i utrzymywać w stanie wrzenia przez 10 minut. Ostudzić, dodać 2 ml kwasu azotowego (3.4), ostrożnie podgrzać, ponownie ostudzić i dodać nieco więcej kwasu azotowego (3.4), a następnie doprowadzić do wrzenia. Powtarzać tę czynność aż do uzyskania bezbarwnego roztworu. Schłodzić, dodać trochę wody, zdekantować ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml, spłukać kolbę gorącą wodą. Ostudzić, uzupełnić do kreski wodą, wymieszać i przesączyć.

5.1.2. Próbkę zawierające substancje organiczne, wolne od wapnia i dwuwodorofosforanu(V) magnezu.

Odważyć około 2,5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w tygliku. Zmieszać dokładnie próbkę z 1 g węglanu wapnia (3.1). Spopielać w piecu w temperaturze $550 \pm 5^\circ\text{C}$ do uzyskania popiołu o jasnej lub szarej barwie (dopuszcza się niewielkie ilości zwęglonej substancji organicznej). Przenieść popiół do zlewki o pojemności 250 ml. Dodać 20 ml wody i kwasu chlorowodorowego (3.2) aż do zaprzestania pienienia się. Następnie dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.2). Umieścić zlewkę na łaźni piaszkowej i odparować do sucha celem przeprowadzenia krzemionki w postać nierozpuszczalną. Pozostałość

rozpuścić w 10 ml kwasu azotowego (3.3) i gotować na łaźni piaskowej przez 5 minut, nie doprowadzając do zupełnego odparowania cieczy. Przenieść ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml, spłukując kilkakrotnie zlewkę gorącą wodą. Pozostawić do schłodzenia, uzupełnić do kreski wodą, wymieszać i przesączyć.

5.2. Wywołanie barwy i pomiar absorbancji

Rozcieńczyć część przesączu otrzymanego według (5.1.1) lub (5.1.2) celem uzyskania roztworu o stężeniu nie większym niż 40 µg/ml. Umieścić 10 ml tego roztworu w probówce (4.6) i dodać 10 ml odczynnika molibdenowanadowego (3.6). Wymieszać i pozostawić na 10 minut w temperaturze 20°C. Zmierzyć absorbancję w spektrofotometrze przy 430 nm w stosunku do roztworu otrzymanego przez dodanie 10 ml odczynnika molibdenowanadowego (3.6) do 10 ml wody.

5.3. Krzywa kalibracyjna

Z roztworu wzorcowego (3.7) przygotować roztwory zawierające odpowiednio 5, 10, 20, 30 i 40 µg fosforu w 1 ml. Pobrać 10 ml każdego z tych roztworów i dodać po 10 ml odczynnika molibdenowanadowego (3.6). Wymieszać i pozostawić na co najmniej 10 minut w temperaturze 20°C. Zmierzyć absorbancję według (5.2).

Wykreślić krzywą wzorcową, odkładając na osi rzędnych wartości absorbancji, a na osi odciętych odpowiadające im ilości fosforu. W zakresie stężeń od 0 do 40 µg/ml krzywa jest liniowa.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Określić zawartość fosforu w badanej próbce za pomocą krzywej wzorcowej. Wynik wyrazić w procentach wagowych.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 3% wartości względnej, dla zawartości fosforu poniżej 5%,
- 0,15% wartości bezwzględnej, dla zawartości fosforu 5% i więcej.

4.7. OZNACZANIE WĘGLANÓW

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości węglanów, w przeliczeniu na węglan wapnia, w większości pasz. W niektórych przypadkach (np. węglan żelaza) należy zastosować inne postępowanie analityczne.

2. ZASADA METODY

Węglany rozkłada się kwasem chlorowodorowym. Powstały dwutlenek węgla zbiera się w wykalibrowanej rurce szklanej, a jego objętość jest porównywana z objętością uwolnioną ze znanej ilości węglanu wapnia w tych samych warunkach.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, d = 1,10.

3.2. Węglan wapnia.

3.3. Kwas siarkowy, około 0,1 N, zabarwiony czerwinią metylową.

4. APARATURA I SPRZĘT

Zestaw aparaturowy Scheiblera-Dietricha (rys. 1) lub podobny.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

W zależności od zawartości węglanów w próbce, zważyć próbkę analityczną o masie podanej poniżej:

- 0,5 g produktu przy zawartościach węglanów powyżej 50 do 100%, wyrażonych jako węglan wapnia,
- 1 g produktu przy zawartościach węglanów od 40 do 50%, wyrażonych jako węglan wapnia,
- 2 do 3 g w przypadkach innych produktów.

Próbkę umieścić w specjalnej kolbie aparatu (4), wyposażonej w małą probówkę wykonaną z nietłukącego się szkła zawierającą 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i podłączyć kolbę do aparatury. Kran trójdrożny (5) ustawić, tak aby rurka (1) była podłączona z wyjściem. Używając ruchomej rurki (2), wypełnionej barwnym kwasem siarkowym (3.3) i połączonej z wykalibrowaną rurką (1), ustawić poziom cieczy na wartość zerową. Przekręcić kran (5), tak aby połączyć rurki (1) i (3), i sprawdzić, czy utrzymywany jest poziom zerowy.

Powoli wlewać kwas chlorowodorowy (3.1) do próbki, przechylając kolbę (4). Wyrównać ciśnienie, obniżając rurkę (2). Potrząsać kolbą (4) aż do całkowitego uwolnienia dwutlenku węgla.

Przywrócić ciśnienie, doprowadzając ciecz w rurkach (1) i (2) do tego samego poziomu. Po kilku minutach, kiedy ustali się objętość gazu, należy wykonać odczyt.

Przeprowadzić test kontrolny w tych samych warunkach z 0,5 g węglanu wapnia (3.2).

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość węglanów wyrażoną w gramach, wyrazić jako procentową zawartość węglanu wapnia w próbce, według następującego wzoru:

$$V \times 100$$

$$T \times 2W$$

gdzie:

V – ilość ml CO₂ uwolniona z odważki analitycznej próbki,

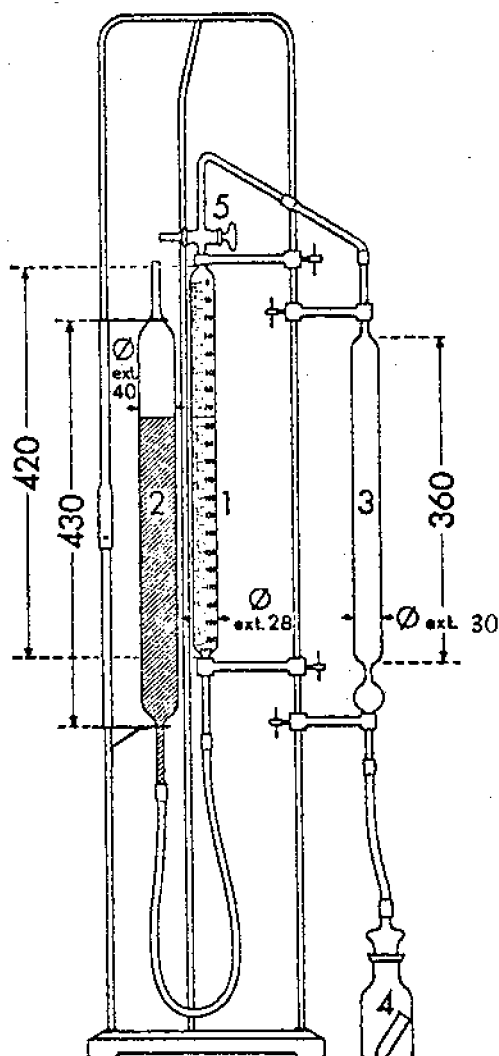
T – ilość ml CO₂ uwolniona z 0,5 g CaCO₃,

W – masa próbki analitycznej, w g.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Jeżeli odważka próbki jest większa niż 2 g, należy najpierw wlać do kolby (4) 15 ml wody destylowanej i wymieszać przed rozpoczęciem badania. Do testu kontrolnego należy użyć takiej samej objętości wody.

7.2. Jeżeli zastosowana aparatura wymaga zastosowania innych objętości niż tych dla aparatu Scheiblera-Dietricha, należy ilości badanej próbki i substancji wzorcowej dostosować do posiadanej aparatury.



Rysunek 1. Aparat Scheiblera-Dietricha do oznaczania CO₂. Skala 1:8 (wymiały w mm)

4.8. OZNACZANIE ŻELAZA, MIEDZI, MANGANU I CYNKU

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości żelaza, miedzi, manganu i cynku w paszach. Granice oznaczalności metody wynoszą:

żelazo (Fe): 20 mg/kg,
miedź (Cu): 10 mg/kg,
mangan (Mn): 20 mg/kg,
cynk (Zn): 20 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Próbkę wprowadza się do roztworu kwasu chlorowodorowego po spopieleniu substancji organicznej. Mikroelementy: żelazo, miedź, mangan i cynk są oznaczane, po odpowiednim rozcieńczeniu, metodą absorpcji spektrometrii atomowej.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Do przygotowania odczynników i roztworów używanych w postępowaniu analitycznym należy stosować wodę wolną od oznaczanych kationów, otrzymaną w drodze podwójnej destylacji w destylarce ze szkła borokrzemowego lub kwarcowego lub otrzymaną w wyniku podwójnego oczyszczania na żywicy jonowymiennej.

Należy stosować odczynniki czyste do analizy. Nieobecność oznaczanych pierwiastków w stosowanych odczynnikach i roztworach powinna być sprawdzana poprzez próbę zerową. Jeżeli to konieczne, należy poddać odczynnik oczyszczeniu przed zastosowaniem.

Zamiast przygotowania roztworów wzorcowych opisanych poniżej, dopuszcza się stosowanie innych dostępnych i sprawdzonych roztworów wzorcowych.

3.1. Kwas chlorowodorowy ($d = 1,19$).

3.2. Kwas chlorowodorowy (6 N).

3.3. Kwas chlorowodorowy (0,5 N).

3.4. Kwas fluorowodorowy od 38 do 40% (V/V), o zawartości żelaza poniżej 1 mg Fe/litr i pozostałości po odparowaniu mniejszej niż 10 mg (jako siarczany)/litr.

3.5. Kwas siarkowy ($d = 1,84$ N).

3.6. Nadtlenek wodoru (zawierający około 100 objętości tlenu (30% wagowych)).

3.7. Roztwór wzorcowy żelaza (1000 μg Fe/ml) przygotowany w następujący sposób:

Rozpuścić 1 g drutu żelaznego w 200 ml kwasu chlorowodorowego 6 N (3.2), dodać 16 ml nadtlenu wodoru (3.6) i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.7.1. Roboczy roztwór wzorcowy żelaza (100 μg Fe/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego (3.7) wodą w stosunku 1 : 9.

3.8. Roztwór wzorcowy miedzi (1000 μg Cu/ml) przygotowany w następujący sposób:

Rozpuścić 1 g sproszkowanej miedzi w 25 ml 6 N kwasu chlorowodorowego (3.2), dodać 5 ml nadtlenu wodoru (3.6) i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.8.1. Roztwór wzorcowy roboczy miedzi (10 μg Cu/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego (3.8) wodą w stosunku 1 : 9, a następnie przez ponowne rozcieńczenie wodą uzyskanego roztworu w takim samym stosunku.

3.9. Roztwór wzorcowy manganu (1000 μg Mn/ml) przygotowany w następujący sposób:

Rozpuścić 1 g sproszkowanego manganu w 25 ml 6 N kwasu chlorowodorowego (3.2) i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.9.1. Roztwór wzorcowy roboczy manganu (10 μg /ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego (3.9) wodą w stosunku 1 : 9, a następnie przez ponowne rozcieńczenie wodą uzyskanego roztworu w takim samym stosunku.

3.10. Roztwór wzorcowy cynku (1000 μg Zn/ml) przygotowany w następujący sposób:

Rozpuścić 1 g cynku w postaci paska lub wiórków w 25 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 N (3.2) i uzupełnić do 1 litra wodą.

3.10.1. Roztwór wzorcowy roboczy cynku (10 μg Zn/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego (3.10) wodą w stosunku 1 : 9, a następnie przez ponowne rozcieńczenie wodą uzyskanego roztworu w takim samym stosunku.

3.11. Roztwór chlorku lantanu przygotowany w następujący sposób:

Rozpuścić 12 g tlenku lantanu w 150 ml wody, dodać 100 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 N (3.2) i uzupełnić do 1 litra wodą.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Piec muflowy z regulacją temperatury i rejestratorem.

4.2. Sprzęt szklany ze szkła borokrzemowego; zalecane jest stosowanie sprzętu szklanego wyłącznie do oznaczania mikroelementów.

4.3. Tygle platynowe lub kwarcowe.

4.4. Spektrofotometr absorpcji atomowej o wymaganej czułości i precyzji w zakresie prezentowanej metody.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Próbkę zawierającą substancję organiczną

5.1.1. Spopielenie i przygotowanie roztworu do analizy

Zielonki (świeże lub suszone) mogą zawierać duże ilości krzemionki, która zatrzymuje mikroelementy i którą należy usunąć. W przypadku analizy takich pasz, należy zastosować następujące, zmodyfikowane postępowanie.

Doprowadzić postępowanie według (5.1.1.1) do etapu sączenia. Przemyc dwukrotnie wrzącą wodą sączek zawierający nierozpuszczalną pozostałość i umieścić w platynowym tyglu (4.3). Spopieścić w piecu muflowym w temperaturze poniżej 550 °C do momentu całkowitego zaniku cząstek węgla. Pozostawić do schłodzenia i dodać kilka kropli wody, 10 do 15 ml kwasu fluorowodorowego (3.4), a następnie odparować do sucha w temperaturze około 150 °C. Jeżeli krzemionka widoczna jest nadal w pozostałości, powtórnie rozpuścić pozostałość w kilku ml kwasu fluorowodorowego (3.4) i odparować do sucha. Dodać 5 kropli kwasu siarkowego (3.5) i ogrzewać aż do zaniku białych dymów. Po dodaniu 5 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 N (3.2) i około 30 ml wody podgrzać, przesączyć roztwór do kolby miarowej o pojemności 250 ml i uzupełnić do kreski wodą (stężenie HCl około 0,5 N). Kontynuować oznaczanie od (5.1.2).

5.1.1.1. Odważyć od 5 do 10 g próbki, z dokładnością do 0,2 mg, w kwarcowym lub platynowym tyglu (4.3) (masę odważki analitycznej należy ustalić na podstawie przybliżonej zawartości mikroelementu w paszy, uwzględniając czułość stosowanego spektrofotometru, w przypadku pasz ubogich w mikroelementy może zachodzić konieczność odważenia od 10 do 20 g próbki i sporządzenia roztworu o końcowej objętości 100 ml), wysuszyć w suszarce w temperaturze 105 °C i wstawić tygiel do zimnego pieca muflowego (4.1). Zamknąć piec (spopielenie powinno być prowadzone w zamkniętym piecu bez dostępu powietrza lub tlenu) i stopniowo podwyższać temperaturę do 450 – 475 °C w czasie około 90 minut. Utrzymywać tę temperaturę od 4 do 16 godzin (np. przez noc) w celu spopielenia substancji organicznej, następnie otworzyć piec i pozostawić do schłodzenia (temperatura według wskazań pirometru nie powinna być wyższa niż 475 °C).

Przenieść zawartość tygla przy użyciu 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) do zlewki, dodając kwas powoli i ostrożnie (może zachodzić gwałtowna reakcja uwalniania utworzonego dwutlenku węgla). Dodawać kwas chlorowodorowy (3.1) kroplami, mieszając, do zaniku pienienia się mieszaniny. Odparować do sucha, od czasu do czasu mieszając szklaną bagietką.

Następnie dodać do pozostałości 15 ml 6 N kwasu chlorowodorowego (3.2) i około 120 ml wody. Zamieszać prętem szklanym, który powinien pozostać w zlewce i przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym.

Doprowadzić ostrożnie do wrzenia i pozostawić w tym stanie aż do całkowitego rozpuszczenia rozpuszczalnych części popiołu. Przesączyć przez bezpopiołowy sączonek i zebrać przesącz w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Spłukać zlewkę i sączonek przy użyciu 5 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 N (3.2) i dwukrotnie gorącą wodą. Uzupełnić do kreski wodą (stężenie HCl około 0,5 N).

5.1.1.2. Jeżeli pozostałość na sączku jest czarna (węgiel), wstawić z powrotem do pieca i ponownie spopielać w temperaturze 450 – 475°C. Spopielenie, które wymaga kilku godzin (od 3 do 4 godzin), należy uważać za zakończone, gdy popiół będzie miał barwę białą lub prawie białą. Rozpuścić pozostałość około 2 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), odparować do sucha i dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 6 N (3.2). Podgrzać, przesączyć roztwór do kolby miarowej i uzupełnić do kreski wodą (stężenie HCl około 0,5 N).

Przy oznaczaniu mikroelementów ważne jest zachowanie ostrożności przed zanieczyszczeniem, zwłaszcza cynkiem, miedzią i żelazem. Dlatego sprzęt stosowany podczas przygotowania próbek powinien być wolny od zanieczyszczeń tymi metalami.

W celu zmniejszenia ogólnego ryzyka zanieczyszczenia należy wykonywać oznaczenie w środowisku wolnym od kurzu, dokładnie czyszcząc wyposażenie i dokładnie myjąc laboratoryjny sprzęt szklany. Zwłaszcza przy oznaczaniu cynku występuje ryzyko zanieczyszczeń, np. ze szkła laboratoryjnego, odczynników, kurzu.

5.1.2. Spektrofotometryczne oznaczanie

5.1.2.1. Przygotowanie roztworów do kalibracji

Dla każdego z oznaczanych mikroelementów przygotować, wychodząc z roboczych roztworów wzorcowych podanych w (3.7.1), (3.8.1), (3.9.1) i (3.10.1), szereg roztworów do kalibracji o stężeniu kwasu chlorowodorowego około 0,5 N i – w przypadku żelaza, manganu i cynku – chlorek lantanu o stężeniu 0,1% La (m/V). Zakres stężeń dla każdego mikroelementu powinien odpowiadać zakresowi optymalnej czułości stosowanego spektrofotometru. W tabelach 9 - 12 podano przykładowy zakres stężeń roztworów kalibracyjnych; zależnie od typu i czułości spektrofotometru może zachodzić konieczność wyboru innych stężeń.

Tabela 9. Żelazo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml roboczego roztworu wzorcowego (3.7.1)							
(1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do 100 ml wodą							

Tabela 10. Miedź

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml roboczego roztworu wzorcowego (3.8.1)							
(1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml 6 N HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8
uzupełnić do 100 ml wodą							

Tabela 11. Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml roboczego roztworu wzorcowego (3.9.1)							
(1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do 100 ml wodą							

Tabela 12. Cynk

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml roztworu wzorcowego roboczego (3.10.1)							
(1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do 100 ml wodą							

5.1.2.2. Przygotowanie roztworu do analizy

W przypadku oznaczania miedzi, roztwór przygotowany według (5.1.1) może być bezpośrednio wykorzystany. W przypadku konieczności dostosowania jego stężenia do zakresu stężeń roztworów kalibracyjnych, pobrać pipetą część roztworu do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić do kreski kwasem chlorowodorowym 0,5 N (3.3).

Przy oznaczaniu żelaza, manganu i cynku pobrać pipetą część roztworu przygotowanego według (5.1.1) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, dodać 10 ml roztworu chlorku lantanu (3.11) i uzupełnić do kreski kwasem chlorowodorowym 0,5 N (3.3), zgodnie z (8).

5.1.2.3. Próba odczynnikowa

Próbkę odczynnikową przeprowadzić zgodnie z postępowaniem toku analitycznego z pominięciem roztworu próbki.

Nie należy stosować roztworu kalibracyjnego „0” jako próby odczynnikowej.

5.1.2.4. Pomiar absorpcji atomowej

Zmierzyć absorpcję atomową roztworów kalibracyjnych i roztworu badanego w utleniającym płomieniu powietrzno-acetylenowym przy następujących długościach fal:

Fe : 248,3 nm,

Cu : 324,8 nm,

Mn : 279,5 nm,

Zn : 213,8 nm.

Każdy pomiar przeprowadzić czterokrotnie.

5.2. Pasze mineralne

Jeżeli próbka paszy nie zawiera substancji organicznych, spopielenie nie jest konieczne. Postępować jak podano w (5.1.1.1) po spopieleniu próbki. Etap odparowania z kwasem fluorowodorowym może być pominięty.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć zawartość oznaczanego mikroelementu, odczytując stężenia z krzywej kalibracyjnej, uwzględniając masę próbki analitycznej, zastosowane rozcieńczenie i wyrazić wynik w mg mikroelementu na kg próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

– 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości mikroelementu do 50 mg/kg,

– 10% najwyższego wyniku, dla zawartości mikroelementu powyżej 50 do 100 mg/kg,

– 10 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości mikroelementu powyżej 100 do 200 mg/kg,

– 5% najwyższego wyniku, dla zawartości mikroelementu powyżej 200 mg/kg.

8. OBJAŚNIENIA

Obecność znacznych ilości fosforanów może interferować przy oznaczaniu żelaza, manganu i cynku. Takie interferencje powinny być skorygowane przez dodatek chlorku lantanu (3.11). Jeżeli wagowy współczynnik $Ca + Mg / P > 2$, dodanie roztworu chlorku lantanu (3.11) do roztworu analizowanego i roztworów kalibracyjnych może być pominięte.

ROZDZIAŁ 5

BADANIE WITAMIN

5.1. OZNACZANIE WITAMINY A METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości witaminy A (retinol) w paszach i premiksach. Metoda pozwala na oznaczenie witaminy A występującej jako *trans*-retinyl i wszystkich jego izomerów *cis*. Zawartość witaminy A jest wyrażana w jednostkach międzynarodowych (IU) na kg. Jedna IU odpowiada aktywności 0,300 µg wszystkich izomerów *trans*-witaminy A w formie alkoholowej lub 0,344 µg wszystkich form *trans*-octanu witaminy A lub 0,550 µg wszystkich form *trans*-palmitynianu witaminy A.

Granica oznaczalności metody wynosi 2000 IU witaminy A/kg.

2. ZASADA METODY

Próbka jest hydrolizowana w etanolowym roztworze wodorotlenku potasu i witamina A ekstrahowana eterem naftowym. Rozpuszczalnik jest usuwany przez odparowanie, a pozostałość rozpuszczana w metanolu i, w razie konieczności, rozcieńczana do wymaganego stężenia. Zawartość witaminy A jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (RP-HPLC) przy wykorzystaniu detektora UV lub fluorescencyjnego. Parametry chromatograficzne zostały tak dobrane, że nie zachodzi rozdział pomiędzy *trans*-witaminą A w formie alkoholowej i jej *cis* izomerami.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$.

3.2. Eter naftowy, zakres wrzenia od 40°C do 60°C.

3.3. Metanol.

3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, $\beta = 50$ g/100 ml.

3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $\beta = 10$ g/100 ml (uwzględnić 7.7).

3.6. Siarczek sodu, $Na_2S \cdot x H_2O$ ($x = 7-9$).

3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5$ mol/l w glicerolu, $\beta = 120$ g/l (dla $x = 9$) (zamiast roztworu siarczku sodu można zastosować około 50 mg EDTA).

3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $\beta = 2$ g/100 ml w etanolu (3.1).

3.8. 2-propanol.

3.9. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v). Dokładny współczynnik jest określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.

3.10. Azot, wolny od tlenu.

3.11. Octan all-*trans*-witaminy A, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności, np. $2,80 \times 10^6$ IU/g.

3.11.1. Roztwór wzorcowy octanu all-*trans*-witaminy A. Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg octanu witaminy A (3.11) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (3.8) i uzupełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość należy oznaczyć według (5.6.3.1).

3.12. Palmitynian all-*trans*-witaminy A, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności, np. $1,80 \times 10^6$ IU/g.

3.12.1. Roztwór wzorcowy palmitynianu all-*trans*-witaminy A. Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 80 mg palmitynianu witaminy A (3.12) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (3.8) i uzupełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość należy oznaczyć według (5.6.3.2).

3.13. 2,6-dwu-tetra-butyl-4-metylofenol (BHT) (zamiast BHT może być użyty hydrochinon).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Odparowywacz próżniowy.

4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe.

4.2.1. Kolba płaskodenna lub stożkowa o pojemności 500 ml, ze szlifem.

4.2.2. Kolby miarowe o pojemnościach 10, 25, 100 i 500 ml, ze szklanymi korkami i wąską szyjką.

4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1000 ml, ze szklanymi korkami.

4.2.4. Kolba gruszkowa o pojemności 250 ml, ze szlifem.

4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa, długość płaszcza 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu.

4.4. Karbowany sącze bibułowy do rozdzielania faz, średnica 185 mm (np. Schleicher & Schuell 597 HY $\frac{1}{2}$).

4.5. Wyposażenie HPLC z systemem dozowania.

4.5.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 250 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 5 lub 10 μ m lub równoważne (kryterium poprawności: pojedynczy pik dla wszystkich izomerów retinolu w warunkach HPLC).

4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z możliwością zmiany długości fali.

4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami 10 mm.

4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym.

4.8. Zestaw do ekstrakcji (rys. 2) zawierający:

4.8.1. Cylinder szklany o pojemności 1 litra, ze szlifem i korkiem.

4.8.2. Nasadka szklana ze szlifem z bocznikiem i ruchomą nastawną rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Zaleca się, aby nastawna rurka miała zakończenie w kształcie litery U i przeciwny otwór skierowany ku górze, tak aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza stożkowego.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Witamina A jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie. Zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane w nieobecności światła (stosując szkło oranżowe lub szkło zabezpieczone folią aluminiową) i tlenu (płukanie strumieniem azotu). Zaleca się, aby podczas ekstrakcji powietrze nad cieczą było zastąpione azotem (należy zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając korek od czasu do czasu).

5.1. Przygotowanie próbki

Rozdrobnić próbkę, tak aby przesiewała się przez 1 mm oczko sita, uważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielalo się ciepło. Rozdrabnianie należy przeprowadzić tuż przed ważeniem i zmydleniem, gdyż w przeciwnym przypadku mogą wystąpić straty witaminy A.

5.2. Zmydlenie

W zależności od zawartości witaminy A, zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 2 do 25 g próbki do kolby okrągłodennej lub stożkowej (4.2.1). Dodać kolejno, każdorazowo mieszając, 130 ml etanolu (3.1), około 100 mg BHT (3.13), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (3.6). Założyć chłodnicę (4.3) na kolbę i umieścić kolbę na łaźni wodnej z mieszadłem magnetycznym (4.7). Ogrzać do wrzenia i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (3.4) przez chłodnicę (4.3) i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez następne 25 minut, mieszając pod powolnym przepływem azotu. Następnie spłukać chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

5.3. Ekstrakcja

Przenieść, dekantując, zmydlony roztwór, ilościowo spłukując 250 ml wody, do rozdzielacza o pojemności 1000 ml (4.2.3) lub do aparatu do ekstrakcji (4.8). Spłukać kolbę po zmydleniu kolejno 25 ml etanolu (3.1) i 100 ml eteru naftowego (3.2) i przenieść popłuczyny do rozdzielacza lub do aparatu do ekstrakcji. Proporcja wody i etanolu w łączonych roztworach powinna wynosić około 2:1. Wstrząsać energicznie przez 2 minuty i pozostawić na 2 minuty.

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza stożkowego (4.2.3)

Po rozdzieleniu warstw (jeżeli rozdzielenie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby usunąć emulsję) przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza (4.2.3). Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego (3.2) i dwukrotnie 50 ml eteru naftowego (3.2).

Przemycić dwukrotnie połączone ekstrakty w rozdzielaczu stożkowym, ostrożnie mieszając (aby zapobiec powstawaniu emulsji), 100 ml porcjami wody, a następnie powtórzyć przemycanie kolejnymi porcjami wody, aż woda pozostanie bezbarwna po dodaniu roztworu fenoloftaleiny (3.7) (zwykle wystarczy czterokrotne przemycie). W celu usunięcia suspensji wodnej przesączyć przemyty ekstrakt przez suchy karbowany sącze do rozdzielania faz (4.4) do kolby miarowej o pojemności 500 ml (4.2.2). Spłukać rozdzielacz przy użyciu 50 ml eteru naftowego (3.2), uzupełnić do kreski eterem naftowym (3.2) i dobrze zamieszać.

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu do ekstrakcji (4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielone (jeżeli rozdzielenie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby usunąć emulsję), zastąpić korek szklanego cylindra (4.8.1) nasadką szklaną ze szlifem (4.8.2) i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U, tak aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez zwiększenie ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza o pojemności 1000 ml (4.2.3). Dodać 100 ml eteru naftowego (3.2) do szklanego cylindra, zamknąć i dobrze wymieszać. Pozostawić do rozdzielenia się faz i przenieść górną

warstwę do rozdzielacza jak poprzednio. Powtórzyć tę czynność, stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego (3.2), a następnie dwukrotnie porcje 50 ml eteru naftowego (3.2), przenosząc górne warstwy do rozdzielacza.

Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego, jak opisano w (5.3.1) i postępować według podanego w (5.3.1) opisu.

5.4. Przygotowanie roztworu próbki do HPLC

Przenieść część roztworu, otrzymanego według (5.3.1) lub (5.3.2), do kolby gruszkowej (4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na odparowywaczu próżniowym (4.1) przy obniżonym ciśnieniu (pod próżnią) na łaźni wodnej w temperaturze nie wyższej niż 40°C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (3.10) i zdjąć kolbę z odparowywacza. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu i szybko rozpuścić pozostałość w znanej ilości (10 – 100 ml) metanolu (3.3) (stężenie witaminy A powinno wynosić od 5 IU/ml do 30 IU/ml).

5.5. Oznaczanie za pomocą HPLC

Witamina A jest rozdzielana na kolumnie z fazą odwróconą C₁₈ (4.5.1), a stężenie jest mierzone przy użyciu detektora UV (325 nm) lub detektora fluorescencyjnego (wzbudzenie: 325 nm, emisja: 475 nm) (4.5.2).

Zadozować część metanolewego roztworu (np. 20 µl) otrzymanego według (5.4) i eluować fazą ruchomą (3.9). Obliczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnią wysokość pików (powierzchnię) kilku dozowań roztworów kalibracyjnych (5.6.2).

Parametry HPLC

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.5.1):	250 mm x 4 mm, faza odwrócona C ₁₈ , wypełnienie 5 lub 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.9):	Mieszanina metanolu (3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v)
Przepływ:	1 – 2 ml/min
Długość fali przy detekcji (4.5.2):	Detektor fluorescencyjny - wzbudzenie: 325 nm, emisja: 475 nm, lub Detektor UV - 325 nm

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.6. Kalibracja

5.6.1. Przygotowanie roboczych roztworów wzorcowych

Pobrać pipetą 20 ml podstawowego roztworu wzorcowego octanu witaminy A (3.11.1) lub 20 ml podstawowego roztworu wzorcowego palmitynianu witaminy A (3.12.1) do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml lub kolby stożkowej (4.2.1) i hydrolizować, jak opisano w (5.2), lecz bez dodatku BHT. Następnie ekstrahować eterem naftowym (3.2), jak opisano w (5.3) i uzupełnić do 500 ml eterem naftowym (3.2). Odparować 100 ml ekstraktu na odparowywaczu próżniowym (5.4) prawie do sucha, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (3.10), ponownie rozpuścić pozostałość w 10,0 ml metanolu (3.3). Nominalne stężenie tego rozcieńczonego roztworu wzorcowego roboczego wynosi 560 IU witaminy A na ml. Należy oznaczyć dokładną zawartość według (5.6.3.3). Roztwór wzorcowy roboczy należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Przenieść pipetą 2,0 ml tego roboczego roztworu wzorcowego do kolby miarowej o pojemności 20 ml, uzupełnić do kreski metanolem (3.3) i zamieszać. Nominalne stężenie tego rozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego wynosi 56 IU witaminy A na ml.

5.6.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml rozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do kreski metanolem (3.3) i zamieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,8, 5,6, 14,0 i 28,0 IU witaminy A na ml.

Zadozować 20 µl każdego roztworu kalibracyjnego i określić średnie wysokości pików (powierzchnie). Wykorzystując średnie wysokości pików (powierzchnie), wykreślić krzywą kalibracyjną, uwzględniając wyniki kontroli UV (5.6.3.3).

5.6.3. Standaryzacja UV roztworów wzorcowych

5.6.3.1. Roztwór wzorcowy podstawowy octanu witaminy A

Pobrać 2,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego octanu witaminy A (3.11.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml (4.2.2) i uzupełnić do kreski 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie roztworu wynosi 56 IU witaminy A na ml. Pobrać 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu octanu witaminy A do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do kreski 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (3.8) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum ekstynkcji powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

1%

(E — dla octanu witaminy A = 1530 przy 326 nm w 2-propanolu)

1 cm

5.6.3.2. Roztwór wzorcowy podstawowy palmitynianu witaminy A

Pobrać 2,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego palmitynianu witaminy A (3.12.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml (4.2.2) i uzupełnić do kreski 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie roztworu wynosi 56 IU witaminy A na ml. Pobrać 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu palmitynianu witaminy A do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do kreski 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (3.8) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum ekstynkcji powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

1%

(E — dla palmitynianu witaminy A = 957 przy 326 nm w 2-propanolu)

1 cm

5.6.3.3. Robocze roztwory wzorcowe witaminy A

Pobrać 3,0 ml nierozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego witaminy A, przygotowanego według (5.6.1), do kolby miarowej o pojemności 50 ml (4.2.2) i uzupełnić do kreski 2-propanolem (3.8). Pobrać 5,0 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do kreski 2-propanolem (3.8). Nominalne stężenie roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (3.8) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum ekstynkcji powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

$$\text{IU witaminy A/ml} = E_{326} \times 18,3$$

1%

(E — dla witaminy A w formie alkoholu = 1821 przy 326 nm w 2-propanolu)

1 cm

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości pików (powierzchni) witaminy A roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w IU/ml z krzywej wzorcowej (5.6.2).

Zawartość witaminy A w mg/kg próbki obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{500 \times \beta \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m} \quad [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

β – stężenie witaminy A w roztworze próbki (5.4), w IU/ml,

V_1 – objętość roztworu próbki (5.4), w ml,

V_2 – objętość podwielokrotnej części roztworu pobranej w (5.4), w ml,

m – masa próbki analitycznej, w g.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Dla próbek o niskiej zawartości witaminy A może być użyteczne połączenie ekstraktów eteru naftowego z dwóch naważek (zważona ilość: 25 g) w jeden roztwór przeznaczony do oznaczania HPLC.

7.2. Nie zaleca się, aby próbka pobrana do analizy zawierała więcej niż 2 g tłuszczu.

7.3. Jeżeli rozdzielenie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby usunąć emulsję.

7.4. W przypadku oleju z dorsza lub innych czystych tłuszczów zaleca się przedłużenie czasu zmydlania do 45 – 60 minut.

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu zwykłej kolumny (normalne wypełnienie) możliwe jest oddzielenie izomerów retinolu.

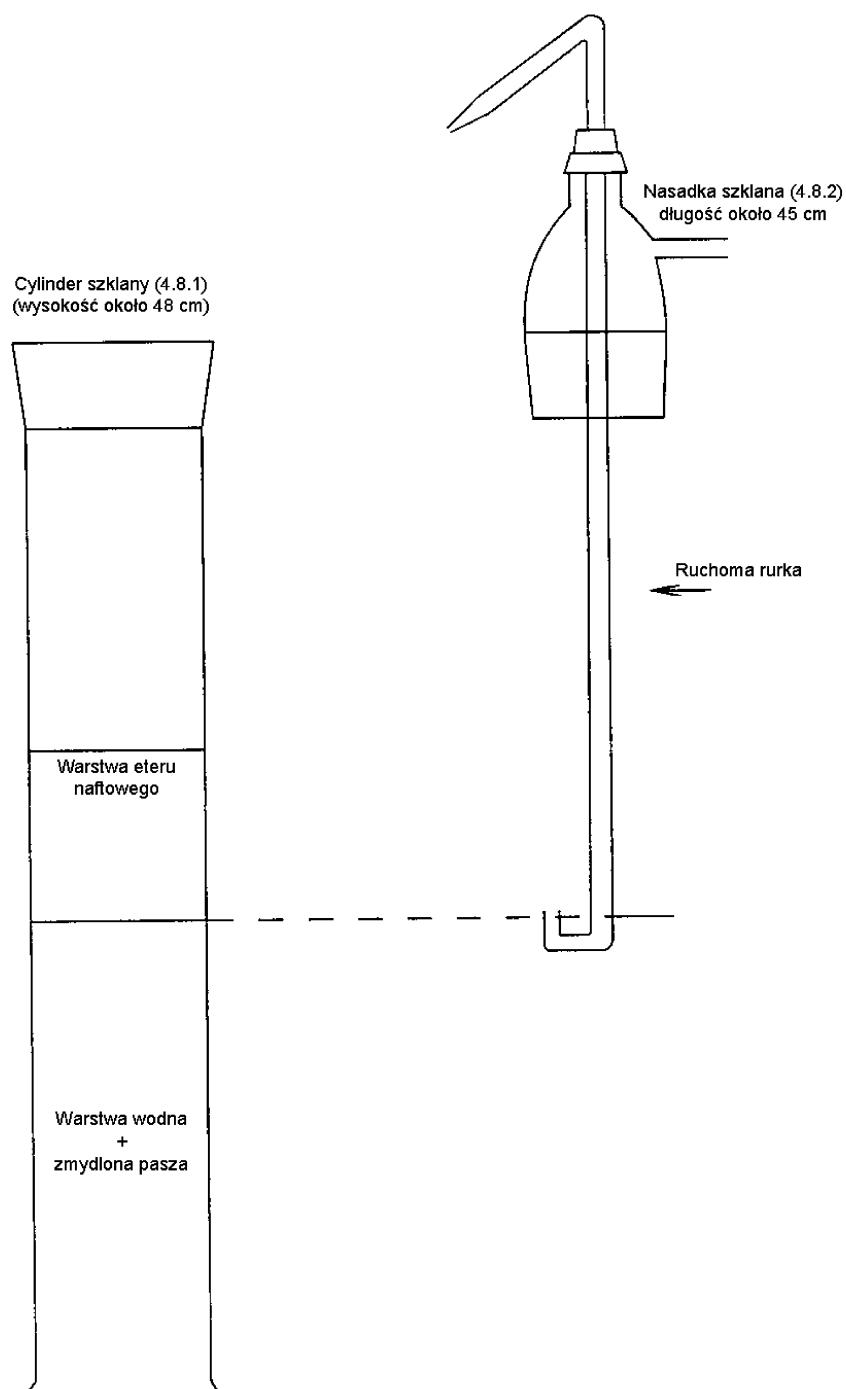
7.7. Zamiast roztworu askorbinianu sodu można użyć około 150 mg kwasu askorbinowego.

7.8. Zamiast roztworu siarczku sodu można zastosować około 50 mg EDTA.

8. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15% najwyższego wyniku, dla zawartości witaminy A.



Rysunek 2. Aparat do ekstrakcji (4.8)

Cylinder szklany (4.8.1) (wysokość około 48 cm)

Warstwa eteru naftowego

Warstwa wodna + zmydlona pasza

Nasadka szklana (4.8.2) (długość około 45 cm)

Ruchoma rurka

5.2. OZNACZANIE WITAMINY E METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości witaminy E w paszach i premiksach. Zawartość witaminy E jest wyrażana w mg octanu DL- α -tokoferolu na 1 kg. 1 mg octanu DL- α -tokoferolu odpowiada 0,91 mg DL- α -tokoferolu (witamina E).

Granica oznaczalności metody wynosi 2 mg witaminy E/kg.

2. ZASADA METODY

Próbka jest hydrolizowana w etanolowym roztworze wodorotlenku potasu i witamina E jest ekstrahowana eterem naftowym. Rozpuszczalnik jest usuwany przez odparowanie, a pozostałość rozpuszczana w metanolu i, w razie konieczności, rozcieńczana do wymaganego stężenia. Zawartość witaminy E jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej z fazą odwróconą (RP-HPLC) przy wykorzystaniu detektora fluorescencyjnego lub UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Etanol, $\sigma = 96\%$.

3.2. Eter naftowy, zakres wrzenia 40°C do 60°C.

3.3. Metanol.

3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, $\beta = 50$ g/100 ml.

3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $\beta = 10$ g/100 ml (zamiast roztworu askorbinianu sodu można użyć około 150 mg kwasu askorbinowego).

3.6. Siarczek sodu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7 - 9$).

3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5$ mol/l w glicerolu, $\beta = 120$ g/l (dla $x = 9$) (zamiast roztworu siarczku sodu można zastosować około 50 mg EDTA).

3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $\beta = 2$ g/100 ml w etanolu (3.1).

3.8. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (3.3) i wody, np. $980 + 20$ (v + v). Dokładny współczynnik jest określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.

3.9. Azot, wolny od tlenu.

3.10. Octan DL- α -tokoferolu, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności.

3.10.1. Roztwór wzorcowy octanu DL- α -tokoferolu:

Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg octanu DL- α -tokoferolu (3.10) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (3.1) i uzupełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg octanu DL- α -tokoferolu (kontrola UV zgodnie z (5.6.1.3); stabilizacja zgodnie z (7.4)).

3.11. DL- α -tokoferol, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności.

3.11.1. Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg DL- α -tokoferolu (3.10) do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (3.1) i uzupełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg DL- α -tokoferolu (kontrola UV zgodnie z (5.6.2.3); stabilizacja zgodnie z (7.4)).

3.12. 2,6-dwu-tetra-butyl-4-metylofenol (BHT) (zamiast BHT może być użyty hydrochinon).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Odparowywacz próżniowy.

4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe.

4.2.1. Kolba płaskodenna lub stożkowa o pojemności 500 ml, ze szlifem.

4.2.2. Kolby miarowe o pojemnościach 10, 25, 100 i 500 ml, ze szklanymi korkami, z wąską szyjką.

4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1000 ml, ze szklanymi korkami.

4.2.4. Kolba gruszkowa o pojemności 250 ml, ze szlifem.

4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa, długość płaszcza 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu.

4.4. Karbowany sączek bibułowy do rozdzielania faz, średnica 185 mm (np. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5. Wyposażenie HPLC z systemem dozowania.

4.5.1. Kolumna do chromatografii cieczerwowej, 250 mm x 4 mm, C_{18} , wypełnienie 5 lub 10 μm lub równoważne.

4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z możliwością zmiany długości fali.

4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami 10 mm.

4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym.

4.8. Zestaw do ekstrakcji (rys. 3) zawierający:

4.8.1. Cylinder szklany o pojemności 1 litra, ze szlifem i korkiem.

4.8.2. Nasadka szklana ze szlifem z bocznikiem i ruchomą nastawną rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Zaleca się, aby nastawna rurka miała zakończenie w kształcie litery U i przeciwny otwór skierowany ku górze, tak aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza stożkowego.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Witamina E jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie. Zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane w nieobecności światła (z zastosowaniem szkła oranżowego lub szkła zabezpieczonego folią aluminiową) i tlenu (płukanie strumieniem azotu). Zaleca się, aby podczas ekstrakcji powietrze nad cieczą było zastąpione azotem (należy zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając korek od czasu do czasu).

5.1. Przygotowanie próbki

Rozdrobnić próbkę, tak aby przesiewała się przez 1 mm oczko sita, uważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielalo się ciepło. Rozdrabnianie należy przeprowadzić tuż przed ważeniem i zmydleniem, gdyż w przeciwnym przypadku mogą wystąpić straty witaminy E.

5.2. Zmydlenie

W zależności od zawartości witaminy E zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 2 do 25 g próbki do kolby okrągłodennej lub stożkowej (4.2.1). Dodać kolejno, każdorazowo mieszając, 130 ml etanolu (3.1), około 100 mg BHT (3.12), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (3.6). Złożyć chłodnicę (4.3) na kolbę i umieścić kolbę na łaźni wodnej z mieszałem magnetycznym (4.7). Ogrzać do wrzenia i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (3.4) przez chłodnicę (4.3) i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez następne 25 minut, mieszając pod powolnym przepływem azotu. Następnie spłukać chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

5.3. Ekstrakcja

Przenieść, dekantując, zmydlony roztwór, ilościowo spłukując 250 ml wody, do rozdzielacza o pojemności 1000 ml (4.2.3) lub do aparatu do ekstrakcji (4.8). Spłukać kolbę po zmydłaniu kolejno 25 ml etanolu (3.1) i 100 ml eteru naftowego (3.2) i przenieść popłuczyny do rozdzielacza lub do aparatu do ekstrakcji. Proporcja wody i etanolu w łączonych roztworach powinna wynosić około 2:1. Wstrząsać energicznie przez 2 minuty i pozostawić na 2 minuty.

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza stożkowego (4.2.3)

Po rozdzieleniu warstw (jeżeli rozdzielenie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby usunąć emulsję) przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza (4.2.3). Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego (3.2) i dwukrotnie 50 ml eteru naftowego (3.2).

Przemyć dwukrotnie połączone ekstrakty w rozdzielaczu stożkowym, ostrożnie mieszając (aby zapobiec powstawaniu emulsji), 100 ml porcjami wody, a następnie powtórzyć przemywanie kolejnymi porcjami wody, aż woda pozostanie bezbarwna po dodaniu roztworu fenoloftaleiny (3.7) (wystarczy zwykle czterokrotne przemycie). W celu usunięcia suspensji wodnej przesączyć przemyty ekstrakt przez suchy karbowany sącdek do rozdzielania faz (4.4) do kolby miarowej o pojemności 500 ml (4.2.2). Spłukać rozdzielacz przy użyciu 50 ml eteru naftowego (3.2), uzupełnić do kreski eterem naftowym (3.2) i dobrze zamieszać.

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu do ekstrakcji (4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielone (jeżeli rozdzielenie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby usunąć emulsję), zastąpić korek szklanego cylindra (4.8.1) nasadką szklaną ze szlifem (4.8.2) i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U, tak aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez zwiększenie ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza o pojemności 1000 ml (4.2.3). Dodać 100 ml eteru naftowego (3.2) do szklanego cylindra, zamknąć i dobrze wymieszać. Pozostawić do rozdzielenia się faz i przenieść górną warstwę do rozdzielacza jak poprzednio. Powtórzyć tę czynność, stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego (3.2), następnie dwukrotnie z porcjami 50 ml eteru naftowego (3.2), przenosząc górne warstwy do rozdzielacza.

Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego, jak opisano w (5.3.1) i postępować według podanego w (5.3.1) opisu.

5.4. Przygotowanie roztworu próbki do HPLC

Przenieść część roztworu, otrzymanego według (5.3.1) lub (5.3.2), do kolby gruszkowej (4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na odparowywaczu próżniowym (4.1) przy obniżonym ciśnieniu na łaźni wodnej w temperaturze nie wyższej niż 40°C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (3.9) i zdjąć kolbę z odparowywacza. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (3.9) i szybko rozpuścić pozostałość w znanej ilości (10 – 100 ml) metanolu (3.3) (stężenie DL- α -tokoferolu powinno wynosić od 5 μ g/ml do 30 μ g/ml).

5.5. Oznaczanie za pomocą HPLC

Witamina E jest rozdzielana na kolumnie z fazą odwróconą C₁₈ (4.5.1), a stężenie jest mierzone przy użyciu detektora fluorescencyjnego (wzbudzenie: 295 nm, emisja: 330 nm) lub detektora UV (292 nm) (4.5.2).

Zadozować część metanolewego roztworu (np. 20 μ l) otrzymanego według (5.4) i eluować fazą ruchomą (3.8). Obliczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnią wysokość pików (powierzchnię) kilku dozowań roztworów kalibracyjnych (5.6.2).

Warunki HPLC

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.5.1):	250 mm x 4 mm, faza odwrócona C ₁₈ , wypełnienie 5 lub 10 μ m lub równoważne
Faza ruchoma (3.8):	Mieszanina metanolu (3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v)
Przepływ:	1 – 2 ml/min
Długość fali przy detekcji (4.5.2):	Detektor fluorescencyjny - wzbudzenie: 295 nm, emisja: 330 nm, lub detektor UV - 292 nm

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.6. Kalibracja (octan DL- α -tokoferolu lub DL- α -tokoferol)

5.6.1. Wzorzec octanu DL- α -tokoferolu

5.6.1.1. Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego

Przenieść pipetą 25 ml podstawowego roztworu wzorcowego octanu DL- α -tokoferolu (3.10.1) do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml lub kolby stożkowej (4.2.1) i hydrolizować, jak opisano w (5.2). Następnie ekstrahować eterem naftowym (3.2), jak opisano w (5.3) i uzupełnić do 500 ml eterem naftowym (3.2). Odparować 25 ml ekstraktu na odparowywaczu próżniowym zgodnie z (5.4) prawie do sucha, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (3.9), ponownie rozpuścić pozostałość w 25,0 ml metanolu (3.3). Nominalne stężenie tego rozcieńczonego roztworu wzorcowego roboczego wynosi 45,5 μ g DL- α -tokoferolu na ml, co odpowiada 50 μ g octanu DL- α -tokoferolu na 1 ml. Roztwór wzorcowy roboczy należy przygotować tuż przed użyciem.

5.6.1.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do kreski metanolem (3.3) i zamieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,5, 5,0, 10,0 i 25 µg/ml octanu DL-α-tokoferolu, tj. 2,28, 4,55, 9,10 i 22,8 µg/ml DL-α-tokoferolu.

Zadozować 20 µl każdego roztworu kilka razy i określić średnie wysokości pików (powierzchnie). Wykorzystując średnie wysokości pików (powierzchnie), wykreślić krzywą kalibracyjną.

5.6.1.3. Standaryzacja UV roztworu wzorcowego octanu DL-α-tokoferolu (3.10.1)

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

Maksimum absorpcji powinno wystąpić przy 284 nm:

1%

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

1 cm

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

5.6.2. Wzorec DL-α-tokoferolu

5.6.2.1. Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego

Przenieść pipetą 2,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego DL-α-tokoferolu (3.11.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, rozpuścić w metanolu (3.3) i uzupełnić do kreski metanolem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 40 µg DL-α-tokoferolu na 1 ml, co odpowiada 44,0 µg octanu DL-α-tokoferolu na 1 ml. Roztwór wzorcowy roboczy należy przygotować tuż przed użyciem.

5.6.2.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do kreski metanolem (3.3) i zamieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 µg/ml DL-α-tokoferolu, tj. 2,20, 4,40, 8,79 i 22,0 µg/ml octanu DL-α-tokoferolu.

Zadozować 20 µl każdego roztworu kilka razy i określić średnie wysokości pików (powierzchnie). Wykorzystując średnie wysokości pików (powierzchnie), wykreślić krzywą kalibracyjną.

5.6.2.3. Standaryzacja UV roztworu wzorcowego DL-α-tokoferolu (3.11.1)

Rozcieńczyć 2,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego DL-α-tokoferolu (3.11.1) do 25,0 ml etanolem i zdjąć spektrum UV tego roztworu wobec etanolu (3.1) w spektrofotometrze (4.6) pomiędzy 250 nm i 320 nm.

Maksimum absorpcji powinno wystąpić przy 292 nm.

1%

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

1 cm

Przy tym rozcieńczeniu wartość powinna wynosić 0,6.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości pików (powierzchni) witaminy E roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml (w odniesieniu do octanu DL-α-tokoferolu), w ml z krzywej wzorcowej (5.6.1.2) lub (5.6.2.2).

Zawartość witaminy E w mg/kg próbki obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{500 \times \beta \times V_2}{V_1 \times m} \quad [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

β – stężenie witaminy E w roztworze próbki (5.4), w µg/ml,

V₁ – objętość roztworu próbki (5.4), w ml,

V₂ – objętość podwielokrotnej części roztworu pobranej w (5.4), w ml,

m – masa próbki analitycznej, w g.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Dla próbek o niskiej zawartości witaminy E może być użyteczne połączenie ekstraktów eteru naftowego z dwóch naważek (zważona ilość: 25 g) w jeden roztwór przeznaczony do oznaczania HPLC.

7.2. Nie zaleca się, aby próbka pobrana do analizy zawierała więcej niż 2 g tłuszczu.

7.3. Jeżeli rozdzielenie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (3.1), aby usunąć emulsję.

7.4. Po pomiarze spektrofotometrycznym roztworu octanu DL-α-tokoferolu lub DL-α-tokoferolu, otrzymanego odpowiednio według (5.6.1.3) lub (5.6.2.3), dodać 10 mg BHT (3.12) do roztworu (3.10.1) lub (3.10.2) i przechowywać roztwór w lodówce (maksimum 4 tygodnie).

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu zwykłej kolumny (normalne wypełnienie) możliwe jest oddzielenie α-, β-, γ- i δ-tokoferolu.

7.7. Zamiast roztworu askorbinianu sodu można użyć około 150 mg kwasu askorbinowego.

7.8. Zamiast roztworu siarczku sodu można zastosować około 50 mg EDTA.

8. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15% najwyższego wyniku, dla zawartości witaminy E.

ROZDZIAŁ 6

BADANIE STYMULATORÓW WZROSTU

6.1. OZNACZANIE WIRGINIAMYCYN Y METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości wirginiamycyny w paszach i premiksach. Granica oznaczalności metody wynosi 2 mg/kg (2 ppm). 1 mg wirginiamycyny odpowiada 1000 jednostek angielskich (UK).

2. ZASADA METODY

Po ekstrakcji próbki metanolem w roztworze Tween 80, zdekantowaniu lub odwirowaniu i rozcieńczeniu oznaczana jest aktywność antybiotyczna ekstraktu przez pomiar dyfuzji wirginiamycyny w żelu agarowym zaszczipionym *Micrococcus luteus*. Dyfuzja jest widoczna w postaci stref zahamowania wzrostu mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Przygotowanie szczepu testowego

Przeszczepić na skos agarowy w próbówce, otrzymany według (4.1), szczep testowy *Micrococcus luteus* i inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze 4°C. Przeszczepiać na nowy skos agarowy co 2 tygodnie.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Skos agarowy ze świeżo wyhodowanym szczepem (3.1) zmyć za pomocą 2 do 3 ml roztworu chlorku sodu (4.3). Uzyskaną suspensję zaszczipić 250 ml roztworu podłoża (4.1) w butelce Roux i inkubować przez 18 do 20 godzin w temperaturze 30°C. Po okresie inkubacji hodowlę zmyć przy użyciu 25 ml roztworu chlorku sodu (4.3) i zamieszać. Rozcieńczyć suspensję w stosunku 1 : 10 roztworem chlorku sodu (4.3).

Transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 650 nm w 1 cm kuwetach w stosunku do roztworu chlorku sodu (4.3), powinna wynosić 75%. Suspensja może być przechowywana przez 1 tydzień w temperaturze 4°C.

Mogą być zastosowane inne metody, w przypadku gdy pozwalają uzyskać podobną zawiesinę bakteryjną.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do hodowli i oznaczania

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Głukoza	1,0 g
Agar	10,0 do 20,0 g
Woda	1000 ml
pH	6,5

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Bufor fosforanowy, pH 6

Wodorofosforan(V) dwupotasu K_2HPO_4 – 2,0 g

Dwuwodorofosforan(V) potasu KH_2PO_4 – 8,0 g

Woda do 1000 ml.

4.3. Chlorek sodu, roztwór 0,8% (m/V): rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do 1000 ml. Sterylizować.

4.4. Metanol.

4.5. Mieszanina buforu fosforanowego (4.2) i metanolu (4.4): 80/20 (V/V).

4.6. Tween 80, metanolem roztwór 0,5% (m/V): rozpuścić 5 g Tween 80 w metanolu (4.4) i rozcieńczyć metanolem do 1000 ml.

4.7. Substancja wzorcowa: wirginiamycyna o znanej aktywności.

5. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić dokładnie odważoną ilość substancji wzorcowej (4.7) w metanolu (4.4) i rozcieńczyć metanolem (4.4) do uzyskania roztworu podstawowego zawierającego 1000 µg wirginiamycyny w 1 ml.

Przechowywany w szczelnie zamkniętej kolbie w temperaturze 4°C, roztwór zachowuje stabilność do 5 dni.

Z tego roztworu przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń przy użyciu mieszaniny (4.5), następujące roztwory:

S ₈	1	µg/ml
S ₄	0,5	µg/ml
S ₂	0,25	µg/ml
S ₁	0,125	µg/ml.

6. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU I ROZTWORÓW DO OZNACZANIA

6.1. Ekstrakcja

6.1.1. Produkty o zawartości wirginiamycyny do 100 mg/kg

Odważyć 50 g próbki, dodać 200 ml roztworu (4.6) i wstrząsać przez 30 minut. Pozostawić w celu sklarowania lub odwirować, pobrać 20 ml klarownego ekstraktu i odparować do około 5 ml w odparowywaczu obrotowym w temperaturze nieprzekraczającej 40°C. Rozcieńczyć pozostałość w mieszaninie (4.5) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości wirginiamycyny 1 µg/ml (= U₈).

6.1.2. Produkty o zawartości wirginiamycyny wyższej niż 100 mg/kg

Odważyć część próbki o masie nie większej niż 10 g i zawierającej od 1 do 50 mg wirginiamycyny, dodać 100 ml roztworu (4.6) i wstrząsać przez 30 minut. Pozostawić w celu sklarowania lub odwirować, następnie rozcieńczyć klarowny ekstrakt mieszaniną (4.5) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości wirginiamycyny 1 µg/ml (= U₈).

6.2. Roztwory do badań

Z roztworu U₈ przygotować roztwory U₄ (oczekiwana zawartość 0,5 µg/ml), U₂ (oczekiwana zawartość 0,25 µg/ml), U₁ (oczekiwana zawartość 0,125 µg/ml) metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu mieszaniny (4.5).

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Zaszczepianie podłoża do badań

Zaszczepić podłoże do badań (4.1) zawiesiną bakteryjną (3.2) w temperaturze około 50°C. Poprzez przeprowadzenie wstępnych prób na płytkach przy użyciu podłoża (4.1) określić ilość bakteryjnej zawiesiny, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń wirginiamycyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach roztworów wzorcowych (S₈, S₄, S₂, S₁) i czterech stężeniach roztworów badanych (U₈, U₄, U₂, U₁). Po cztery stężenia wzorca i roztworów badanych powinny być umieszczone na każdej płytce. Aby to uzyskać, należy wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w agarze wyciąć 8 studzienek o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami studzienek nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na płytkach składających się ze szklanej podstawy i aluminiowego lub plastikowego pierścienia umieszczonego na płytce, o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość podłoża (4.1), zaszczepionego zgodnie z postępowaniem podanym w (7.1), aby otrzymać warstwę o grubości 2 mm (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm).

Pozostawić w pozycji poziomej, wyciąć studzienki i umieścić w nich dokładnie odmierzone objętości roztworów badanych i wzorcowych (od 0,10 do 0,15 ml na studzienkę, w zależności od średnicy).

Nanieść każde stężenie co najmniej czterokrotnie; w ten sposób każde oznaczenie odpowiada pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Inkubować płytki przez 16 do 18 godzin w temperaturze 30°C ± 2°C.

8. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść średnią wartość pomiarów dla każdego stężenia na papier o skali półlogarytmicznej, pokazując zależność logarytmu stężenia od średnicy stref zahamowania. Wykreślić przez uzyskane „uśrednione punkty” linie dla roztworów wzorcowych i badanych, według następującego przykładu.

Określić „uśredniony punkt” dla najniższego stężenia wzorca (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Określić „uśredniony punkt” dla najwyższego stężenia wzorca (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć „uśrednione punkty” dla najniższego stężenia badanego ekstraktu (UL) i stężenia najwyższego (UH), zastępując S₁, S₂, S₄, S₈ przez U₁, U₂, U₄, U₈ w powyższych wzorach.

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier, połączyć punkty i wykreślić prostą dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i wykreślić prostą dla roztworu badanego.

W przypadku braku interferencji proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10% od ich średniej wartości.

Jeżeli proste nie spełniają warunku równoległości, U₁ i S₁ lub U₈ i S₈ mogą być odrzucone, a SL, SH, UL i UH obliczone według alternatywnych wzorów, dając alternatywne „uśrednione linie”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Powinno być zastosowane to samo kryterium równoległości. W końcowym sprawozdaniu z badań należy odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 punktów.

Gdy proste spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby punktów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 punktów

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 punktów

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

lub

$$(d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

$$U_8 = S_8 \times A$$

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, należy powtórzyć oznaczanie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktów lub, jeżeli nie jest to możliwe, roztworów wzorcowych. Gdy względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Gdy proste nie spełniają warunku równoległości, należy powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, uzyskany wynik oznaczenia nie będzie zadowalający. Wyrazić wynik w mg wirginiamycyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 2 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości wirginiamycyny do 10 mg/kg,
- 20% najwyższego wyniku, dla zawartości wirginiamycyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości wirginiamycyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10% najwyższego wyniku, dla zawartości wirginiamycyny powyżej 50 mg/kg.

6.2. OZNACZANIE ZN-BACYTRACYN METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości Zn-bacytracyny w paszach i premiksach. Granica oznaczalności metody wynosi 5 mg/kg (5 ppm). 1 mg Zn-bacytracyny paszowej odpowiada 42 międzynarodowym jednostkom (i.u.).

2. ZASADA METODY

Próbka jest poddawana ekstrakcji mieszaniną metanolu, wody i kwasu chlorowodorowego o pH 2 z dodatkiem roztworu siarczku sodowego. Siarczek sodowy służy do strącania rozpuszczalnych soli miedzi, które mogą interferować przy oznaczaniu. Ekstrakt jest doprowadzany do pH 6,5, zateżany (jeżeli to konieczne) lub rozcieńczany. Aktywność antybiotyczna ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji Zn-bacytracyny w żelu agarowym zaszczipionym *Micrococcus luteus* (flavus). Dyfuzja jest widoczna w postaci stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Micrococcus luteus* ATCC 10240

3.1. Przygotowanie szczepu testowego

Przeszczepić na skos agarowy w próbówce, otrzymany według (4.1), mikroorganizm *Micrococcus luteus* (flavus) i inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze 4°C. Przeszczepiać na nowy skos agarowy co 2 tygodnie.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Skos agarowy ze świeżo wyhodowanym szczepem (3.1) zmyć za pomocą 2 do 3 ml roztworu chlorku sodu (4.3). Uzyskaną suspensję zaszczipić 250 ml roztworu podłoża (4.1) w butelce Roux i inkubować przez 18 do 20 godzin w temperaturze 30°C. Po okresie inkubacji hodowlę zmyć 25 ml roztworu chlorku sodu (4.3) i zamieszać. Rozcieńczyć suspensję w stosunku 1 : 10 przy użyciu roztworu chlorku sodu (4.3).

Transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 650 nm w 1 cm kuwetach w stosunku do roztworu chlorku sodu (4.3), powinna wynosić 75%. Suspensja może być przechowywana przez 1 tydzień w temperaturze 4°C.

Mogą być zastosowane inne metody, w przypadku gdy pozwalają uzyskać podobną zawiesinę bakteryjną.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do hodowli

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mienny	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0 do 20,0 g
Woda	1000 ml
pH	6,5 do 6,6 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Podłoże do oznaczania

Trypton	10,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0 do 20,0 g
Tween 80	1 ml
Woda	1000 ml
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.3. Chlorek sodu, roztwór 0,8% (m/V): rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do 1000 ml. Sterylizować.

4.4. Mieszanina: metanolu, wody i kwasu chlorowodorowego (4.6): 80/17,5/2,5 (V/V/V).

4.5. Bufor fosforanowy, pH 6,5

Wodorofosforan(V) dwupotasu K_2HPO_4	22,15 g
Dwuwodorofosforan(V) potasu KH_2PO_4	27,85 g
Woda	do 1 000 ml

4.6. Kwas chlorowodorowy (d = od 1,18 do 1,19).

4.7. Kwas chlorowodorowy, roztwór 0,1 M.

4.8. Wodorotlenek sodu, roztwór 1 M.

4.9. Siarczek sodu, roztwór w przybliżeniu 0,5 M.

4.10. Purpura bromokrezolowa, roztwór 0,04% (m/V): rozpuścić 0,1 g purpury bromokrezolowej w 18,5 ml wodorotlenku sodu o stężeniu 0,01 M. Uzupełnić do 250 ml wodą i zamieszać.

4.11. Substancja wzorcowa: Zn-bacytracyna o znanej aktywności (w i.u.).

5. ROZTWORY WZORCOWE

Odważyć taką ilość wzorca Zn-bacytracyny (4.11), która odpowiada aktywności równej 1050 i.u. Dodać 5 ml 0,1 M kwasu chlorowodorowego (4.7) i pozostawić na 15 minut. Dodać 30 ml wody, doprowadzić do pH 4,5 przy użyciu buforu fosforanowego o pH 6,5 (4.5) (około 4 ml), uzupełnić do objętości 50 ml wodą i dobrze zamieszać (1 ml = 21 i.u.).

Z tego roztworu przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń przy użyciu buforu fosforanowego o pH 6,5 (4.5), następujące roztwory:

S_8	0,42	i.u./ ml
S_4	0,21	i.u./ ml
S_2	0,105	i.u./ ml
S_1	0,0525	i.u./ ml.

6. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU I ROZTWORÓW DO OZNACZANIA

6.1. Ekstrakcja

6.1.1. Premiksy i pasze mineralne

Odważyć od 2,0 do 5,0 g próbki, dodać 29,0 ml mieszaniny (4.4), 1 ml roztworu siarczku sodu (4.9) i krótko wstrząsnąć. Sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Wstrząsać przez 10 minut, dodać 30 ml buforu fosforanowego (4.5), ponownie wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Pobrać odpowiednią ilość klarownego ekstraktu i doprowadzić pH do 6,5 roztworem wodorotlenku sodu 1 M (4.8), sprawdzając przy użyciu pehametru lub wobec roztworu purpury bromokrezolowej (4.10) jako wskaźnika. Rozcieńczyć buforem fosforanowym (4.5), aby otrzymać oczekiwaną zawartość Zn-bacytracyny 0,42 i.u./ml ($= U_8$).

6.1.2. Koncentraty białkowe

Odważyć próbkę o masie 10,0 g, dodać 49,0 ml mieszaniny (4.4), 1 ml roztworu siarczku sodu (4.9) i krótko wstrząsać. Sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Wstrząsać przez 10 minut. Dodać 50 ml buforu fosforanowego (4.5), wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Pobrać odpowiednią ilość klarownego ekstraktu i doprowadzić pH do 6,5 roztworem wodorotlenku sodowego 1 M (4.8), sprawdzając przy użyciu pehametru lub wobec roztworu purpury bromokrezolowej (4.10) jako wskaźnika. Odparować do połowy objętości na odparowywaczu próżniowym w temperaturze nie wyższej niż 35°C. Rozcieńczyć buforem fosforanowym (4.5) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości Zn-bacytracyny 0,42 i.u./ml ($= U_8$).

6.1.3. Pasze pozostałe

Odważyć 10 g próbki (20,0 g dla zawartości Zn-bacytracyny 5 mg/kg). Dodać 24,0 ml mieszaniny (4.4), 1,0 ml roztworu siarczku sodu (4.9) i homogenizować przez 10 minut. Dodać 25 ml buforu fosforanowego (4.5), wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Przenieść 20 ml klarownego ekstraktu i doprowadzić do pH 6,5 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu 1 M (4.8) w obecności purpury bromokrezolowej (4.9) jako wskaźnika. Odparować do około 4 ml na odparowywaczu próżniowym w temperaturze nieprzekraczającej 35°C. Rozcieńczyć pozostałość buforem fosforanowym (4.5) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości Zn-bacytracyny 0,42 i.u./ml ($= U_8$).

6.2. Roztwory do badań

Z roztworu U_8 przygotować roztwory U_4 (oczekiwana zawartość 0,21 i.u./ml), U_2 (oczekiwana zawartość 0,105 i.u./ml), U_1 (oczekiwana zawartość 0,0525 i.u./ml) metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu buforu fosforanowego (4.5).

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Zaszczepianie podłoża do badań

Zaszczepić podłoże do badań (4.2) zawiesiną bakteryjną (3.2) w temperaturze około 50°C. Poprzez przeprowadzenie wstępnych prób na płytkach przy użyciu pożywki do badań (4.2), określić ilość zawiesiny bakteryjnej, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń Zn-bacytracyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach roztworów wzorcowych (S_8, S_4, S_2, S_1) i czterech stężeniach roztworów badanych (U_8, U_4, U_2, U_1). Po cztery stężenia wzorca i roztworów badanych powinny być umieszczone na każdej płytce. Aby to uzyskać, należy wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w agarze wyciąć 8 studzienek o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami studzienek nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na płytkach składających się ze szklanej podstawy i aluminiowego lub plastikowego pierścienia umieszczonego na płytce, o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość podłoża (4.2), zaszczerpnego według (7.1), aby otrzymać warstwę o grubości 2 mm (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Pozostawić w pozycji poziomej, wyciąć studzienki i umieścić w nich dokładnie odmierzane objętości roztworów badanych i wzorcowych (od 0,10 do 0,15 ml na studzienkę, w zależności od średnicy).

Nanieść każde stężenie co najmniej czterokrotnie, w ten sposób każde oznaczenie odpowiada pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Inkubować płytki przez 16 do 18 godzin w temperaturze $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

8. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść średnią wartość pomiarów dla każdego stężenia na papier o skali półlogarytmicznej, pokazując zależność logarytmu stężenia od średnicy stref zahamowania. Wykreślić przez uzyskane „uśrednione punkty” linie dla roztworów wzorcowych i badanych, według następującego przykładu.

Określić „uśredniony punkt” dla najniższego stężenia wzorca (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Określić „uśredniony punkt” dla najwyższego stężenia wzorca (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć „uśrednione punkty” dla najniższego stężenia badanego ekstraktu (UL) i stężenia najwyższego (UH), zastępując S_1, S_2, S_4, S_8 przez U_1, U_2, U_4, U_8 w powyższych wzorach.

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier, połączyć punkty i wykreślić prostą dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i wykreślić prostą dla roztworu badanego.

W przypadku braku interferencji proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10% od ich średniej wartości.

Jeżeli proste nie spełniają warunku równoległości, U_1 i S_1 lub U_8 i S_8 mogą być odrzucone, a SL, SH, UL i UH obliczone według alternatywnych wzorów, dając alternatywne „uśrednione linie”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Powinno być zastosowane to samo kryterium równoległości. W końcowym sprawozdaniu z badań należy odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 punktów.

Gdy proste spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby punktów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 punktów

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 punktów

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

lub

$$(d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

$$U_8 = S_8 \times A$$

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, należy powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktów lub, jeżeli nie jest to możliwe, roztworów wzorcowych. Gdy względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Gdy proste nie spełniają warunku równoległości, należy powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, uzyskany wynik oznaczenia nie będzie zadowalający. Wyrazić wynik w mg Zn-bacytracyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 2 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości Zn-bacytracyny do 10 mg/kg,
- 20% najwyższego wyniku, dla zawartości Zn-bacytracyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości Zn-bacytracyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10% najwyższego wyniku, dla zawartości Zn-bacytracyny powyżej 50 mg/kg.

6.3. OZNACZANIE FLAWOMYCYN Y METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości flawomycyny w paszach, koncentratkach i premiksach. Granica oznaczalności metody wynosi 1 mg/kg (1 ppm).

2. ZASADA METODY

Próbka jest ekstrahowana rozcieńczonym metanolem na gorąco pod chłodnicą zwrotną. Po odwirowaniu ekstrakt zostaje oczyszczony (gdy jest to konieczne) na żywicy jonowymiennej i rozcieńczony. Aktywność antybiotyczna ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji flawomycyny w żelu agarowym zaszczepionym *Staphylococcus aureus*. Dyfuzja jest widoczna w postaci stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P

3.1. Przygotowanie szczepu testowego

Przeszczepić *Staphylococcus aureus* na skosy agarowe sporządzone z podłoża do hodowli (4.1). Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 37 °C. Przechowywać w lodówce w temperaturze 4°C i przeszczepiać co miesiąc na nowy skos agarowy.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Odstawić dwie próbki zawierające szczep testowy (3.1) i powtórnie przeszczepić w ciągu tygodnia. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 37°C i przechowywać w lodówce w temperaturze 4°C. Na 24 godziny przed oznaczaniem przenieść tę hodowlę do dwóch, a najwyżej czterech próbek zawierających skosy agarowe na podłożu (4.1). Inkubować przez 16 do 18 godzin w temperaturze 37°C. Przygotować suspensję hodowli w roztworze chlorku sodu (4.3). Transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 578 nm w 1 cm kuwetach w stosunku do roztworu chlorku sodu (4.3), powinna wynosić około 40%.

Mogą być zastosowane inne metody, w przypadku gdy pozwalają uzyskać podobną zawiesinę bakteryjną.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do hodowli

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	15,0 g
Woda	1000 ml
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki, np. oxoid antibiotic medium 1 (CM 327) z dodatkiem agaru oxoid Nr 3 (L 13).

4.2. Podłoże do oznaczania

4.2.1. Warstwa dolna

Pepton	6,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Agar	10,0 g
Woda	1000 ml
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki, np. oxoid antibiotic medium 2 (CM 335) z dodatkiem agaru Nr 3 (L 13).

4.2.2. Warstwa górna do posiewu

Sporządzić według (4.1) z dodatkiem 2,0 g emulsji silikonowej zapobiegającej pienieniu się.

4.3. Chlorek sodu, roztwór 0,4% (m/V): rozpuścić 4 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do 1000 ml, sterylizować.

4.4. Metanol, czysty.

4.5. Metanol, roztwór 50% (V/V): rozcieńczyć 500 ml metanolu (4.4) przy użyciu 500 ml wody.

4.6. Metanol, roztwór 80% (V/V): rozcieńczyć 800 ml metanolu (4.4) przy użyciu 200 ml wody.

4.7. Tris(hydroksymetylo)aminometan.

4.8. Chlorek potasowy, roztwór metanolowy 1,5% (m/V): rozpuścić 1,5 g chlorku potasu w 20 ml wody, uzupełnić do objętości 100 ml metanolem (4.4).

4.9. Żywica jonowymienna kationitowa: Dowex 50 W x 8, 20 do 50 mesh, forma sodowa (kat. Serva Nr 41600) lub podobna.

4.10. Żywica jonowymienna anionitowa: Dowex 1 x 2, 50 do 100 mesh, forma chlorkowa (kat. Serva Nr 41010) lub podobna. Przed użyciem utrzymywać od 14 do 16 godzin w 80% metanolu (4.6).

4.11. Wata szklana.

4.12. Papierek wskaźnikowy (pH 6,6 do 8,1).

4.13. Kwas askorbinowy.

4.14. Substancja wzorcowa: flawomycyna o znanej aktywności.

5. APARATURA I SPRZĘT

5.1. Kolumna chromatograficzna, średnica wewnętrzna: 9 mm, długość 150 do 200 mm, zakończona kranem na węższym, dolnym końcu i szlifem szklanym (w celu podłączenia wkraplacza (5.2)) w części górnej.

5.2. Wkraplacz o pojemności 250 ml, z kranem i szlifem szklanym.

5.3. Kolba stożkowa o pojemności 250 ml ze szlifem szklanym.

5.4. Chłodnica ze szlifem szklanym.

6. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić dokładnie odważoną ilość substancji wzorcowej (4.14) w 50% metanolu (4.5) i rozcieńczyć, uzyskując roztwór wzorcowy zawierający 100 µg flawomycyny w 1 ml. Roztwór wzorcowy przechowywać w zamkniętych kolbach w temperaturze 4°C. Roztwór jest stabilny przez 2 miesiące.

Z tego roztworu przygotować metodą kolejnych rozcieńczeń przy użyciu 50% metanolu (4.5) następujące roztwory:

S_8 0,2 µg/ml

S_4 0,1 µg/ml

S_2 0,05 µg/ml

S_1 0,025 µg/ml.

7. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU

7.1. Ekstrakcja

7.1.1. Koncentraty, premiksy i pasze mineralne

Odważyć od 2,0 do 5,0 g próbki i dodać około 150 mg kwasu askorbinowego (4.13). Zhomogenizować przy użyciu 150 ml 50% metanolu (4.5) w kolbie stożkowej (5.3) i doprowadzić pH do 8,1 – 8,2, dodając około 400 mg tris(hydroksymetylo)aminometanu (4.7).

Sprawdzić pH papierkiem wskaźnikowym (4.12). Pozostawić na 15 minut, ponownie doprowadzić do pH 8,1 – 8,2 przy użyciu tris(hydroksymetylo)aminometanu (4.7) i gotować przez 10 minut pod chłodnicą zwrotną (5.4), stale mieszając. Pozostawić do schłodzenia, odwirować mieszaninę i zdekantować ekstrakt.

7.1.2. Pozostałe pasze

Odważyć od 5,0 do 30,0 g próbki zawierającej co najmniej 30 µg flawomycyny. Zhomogenizować przy użyciu 150 ml 50% metanolu (4.5) w kolbie stożkowej (5.3) i doprowadzić pH do 8,1 – 8,2, dodając około 400 mg tris(hydroksymetylo)aminometanu (4.7). Sprawdzić pH papierkiem wskaźnikowym (4.12). Pozostawić na 15 minut, ponownie doprowadzić do pH 8,1 – 8,2 przy użyciu tris(hydroksymetylo)aminometanu (4.7) i gotować przez 10 minut pod chłodnicą zwrotną (5.4), stale wstrząsając. Pozostawić do schłodzenia, odwirować mieszaninę i zdekantować ekstrakt.

7.2. Oczyszczanie (ten etap może być pominięty w przypadku analizy koncentratów, premiksów i pasz mineralnych)

Zmieszać 110 ml ekstraktu z 1 l żywicy jonowymiennej kationitowej (4.9), gotować przez 1 minutę pod chłodnicą zwrotną (5.4), stale mieszając. Oddzielić żywicę przez odwirowanie lub odsączenie. Zmieszać 100 ml ekstraktu z 150 ml metanolu (4.4) i przechowywać roztwór od 12 do 15 godzin w temperaturze 4°C. Odsączyć osad na zimno.

Umieścić zwitek waty szklanej (4.11) na dole kolumny chromatograficznej (5.1), umieścić w kolumnie 5 ml żywicy jonowymiennej (4.10) i przemyć kolumnę, stosując 100 ml 80% metanolu (4.6). Przy użyciu wkraplacza (5.2) nanieść na kolumnę filtrat o objętości co najmniej 100 ml, zawierający przypuszczalnie 16 µg flawomycyny (200 ml dla 30 g próbki paszy o zawartości 1 ppm). W koniecznym przypadku, przed wprowadzeniem na kolumnę, rozcieńczyć filtrat 80% metanolem (4.6) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości flawomycyny 16 µg/100 ml. Ustawić przepływ na około 2 ml na minutę.

Odrzucić eluent. Następnie przemywać kolumnę przy użyciu 50 ml 80% metanolu (4.6) i ponownie odrzucić eluent. Eluować flawomycynę metanolem z roztworem chlorku potasu (4.8), utrzymując przepływ około 2 ml na minutę. Zebrać 50 ml eluatu w kolbie miarowej, dodać 30 ml wody i zamieszać. Zawartość flawomycyny w tym roztworze powinna wynosić 0,2 µg/ml (= U_8).

7.3. Roztwory do oznaczania

W koniecznym przypadku (tj. gdy etap oczyszczania jest pomijany) rozcieńczyć ekstrakt otrzymany według opisu w (7.1.1) przy użyciu 50% metanolu (4.5) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości flawomycyny 0,2 µg/ml (= U_8).

Z roztworu U_8 przygotować roztwory U_4 (oczekiwana zawartość: 0,1 µg/ml), U_2 (oczekiwana zawartość: 0,05 µg/ml) i U_1 (oczekiwana zawartość: 0,025 µg/ml) metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu 50% metanolu (4.5).

8. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

8.1. Zaszczepienie pożywki do badań

Zaszczepić pożywkę do badań (4.2.2) zawiesiną bakteryjną (3.2) w temperaturze około 50°C. Poprzez przeprowadzenie wstępnych prób na płytkach przy użyciu pożywki do badań (4.2.2) określić ilość bakteryjnej zawiesiny, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń flawomycyny (około 30 ml/l).

8.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach roztworów wzorcowych (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeniach roztworów badanych (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Po cztery stężenia wzorca i roztworów badanych powinny być umieszczone na każdej płytce. Aby to uzyskać, należy wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w agarze wyciąć 8 studzienek o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami studzienek nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na płytkach składających się ze szklanej podstawy i aluminiowego lub plastikowego pierścienia umieszczonego na płytce, o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość pożywki (4.2.1), aby otrzymać warstwę o grubości 1,5 mm (45 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Pozostawić w pozycji poziomej i nanieść górną warstwę z pożywki (4.2.2), zaszczepioną według (8.1), o grubości 1 mm (30 ml na płytkę o średnicy 200 ml). Pozostawić w poziomej pozycji, wyciąć studzienki i umieścić w nich dokładnie odmierzane objętości roztworów badanych i wzorcowych (od 0,10 do 0,15 ml na studzienkę, w zależności od średnicy).

Nanieść każde stężenie co najmniej czterokrotnie, w ten sposób każde oznaczenie odpowiada pomiarowi 32 stref zahamowania.

8.3. Inkubacja

Inkubować płytki przez 16 do 18 godzin w temperaturze od 28 do 30°C.

9. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść średnią wartość pomiarów dla każdego stężenia na papier o skali półlogarytmicznej, pokazując zależność logarytmu stężenia od średnicy zahamowania. Wykreślić przez uzyskane „uśrednione punkty” linie dla roztworów wzorcowych i badanych, według następującego przykładu.

Określić „uśredniony punkt” dla najniższego stężenia wzorca (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Określić „uśredniony punkt” dla najwyższego stężenia wzorca (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć „uśrednione punkty” dla najniższego stężenia badanego ekstraktu (UL) i stężenia najwyższego (UH), zastępując S_1, S_2, S_4, S_8 przez U_1, U_2, U_4, U_8 w powyższych wzorach.

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier, połączyć punkty i wykreślić prostą dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i wykreślić prostą dla roztworu badanego.

W przypadku braku interferencji proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10% od ich średniej wartości.

Jeżeli proste nie spełniają warunku równoległości, U_1 i S_1 lub U_8 i S_8 mogą być odrzucone, a SL, SH, UL i UH obliczone według alternatywnych wzorów, dając alternatywne „uśrednione linie”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Alternatywne „uśrednione linie”, tak jak poprzednio, powinny być sprawdzone pod względem równoległości. W końcowym sprawozdaniu z badań należy odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 punktów.

Gdy proste spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby punktów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 punktów

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 punktów

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

lub

$$(d') \quad \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna.

$$U_8 = S_8 \times A$$

Gdy proste nie spełniają warunku równoległości, należy powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według wzoru (c). Otrzymany w ten sposób wynik należy uważać za przybliżony i odnotować to w końcowym sprawozdaniu.

10. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 0,5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości flawomycyny od 1 do 2 mg/kg,
- 25% najwyższego wyniku, dla zawartości flawomycyny powyżej 2 do 10 mg/kg,
- 20% najwyższego wyniku, dla zawartości flawomycyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości flawomycyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10% najwyższego wyniku dla zawartości flawomycyny powyżej 50 mg/kg.

6.4. OZNACZANIE SPIRAMYCYNY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości spiramycyny w paszach i premiksach. Granica oznaczalności metody wynosi 1 mg/kg (1 ppm). 1 mg spiramycyny odpowiada 3200 międzynarodowym jednostkom (IU).

2. ZASADA METODY

Próbka jest ekstrahowana mieszaniną metanolu i buforu fosforanowo-węglanowego o pH 8. Ekstrakt jest dekantowany lub odwirowywany, a następnie rozcieńczany. Aktywność antybiotyczna ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji spiramycyny w żelu agarowym zaszczipionym *Micrococcus luteus*. Dyfuzja jest widoczna w postaci stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Przygotowanie szczepu testowego

Na skos agarowy otrzymany z podłoża do hodowli (4.1) przeszczepić *Micrococcus luteus* i inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30°C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze 4°C. Przeszczepiać co 2 tygodnie na świeży skos.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Zmyć hodowlę z ostatnio przygotowanego skosu agarowego (3.1) przy użyciu 2 do 3 ml roztworu chlorku sodu (4.3). Uzyskaną suspensję zaszczipić 250 ml roztworu podłoża (4.1) w butelce Roux i inkubować przez 18 do 20 godzin w temperaturze 30°C. Po okresie inkubacji hodowlę zmyć 25 ml roztworu chlorku sodu (4.3) i zamieszać. Rozcieńczyć suspensję w stosunku 1 : 10 przy użyciu roztworu chlorku sodu (4.3).

Transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 650 nm w 1 cm kuwetach w stosunku do roztworu chlorku sodu (4.3), powinna wynosić 75%. Suspensja może być przechowywana przez 1 tydzień w temperaturze 4°C.

Mogą być zastosowane inne metody, w przypadku gdy pozwalają uzyskać podobną zawiesinę bakteryjną.

4. PODŁOŻA, ODCZYNNIKI I ROZTWORY

4.1. Podłoże do hodowli

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0 do 20,0 g
Woda	1000 ml
pH	6,5 do 6,6 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Podłoże do oznaczania

Trypton	5,0 g
Ekstrakt drożdżowy	4,0 g
Ekstrakt mięsny	3,0 g
Agar	10,0 do 20,0 g
Woda	1000 ml
pH	8,0 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.3. Chlorek sodu, roztwór 0,8% (m/V). Rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do 1000 ml. Sterylizować.

4.4. Bufor fosforanowo-węglanowy, pH 8,0:

– Wodorofosforan(V) dwupotasu K_2HPO_4	16,7 g
– Dwuwodorofosforan(V) potasu KH_2PO_4	0,5 g
– Wodorowęglan sodu $NaHCO_3$	20,0 g
– Woda	do 1000 ml.

4.5. Mieszanina: metanolu i buforu fosforanowo-węglanowego (4.4) 50/50 (V/V).

4.6. Substancja wzorcowa: spiramycyna o znanej aktywności (w IU).

5. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić dokładnie zważoną ilość substancji wzorcowej (4.6) w mieszaninie (4.5) i rozcieńczyć tą samą mieszaniną do uzyskania roztworu podstawowego zawierającego 1000 IU spiramycyny w 1 ml. Roztwór przechowywany w zamkniętej kolbie w temperaturze 4°C zachowuje stabilność przez 5 dni.

Z tego roztworu przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń przy użyciu mieszaniny (4.5), następujące roztwory:

S_8	1 IU/ ml
S_4	0,5 IU/ ml
S_2	0,25 IU/ ml
S_1	0,125 IU/ ml

6. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU I ROZTWORÓW DO OZNACZANIA

6.1. Ekstrakcja

Odważyć 20,0 g próbki w przypadku mieszanek paszowych i od 1,0 do 20,0 g w przypadku premiksów. Dodać 100 ml mieszaniny (4.5) i wstrząsać przez 30 minut. Odwirować lub zdekantować i rozcieńczyć roztwór supernatantu przy użyciu mieszaniny (4.5) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości spiramycyny 1 IU/ ml (= U_8).

W przypadku spodziewanych zawartości spiramycyny niższych niż 2,5 mg/kg paszy przeprowadzić ekstrakcję w następujący sposób. Odważyć 20,0 g próbki. Dodać 100 ml mieszaniny (4.5) i wstrząsać przez 30 minut. Wirować przez kilka minut, pobrać 50 ml ekstraktu z nad osadu i odparować do około 4 ml na odparowywaczu próżniowym w temperaturze nie wyższej niż 40°C. Rozcieńczyć pozostałość mieszaniną (4.5) w celu otrzymania oczekiwanej zawartości spiramycyny 1 IU/ ml (= U_8).

6.2. Roztwory do badań

Z roztworu U_8 przygotować roztwory U_4 (oczekiwana zawartość 0,5 IU/ ml), U_2 (oczekiwana zawartość 0,25 IU/ ml) i U_1 (oczekiwana zawartość 0,125 IU/ ml) metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu mieszaniny (4.5).

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Zaszczepienie pożywki do badań

Zaszczepić pożywkę do badań (4.2) zawiesiną bakteryjną (3.2) w temperaturze około 50°C. Poprzez przeprowadzenie wstępnych prób na płytkach przy użyciu podłoża do badań (4.2) określić ilość zawiesiny bakteryjnej, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń spiramycyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach roztworów wzorcowych (S_8, S_4, S_2, S_1) i czterech stężeniach roztworów badanych (U_8, U_4, U_2, U_1). Po cztery stężenia wzorca i roztworów badanych powinny być umieszczone na każdej płytce. Aby to uzyskać, należy wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w agarze wyciąć 8 studzienek o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami studzienek nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach, na których umieszczono aluminiowy lub plastikowy pierścień o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość pożywki (4.2), zaszczepioną według (7.1), aby otrzymać warstwę o grubości 2 mm (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Pozostawić w pozycji poziomej, wyciąć studzienki i umieścić w nich dokładnie odmierzone objętości roztworów badanych i wzorcowych (od 0,10 do 0,15 ml na studzienkę, w zależności od średnicy).

Nanieść każde stężenie co najmniej czterokrotnie, w ten sposób każde oznaczenie odpowiada pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Inkubować płytki przez 16 do 18 godzin w temperaturze 30°C ± 2°C.

8. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść średnią wartość pomiarów dla każdego stężenia na papier o skali półlogarytmicznej, pokazując zależność logarytmu stężenia od średnicy zahamowania. Wykreślić przez uzyskane „uśrednione punkty” linie dla roztworów wzorcowych i badanych, według następującego przykładu.

Określić „uśredniony punkt” dla najniższego stężenia wzorca (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Określić „uśredniony punkt” dla najwyższego stężenia wzorca (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć „uśrednione punkty” dla najniższego stężenia badanego ekstraktu (UL) i stężenia najwyższego (UH), zastępując S_1, S_2, S_4, S_8 przez U_1, U_2, U_4, U_8 w powyższych wzorach.

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier, połączyć punkty i wykreślić prostą dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i wykreślić prostą dla roztworu badanego.

W przypadku braku interferencji proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10% od ich średniej wartości.

Jeżeli proste nie spełniają warunku równoległości, U_1 i S_1 lub U_8 i S_8 mogą być odrzucone, a SL, SH, UL i UH obliczone według alternatywnych wzorów, dając alternatywne „uśrednione linie”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Alternatywne „uśrednione linie”, tak jak poprzednio, powinny być sprawdzone pod względem równoległości. W końcowym sprawozdaniu z badań należy odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 punktów.

Gdy proste spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby punktów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 punktów

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 punktów

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

lub

$$(d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

$$U_8 = S_8 \times A$$

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, należy powtórzyć oznaczanie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktów lub, jeżeli nie jest to możliwe, roztworów wzorcowych. Gdy względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Gdy proste nie spełniają warunku równoległości, należy powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, uzyskany wynik oznaczenia nie będzie zadowalający. Wyrazić wynik w mg spiramycyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 2 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości spiramycyny do 10 mg/kg,
- 20% najwyższego wyniku, dla zawartości spiramycyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości spiramycyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10% najwyższego wyniku, dla zawartości spiramycyny powyżej 50 mg/kg.

6.5. OZNACZANIE AWOPARCYN Y METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości awoparcyny w paszach i premiksach. Granica oznaczalności metody wynosi 2 mg/kg (2 ppm). Obecność antybiotyków politerowych może interferować przy oznaczaniu.

2. ZASADA METODY

Metoda polega na ekstrakcji awoparcyny przy użyciu mieszaniny acetonu, wody i kwasu chlorowodorowego. Aktywność antybiotyku jest oznaczana przez pomiar dyfuzji awoparcyny w ośrodku agarowym zaszczipionym *Bacillus subtilis*. Dyfuzja jest widoczna w postaci stref zahamowania wzrostu mikroorganizmu. Średnica stref zahamowania jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Utrzymywanie szczepu testowego

Przeszczepić *Bacillus subtilis* na skos agarowy sporządzony na pożywce. Inkubować przez noc w temperaturze 30°C. Przechowywać w lodówce w temperaturze 4°C i co miesiąc przeszczepiać na świeży skos.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Zmyć bakterie z ostatnio przygotowanego skosu agarowego (3.1) przy użyciu 2 do 3 ml wody jałowej. Uzyskaną suspensję zaszczipić 300 ml roztworu podłoża (4.1) w butelce Roux i inkubować przez 5 dni w temperaturze 30°C. Po okresie inkubacji sprawdzić zarodniki pod mikroskopem, zmyć hodowlę 15 ml etanolu (4.2) i zamieszać. Trwałość zawiesiny wynosi do 5 miesięcy, w temperaturze 4°C.

Można stosować inne metody, jeżeli uzyskuje się podobną zawiesinę bakteryjną.

4. POŻYWKI, ODCZYNNIKI I ROZTWORY

4.1. Pożywka

Pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	15,0 g
Woda	1000 ml
pH	6,5 (po sterylizacji).

Można zastosować gotową pożywkę o podobnym składzie, dającą takie same wyniki.

4.2. Etanol 20% (V/V):

Rozcieńczyć 200 ml etanolu w 800 ml wody.

4.3. Kwas chlorowodorowy (d = od 1,18 do 1,19).

4.4. Wodorotlenek sodu, roztwór 2 M.

4.5. Bufor fosforanowy, 0,1 M:

Dwuwodorofosforan(V) potasu KH_2PO_4	13,6 g
Woda	do 1 000 ml
pH	4,5

4.6. Mieszanina acetonu, wody i kwasu chlorowodorowego (4.3): 65/32,5/2,5 (V/V/V).

4.7. Substancja wzorcowa: awoparcyna o znanej aktywności.

5. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić w buforze fosforanowym (4.5) 10 mg substancji wzorcowej (4.7). Następnie dodać tyle buforu fosforanowego, aby otrzymać roztwór zawierający 100 µg awoparcyny w 1ml. Uzyskany roztwór przechowywany w lodówce w temperaturze 4°C zachowuje trwałość przez 2 dni. Jest to roztwór wzorcowy podstawowy.

5.1. Dla premiksów

Z roztworu podstawowego przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń oraz przy użyciu buforu fosforanowego (4.5), następujące roztwory:

S_8	4,0 µg/ml
S_4	2,0 µg/ml
S_2	1,0 µg/ml
S_1	0,5 µg/ml

5.2. Dla pasz

Z roztworu podstawowego przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń oraz przy użyciu buforu fosforanowego (4.5), następujące roztwory:

S_8	2,0 µg/ml
S_4	1,0 µg/ml
S_2	0,5 µg/ml
S_1	0,25 µg/ml

6. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU I ROZTWORÓW DO OZNACZANIA

6.1. Premiksy

Odważyć, z dokładnością do 10 mg, taką ilość próbki, której odpowiada 10 – 100 mg awoparcyny. Umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml około 60 ml mieszaniny (4.6) i mieszać przez 15 minut mieszadłem magnetycznym. Ustawić pH = 2 za pomocą kwasu chlorowodorowego (4.3). Uzupełnić kolbę do kreski mieszaniną (4.6) i wymieszać. Przesączyć przez odpowiedni sączonek (np. Whatman Nr 1), odrzucając pierwsze 5 ml filtratu. Ustawić pH = 4,5 za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (4.4). Rozcieńczyć roztwór buforem (4.5) do uzyskania stężenia awoparcyny 4 µg/ml (= U_8).

Z tego roztworu przygotować roztwory U_4 (oczekiwana zawartość: 2 µg/ml), U_2 (oczekiwana zawartość: 1 µg/ml) i U_1 (oczekiwana zawartość: 0,5 µg/ml) przez kolejne rozcieńczenia (1 + 1) buforem (4.5).

6.2. Pasze

Odważyć próbkę o masie 50 g i wstrząsać przez 30 minut z 100 ml mieszaniny (4.6), używając mieszadła magnetycznego. Sklarować ekstrakt przez odwirowanie, używając zakorkowanych probówek. Następnie ustawić pH sklarowanego ekstraktu na 4,5 za pomocą roztworu wodorotlenku sodu (4.4). Roztwór rozcieńczyć buforem (4.5) w celu uzyskania U_8 (tabela 13).

Z tego roztworu poprzez odpowiednie rozcieńczenia przygotować roztwory U_4 (oczekiwana zawartość: 1 µg/ml), U_2 (oczekiwana zawartość: 0,5 µg/ml), U_1 (oczekiwana zawartość: 0,25 µg/ml) przez kolejne rozcieńczenia (1 + 1) buforem (4.5).

Tabela 13

Przewidywany poziom awoparcyny, mg/kg	5	7,5	10	15	20	40
Masa próbki, g ($\pm 0,1$ g)	50	50	50	50	50	50
Objętość mieszaniny (4.6), ml	100	100	100	100	100	100
Objętość klarownego ekstraktu, ml	20	15	20	15	20	10
Końcowa objętość (ml): U_8	25	25	50	50	100	100
Oczekiwane stężenie U_x (µg/ml)	2	około 2	2	około 2	2	2

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Zaszczepienie pożywki do badań

Zaszczepić pożywkę do badań (4.1) zawiesiną bakteryjną (3.2) w temperaturze około 50 – 60°C. Poprzez przeprowadzenie wstępnych prób na płytkach przy użyciu pożywki do badań (4.1) określić ilość zawiesiny bakteryjnej, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń awoparcyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach roztworów wzorcowych (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeniach roztworów badanych (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Po cztery stężenia wzorca i roztworów badanych powinny być umieszczone na każdej płytce. Aby to uzyskać, należy wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w agarze wyciąć 8 studzienek o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami studzienek nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być

prowadzone na płytkach składających się ze szklanej podstawy i aluminiowego lub plastikowego pierścienia umieszczonego na płytce, o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość pożywki (4.1), zaszczerpić według (7.1), aby otrzymać warstwę o grubości 2 mm (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Pozostawić w pozycji poziomej, wyciąć studzienki i umieścić w nich dokładnie odmierzone objętości roztworów badanych i wzorcowych (od 0,10 do 0,15 ml na studzienkę, w zależności od średnicy).

Wykonać oznaczenie w czterech powtórzeniach, co odpowiada pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Inkubować płytki przez 16 do 18 godzin w temperaturze 30°C.

8. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść średnią wartość pomiarów dla każdego stężenia na papier o skali półlogarytmicznej, pokazując zależność logarytmu stężenia od średnicy stref zahamowania. Wykreślić przez uzyskane „uśrednione punkty” linie dla roztworów wzorcowych i badanych, według następującego przykładu.

Określić „uśredniony punkt” dla najniższego stężenia wzorca (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \text{ SL} = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10}$$

Określić „uśredniony punkt” dla najwyższego stężenia wzorca (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \text{ SH} = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć „uśrednione punkty” dla najniższego stężenia badanego ekstraktu (UL) i stężenia najwyższego (UH), zastępując S_1, S_2, S_4, S_8 przez U_1, U_2, U_4, U_8 w powyższych wzorach.

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier, połączyć punkty i wykreślić prostą dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i wykreślić prostą dla roztworu badanego.

W przypadku braku interferencji proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10% od ich średniej wartości.

Jeżeli proste nie spełniają warunku równoległości, U_1 i S_1 lub U_8 i S_8 mogą być odrzucone, a SL, SH, UL i UH obliczone według alternatywnych wzorów, dając alternatywne „uśrednione linie”:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \text{ lub } \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \text{ lub } \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Alternatywne „uśrednione linie”, tak jak poprzednio, powinny być sprawdzone pod względem równoległości. W końcowym sprawozdaniu z badań należy odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 punktów.

Gdy proste spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby punktów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 punktów

$$(c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 punktów

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

lub

$$(d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

$$U_8 = S_8 \times A$$

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, należy powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktów lub, jeżeli nie jest to możliwe, roztworów wzorcowych. Gdy względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Gdy proste nie spełniają warunku równoległości, należy powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, uzyskany wynik oznaczenia nie będzie zadowalający.

9. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 2 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości awoparcyny od 2 do 10 mg/kg,
- 20% najwyższego wyniku, dla zawartości awoparcyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości awoparcyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10% najwyższego wyniku, dla zawartości awoparcyny powyżej 50 mg/kg.

6.6. OZNACZANIE SOLI SODOWEJ MONENZYNY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości soli sodowej monenzyny w paszach i premiksach. Granica oznaczalności metody wynosi 10 mg/kg (10 ppm). 1 mg soli sodowej monenzyny odpowiada 1000 UK jednostek.

2. ZASADA METODY

Metoda polega na ekstrakcji monenzyny 90% metanolem. Następnie, w zależności od zawartości monenzyny w próbce, ekstrakt należy poddać odpowiedniej procedurze. Aktywność antybiotyku jest oznaczana przez pomiar dyfuzji monenzyny w ośrodku agarowym zaszczipionym *Bacillus subtilis*. Dyfuzja jest widoczna w postaci stref zahamowania wzrostu mikroorganizmu. Średnica stref zahamowania jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku. Czułość metody zmniejszają jony sodowe.

3. MIKROORGANIZM: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Przechowywanie szczepu testowego

Posiać *Bacillus subtilis* na skos agarowy sporządzony na pożywce. Inkubować przez noc w temperaturze 30°C. Przechowywać w lodówce w temperaturze 4°C i co miesiąc przesiewać na świeży skos.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Zmyć bakterie z ostatnio przygotowanego skosu agarowego (3.1) przy użyciu 2 do 3 ml wody jałowej. Uzyskaną zawiesinę zaszczipić 300 ml roztworu podłoża (4.1) w butelce Roux i inkubować przez 5 dni w temperaturze 30°C. Po okresie inkubacji zmyć hodowlę 15 ml 20% etanolu (4.3) i sprawdzić zarodniki pod mikroskopem.

Mogą być zastosowane inne metody, w przypadku gdy pozwalają uzyskać podobną zawiesinę bakteryjną.

4. POŻYWKI, ODCZYNNIKI I ROZTWORY

4.1. Pożywka do hodowli

Trypton	10,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	10,0 – 20,0 g
Woda	1000 ml
pH	6,5 (po sterylizacji).

Można zastosować gotową pożywkę o podobnym składzie, dającą takie same wyniki.

4.2. Pożywka do oznaczania

Glukoza	10,0 g
Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Wodorofosforan(V) dwupotasowy K_2HPO_4	0,69 g
Dwuwodorofosforan(V) potasowy KH_2PO_4	0,45 g
Agar	10,0 – 20,0 g
Woda	1000 ml
pH	6 (po sterylizacji).

4.3. Etanol 20% (V/V): rozcieńczyć 200 ml etanolu w 800 ml wody.

4.4. Metanol, bezwodny.

4.5. Metanol 90% (V/V): 900 ml metanolu (4.4) rozcieńczyć 100 ml wody.

4.6. Metanol 50% (V/V): 500 ml metanolu (4.4) rozcieńczyć 500 ml wody.

4.7. Tlenek glinu, granulatu (Alcoa F, 20 mesh; aktywowany glin UG1; F. Lancaster & Co. lub podobne).

4.8. Substancja wzorcowa: sól sodowa monenzyny o znanej aktywności (np. z International Laboratory for Biological Standards, Weybridge, UK-Surrey KT 15 3 NB).

5. APARATURA I SPRZĘT

5.1. Obrótowy odparowywacz próżniowy z okrągłodenną kolbą o pojemności 250 ml.

5.2. Szklana kolumna chromatograficzna: średnica wewnętrzna 25 mm, długość 400 mm, otwarty koniec o średnicy 2 mm.

5.3. Szklana kolumna chromatograficzna: średnica wewnętrzna 11 mm, długość około 300 mm, otwarty koniec o średnicy 2 mm.

6. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić taką ilość substancji wzorcowej (4.8) w metanolu (4.4), aby otrzymać roztwór zawierający 800 µg monenzyny w 1 ml. Uzyskany roztwór przechowywany w lodówce w temperaturze 4°C zachowuje trwałość przez 2 tygodnie. Jest to podstawowy roztwór wzorcowy.

Z roztworu podstawowego przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń 50% metanolem (4.6), następujące roztwory:

S_8 8,0 $\mu\text{g/ml}$

S_4 4,0 $\mu\text{g/ml}$

S_2 2,0 $\mu\text{g/ml}$

S_1 1,0 $\mu\text{g/ml}$

7. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU

7.1. Ekstrakcja

7.1.1. Premiksy

Odważyć 2 g próbki, dodać 100 ml 90% metanolu (4.5), zhomogenizować i wirować przez 5 minut. Roztwór znad osadu rozcieńczyć 50% metanolem, tak aby otrzymać roztwór o zawartości monenzyny 8 $\mu\text{g/ml}$ ($=U_8$).

7.1.2. Pasze zawierające 50 i więcej ppm monenzyny.

Odważyć próbkę o masie 10 do 20 g, dodać 100 ml 90% metanolu (4.5), homogenizować przez 15 minut i odstawić.

Wąski koniec kolumny (5.2) zatkać watą bawełnianą i wsypywać tlenek glinowy, lekko postukując kolumną o blat stołu. Napęlić kolumnę na wysokość 75 – 80 mm. Następnie nanieść na kolumnę ekstrakt i zebrać filtrat. Odmierzyć 30 ml filtratu i rozcieńczyć go do 50 ml wodą. Roztwór ten następnie rozcieńczyć taką ilością 50% metanolu (4.6), aby otrzymać stężenie monenzyny 8 $\mu\text{g/ml}$ ($=U_8$).

7.1.3. Pasze zawierające od 10 ppm do poniżej 50 ppm monenzyny.

Odważyć próbkę o masie 10 do 20 g, dodać 100 ml 90% metanolu (4.5), homogenizować przez 15 minut. Wirować aż do uzyskania klarownego roztworu.

W przypadku próbki zawierającej 20 mg/kg monenzyny wziąć do dalszych czynności 40 ml cieczy znad osadu. Gdy próbka zawiera 10 mg/kg substancji, wziąć 80 ml i odparować na obrotowym odparowywaczu próżniowym (5.1) w temperaturze nie wyższej niż 40°C. Pozostałość rozpuścić w 10 ml 90% metanolu (4.5).

Wąski koniec kolumny (5.3) zamknąć bawełnianą watą i wsypywać tlenek glinu, lekko postukując kolumną o blat stołu. Napęlić kolumnę na wysokość 75 – 80 mm. Następnie nanieść na kolumnę metanолоwый roztwór znad osadu i zebrać wyciek. Przemyc kolumnę 10 ml 90% metanolu (4.5) i roztwór z przemycia połączyć z wcześniejszym wyciekiem.

Roztwór odparować do sucha na obrotowym odparowywaczu próżniowym (5.1) w temperaturze do 40°C. Pozostałość rozpuścić w 10 ml bezwodnego metanolu (4.4) i uzupełnić do 20 ml wodą. Przez 5 minut roztwór odwirowywać przy 4000 obr/min. Sporządzić odpowiednie rozcieńczenie przy użyciu 50% metanolu, aby oczekiwana zawartość monenzyny wynosiła 8 $\mu\text{g/ml}$ ($=U_8$).

7.2. Roztwory badane

Z roztworu U_8 poprzez odpowiednie rozcieńczenia przy pomocy 50% metanolu, przygotować roztwory U_4 (oczekiwana zawartość: 4 $\mu\text{g/ml}$), U_2 (oczekiwana zawartość: 2 $\mu\text{g/ml}$), U_1 (oczekiwana zawartość: 1 $\mu\text{g/ml}$).

8. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

8.1. Zaszczepienie pożywki do badań

Zaszczepić pożywkę do badań (4.2) zawiesiną bakteryjną (3.2) w temperaturze około 50°C – 60°C. Poprzez przeprowadzenie wstępnych prób na płytkach przy użyciu pożywki do badań (4.1) określić ilość zawiesiny bakteryjnej, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń monenzyny.

8.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach roztworów wzorcowych (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeniach roztworów badanych (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Po cztery stężenia wzorca i roztworów badanych powinny być umieszczone na każdej płytce. Aby to uzyskać, należy wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w agarze wyciąć 8 studzienek o średnicy od 10 do 13 mm i w odległości pomiędzy środkami studzienek nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na płytkach składających się ze szklanej podstawy i aluminiowego lub plastikowego pierścienia umieszczonego na płytce, o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość pożywki (4.2), zaszczepioną według (8.1), aby otrzymać warstwę o grubości 2 mm (60 ml na płytkę o średnicy 200 mm). Pozostawić w pozycji poziomej, wyciąć studzienki i umieścić w nich dokładnie odmierzone objętości roztworów badanych i wzorcowych (od 0,10 do 0,15 ml na studzienkę, w zależności od średnicy).

Wykonać oznaczenie w czterech powtórzeniach, co odpowiada pomiarowi 32 stref zahamowania.

8.3. Inkubacja

Inkubować płytki przez 18 godzin w temperaturze od 35°C do 37°C.

9. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść średnią wartość pomiarów dla każdego stężenia na papier o skali półlogarytmicznej, pokazując zależność logarytmu stężenia od średnicy stref zahamowania. Wykreślić przez uzyskane „uśrednione punkty” linie dla roztworów wzorcowych i badanych, według następującego przykładu.

Określić „uśredniony punkt” dla najniższego stężenia wzorca (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \text{ SL} = \frac{7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8}{10}$$

Określić „uśredniony punkt” dla najwyższego stężenia wzorca (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \text{ SH} = \frac{7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć „uśrednione punkty” dla najniższego stężenia badanego ekstraktu (UL) i stężenia najwyższego (UH), zastępując S_1, S_2, S_4, S_8 przez U_1, U_2, U_4, U_8 w powyższych wzorach.

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier, połączyć punkty i wykreślić prostą dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i wykreślić prostą dla roztworu badanego.

W przypadku braku interferencji proste powinny być równoległe. W praktyce proste mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10% od ich średniej wartości.

Jeżeli proste nie spełniają warunku równoległości, U_1 i S_1 lub U_8 i S_8 mogą być odrzucone, a SL, SH, UL i UH obliczone według alternatywnych wzorów, dając alternatywne „uśrednione linie”:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5S_1 + 2S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5S_2 + 2S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5S_4 + 2S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5S_8 + 2S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Alternatywne „uśrednione linie”, tak jak poprzednio, powinny być sprawdzone pod względem równoległości. W końcowym sprawozdaniu z badań należy odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 punktów.

Gdy proste spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności ($\log A$) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby punktów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 punktów

$$(c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 punktów

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

lub

$$(d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

$$U_8 = S_8 \times A$$

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, należy powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktów lub, jeżeli nie jest to możliwe, roztworów wzorcowych. Gdy względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Gdy proste nie spełniają warunku równoległości, należy powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, uzyskany wynik oznaczenia nie będzie zadowalający.

10. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 20% najwyższego wyniku, dla zawartości soli sodowej monenzyny od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości soli sodowej monenzyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10% najwyższego wyniku, dla zawartości soli sodowej monenzyny powyżej 50 mg/kg.

6.7. OZNACZANIE SOLI SODOWEJ LASALOCIDU METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

(sól sodowa polieterowego monokarboksylowego kwasu wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*)

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości soli sodowej lasalocidu w paszach i premiksach. Granica wykrywalności metody wynosi 5 mg/kg, granica oznaczalności wynosi 30 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Sól sodowa lasalocidu jest ekstrahowana z próbki zakwaszonym metanolem i oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem spektrofлуorometrycznym i wykorzystaniem techniki odwróconych faz.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Dwuwodorofosforan(V) potasu (KH_2PO_4).

3.2. Kwas ortofosforowy, w = 85 %.

3.3. Roztwór kwasu ortofosforowego, $\sigma = 20$ %.

Rozcieńczyć 23,5 ml kwasu ortofosforowego (3.2) do 100 ml wodą.

3.4. 6-metylo-2-heptyloamina (1,5-dwumetyloheksyloamina), w = 99 %.

3.5. Metanol, czysty do HPLC.

3.6. Kwas chlorowodorowy, $\rho_{20} = 1,19$ g/ml.

3.7. Bufor fosforanowy, c = 0,01 mol/l.

Rozpuścić 1,36 g KH_2PO_4 (3.1) w 500 ml wody (3.11), dodać 3,5 ml kwasu ortofosforowego (3.2) i 10,0 ml 6-metylo-2-heptyloaminy (3.4). Doprowadzić pH do 4,0 roztworem kwasu ortofosforowego (3.3) i rozcieńczyć do 1000 ml wodą (3.11).

3.8. Zakwaszony metanol.

Przenieść 5,0 ml kwasu chlorowodorowego (3.6) do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, uzupełnić do kreski metanolem (3.5) i zamieszać. Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.9. Faza ruchoma HPLC, bufor fosforanowy – metanol 5 + 95 (V + V).

Zmieszać 5 ml buforu fosforanowego (3.7) z 95 ml metanolu (3.5).

3.10. Substancja wzorcowa soli sodowej lasalocidu o gwarantowanej czystości, $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$ (sól sodowa polieterowego monokarboksylowego kwasu wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1. Roztwór wzorcowy podstawowy soli sodowej lasalocidu, 500 $\mu\text{g/ml}$.

Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg soli sodowej lasalocidu (3.10) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w zakwaszonym metanolu (3.8), uzupełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem i zamieszać. Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.2. Roztwór wzorcowy pośredni soli sodowej lasalocidu, 50 $\mu\text{g/ml}$.

Odpipetować 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego soli sodowej lasalocidu (3.10.1) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do kreski zakwaszonym metanolem (3.8) i zamieszać. Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.3. Roztwory wzorcowe kalibracyjne.

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego (3.10.2). Uzupełnić do kreski zakwaszonym metanolem (3.8) i zamieszać. Roztwory odpowiadają stężeniom odpowiednio 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 μg soli sodowej lasalocidu w 1 ml. Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Woda, o czystości do HPLC.

4. APARATURA I SPRZĘT

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

4.2. Filtry membranowe, 0,45 μm .

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

4.3.1. Kolumna do wysokosprawnej chromatografii cieczowej: 125 mm x 4 mm, faza odwrócona C_{18} , wypełnienie 5 μm lub równoważne.

4.3.2. Spektrofлуorometr o zmiennej fali, z możliwością ustawienia długości fali wzbudzenia i emisji.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Objasnienia

5.1.1. Ślepa próba

W celu przeprowadzenia badania odzysku (5.1.2) należy przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu sprawdzenia, że badana pasza nie zawiera ani lasalocidu, ani interferujących substancji. Pasza użyta do ślepej próby powinna być podobnego rodzaju do próbki paszy badanej.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku należy przeprowadzić, poddając analizie ślepą próbę paszy z dodatkiem znanej ilości soli sodowej lasalocidu, podobnej do tej, jaka występuje w próbce badanej. W celu wprowadzenia dodatku 100 mg/kg, przenieść 10,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego (3.10.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby paszy, dokładnie wymieszać i pozostawić na 10 minut, kilkakrotnie mieszając, przed rozpoczęciem etapu ekstrakcji (5.2).

Alternatywnie, gdy ślepa próba paszy podobna do tej, która występuje w badanej próbce, nie jest dostępna (5.1.1), badanie odzysku może być przeprowadzone metodą dodatku wzorca. W tym przypadku analizowana próbka jest fortyfikowana solą sodową lasalocidu w ilości podobnej do tej, jaka już występuje w próbce. Próbka jest analizowana wraz ze ślepą próbą bez dodatku soli sodowej lasalocidu i odzysk jest obliczany przez odjęcie.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Mieszanki paszowe

Zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 5 g do 10 g próbki do kolby stożkowej o pojemności 250 ml z korkiem. Dodać 100 ml zakwaszonego metanolu (3.8) przy użyciu pipety. Zamknąć korkiem i wstrząsnąć w celu zdyspergowania. Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (4.1) w temperaturze 40°C na 20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Pozostawić kolbę na około 1 godzinę, dopóki suspensja nie opadnie, następnie przefiltrować część roztworu przez filtr membranowy 0,45 µm (4.2) do odpowiedniego naczynia. Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.2.2. Premiksy

Zważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 2 g rozdrobnionego premiksu do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 100 ml zakwaszonego metanolu (3.8) i wstrząsnąć w celu zdyspergowania. Umieścić kolbę z zawartością w łaźni ultradźwiękowej (4.1) w temperaturze 40°C na 20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Rozcieńczyć do kreski zakwaszonym metanolem (3.8) i dokładnie wymieszać. Pozostawić kolbę na około 1 godzinę, dopóki suspensja nie opadnie, następnie przefiltrować część roztworu przez filtr membranowy 0,45 µm (4.2). Rozcieńczyć do odpowiedniej objętości klarowny filtrat przy użyciu zakwaszonego metanolu (3.8) w celu otrzymania ostatecznego roztworu badanego zawierającego około 4 µg/ml soli sodowej lasalocidu. Przystąpić do oznaczania HPLC (5.3).

5.3. Oznaczanie HPLC

5.3.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.3.1):	125 mm x 4 mm, faza odwrócona C ₁₈ , wypełnienie 5 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.9):	Mieszanina buforu fosforanowego (3.7) i metanolu (3.5), 5 + 95 (V + V)
Przepływ:	1,2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	wzbudzenie: 310 nm, emisja: 419 nm
Dozowana objętość:	20 µl

Określić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.10.3) o stężeniu 4,0 µg/ml, aż do uzyskania pików o stałej wysokości (lub powierzchni) i powtarzalnych czasach retencji.

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna

Dozować każdy kalibracyjny roztwór (3.10.3) kilka razy i określić średnią wysokość pików (pole powierzchni) dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, zaznaczając średnie wysokości pików (pola powierzchni) na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Dozować ekstrakty próbki otrzymanej według (5.2.1) lub (5.2.2) kilka razy, stosując taką samą objętość jak przy roztworze kalibracyjnym, i określić średnią wysokość (pole powierzchni) pików soli sodowej lasalocidu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Ze średniej wysokości pików (pola powierzchni) otrzymanej po zadozowaniu roztworu próbki (5.3.3) odczytać stężenie soli sodowej lasalocidu (µg/ml) z krzywej kalibracyjnej.

6.1. Pasze

Zawartość soli sodowej lasalocidu, w mg/kg, w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\beta \times V_1}{m} \text{ [mg/kg]}$$

gdzie:

β – stężenie soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki (5.2.1), w µg/ml,

V₁ – objętość ekstraktu próbki zgodnie z (5.2.1), w ml (np. 100),

m – masa próbki analitycznej, w g.

6.2. Premiksy

Zawartość soli sodowej lasalocidu, w mg/kg, w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\beta \times V_2 \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

gdzie:

β – stężenie soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki (5.2.2), w µg/ml,

V₁ – objętość ekstraktu próbki zgodnie z (5.2.2), w ml (np. 250),

f – współczynnik rozcieńczenia zgodnie z (5.2.2),

m – masa próbki analitycznej, w g.

7. SPRAWDZENIE WYNIKÓW

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Metody bazujące na detekcji spektrofлуorometrycznej są mniej podatne na interferencje niż metody oparte na detekcji UV. Tożsamość substancji analizowanej może być potwierdzona za pomocą kochromatografii.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki (5.2.1) lub (5.2.2) jest fortyfikowany przez dodatek odpowiedniej ilości wzorcowego roztworu kalibracyjnego (3.10.3). Ilość dodanej soli sodowej lasalocidu powinna być podobna do ilości soli sodowej lasalocidu w ekstrakcie próbki. Tylko wysokość pików soli sodowej lasalocidu powinna wzrosnąć w stopniu zależnym od ilości dodanej soli sodowej lasalocidu i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie wysokości powinna odpowiadać z dokładnością $\pm 10\%$ szerokości pików oryginalnej próbki otrzymanej z badanego ekstraktu.

7.2. Powtarzalność

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

- 15% najwyższego wyniku, dla zawartości soli sodowej lasalocidu od 30 mg/kg do 100 mg/kg,
- 15 mg/kg, dla zawartości soli sodowej lasalocidu powyżej 100 mg/kg do 200 mg/kg,
- 7,5% najwyższego wyniku, dla zawartości soli sodowej lasalocidu powyżej 200 mg/kg.

7.3. Odzysk

Odzysk soli sodowej lasalocidu dodanej do ślepej próby mieszanki paszowej nie może być niższy od 80%. W przypadku fortyfikowanych próbek premiksów odzysk nie może być niższy od 90%.

6.8. OZNACZANIE TYLOZYNY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczenia zawartości tylozyny w paszach, koncentratkach i premiksach, przy zawartości wyższej niż 2,0 ppm.

2. ZASADA METODY

Próbka jest traktowana roztworem buforu fosforanowego o pH 8, ogrzanym do temperatury 80 °C, a następnie ekstrahowana metanolem i odwirowywana. Po odwirowaniu, ekstrakt zostaje rozcieńczony, a aktywność tylozyny jest oznaczana przez pomiar dyfuzji tylozyny w pożywce agarowej zaszczipionej *Sarcina lutea*. Dyfuzja jest widoczna w postaci stref zahamowania wzrostu mikroorganizmu. Średnica stref zahamowania jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Sarcina lutea* ATTC nr 9341

3.1. Utrzymanie szczepu macierzystego (testowego)

Posiać *Sarcina lutea* na skos agarowy (4.1) o pH 7,0. Inkubować przez noc w temperaturze około 35 °C. Hodowlę bakteryjną przechowywać w lodówce i przesiewać co miesiąc na świeży skos.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej (zarodników szczepu testowego)

Zmyć bakterie z ostatnio przygotowanego agaru (3.1) używając 2 - 3 ml roztworu soli fizjologicznej (4.4). Uzyskaną zawiesinę przenieść na 250 ml podłoża do oznaczania (4.1) umieszczonego w kolbie Roux i doprowadzonego do pH 7,0. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 35 °C. Następnie zebrać bakterie roztworem soli fizjologicznej w ilości do 25 ml (4.4), wymieszać i rozcieńczyć do uzyskania roztworu wykazującego transmitancję światła 75% przy długości fali 650 nm.

Suspensja przechowywana w lodówce zachowuje trwałość przez okres 1 tygodnia.

Na podstawie płytek z podłożem do oznaczania (4.1) ustala się ilość materiału szczepiennego, który dla różnych stężeń stosowanej tylozyny określi największe możliwe strefy zahamowania wzrostu szczepu testowego. Podłoże zaszczipia się w temperaturze 48-50 °C.

4. PODŁOŻE I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do oznaczania

Głukoza	1 g
Pepton trypsynowy	10 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Agar - w zależności od jakości	10 g do 20 g
Woda	destylowana do 1 000 ml

Bezpośrednio przed użyciem, pH podłoża doprowadzić do wartości 7,0, co jest potrzebne do utrzymania szczepu macierzystego i zawiesiny bakterii, a w przypadku oznaczania, pH doprowadzić do wartości 8,0.

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Bufor fosforanowy, pH 8

Dwuwodorofosforan potasu KH_2PO_4	0,523 g
Wodorofosforan dwupotasu K_2HPO_4	16,730 g
Woda	destylowana do 1 000 ml

4.3. Bufor fosforanowy, pH 7

Dwuwodorofosforan potasu KH_2PO_4	5,5 g
Wodorofosforan dwupotasu K_2HPO_4	13,6 g
Woda	destylowana do 1 000 ml

- 4.4. Sterylny roztwór soli fizjologicznej.
- 4.5. Czysty metanol.
- 4.6. 40% (v/v) roztwór metanolu.
- 4.7. Mieszanina buforu fosforanowego (4.2) i czystego metanolu, w stosunku objętościowym 60 : 40.
- 4.8. Substancja wzorcowa: tylozyna o znanej aktywności.

5. ROZTWORY WZORCOWE

Suszyć substancję wzorcową (4.8) przez 3 godziny w piecu próżniowym (ciśnienie 5 mm słupa rtęci) w temperaturze 60°C. Następnie odważyć do kolby miarowej 10-50 mg tej substancji, rozmyć w 5 ml metanolu (4.5) i rozcieńczyć buforem fosforanowym o pH 7 (4.3), aby otrzymać roztwór o stężeniu tylozyny 1 000 µg w 1ml.

Z otrzymanego roztworu podstawowego przygotować roztwór wzorcowy roboczy S₈ zawierający 2,0 µg tylozyny w 1ml, rozcieńczając mieszaniną (4.7).

Następnie, używając mieszniny (4.7), przygotować kolejne roztwory (1+1) o następujących stężeniach:

S₄ 1,0 µg/ml

S₂ 0,5 µg/ml

S₁ 0,25 µg/ml

6. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU

W przypadku koncentratu przygotować próbkę o wadze 10 g, w przypadku premiksu lub paszy - przygotować próbkę o wadze 20 g. Dodać 60 ml roztworu buforu fosforanowego o pH 8,0 (4.2), ogrzanego do temperatury 80 °C i homogenizowanego przez 2 minuty (używając kuchennego miksera lub innego, podobnego urządzenia).

Pozostawić na 10 minut, dodać 40 ml metanolu (4.5) i homogenizować przez 5 minut. Ekstrakt odwirować i część cieczy sklarowanej nad osadem rozcieńczyć mieszaniną (4.7), aby otrzymać przypuszczalne stężenie tylozyny wynoszące 2,0 µg w 1ml (U₈). Następnie przygotować stężenia U₄, U₂ i U₁, przez stopniowe rozcieńczanie (1+1) roztworem (4.7).

W przypadku stężeń niższych niż 10 ppm, całkowicie odparować ekstrakt na wyparce obrotowej w temperaturze 35 °C, a następnie pozostałości rozmyć w 40% metanolu (4.6).

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Szczepienie podłoża

Zaszczepić podłoże do oznaczania (4.1) doprowadzone do pH 8 zawiesiną bakteryjną (3.2) w temperaturze 48-50 °C.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach roztworów wzorcowych (S₈, S₄, S₂, S₁) i czterech stężeniach roztworów badanych (U₈, U₄, U₂, U₁). Po cztery stężenia wzorca i roztworów badanych umieszcza się na każdej płytce. Aby to uzyskać, należy wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w agarze wyciąć 8 studzienek o średnicy 10 do 13 mm. Obliczyć ilość zaszczonego podłoża (7.1) potrzebną do jednolitego pokrycia tacki warstwą o grubości około 2 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach, na których umieszczono aluminiowy lub plastikowy pierścień o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Do każdej studzienki odpipetować roztwór antybiotyku w ilości od 0,10 do 0,15 ml, w zależności od średnicy studzienki.

Dla każdej próbki powtarzać dyfuzję co najmniej 4 razy z każdym ze stężeń, tak aby każde oznaczenie było wypadkową wyników uzyskanych z 32 stref zahamowania (inhibicji).

7.3. Inkubacja

Inkubować płytki przez noc w temperaturze 35-37 °C.

8. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania (inhibicji), najlepiej metodą rzutowania. Nanieść wyniki na papier o skali półlogarytmicznej, zaznaczając zależność stężenia logarytmu i odpowiadającą mu średnicę stref zahamowania (inhibicji). Wyznaczyć linie dla roztworu wzorcowego i dla ekstraktu. Linie nie powinny w żadnym punkcie stykać się ze sobą, lecz przebiegać równolegle.

Logarytm aktywności względnej obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

9. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10% wartości względnej, dla zawartości tylozyny.

ROZDZIAŁ 7

BADANIE KOKCYDIOSTATYKÓW I INNYCH PRODUKTÓW LECZNICZYCH

7.1. OZNACZANIE METYLOBENZOQUATU

(7-benzylloksy-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon)

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości metylobenzoquatu w paszach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 1 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Metylobenzoquat ekstrahuje się z próbki alkoholowym roztworem kwasu metanosulfonowego. Ekstrakt oczyszcza się dwuchlorometanem przy wykorzystaniu chromatografii jonowymiennej, a następnie ponownie dwuchlorometanem. Zawartość metylobenzoquatu oznacza się za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Dwuchlorometan.

3.2. Metanol, czysty do HPLC.

3.3. Faza ruchoma HPLC:

mieszanka metanolu (3.2) i wody (czystej do HPLC) 75 + 25 (V/V)

Przesączyć roztwór przez sączek o porach 0,22 µm (4.5) i odgazować roztwór (np. poddając roztwór działaniu ultradźwiękami przez 10 minut).

3.4. Roztwór kwasu metanosulfonowego, 2%.

20,0 ml kwasu metanosulfonowego rozcieńczyć metanolem (3.2) do objętości 1000 ml.

3.5. Roztwór kwasu chlorowodorowego, 10%

100 ml kwasu chlorowodorowego ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) rozcieńczyć wodą do objętości 1000 ml.

3.6. Żywica jonowymienna Amberlit CG-120 (Na), 100 do 200 mesh.

Przygotowanie żywicy: zalać 100 g żywicy 500 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (3.5) i ogrzewać do wrzenia, ciągle mieszając. Po ochłodzeniu kwas zdekantować. Pozostałość odsączyć na sączku z bibuły przy użyciu próżni. Żywicę przemyc dwukrotnie 500 ml porcjami wody, a następnie 250 ml metanolu (3.2). Przemyc ponownie żywicę 250 ml metanolu i wysuszyć, przepuszczając powietrze przez warstwę żywicy na sączku. Żywicę przechowywać w suchej, zakorkowanej butelce.

3.7. Substancja wzorcowa: czysty metylobenzoquat.

3.7.1. Roztwór wzorcowy podstawowy metylobenzoquatu, 500 µg/ml.

Odważyć 50 mg substancji wzorcowej (3.7), z dokładnością do 0,1 mg, i przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w roztworze kwasu metanosulfonowego (3.4), uzupełnić do kreski i zamieszać.

3.7.2. Roztwór wzorcowy pośredni metylobenzoquatu, 50 µg/ml.

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml przenieść 5 ml podstawowego roztworu wzorcowego metylobenzoquatu (3.7.1), uzupełnić zawartość do kreski metanolem (3.2) i wymieszać.

3.7.3. Roztwory wzorcowe do kalibracji.

Do kolb miarowych o pojemności 25 ml przenieść kolejno 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 5,0 ml pośredniego roztworu wzorcowego metylobenzoquatu (3.7.2). Uzupełnić zawartość do kreski fazą ruchomą (3.3) i wymieszać. Roztwory te zawierają odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 µg/ml metylobenzoquatu. Roztwory przygotować bezpośrednio przed użyciem.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wstrząsarka laboratoryjna.

4.2. Obrotowy odparowywacz próżniowy.

4.3. Kolumna szklana (250 mm x 15 mm) z kranem i zbiornikiem o pojemności około 200 ml.

4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem UV o zmiennej długości fali miarowej lub z detektorem diodowym.

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 300 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne.

4.5. Filtry membranowe, 0,22 µm.

4.6. Filtry membranowe, 0,45 µm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Podać analizie ślepą próbę paszy celem potwierdzenia, że nie zawiera metylobenzoquatu ani substancji interferujących.

5.1.2. Należy przeprowadzić badanie odzysku, analizując ślepą próbę paszy z dodatkiem znanej ilości metylobenzoquatu, podobnej do ilości, jaka znajduje się w analizowanej próbce. Aby wzbogacić paszę w metylobenzoquat na poziomie 15 mg/kg, należy dodać 600 µl wzorcowego roztworu podstawowego (3.7.1) do 20 g ślepej próby paszy, wymieszać i odczekać 10 minut do rozpoczęcia ekstrakcji (5.2).

Ślepa próba paszy powinna być podobnego typu do analizowanej próbki, a jej analiza nie powinna stwierdzać obecności metylobenzoquatu.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć około 20 g przygotowanej próby z dokładnością do 0,01 g. Odważkę umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać 100 ml roztworu kwasu metanosulfonowego (3.4) i wstrząsać mechanicznie (4.2) przez 30 minut. Roztwór przesączyć przez sączek z bibuły i następnie przesączyć do rozdzielu w układzie ciecz – ciecz.

5.3. Rozdział w układzie ciecz – ciecz

Do rozdzielacza o pojemności 500 ml zawierającego 100 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (3.5) wprowadzić 25 ml otrzymanego wcześniej przesączu (5.2). Dodać 100 ml dwuchlorometanu (3.1) i wstrząsać przez 1 minutę. Pozostawić do rozdzielenia się warstw, a następnie dolną warstwę (dwuchlorometanową) spuścić do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, dodając do warstwy wodnej 40 ml dwuchlorometanu. Oddzielną warstwę dolną połączyć z ekstraktem znajdującym się w kolbie okrągłodennej. Odparować ekstrakt do sucha na obrotowym odparowywaczu próżniowym (4.2) pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 40°C. Pozostałość rozpuścić w 20 do 25 ml metanolu (3.2), zamknąć kolbę i pozostawić całą zawartość do chromatografii jonowymiennej (5.4).

5.4. Chromatografia jonowymienna

5.4.1. Przygotowanie kolumny z kationitem

Dolny koniec kolumny zamknąć korkiem z waty szklanej (5.4). Przygotować zawiesinę 5 g żywicy kationitowej (3.6) w 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.5). Wlać ją do kolumny i pozostawić do ustabilizowania się. Spuścić nadmiar kwasu z nad powierzchni żywicy i przemywać kolumnę wodą do obojętnego odczynu wycieku wobec lakmusu. Przez kolumnę przepuścić 50 ml metanolu i poczekać, aż wypełni żywicę.

5.4.2. Chromatografia kolumnowa

Przesącz (5.3) nanieść ostrożnie pipetą na kolumnę. Kolbę okrągłodenną przemyć dwukrotnie porcjami 5 – 10 ml metanolu (3.2), a następnie roztwór z przemycia nanieść na kolumnę. Ekstrakt przepuścić przez kolumnę, następnie przemyć ją 50 ml metanolu przy przepływie nie większym niż 5 ml na minutę. Wyciek odrzucić. Metylobenzoquat wymyć z kolumny za pomocą 150 ml roztworu kwasu metanosulfonowego (3.4) i zebrać eluat w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml.

5.5. Rozdział w układzie ciecz – ciecz

Otrzymany eluat (5.4.2) przenieść do rozdzielacza o pojemności 1 litra. Przemyć kolbę stożkową 5 – 10 ml metanolu (3.2) i roztwór po przemyciu dołączyć do zawartości rozdzielacza. Dodać 300 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (3.5) i 130 ml dwuchlorometanu (3.1). Wstrząsać przez 1 minutę i pozostawić do rozdzielania faz. Dolną warstwę (dwuchlorometan) przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję fazy wodnej następnymi dwoma porcjami 70 ml dwuchlorometanu i ekstrakty dołączyć do zawartości pierwszej kolby okrągłodennej.

Ekstrakt odparować do sucha na obrotowym odparowywaczu próżniowym (4.2) przy zmniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40°C. Pozostałość rozpuścić w około 5 ml metanolu (3.2) i roztwór przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Przemyć 2 razy kolbę porcjami 1 do 2 ml metanolu i roztwór po przemyciu przenieść do kolby. Uzupełnić metanolem do kreski i wymieszać. Część roztworu przesączyć przez filtr membranowy (4.6). Roztwór zachować do oznaczania HPLC (5.6).

5.6. Oznaczanie HPLC

5.6.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1):	300 mm x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma do HPLC:	mieszanina metanolu (3.2) i wody (czystej do HPLC) 75 + 25 (V/V)
Przepływ:	od 1 do 1,5 ml/min
Długości fali przy detekcji:	265 nm
Dozowana objętość:	od 20 do 50 µl

Sprawdzić stabilność układu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny (3.7.3) zawierający 4 µg/ml aż do ustalenia stałych wysokości lub powierzchni pików oraz czasów retencji.

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.6.2. Krzywa kalibracyjna

Dozować każdy z roztworów wzorcowych kalibracyjnych (3.7.3) kilka razy i zmierzyć wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Sporządzić krzywą zależności, umieszczając średnie wysokości lub powierzchnie pików na osi rzędnych, a odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.6.3. Badany roztwór próbki

Dozować kilkakrotnie taką samą objętość ekstraktu próbki (5.5), jaką brano przy roztworach kalibracyjnych, i wyznaczyć średnią wysokość lub powierzchnię pików metylobenzoquatu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Stężenie metylobenzoquatu (µg/ml) w roztworze próbki badanej odczytać z wykresu, przyporządkowując zmierzonej wysokości pików odpowiednie stężenie (5.6.2). Zawartość metylobenzoquatu w (mg/kg) w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 40}{m}$$

gdzie:

c – stężenie metylobenzoquatu w roztworze próbki wyrażone w µg/ml, odczytane z wykresu,

m – masa badanej próbki, w g.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzanie tożsamości

Tożsamość zanalizowanej substancji można potwierdzić na drodze kochromatografii lub przy użyciu detektora diodowego, porównując spektra ekstraktu próbki z roztworem kalibracyjnym zawierającym 10 µg/ml metylobenzoquatu.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki wzbogacić dodatkiem odpowiedniej ilości pośredniego roztworu wzorcowego (3.7.2). Ilość dodanego metylobenzoquatu powinna być porównywalna z ilością metylobenzoquatu w ekstrakcie próbki.

Wzrosnąć może tylko wysokość pików metylobenzoquatu, odpowiednio do dodanej ilości i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie wysokości nie powinna przekraczać około 10% pierwotnej szerokości.

7.1.2. Użycie detektora diodowego

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

(a) Długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji widma próbki i wzorca w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcyjnego. Dla detektora diodowego zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm.

(b) W zakresie pomiędzy 220 a 350 nm widma próbki i wzorca w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić więcej niż w zakresie od 10 do 100% względnej absorbancji. To kryterium jest spełnione, gdy występują te same maksima i nie obserwuje się punktów rozbieżności pomiędzy dwoma widmami większych niż 15% absorbancji wzorcowego roztworu.

(c) W zakresie od 220 do 350 nm odcinki wzrostu, maksimum i spadku pików próbki i wzorca nie powinny się różnić więcej niż od 10 do 100% absorbancji względnej. Kryterium to jest spełnione, jeżeli na spektrum obecne są te same pików, a różnice między spektrami dla wszystkich obserwowanych punktów nie przekraczają 15% absorbancji wierzchołka.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność oznaczanej substancji nie została potwierdzona.

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10% najwyższego wyniku, dla zawartości metylobenzoquatu od 4 do 20 mg/kg.

7.3. Odzysk

Odzysk metylobenzoquatu ze wzbogaconej ślepej próby nie może być mniejszy niż 90%.

7.2. OZNACZANIE HALOFUGINONU

(dl-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetylo]-chinazolin-4-(3H)-1 bromowoderek)

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości halofuginonu w paszach o zawartości tego składnika powyżej 1 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Po potraktowaniu gorącą wodą, halofuginon ekstrahuje się w postaci wolnej do octanu etylowego, a częściowo jako chlorowoderek do wodnego roztworu kwasu chlorowodorowego. Ekstrakt oczyszcza się przy wykorzystaniu chromatografii jonowymiennej, zawartość halofuginonu określa się za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą (HPLC) oraz przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Acetonitryl czystości do HPLC.

3.2. Żywica Amberlite XAD-2.

3.3. Octan amonu.

3.4. Octan etylowy.

3.5. Lodowaty kwas octowy.

3.6. Wzorec halofuginonu (E 764).

3.6.1. Podstawowy roztwór halofuginonu, 100 µg/ml:

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg halofuginonu (3.6). Przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml i rozpuścić w buforze z octanem amonu (3.18). Uzupełnić kolbę do kreski buforem i wymieszać. Roztwór jest stabilny przez 3 tygodnie, jeżeli jest przechowywany bez dostępu światła w zakorkowanym naczyniu.

3.6.2. Roztwory wzorcowe kalibracyjne.

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml odpipetować kolejno 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, i 6,0 ml podstawowego roztworu halofuginonu (3.6.1). Po uzupełnieniu zawartości kolb do kreski fazą ruchomą (3.21) wymieszać. Roztworom tym odpowiadają następujące stężenia halofuginonu 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 µg/ml. Roztwory przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.7. Kwas chlorowodorowy (p_{20} = około 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Azotan srebra.

3.10. Askorbinian sodu.

3.11. Węglan sodu.

3.12. Chlorek sodu.

3.13. EDTA (etylenodwuaminocteroowy kwas, sól dwusodowa).

3.14. Woda czystości do HPLC.

3.15. Roztwór węglanu sodu, $v = 10$ g/100 ml.

3.16. Roztwór chlorku sodu wysycony węglanem sodu, $v = 5$ g/100 ml.

Rozpuścić 50 g węglanu sodu (3.11) w wodzie, rozcieńczyć do 1 litra i dodawać chlorek sodu (3.12) aż do otrzymania roztworu nasyconego.

3.17. Kwas chlorowodorowy, stężenie około 0,1 mol/l. Rozcieńczyć 10 ml HCL (3.7) wodą do 1 litra.

3.18. Roztwór buforu octanu amonu, około 0,25 mol/l.

Rozpuścić 19,3 g octanu amonu (3.3) i 30 ml kwasu octowego (3.5) w wodzie (3.14) i rozcieńczyć do 1 litra.

3.19. Przygotowanie żywicy Amberlit XAD-2.

Żywicę przemycać wodą do zaniku chlorków, co sprawdza się azotanem srebra (3.20) w odrzucanej fazie wodnej. Następnie przemycić żywicę 50 ml metanolu (3.8), odrzucając metanol z przemycia. Żywicę przechowywać pod świeżym metanolem.

3.20. Roztwór azotanu srebra około 0,1 mol/l.

Rozpuścić 0,17 g azotanu srebra (3.9) w 10 ml wody.

3.21. Faza ruchoma do HPLC.

Zmieszać 500 ml acetonitrylu (3.1) z 300 ml buforowego octanu amonu (3.18) i 1200 ml wody (3.14). Za pomocą kwasu octowego (3.5) doprowadzić do pH 4,3. Przesączyć przez sącdek o porach 0,22 µm (4.8), a następnie odgazować roztwór (np. na łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut). Roztwór jest stabilny przez 1 miesiąc, jeżeli jest przechowywany z dala od światła, w szczelnie zamkniętym naczyniu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.2. Obrotowy odparowywacz próżniowy.

4.3. Wirówka.

4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem UV o zmiennej długości fali lub z detektorem diodowym.

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 300 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm, lub równoważne.

4.5. Kolumna szklana (300 mm x 10 mm) z kranem i ze spięciem.

4.6. Filtry z włóknem szklanym o średnicy 150 mm.

4.7. Filtry membranowe 0,45 µm.

4.8. Filtry membranowe 0,22 µm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Halofuginon w wolnej formie jest niestabilny zarówno w roztworze zasadowym, jak i w octanie etylowym. Nie powinien pozostawać w octanie etylu dłużej niż 30 minut.

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Ślepa próba nie powinna zawierać ani halofuginonu, ani innych substancji interferujących.

5.1.2. Należy przeprowadzić test na odzysk, analizując ślepą próbę (5.1.1) z dodatkiem znanej ilości halofuginonu i podobnej do ilości obecnej w próbce. Wzbogacenie na poziomie 3 mg/kg uzyskuje się, dodając 300 µl roztworu podstawowego (3.6.1) do 10 g ślepej próby. Po wymieszaniu i odczekaniu 10 minut rozpocząć ekstrakcję według (5.2).

5.1.3. Rodzaj ślepej próby powinien być podobny do rodzaju próbki analizowanej.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć, z dokładnością do 0,1 g, 10 g przygotowanej próbki i umieścić w probówce wirówkowej o pojemności 200 ml. Dodać 0,5 g askorbianu sodu (3.10), 0,5 g EDTA (3.13), 20 ml wody i wszystko wymieszać. Probówkę umieścić na 5 minut w łaźni wodnej (80°C). Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej dodać 20 ml roztworu węglanu sodu (3.15) i wymieszać. Niezwłocznie dodać 100 ml octanu etylowego (3.4) i ręcznie, energicznie wstrząsać przez 15 sekund. Następnie umieścić probówkę w łaźni ultradźwiękowej (4.1), odkorkować. Wirować przez 2 minuty, zdekantować fazę octanu etylowego i przesączyć przez sącdek z włóknem szklanym (4.6) do rozdzielacza o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję drugą porcją 100 ml octanu etylowego. Przemycać połączone ekstrakty przez 1 minutę 50 ml roztworu chlorku sodu nasyconego węglanem sodu (3.16) i zdekantować warstwę wodną.

Fazę organiczną ekstrahować przez 1 minutę 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.17). Dolną kwasową warstwę spuścić do rozdzielacza o pojemności 250 ml. Przez kolejne 1,5 minuty powtarzać ekstrakcję warstwy organicznej 50 ml kwasu chlorowodorowego i ekstrakt połączyć z ekstraktem uzyskanym z pierwszego procesu. Przemycić połączone ekstrakty, wirując z 10 ml octanu etylowego (3.4) przez 10 sekund.

Fazę organiczną odrzucić, a fazę wodną przenieść ilościowo do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml. Znajdujący się jeszcze w roztworze kwasu octan etylowy odparować na obrotowym odparowywaczu próżniowym (2.4). Temperatura wody w łaźni nie powinna przekraczać 40°C. Przy podciśnieniu około 25 milibarów cały pozostający jeszcze octan etylowy odparuje w ciągu 5 minut w temperaturze 38°C.

5.3. Oczyszczanie

5.3.1. Przygotowanie kolumny z Amberlitem

Dla każdej próbki ekstraktu przygotować kolumnę z żywicą XAD.2. 10 g przygotowanego Amberlitu (3.18) umieścić w szklanej kolumnie (4.5) za pomocą metanolu (3.8). Nad żywicą umieścić korek z waty szklanej. Przepuścić metanol przez kolumnę, a następnie przemycić żywicę 100 ml wody, zatrzymując proces w momencie, gdy ciecz osiągnie wierzchołka żywicy. Pozostawić kolumnę do ustabilizowania na 10 minut przed użyciem. Nie dopuścić do osuszenia kolumny.

5.3.2. Oczyszczanie próbki

Ekstrakt uzyskany w (5.2) nanieść ilościowo na kolumnę z Amberlitem (5.3.1) i eluować, odrzucając eluat. Szybkość elucji nie powinna przekraczać 20 ml/min. Przemycić kolbę okrągłodenną 20 ml porcją kwasu chlorowodorowego (3.17), roztwór z przemycia wykorzystać następnie do przemycia żywicy. Przedmuchać resztki pozostającego kwaśnego roztworu strumieniem powietrza. Wylać roztwór po przemyciu, nanieść 100 ml metanolu (3.8) na kolumnę, zebrać 5 do 10 ml eluatu w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml. Pozostający jeszcze na kolumnie metanol zebrać po 10 minutach do tej samej kolby okrągłodennej, kontynuując elucję przy ustalonym przepływie 20 ml/min. Na obrotowym odparowywaczu próżniowym (4.2) odparować metanol w łaźni o temperaturze wody nie wyższej niż 40°C. Za pomocą fazy ruchomej (3.21) przenieść ilościowo pozostałość do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Uzupełnić kolbę fazą ruchomą do kreski i wymieszać. Ciecz przesączyć przez filtr membranowy (4.7). Roztwór użyć do oznaczeń metodą HPLC.

5.4. Oznaczenie przez HPLC

5.4.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1):	300 mm x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma do HPLC(3.21):	Zmieszać 500 ml acetonitrylu (3.1) z 300 ml buforowego octanu amonu (3.18) i 1200 ml wody. Za pomocą kwasu octowego (3.5) doprowadzić do pH 4,3. Przesączyć przez sącze o porach 0,22 µm (4.8), a następnie odgazować roztwór (np. na łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut).
Przepływ:	od 1,5 do 2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	265 nm
Dozowana objętość	od 40 do 100 µl

Sprawdzić stabilność układu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny o stężeniu 3,0 µg/ml, aż do ustabilizowania wysokości lub powierzchni pików oraz czasów retencji.

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Każdy z roztworów wzorcowych zadozować (3.6.2) kilka razy i zmierzyć wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Sporządzić krzywą zależności średnich wysokości lub powierzchni pików od odpowiednich stężeń w µg/ml roztworów wzorcowych kalibracyjnych. Sporządzić krzywą kalibracyjną. Na osi odciętych umieścić stężenia roztworów kalibracyjnych (3.6.2) w µg/ml, a na osi rzędnych odpowiadające im średnie wysokości lub powierzchnie pików.

5.4.3. Roztwór badany

Zadozować kilkakrotnie taką samą objętość ekstraktu próbki (5.3.2), jaką brano przy roztworach kalibracyjnych, i wyznaczyć średnią wysokość lub powierzchnię pików halofuginonu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Stężenie halofuginonu (µg/ml) w roztworze próbki badanej odczytuje się z wykresu, przyporządkowując zmierzonej wysokości pików odpowiednie stężenie (5.4.2). Zawartość halofuginonu (w mg/kg) w próbce oblicza się według następującego wzoru:

$$W = c \times 10/m$$

gdzie:

c – stężenie halofuginonu w roztworze próbki, wyrażone w µg/ml, (odczytane z wykresu kalibracyjnego),

m – masa odważki próbki, w g.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzanie tożsamości

Tożsamość zanalizowanej substancji można potwierdzić na drodze kochromatografii lub przy użyciu detektora diodowego, porównując spektra ekstraktu próbki z kalibracyjnym roztworem wzorca (3.6.2), zawierającym 6 µg/ml halofuginonu.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki wzbogaca się dodatkiem odpowiedniej ilości pośredniego roztworu wzorcowego (3.6.2). Ilość dodanego halofuginonu powinna być porównywalna do ilości halofuginonu w ekstrakcie próbki. Może wzrosnąć wyłącznie wysokość pików halofuginonu odpowiednio do dodanej ilości i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie wysokości nie powinna przekraczać około 10% pierwotnej szerokości.

7.1.2. Użycie detektora diodowego.

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

(a) Długość fali odpowiadająca na spektrum maksymalnej absorpcji próbki i wzorca dla wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcyjnego. Dla detektora diodowego zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm.

(b) Zarejestrowane na chromatogramie wierzchołki pików próbki badanej i wzorca w zakresie spektrum pomiędzy 220 i 350 nm nie mogą się różnić w przedziale absorpcji od 10 do 100%. Kryterium to stosuje się w przypadku obecności takich samych maksimum, a odchylenia między tymi dwoma widmami nie przekraczają 15% absorpcji wzorca analitycznego.

(c) W zakresie od 220 do 350 nm odcinki wzrostu, maksimum i spadku na spektrum, dla pików próbki i wzorca nie powinny się różnić w przedziale od 10 do 100% absorpcji względnej. Kryterium to stosuje się, jeżeli na spektrum obecne są te same piki, a różnice między spektrami dla wszystkich obserwowanych punktów nie przekraczają 15% absorpcji wierzchołka.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, nie można uznać analizy za poprawną.

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,5 mg/kg, dla zawartości halofuginonu do 3 mg/kg.

7.3. Odzysk

Odzysk ze ślepej próby z dodatkiem wzorca nie może być mniejszy niż 80%.

7.3. OZNACZANIE ROBENIDYNY

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

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości robenidyny w paszach. Dolna granica wykrywalności metody wynosi 5 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Próbkę poddaje się ekstrakcji zakwaszonym metanolem. Ekstrakt oczyszcza się na kolumnie chromatograficznej wypełnionej tlenkiem glinu. Robenidynę z kolumny eluuje się metanolem, eluat zatęża i rozpuszcza w fazie ruchomej. Robenidynę oznacza się metodą chromatografii cieczowej wysokosprawnej z odwróconą fazą (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Metanol.

3.2. Zakwaszony metanol.

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml umieścić 4 ml kwasu chlorowodorowego ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml), uzupełnić zawartość do kreski metanolem (3.1) i wymieszać. Roztwór przygotować tuż przed użyciem.

3.3. Acetonityl o czystości do HPLC.

3.4. Sito molekularne.

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

3.5. Tlenek glinu pierwszego stopnia aktywności kwasowej do chromatografii:

100 g tlenku glinu umieścić w naczyniu i dodać 2 ml wody. Naczynie zakorkować i wstrząsać przez około 20 minut.

Przechowywać w dobrze zamkniętym naczyniu.

3.6. Roztwór dwuwodorofosforanu(V) potasu, $c = 0,25$ mol/l:

3,40 g dwuwodorofosforanu(V) potasu rozpuścić w 1000 ml wody w kolbie miarowej, wymieszać.

3.7. Monowodorofosforan(V) dwusodu, $c = 0,025$ mol/l: 3,55 g bezwodnego monowodorofosforanu(V) dwusodu (lub 4,45 g dwuhydratu, lub 8,95 g dekahydratu) rozpuścić w wodzie (o czystości do HPLC) w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml. Uzupełnić kolbę do kreski i wymieszać.

3.8. Faza ruchoma do HPLC.

Zmieszać razem:

650 ml acetonitrylu (3.3),

250 ml wody czystej do HPLC,

50 ml roztworu dwuwodorofosforanu(V) sodu (3.6),

50 ml roztworu monowodorofosforanu(V) dwusodu (3.7).

Przesączyć przez sączonek o porach wielkości 0,22 μm i roztwór odgazować (np. traktując go przez 10 minut ultradźwiękami).

3.9. Substancja wzorcowa.

Czysta robenidyna: chlorowodorek 1,3-bis[(4-chlorobenzylideno)amino]guanidyny, E 750.

3.9.1. Roztwór wzorcowy podstawowy: 300 $\mu\text{g/ml}$.

Odważyć 30 mg substancji wzorcowej (3.9) robenidyny z dokładnością do 0,1 mg. Rozpuścić w zakwaszonym metanolu (3.2) w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić kolbę do kreski i wymieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.2. Roztwór wzorcowy pośredni robenidyny: 12 $\mu\text{g/ml}$.

10 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.9.1) przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Po uzupełnieniu kolby do kreski fazą ruchomą wymieszać (3.8). Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.3. Roztwory wzorcowe kalibracyjne.

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml odpipetować kolejno 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego (3.9.2). Uzupełnić kolbę do kreski fazą ruchomą (3.8) i wymieszać. Roztworom tym odpowiada kolejno 1,2, 2,4, 3,6, 4,8, 6,0 $\mu\text{g/ml}$ robenidyny. Roztwory przygotować bezpośrednio przed użyciem.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Kolumna szklana.

Przygotować kolumnę ze szkła oranżowego wyposażoną w kran i zbiorniczek o pojemności około 150 ml. Średnica wewnętrzna od 10 do 15 mm i długość 250 mm.

4.2. Wstrząsarka laboratoryjna.

4.3. Obrotowy odparowywacz próżniowy.

4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem UV lub diodowym pracującym w zakresie 250 do 400 nm.

4.4.1. Kolumna do chromatografii: 300 mm x 4 mm, C_{18} , wypełnienie 10 μm lub równoważne.

4.5. Sączonek z włóknem szklanym Whatman GF/A lub podobny.

4.6. Filtry membranowe, 0,22 μm .

4.7. Filtry membranowe, 0,45 μm .

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Robenidyna jest czuła na światło. Do wszystkich czynności należy używać szkła oranżowego.

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Ślepa próba paszy nie może zawierać ani robenidyny, ani innych substancji interferujących.

5.1.2. Należy przeprowadzić badanie odzysku, analizując ślepą próbę paszy (5.1.1) z dodatkiem znanej ilości robenidyny, podobnej do występującej w badanej próbce. Wzbogacenie na poziomie 60 mg/kg robenidyny uzyskuje się, odparowując 30 ml podstawowego roztworu wzorcowego w strumieniu azotu umieszczonego w kolbie miarowej do 0,5 ml, dodając 15 g ślepej próby paszy. Po wymieszeniu i odczekaniu 10 minut rozpocząć ekstrakcję według (5.2).

Ślepa próba paszy powinna być tego samego typu jak próbka badana. Analiza ślepej próby paszy powinna potwierdzić niewystępowanie robenidyny.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 15 g wcześniej przygotowanej próbki. Odważyć umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml i dodać 100 ml zakwaszonego metanolu (3.2), zakorkować i wstrząsać przez 1 godzinę na wytrząsarce (4.2). Przesączyć przez filtr szklany (4.5) i przesącz zebrać do kolby stożkowej o pojemności 150 ml. Dodać 7,5 g sita molekularnego (3.4), zamknąć i wstrząsać przez 5 minut. Natychmiast przesączyć przez sączone włóknem szklanym. Roztwór poddać procesowi oczyszczania (5.3).

5.3. Oczyszczanie

5.3.1. Przygotowanie kolumny z tlenkiem glinu. Kolumnę (4.1) zatkać od dołu korkiem z waty szklanej. Odważyć 11 g wcześniej przygotowanego tlenku glinu (3.5) i przenieść go do kolumny. Maksymalnie skrócić czas kontaktu tlenku glinu z atmosferą. Ubić zawartość, delikatnie stukając dolnym końcem o blat stołu i pozostawić do ustabilizowania się układu.

5.3.2. Oczyszczanie próbki

Odpipetować 5 ml ekstraktu próbki otrzymanego w (5.2) i nanieść na kolumnę po ścianie aż do zaabsorbowania przez tlenek glinu. Eluować robenidynę z kolumny 100 ml metanolu (3.1) przy przepływie od 2 do 3 ml/min, zbierając eluat do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml. Na obrotowym odparowywaczu próżniowym odparować zawartość do sucha, przy zredukowanym ciśnieniu w temperaturze 40°C. Pozostałość ponownie rozpuścić w 3 do 4 ml fazy ruchomej (3.8) i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Kolbę przemyć kilkakrotnie 1 do 2 ml porcjami fazy ruchomej i roztwór z przemycia wlać do kolby miarowej. Uzupełnić kolbę do kreski tym samym rozpuszczalnikiem i wymieszać. Ciecz przesączyć przez sączone o porach 0,45 µm (4.7). Roztwór następnie użyć do oznaczeń HPLC (5.4).

5.4. Oznaczanie przez HPLC

5.4.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.4.1):	300 mm x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma do HPLC (3.8):	Zmieszać razem: 650 ml acetonitrylu (3.3), 250 ml wody czystej do HPLC, 50 ml roztworu dwuwodorofosforanu(V) sodu (3.6), 50 ml roztworu monowodorofosforanu(V) dwusodu (3.7). Przesączyć przez sączone o porach wielkości 0,22 µm i roztwór odgazować (np. traktując go przez 10 minut ultradźwiękami).
Przepływ:	1,5 do 2 ml/min
Długości fali przy detekcji:	317 nm
Dozowana objętość:	20 do 50 µl

Sprawdzić stabilność układu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny o stężeniu 3,6 µg/ml (3.9.3) aż do ustalenia się wysokości pików i czasów retencji.

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Dozować każdy z roztworów wzorcowych kalibracyjnych (3.9.3) kilka razy i zmierzyć wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Sporządzić krzywą zależności średnich wysokości lub powierzchni pików od odpowiednich stężeń w µg/ml roztworów wzorcowych kalibracyjnych. Sporządzić krzywą kalibracyjną. Na osi odciętych umieścić stężenia roztworów wzorcowych w µg/ml, a na osi rzędnych odpowiadające im średnie wysokości lub powierzchnie pików.

5.4.3. Badany roztwór próbki

Dozować kilkakrotnie taką samą objętość ekstraktu próbki (5.3.2) jak przy roztworach kalibracyjnych i wyznaczyć średnią wysokość lub powierzchnię pików robenidyny.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Stężenie robenidyny (µg/ml) w roztworze próbki badanej odczytuje się z wykresu (5.4.2), przyporządkowując zmierzonej wysokości pików odpowiednie stężenie. Zawartość robenidyny (w mg/kg) w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

gdzie:

c – stężenie robenidyny w roztworze próbki, wyrażone w µg/ml, odczytuje się z wykresu,

m – masa badanej próbki, w g.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzanie tożsamości

Tożsamość zanalizowanej substancji można potwierdzić na drodze kochromatografii lub przy użyciu detektora diodowego porównując spektra ekstraktu próbki z roztworem kalibracyjnym zawierającym 6 µg/ml robenidyny.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki wzbogaca się dodatkiem odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.9.3). Ilość dodanej robenidyny powinna być porównywalna do ilości robenidyny w ekstrakcie próbki. Może wzrosnąć tylko wysokość pików robenidyny

odpowiednio do dodanej ilości i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie wysokości nie powinna przekraczać około 10% pierwotnej szerokości.

7.1.2. Użycie detektora diodowego

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

(a) Długość fali odpowiadająca na spektrum maksymalnej absorpcji próbki i wzorca dla wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcyjnego. Dla detektora diodowego zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm.

(b) Pomiędzy 220 i 350 nm spektra próbek i wzorca, rejestrowane w szczytowym punkcie pików chromatografu, nie powinny się różnić więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorpcji. To kryterium jest spełnione, gdy występują takie same maksima i gdy odchylenia między tymi dwoma widmami we wszystkich obserwowanych punktach nie przekraczają 15% absorpcji wzorcowego analitu.

(c) Pomiędzy 220 a 350 nm spektra narastającego zbocza, wierzchołka i obniżającego się zbocza pików uzyskiwanych z ekstraktów próbek nie powinny się różnić od siebie więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorpcji. To kryterium jest spełnione, gdy występują te same maksima i gdy wszystkie obserwowane punkty odchylen między spektrami nie przekraczają 15% absorpcji najwyższego pików widma.

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

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10% najwyższego wyniku, dla zawartości robenidyny powyżej 15 mg/kg.

7.3. Odzysk

Odzysk ze ślepej próby z dodatkiem standardu nie może być mniejszy niż 90%.

7.4. OZNACZANIE AMPROLIUM METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

(chlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidyno-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny)

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości amprolium w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 1 mg/kg, granica oznaczalności wynosi 25 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Próbka jest ekstrahowana wodnym roztworem metanolu. Po rozcieńczeniu fazą ruchomą i przesączeniu przez sączonek membranowy zawartość amprolium jest oznaczana metodą jonowymiennej wysokospawnej chromatografii cieczowej HPLC przy wykorzystaniu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitryl, czysty do HPLC.

3.3. Woda, do HPLC.

3.4. Dwuwodorofosforan(V) sodu, roztwór $c = 0,1$ mol/l.

Rozpuścić 13,80 g monohydratu dwuwodorofosforanu(V) sodu w wodzie (3.3) w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml, uzupełnić wodą (3.3) do kreski i wymieszać.

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

Rozpuścić 224,74 g monohydratu nadchloranu sodu w wodzie (3.3) w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml, uzupełnić wodą (3.3) do kreski i wymieszać.

3.6. Faza ruchoma do HPLC (8.1).

Mieszanina acetonitrylu (3.2), roztworu dwuwodorofosforanu(V) sodu (3.4) oraz roztworu nadchloranu sodu (3.5) 450 + 450 + 100 (v + v + v). Przed użyciem przesączyć przez sączonek membranowy 0,22 μ m (4.3) i odgazować roztwór (np. w łaźni ultradźwiękowej (4.4) przez co najmniej 15 minut).

3.7. Substancja wzorcowa: czyste amprolium, chlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidyno-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny, E 750 uwzględnić (8.2).

3.7.1. Roztwór wzorcowy podstawowy amprolium, 500 μ g/ml.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg amprolium (3.7) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w 80 ml metanolu (3.1) i umieścić kolbę na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej (4.4). Następnie doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do kreski wodą i zamieszać. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność przez 1 miesiąc.

3.7.2. Pośredni podstawowy roztwór amprolium, 50 μ g/ml.

Przenieść pipetą 5 ml wzorcowego podstawowego roztworu (3.7.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do kreski roztworem do ekstrakcji (3.8) i wymieszać. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność przez 1 miesiąc.

3.7.3. Roztwory kalibracyjne.

Przenieść 0,5, 1,0, i 2,0 ml pośredniego roztworu podstawowego (3.7.2) do kolb miarowych o pojemności 50 ml. Uzupełnić do kreski fazą ruchomą (3.6) i zamieszać. Stężenia amprolium w roztworach wynoszą odpowiednio 0,5, 1,0 i 2,0 μ g/ml. Roztwory należy sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

3.8. Roztwór do ekstrakcji.

Mieszanina metanolu (3.1) i wody 2 + 1 (v + v).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Zestaw do HPLC z dozownikiem, umożliwiającym dozowanie 100 μ l cieczy.

4.1.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 125 mm x 4 mm, z żywicą jonowymienną kationową Nucleosil 10 SA, wypełnienie 10 μ m lub równoważne.

4.1.2. Detektor UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy.

4.2. Sącze membranowy, PTFE, 0,45 µm.

4.3. Sącze membranowy, 0,22 µm.

4.4. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.5. Wstrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Pasza bez substancji oznaczanej

Dla potrzeb badania odzysku należy przeprowadzić analizę próbki paszy bez amprolium w celu upewnienia się, że nie zawiera amprolium ani substancji zakłócających. Rodzaj paszy bez amprolium powinien być podobny do paszy występującej w analizowanej próbce, a analiza powinna potwierdzić brak amprolium i substancji zakłócających.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku należy przeprowadzić, poddając analizie próbkę paszy bez amprolium, do której dodano taką ilość amprolium, która jest podobna do występującej w próbce. W celu uzyskania zawartości na poziomie 100 mg/kg należy dodać 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.7.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do około 0,5 ml. Dodać 50 g paszy bez amprolium, starannie wymieszać i pozostawić na 10 minut, mieszając kilkakrotnie przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Alternatywnie, jeżeli nie ma próbki paszy o typie zbliżonym do próbki badanej (5.1.1), badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest uzupełniana ilością amprolium podobną do już obecnej w próbce. Próbka ta jest poddawana analizie wraz z próbką bez zwiększonej zawartości amprolium i odzysk może być obliczony przez odejmowanie.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Premiksy (zawartość poniżej 1% amprolium) i pasze

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 5 do 40 g próbki, w zależności od zawartości amprolium, do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 200 ml roztworu do ekstrakcji (3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i umieścić na 1 godzinę na wstrząsarce lub mieszadło magnetycznym (4.5). Rozcieńczyć część ekstraktu fazą ruchomą (3.6) do zawartości amprolium 0,5 do 2 µg/ml i wymieszać (8.3). Przesączyć 5 do 10 ml tego rozcieńczonego roztworu przez sącze membranowy (4.2). Przejść do oznaczania HPLC (5.3).

5.2.2. Premiksy (zawartość od 1,0% amprolium)

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, od 1 do 4 g premiksu, w zależności od zawartości amprolium, do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 200 ml roztworu do ekstrakcji (3.8). Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i umieścić na 1 godzinę na wstrząsarce lub mieszadło magnetycznym (4.5). Rozcieńczyć część ekstraktu fazą ruchomą (3.6) do zawartości amprolium od 0,5 do 2 µg/ml i wymieszać. Przesączyć 5 do 10 ml tego rozcieńczonego roztworu przez sącze membranowy (4.2). Przejść do oznaczania HPLC (5.3).

5.3. Oznaczanie HPLC

5.3.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej (4.1.1):	125 mm x 4 mm, żywica jonowymienna Nucleosil 10 SA, wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.6):	mieszanina acetonitrylu (3.2), roztworu dwuwodorofosforanu(V) sodu (3.4) i roztworu nadtlenku sodu (3.5) 450 + 450 + 100 (v + v + v)
Przepływ:	0,7 – 1 ml/min
Długość fali przy detekcji:	264 nm
Dozowana objętość:	100 µl

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

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.3.2. Wykres kalibracyjny

Dozować kilkakrotnie każdy roztwór wzorcowy (3.7.3) i oznaczyć średnią wysokość (powierzchnię) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracji, odkładając średnie wysokości pików roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Dozować kilkakrotnie ekstrakt próbki (5.2), stosując takie same objętości jak dla roztworów wzorcowych, i oznaczyć średnią wysokość (powierzchnię) pików amprolium.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików amprolium dla roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, korzystając z wykresu kalibracyjnego (5.3.2). Zawartość amprolium w mg/kg próbki obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

V – objętość roztworu do ekstrakcji (3.8), w ml, według (5.2) (np. 200 ml),

δ – stężenie amprolium w ekstrakcie próbki (5.2), w $\mu\text{g/ml}$,

f – współczynnik rozcieńczania według (5.2),

m – masa próbki analitycznej, w g.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, za pomocą którego porównuje się widma ekstraktu próbki (5.2) i roztworu wzorcowego (3.7.3) o stężeniu 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

7.1.1. Kochromatografia

Do ekstraktu próbki (5.2) dodawana jest odpowiednia ilość roztworu wzorcowego (3.7.3). Ilość dodanego amprolium powinna być zbliżona do ilości amprolium znajdującego się w ekstrakcie próbki.

Zwiększyć się powinna tylko wysokość pików amprolium stosownie do dodanej ilości i stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach $\pm 10\%$ szerokości pików amprolium w próbce przed dodaniem roztworu wzorcowego.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

(a) Długość fali maksimum absorpcji dla spektrum próbki i wzorca, mierzona w szczytowym punkcie pików chromatogramu, powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcyjnego. Dla detektora diodowego zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm.

(b) Pomiędzy 210 a 320 nm spektra próbki i wzorca, zarejestrowane w szczytowym punkcie pików chromatogramu, nie powinny się różnić więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorbancji. To kryterium jest spełnione, gdy występują takie same maksima i gdy odchylenia między tymi dwoma widmami we wszystkich obserwowanych punktach nie przekraczają 15% absorbancji wzorcowego analitu.

(c) Pomiędzy 210 a 320 nm spektra narastającego zbocza, wierzchołka i obniżającego się zbocza pików uzyskiwanych z ekstraktów próbek nie powinny się różnić od siebie więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorbancji. To kryterium jest spełnione, gdy występują te same maksima i gdy wszystkie obserwowane punkty odchyleni pomiędzy spektrami nie przekraczają 15% absorbancji najwyższego pików widma.

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

7.2. Powtarzalność

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

– 15% najwyższego wyniku, dla zawartości amprolium od 25 mg/kg do 500 mg/kg,

– 0,75 mg/kg, dla zawartości amprolium powyżej 500 mg/kg do 1000 mg/kg,

– 7,5% najwyższego wyniku, dla zawartości amprolium powyżej 1000 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku fortyfikacji ślepej próby paszy odzysk powinien wynosić co najmniej 90%.

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Jeżeli próbka zawiera tiaminę, pik tiaminy na chromatogramie ukazuje się na krótko przed pikiem amprolium. W tej metodzie amprolium i tiamina powinny być rozdzielone. Jeżeli amprolium i tiamina nie zostaną rozdzielone w kolumnie (4.1.1) użytej w tej metodzie, należy zastąpić do 50% acetonitrylu w fazie ruchomej (3.6) metanolem.

8.2. Widmo roztworu amprolium: ($c = 0,02 \text{ mol/l}$) w kwasie chlorowodorowym ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) wykazuje maksima przy 246 nm i 262 nm, absorbancja powinna wynieść 0,84 przy 246 nm i 0,80 przy 262 nm.

8.3. Ekstrakt należy zawsze rozcieńczać fazą ruchomą, gdyż w przeciwnym razie czas retencji pików amprolium może się znacznie przesunąć, z uwagi na zmiany siły jonowej.

7.5. OZNACZANIE DIKLAZURILU

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

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości diklazurilu w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 0,1 mg/kg, granica oznaczalności 0,5 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Po dodaniu wzorca wewnętrznego próbka jest ekstrahowana zakwaszonym metanolem. W przypadku mieszanek paszowych, część ekstraktu jest oczyszczana przez ekstrakcję do fazy stałej z wykorzystaniem wkładu filtrującego C_{18} . Diklazuril jest eluowany z wkładu filtrującego zakwaszonym wodnym roztworem metanolu. Po odparowaniu pozostałość jest rozpuszczana w DMF/woda. W przypadku premiksów ekstrakt jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana w DMF/woda. Zawartość diklazurilu jest oznaczana metodą HPLC z odwróconą fazą i potrójnym gradientem przy zastosowaniu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Woda, o czystości do HPLC.

3.2. Octan amonu.

3.3. Kwaśny siarczan tetrabutylamonowy (TBHS).

3.4. Acetonitryl, o czystości do HPLC.

3.5. Metanol, czysty do HPLC.

3.6. N,N-dwumetyloformamid (DMF).

3.7. Kwas chlorowodorowy, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$.

3.8. Substancja wzorcowa: diklauril (+)-4-chlorofenyl[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2-yl)fenyl]oacetonyl o gwarantowanej czystości, E 771.

3.8.1. Roztwór wzorcowy podstawowy diklaurilu, 500 µg/ml.

Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg diklaurilu (3.8) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (3.6), uzupełnić do kreski DMF (3.6) i zamieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć oranżowego szkła i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór jest stabilny przez 1 miesiąc.

3.8.2. Roztwór wzorcowy diklaurilu, 50 µg/ml.

Przenieść 5,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.8.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do kreski DMF (3.6) i zamieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć oranżowego szkła i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór jest stabilny przez 1 miesiąc.

3.9. Wzorzec wewnętrzny: 2,6-dwuchloro- α -(4-chlorofenyl)-4-(4,5dihydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2(3H)-yl) α -metylobenzeno-acetonitryl.

3.9.1. Roztwór wzorca wewnętrznego, 500 µg/ml.

Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg wzorca wewnętrznego (3.9) do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF (3.6), uzupełnić do kreski DMF (3.6) i zamieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć oranżowego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór jest stabilny przez 1 miesiąc.

3.9.2. Roztwór wzorca wewnętrznego, 50 µg/ml.

Przenieść 5,00 ml roztworu wzorca (3.9.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do wymaganej objętości DMF (3.6) i wymieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub przelać zawartość do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność przez 1 miesiąc.

3.9.3. Roztwór wzorca wewnętrznego do premiksów, p/1000 mg/ml (p = nominalna zawartość diklaurilu w premiksie w mg/kg).

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, p/10 mg wewnętrznej substancji wzorcowej do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w DMF (3.6) w kąpeli ultradźwiękowej, uzupełnić DMF do wymaganej objętości i zamieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub przelać zawartość do kolby z przyciemnionego szkła i umieścić w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność przez 1 miesiąc.

3.10. Roztwór wzorcowy kalibracyjny, 50 µg/ml.

Odmierzyć pipetą 2,00 ml wzorcowego roztworu diklaurilu (3.8.2) i 2,00 ml wewnętrznego roztworu wzorcowego (3.9.2) do kolby o pojemności 50 ml z podziałką. Dodać 16 ml DMF (3.6), uzupełnić do kreski wodą i zamieszać. Roztwór należy sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Stały wkład ekstrakcyjny C18, np. Bond Elut, objętość: 1 cm³, masa sorbentu: 100 mg.

3.12. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny: zakwaszony metanol.

Odmierzyć pipetą 5,0 ml kwasu chlorowodorowego (3.7) do 1000 ml metanolu (3.5) i wymieszać.

3.13. Faza ruchoma do HPLC.

Eluent A: octan amonu – roztwór kwaśnego siarczanu tetrabutylamonu.

3.13.1. Rozpuścić 5 g octanu amonu (3.2) i 3,4 g TBHS (3.3) w 1000 ml wody (3.1) i zamieszać.

3.13.2. Eluent B: acetonitryl (3.4).

3.13.3. Eluent C: metanol (3.5).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wstrząsarka mechaniczna.

4.2. Sprzęt do HPLC z potrójnym gradientem.

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

4.2.2. Detektor UV ze zmienną długością fali lub detektor diodowy.

4.3. Obrotowa wyparka próżniowa.

4.4. Filtr membranowy 0,45 µm.

4.5. Próżniowy przewód rozgałęźny.

4.6. Łażnia ultradźwiękowa.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Ślepa próba paszy

Należy przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu upewnienia się, czy nie występują w niej diklauril ani substancje zakłócające. Rodzaj ślepej próby paszy powinien być podobny do rodzaju próbki badanej, a analiza powinna potwierdzić brak diklaurilu i substancji zakłócających.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku powinno być przeprowadzone na drodze analizy ślepej próby paszy, do której dodano taką ilość diklaurilu, która występuje w próbce. W celu uzyskania zawartości na poziomie 1 mg/kg dodać 0,1 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.8.1) do 50 g ślepej próby paszy, starannie wymieszać i pozostawić na 10 minut, a następnie mieszać jeszcze kilkakrotnie przed użyciem (5.2).

Alternatywnie, gdy nie ma ślepej próby paszy zbliżonej typem do próbki badanej (5.1.1), badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest wzbogacana diklaurilem, w ilości podobnej do występującej w próbce. Ta próbka ta jest analizowana razem z próbką bez zwiększonej zawartości diklaurilu, a odzysk może być obliczony przez odejmowanie.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Pasze

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 50 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (3.9.2), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce (4.1) przez całą noc. Pozostawić na 10 minut dla odstania. Przelać 20 ml sklarowanej cieczy do

odpowiedniego szklanego naczynia i rozcieńczyć 20 ml wody. Przenieść roztwór na wkład ekstrakcyjny (3.11) i przepuścić przez wkład, stosując podciśnienie (4.5). Przepłukać wkład 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego i wody, 65 + 35 (V + V). Odrzucić zebrane frakcje i eluować związki, stosując 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.12) i wody, 80 + 20 (V + V). Odparować tę frakcję do momentu osuszenia za pomocą wyparki obrotowej (4.3) w temperaturze 60°C. Rozpuścić suchą pozostałość w 1,0 ml DMF (3.6), dodać 1,5 ml wody (3.1) i wymieszać. Przesączyć przez sączonek membranowy (4.4). Przystąpić do analizy HPLC (5.3).

5.2.2. Premiksy

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 1 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego (3.9.3), 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego (3.12) i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce (4.1) przez całą noc. Pozostawić na 10 minut dla odstania. Przenieść część 10000/p ml (p = nominalna zawartość diklazurolu w premiksie w mg/kg) sklarowanej cieczy nad osadem do kolby okrągłodennej o odpowiedniej pojemności. Odparować do momentu osuszenia, pod obniżonym ciśnieniem, w temperaturze 60°C przy użyciu wyparki obrotowej (4.3). Ponownie rozpuścić suchą pozostałość w 10,0 ml DMF (3.6), dodać 15,0 ml wody (3.1) i wymieszać. Przystąpić do analizy HPLC (5.3).

5.3. Analiza HPLC

5.3.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna chromatograficzna (4.2.1):	100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS wypełnienie 3 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.9):	Eluent A (3.13.1): wodny roztwór octanu amonu i kwaśnego siarczanu tetrabutylamoniowego Eluent B (3.12.2): acetonitryl Eluent C (3.13.3): metanol
Sposób elucji:	– gradient liniowy – warunki początkowe: A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v) – po 10 minutach elucja gradientowa przez 30 minut do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v) Płukać eluentem B przez 10 minut
Przepływ:	1,5 – 2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	280 nm
Dozowana objętość:	20 µl

Określić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.10) o stężeniu 2,0 µg/ml, aż do uzyskania pików o stałej wysokości i powtarzalnych czasach retencji.

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.3.2. Roztwór kalibracyjny

Wprowadzić kilkakrotnie 20 µl roztworu kalibracyjnego (3.10) i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla diklazurolu i wzorca wewnętrznego.

5.3.3. Roztwór próbki

Dozować kilkakrotnie 20 µl roztworu próbki (5.2.1) lub (5.2.2) i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla diklazurolu i wzorca wewnętrznego.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

6.1. Mieszanki paszowe

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

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{\delta_{d,c} \times 10V}{m} \quad [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

$h_{d,s}$ – wysokość pików (powierzchnia) diklazurolu w roztworze próbki (5.2.1),

$h_{i,s}$ – wysokość pików (powierzchnia) wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (5.2.1),

$h_{d,c}$ – wysokość pików (powierzchnia) diklazurolu w roztworze kalibracyjnym (3.10),

$h_{i,c}$ – wysokość pików (powierzchnia) wzorca wewnętrznego w roztworze kalibracyjnym (3.10),

$\delta_{d,c}$ – stężenie diklazurolu w roztworze kalibracyjnym w µg/ml (3.10),

m – masa próbki analitycznej, w g,

V – objętość ekstraktu próbki według (5.2.1) (tj. 2,5 ml).

6.2. Premiksy

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

$$W = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{\delta_{d,c} \times 0,02 V \times p}{m} \quad [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

- $h_{d,c}$ – wysokość pików (powierzchnia) diklazurolu w roztworze kalibracyjnym (3.10),
- $h_{i,c}$ – wysokość pików (powierzchnia) wzorca wewnętrznego w roztworze kalibracyjnym (3.10),
- $h_{d,s}$ – wysokość pików (powierzchnia) diklazurolu w roztworze próbki (5.2.2),
- $h_{i,s}$ – wysokość pików (powierzchnia) wzorca wewnętrznego w roztworze próbki (5.2.2),
- $\delta_{d,c}$ – stężenie diklazurolu w roztworze kalibracyjnym (3.10),
- m – masa odważki analitycznej, w g,
- V – objętość ekstraktu próbki według (5.2.2) (tj. 25 ml),
- p – nominalna zawartość diklazurolu w premiksie, w mg/kg.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość substancji analizowanej może być potwierdzona przez równoległą chromatografię (kochromatografia) lub zastosowanie detektora diodowego, za pomocą którego porównuje się widma ekstraktu próbki (5.2.1) lub (5.2.2) i roztworu kalibracyjnego (3.10).

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki (5.2.1) lub (5.2.2) jest wzbogacany przez dodatek odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.10). Ilość dodanego diklazurolu powinna być podobna do ilości diklazurolu znajdującej się w ekstrakcie próbki.

Wzrastać powinna tylko wysokość pików diklazurolu i pików wzorca wewnętrznego, po uwzględnieniu dodanej ilości i stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach $\pm 10\%$ szerokości pierwotnej pików diklazurolu lub wzorca wewnętrznego w stosunku do pików ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

- (a) Długość fali maksimum absorpcji dla spektrum próbki i wzorca, mierzona w szczytowym punkcie pików chromatogramu, powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcyjnego. Dla detektora diodowego zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm.
- (b) Pomiędzy 230 a 320 nm spektra próbki i wzorca, zarejestrowane w szczytowym punkcie pików chromatogramu, nie powinny się różnić więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorpcji. To kryterium jest spełnione, gdy występują takie same maksima i gdy odchylenia między tymi dwoma widmami we wszystkich obserwowanych punktach nie przekraczają 15% absorpcji wzorcowego analitu.
- (c) Pomiędzy 230 a 320 nm spektra narastającego zbocza, wierzchołka i obniżającego się zbocza pików uzyskiwanych z ekstraktów próbek nie powinny się różnić od siebie więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorpcji. To kryterium jest spełnione, gdy występują te same maksima i gdy wszystkie obserwowane punkty odchylen między spektrami nie przekraczają 15% absorpcji najwyższego pików widma.

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

7.2. Powtarzalność

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

- 30% najwyższego wyniku, dla zawartości diklazurolu od 0,5 mg/kg do 2,5 mg/kg,
- 0,75 mg/kg, dla zawartości diklazurolu powyżej 2,5 mg/kg do 5 mg/kg,
- 15% najwyższego wyniku, dla zawartości diklazurolu powyżej 5 mg/kg.

7.3. Odzysk

W przypadku fortyfikacji ślepej próby paszy odzysk powinien wynosić co najmniej 80%.

8. OBJAŚNIENIA

Należy uprzednio sprawdzić, czy wysokości (powierzchnie) pików diklazurolu zmieniają się liniowo w zakresie mierzonych stężeń.

7.6. OZNACZANIE KARBADOKSU

(metylo 3-(2-chinoksalinylo)metyleno)pikrynian N¹,N⁴-dwutlenek)

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości karbadoksu w paszach, premiksach i preparatach. Granica wykrywalności wynosi 0,1 mg/kg, a granica oznaczalności wynosi 10 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Próbka jest zwilżana wodą i poddawana ekstrakcji za pomocą mieszaniny metanolu i acetonitrylu. W przypadku mieszanek paszowych część przesączonego ekstraktu zostaje oczyszczona w kolumnie z tlenkiem glinu. W przypadku premiksów i preparatów część przesączonego ekstraktu zostaje rozcieńczona do odpowiedniego stężenia wodą, metanolem i acetonitrylem. Zawartość karbadoksu oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej o odwróconej fazie (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- 3.1. Metanol.
- 3.2. Acetonitryl, klasy HPLC.
- 3.3. Kwas octowy, w = 100%.
- 3.4. Tlenek glinu: obojętny, stopień aktywności I.
- 3.5. Metanol – acetonitryl 1 + 1 (v + v).
- Zmieszać 500 ml metanolu (3.1) z 500 ml acetonitrylu (3.2).
- 3.6. Kwas octowy, $\sigma = 10\%$.
- Rozcieńczyć 10 ml kwasu octowego (3.3) wodą do 100 ml.

3.7. Octan sodu, CH_3COONa .

3.8. Woda o czystości do HPLC.

3.9. Roztwór buforowy octanowy, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.

Rozpuścić 0,82 g octanu sodu (3.7) w 700 ml wody (3.8) i doprowadzić pH do 6,0 kwasem octowym (3.6). Przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, uzupełnić wodą (3.8) do kreski i wymieszać.

3.10. Faza ruchoma do HPLC.

Zmieszać 825 ml roztworu buforu octanowego (3.9) i 175 ml acetonitrylu (3.2). Przesączyć przez sączonek przeponowy $0,22 \mu\text{m}$ (4.5) i odgazować roztwór (np. w łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut).

3.11. Substancja wzorcowa: czysty karbadoks: metylo 3-(2-chinoksalinylo-metyleno) pikrynian N^1 , N^4 -dwutlenek, E 850.

3.11.1. Roztwór wzorcowy podstawowy karbadoksu, $100 \mu\text{g/ml}$ (5).

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg wzorca karbadoksu (3.11) do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Rozpuścić w mieszaninie metanolu i acetonitrylu (3.5) w łaźni ultradźwiękowej (4.7). Po działaniu ultradźwięków doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do kreski mieszaniną metanolu i acetonitrylu (3.5) i zamieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć szkła oranżowego i umieścić w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność przez 1 miesiąc.

3.11.2. Roztwory wzorcowe kalibracyjne.

Przenieść 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.11.1) do kolb miarowych o pojemności 100 ml. Dodać 30 ml wody, uzupełnić do kreski mieszaniną metanolu i acetonitrylu (3.5) i zamieszać. Kolbę owinać folią aluminiową. Roztwory te odpowiadają 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu. Roztwory wzorcowe należy sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

W celu oznaczenia karbadoksu w mieszkankach paszowych zawierających poniżej 10 mg/kg, należy użyć roztworów wzorcowych o stężeniu poniżej 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

3.12. Mieszanina wody-[metanolu i acetonitrylu] (3.5), $300 + 700 (v + v)$.

Zmieszać 300 ml wody z 700 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu (3.5).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wstrząsarka laboratoryjna lub mieszadło magnetyczne.

4.2. Sączonek papierowy z włóknem szklanym (Whatman GF/A lub podobny).

4.3. Szklana kolumna (długość 300 do 400 mm, wewnętrzna średnica około 10 mm) ze spiekami szklanymi oraz zaworem odpływowym.

Można użyć również kolumny szklanej z kurkiem lub ze ściętym końcem, w takim przypadku w dolnym końcu umieszcza się zwitek waty szklanej, ubity szklanym prętem.

4.4. Sprzęt do HPLC z dozownikiem umożliwiającym dozowanie 20 μl .

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 300 mm x 4 mm, C_{18} , wypełnienie $10 \mu\text{m}$ lub równoważne.

4.4.2. Detektor UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy pracujący w zakresie 225 do 400 nm.

4.5. Sączonek membranowy, $0,22 \mu\text{m}$.

4.6. Sączonek membranowy, $0,45 \mu\text{m}$.

4.7. Łaźnia ultradźwiękowa.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Karbadoks jest wrażliwy na działanie światła. Wszystkie czynności wykonywać przy słabym świetle lub używać szkła oranżowego, lub owijać szkło folią aluminiową.

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Ślepa próba paszy

Dla potrzeb przeprowadzenia testu odzysku należy przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu upewnienia się, czy nie występują w niej karbadoks i substancje zakłócające. Rodzaj ślepej próby paszy powinien być podobny do rodzaju próbki, a analiza powinna potwierdzić brak karbadoksu i substancji zakłócających.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku powinno być przeprowadzone na drodze analizy ślepej próby paszy, do której dodano ilość karbadoksu, podobną do już występującej w próbce. W celu uzyskania zawartości na poziomie 50 mg/kg dodać 5,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.11.1) do kolby stożkowej 200 ml. Odparować roztwór w strumieniu azotu. Dodać 10 g ślepej próby paszy, starannie wymieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji (5.2).

Alternatywnie, jeżeli nie ma próbki paszy o typie zbliżonym do próbki badanej (5.1.1), badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodatku wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest uzupełniana ilością karbadoksu podobną do już obecnej w próbce. Próbkę ta jest poddawana analizie wraz z próbką bez zwiększonej zawartości karbadoksu i odzysk może być obliczony przez odejmowanie.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Mieszanki paszowe

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 10 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml, dodać 15,0 ml wody, wymieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35,0 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu (3.5), zamknąć korkiem i wstrząsać przez 30 minut na wstrząsarce lub mieszać na mieszadło magnetycznym (4.1). Przesączyć ekstrakt przez sączonek papierowy z włóknem szklanym (4.2). Zachować ten roztwór do etapu oczyszczania (5.3).

5.2.2. Premiksy (0,1 do 2,0%)

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 1 g niezmielonej próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml, dodać 15,0 ml wody, wymieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu 1 + 1 (v + v) (3.5), zamknąć korkiem i wstrząsać przez 30 minut na wstrząsarce lub mieszać na mieszadło magnetyczne (4.1). Przetłoczyć na sączonek papierowy z włóknem szklanym (4.2). Pipetą przenieść część przesączonego ekstraktu do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 15 ml wody, uzupełnić do kreski metanolem z acetonitrylem (3.5) i wymieszać.

Stężenie karbadoksu w roztworze końcowym powinno wynieść około 10 µg/ml. Część roztworu sączona jest przez sączonek 0,45 µm (4.6). Przystąpić do analizy HPLC (5.4).

5.2.3. Preparaty (powyżej 2,0%)

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 0,1 g niezmielonej próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml, dodać 45,0 ml wody, wymieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 105 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu (3.5), zamknąć korkiem, poddawać działaniu ultradźwięków przez 15 minut i pozostawić mieszaninę na wstrząsarce (4.1) na 15 minut. Przesączyć przez sączonek papierowy z włóknem szklanym (4.2). Rozcieńczyć część przesączonego ekstraktu mieszaniną wody, metanolu i acetonitrylu (3.5) do ostatecznego stężenia karbadoksu 10 – 15 µg/ml (w preparatach o 10% zawartości karbadoksu współczynnik rozcieńczania wynosi 10). Część ekstraktu przesączyć przez sączonek 0,45 µm (4.6). Przystąpić do analizy HPLC (5.4).

5.3. Oczyszczanie

5.3.1. Przygotowanie kolumny tlenku glinu

Odważyć 4 g tlenku glinu (3.4) i przenieść do szklanej kolumny (4.3).

5.3.2. Czyszczenie próbki

Umieścić 15 ml odfiltrowanego ekstraktu (5.2.1) w kolumnie z tlenkiem glinu i usunąć pierwsze 2 ml eluatu. Następnie pobrać 5 ml i przesączyć część roztworu przez sączonek 0,45 µm (4.6). Przystąpić do analizy HPLC (5.4).

5.4. Analiza HPLC

5.4.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna do chromatografii ciekowej (4.4.1):	300 mm x 4 mm, faza odwrócona C ₁₈ , wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.10):	Mieszanina buforu octanowego (3.9) i acetonitrylu (3.2), 825 + 175 (V + V)
Przepływ:	1,5 – 2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	365 nm
Dozowana objętość:	20 µl

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

Określić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.11.2) o stężeniu 5,0 µg/ml, aż do uzyskania pików o stałej wysokości (lub powierzchni) i powtarzalnych czasach retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Dozować kilkakrotnie każdy roztwór wzorcowy (3.11.2) i oznaczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości pików lub powierzchnie roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki

Dozować kilkakrotnie ekstrakt próbki ((5.3.2) dla pasz, (5.2.2) dla premiksów i (5.3.2) dla preparatów) i oznaczyć średnią wysokość (powierzchnię) pików karbadoksu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średnich wysokości (powierzchni) pików karbadoksu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml z wykresu kalibracyjnego (5.4.2).

6.1. Mieszanki paszowe

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\delta \times V_1}{m} [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

δ – stężenie karbadoksu w ekstrakcie próbki (5.3.2), w µg/ml,

V₁ – objętość ekstraktu próbki w ml (tzn. 50),

m – masa próbki analitycznej, w g.

6.2. Premiksy i preparaty

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\delta \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

δ – stężenie karbadoksu w ekstrakcie próbki (5.2.2) lub (5.2.3) w µg/ml,

V₂ – objętość ekstraktu próbki w ml (tzn. 50 dla premiksów, 150 dla preparatów),

f – współczynnik rozcieńczenia w g dla premiksów (5.2.2) lub dla preparatów (5.2.3),

m – masa próbki analitycznej, w g.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość analizowanej substancji może być potwierdzona przez równoległą chromatografię (kochromatografia) lub zastosowanie detektora diodowego, za pomocą którego porównuje się widma ekstraktu próbki (5.2.1) lub (5.2.2) i roztworu kalibracyjnego (3.10) o stężeniu karbadoksu 10,0 µg/ml.

7.1.1. Kochromatografia

Do ekstraktu próbki dodawana jest odpowiednia ilość roztworu wzorcowego. Ilość dodanego karbadoksu powinna być zbliżona do ilości karbadoksu stwierdzonej w ekstrakcie próbki.

Zwiększona powinna być tylko wysokość pików karbadoksu stosownie do dodanej ilości wzorca i stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach 10% szerokości pierwotnej.

7.1.2. Detekcja diodowa

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

(a) Długość fali maksimum absorpcji dla spektrum próbki i wzorca, mierzona w szczytowym punkcie pików chromatogramu, powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcyjnego. Dla detektora diodowego zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm.

(b) Pomiędzy 225 a 400 nm spektra próbki i wzorca, zarejestrowane w szczytowym punkcie pików chromatogramu, nie powinny się różnić więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorbancji. To kryterium jest spełnione, gdy występują takie same maksima i gdy odchylenia między tymi dwoma widmami we wszystkich obserwowanych punktach nie przekraczają 15% absorbancji wzorcowego analitu.

(c) Pomiędzy 225 a 400 nm spektra narastającego zbocza, wierzchołka i obniżającego się zbocza pików uzyskiwanych z ekstraktów próbek nie powinny się różnić od siebie więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorbancji. To kryterium jest spełnione, gdy występują te same maksima i gdy wszystkie obserwowane punkty odchylen między spektrami nie przekraczają 15% absorbancji najwyższego pików widma.

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

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15% najwyższego wyniku, dla zawartości karbadoksu 10 mg/kg i więcej.

7.3. Odzysk

W przypadku fortyfikacji ślepej próby paszy odzysk powinien wynosić co najmniej 90%.

7.7. OZNACZANIE OLAQUINDOKSU

(2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksalino-N¹,N⁴-dioksyd)

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości olaquindoksu w paszach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 5 mg/kg.

2. ZASADA METODY

Próbka jest ekstrahowana mieszaniną wody i metanolu. Zawartość olaquindoksu jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w fazie odwróconej przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Metanol.

3.2. Metanol, czysty do HPLC.

3.3. Woda, czysta do HPLC.

3.4. Faza ruchoma do HPLC:

Mieszanina: wody (3.3) i metanolu (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5. Substancja wzorcowa: czysty olaquindoks (2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksalino-N¹,N⁴-dioksyd, E 851.

3.5.1. Roztwór wzorcowy podstawowy olaquindoksu, 250 µg/ml.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg olaquindoksu (3.5) do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać około 190 ml wody. Następnie umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej (4.1) na 20 minut. Po działaniu ultradźwięków doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Roztwór powinien być przygotowywany każdego miesiąca.

3.5.2. Roztwór wzorcowy pośredni olaquindoksu, 25 µg/ml.

Przenieść 10 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.5.1) do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do kreski fazą ruchomą (3.4) i wymieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Roztwór powinien być przygotowywany każdego dnia.

3.5.3. Roztwory kalibracyjne.

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 15,0 i 20,0 ml pośredniego roztworu wzorcowego (3.5.2). Uzupełnić do kreski fazą ruchomą (3.4) i wymieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, i 10 µg olaquindoksu / ml.

Roztwory powinny być przygotowywane każdego dnia.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.2. Wstrząsarka mechaniczna.

4.3. Aparat do HPLC z detektorem o zmiennej długości fali lub detektorem diodowym.

4.3.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 250 mm x 4 mm, wypełnienie C₁₈, 10 µm lub równoważne.

4.4. Sączek membranowy, 0,45 µm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Olaquindoks jest wrażliwy na światło. Prowadzić całe postępowanie przy ograniczonym dostępie światła lub używając szkła oranżowego.

5.1. Wskazówki ogólne

5.1.1. Należy poddać analizie ślepą próbę paszy celem potwierdzenia braku olaquindoksu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku należy przeprowadzić, poddając analizie ślepą próbę paszy z dodatkiem ilości olaquindoksu, podobnej do tej, która występuje w badanej próbce. W celu wprowadzenia dodatku na poziomie 50 mg/kg przenieść 10 ml podstawowego roztworu wzorcowego (3.5.1) do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do około 0,5 ml. Dodać 50 g wyjściowej paszy bez olaquindoksu, dokładnie wymieszać i pozostawić na 10 minut, kilkakrotnie mieszając przed przystąpieniem do etapu ekstrakcji (5.2).

W celu właściwego wykonania analizy ślepa próba paszy powinna być typu podobnego do badanych próbek, a olaquindoks nie powinien być w niej obecny.

5.2. Ekstrakcja

Odważyć, z dokładnością 0,01 g, około 50 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 1000 ml, dodać 100 ml metanolu (3.1) i umieścić na 5 minut w łaźni ultradźwiękowej (4.1). Dodać 410 ml wody i pozostawić w łaźni ultradźwiękowej na następne 15 minut. Przenieść kolbę z łaźni i wstrząsać przez 30 minut przy użyciu wstrząsarki mechanicznej (4.2), następnie przesączyć przez pofałdowany sącze. Przenieść 10 ml przesącza do kolby miarowej o pojemności 20 ml, uzupełnić wodą do kreski i zamieszać. Przesączyć część roztworu przez sącze membranowy (4.4) uwzględnić (9). Przystąpić do analizy HPLC (5.3).

5.3. Analiza HPLC

5.3.1. Parametry

Poniższe parametry oznaczania podano jako przykładowe.

Kolumna chromatograficzna (4.3.1):	250 mm x 4 mm, wypełnienie C ₁₈ , 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (3.4):	mieszanina wody (3.3) i metanolu (3.2), 900 + 100 (V + V)
Przepływ:	1,5 – 2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	380 nm
Dozowana objętość:	20 µl – 100 µl.

Określić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny (3.5.3) o stężeniu 2,5 µg/ml, aż do uzyskania pików o stałej wysokości i powtarzalnych czasach retencji.

Można zastosować inne parametry pozwalające uzyskać równoważne wyniki.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna

Dozować każdy kalibracyjny roztwór (3.5.3) kilka razy i określić średnią wysokość pików (pole powierzchni) dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, zaznaczając średnie wysokości pików (pola powierzchni) na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Dozować ekstrakt próbki (5.2) kilka razy, stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (pole powierzchni) pików olaquindoksu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości pików (pola powierzchni) olaquindoksu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml na podstawie krzywej kalibracyjnej (5.3.2).

Zawartość olaquindoksu w próbce w mg/kg obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

gdzie:

c – stężenie olaquindoksu w ekstrakcie próbki (5.2), w µg/ml,

m – masa próbki analitycznej, w g (5.2).

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości

Tożsamość analitu może być potwierdzona za pomocą kochromatografii lub po zastosowaniu detektora diodowego, w którym spektra ekstraktu próbki (5.2) i roztworu kalibracyjnego (3.5.3) o stężeniu 5 µg/ml są porównywane.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakt próbki (5.2) wzbogaca się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego (3.5.3). Ilość dodanego olaquindoksu powinna być podobna do ilości olaquindoksu w ekstrakcie próbki. Wzrosnąć powinna tylko wysokość pików olaquindoksu w stopniu zależnym od ilości dodanego olaquindoksu i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie wysokości powinna odpowiadać z dokładnością ±10% szerokości pików pierwotnej próbki otrzymanej z badanego ekstraktu.

7.1.2. Detekcja z użyciem detektora diodowego

Wyniki są oceniane według następujących kryteriów:

(a) Długość fali, przy której występuje maksimum absorpcji próby i wzorca, oznaczona w szczytowym punkcie pików chromatogramu, nie powinna przekraczać zdolności rozdzielczej systemu detekcji. Dla detektora diodowego zdolność rozdzielcza wynosi ± 2 nm.

(b) Pomiędzy 220 i 400 nm spektra próbki i wzorca, rejestrowane w szczytowym punkcie pików chromatografu, nie powinny się różnić więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorpcji. To kryterium jest spełnione, gdy występują takie same maksima i gdy odchylenia między tymi dwoma widmami we wszystkich obserwowanych punktach nie przekraczają 15 % absorpcji wzorcowego analitu.

(c) Pomiędzy 220 a 400 nm spektra narastającego zbocza, wierzchołka i obniżającego się zbocza pików uzyskiwanych z ekstraktów próbek nie powinny się różnić od siebie więcej niż w przedziale 10 – 100% względnej absorpcji. To kryterium jest spełnione, gdy występują te same maksima i gdy wszystkie obserwowane punkty odchylen pomiędzy spektrami nie przekraczają 15% absorpcji najwyższego pików widma.

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

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15% najwyższego wyniku, dla zawartości olaquindoksu od 10 mg/kg do 20 mg/kg.

7.3. Odzysk

Odzysk olaquindoksu dodanego do ślepej próby paszy nie może być niższy od 90%.

8. OBJAŚNIENIA

Chociaż metoda nie była sprawdzana dla pasz zawierających więcej niż 100 mg/kg olaquindoksu, jednak jest możliwe otrzymanie zadowalających wyników poprzez zmniejszenie odważki analitycznej lub rozcieńczenie ekstraktu (5.2) celem otrzymania stężenia w zakresie krzywej kalibracyjnej (5.3.2).

ROZDZIAŁ 8

BADANIE SUBSTANCJI I MATERIAŁÓW NIEPOŻĄDANYCH I SZKODLIWYCH

8.1. OZNACZANIE AFLATOKSYNY B₁ METODĄ JEDNOKIERUNKOWEJ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości aflatoksyny B₁ w paszach jednoskładnikowych. Metody nie można stosować w obecności pulpy cytrusowej. Granica oznaczalności metody wynosi 0,01 mg/ kg (10 ppb).

W obecności substancji interferujących konieczne jest powtórzenie oznaczania metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.

2. ZASADA METODY

Próbka jest poddawana ekstrakcji chloroformem. Ekstrakt jest sączony, a jego część poddawana oczyszczaniu metodą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym. Eluat jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana ponownie w ściśle określonej objętości chloroformu lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu. Część tego roztworu jest poddawana chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Zawartość aflatoksyny B₁ jest oznaczana poprzez naświetlanie chromatogramu lampą UV, wizualnie lub fluorodensytometrycznie, przez porównanie ze znaną ilością substancji wzorcowej aflatoksyny B₁. Identyfikacja aflatoksyny B₁ wyekstrahowanej z paszy powinna być potwierdzona poprzez postępowanie identyfikacyjne.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Wszystkie odczynniki powinny mieć jakość „czysty do analizy”, jeżeli nie zaznaczono inaczej.

3.1. Aceton.

3.2. Chloroform, stabilizowany dodatkiem alkoholu etylowego 96% w ilości od 0,5 do 1,0% (V/V) .

3.3. N-heksan.

3.4. Metanol.

3.5. Eter dwuetylowy bezwodny, wolny od nadtlenu.

3.6. Mieszanina benzenu i acetonitrylu: 98/2 (V/V).

3.7. Mieszanina chloroformu (3.2) i metanolu (3.4): 97/3 (V/V).

3.8. Żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej, średnica cząstek od 0,05 do 0,20 mm.

3.9. Wata bawełniana odfuszczone chloroformem lub wata szklana.

3.10. Siarczan sodu bezwodny, granulowany.

3.11. Gaz obojętny, np. azot.

3.12. Kwas chlorowodorowy (1 N).

3.13. Kwas siarkowy 50% (V/V).

3.14. Ziemia okrzemkowa (hyflosupel), przemywana kwasem.

3.15. Żel krzemionkowy G-HR lub podobny, do TLC.

3.16. Roztwór wzorcowy zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B₁ w mililitrze chloroformu (3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (3.6), przygotowany i sprawdzony jak podano w (7).

3.17. Roztwór wzorcowy do testów identyfikacyjnych zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B₁ i B₂ w mililitrze chloroformu (3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (3.6). Stężenia aflatoksyn podano przykładowo. Stężenia te powinny być tak dobrane, aby otrzymać taką samą intensywność fluorescencji dla obu aflatoksyn.

3.18. Rozpuszczalniki rozwijające:

3.18.1. Chloroform (3.2) / aceton (3.1): 9/1 (V/V), komora nienasycona.

3.18.2. Eter dwuetylowy (3.5) / metanol (3.4) / woda: 96/3/1 (V/V/V), komora nienasycona.

3.18.3. Eter dwuetylowy (3.5) / metanol (3.4) / woda: 94/4,5/1,5 (V/V/V), komora nasycona.

3.18.4. Chloroform (3.2) / metanol (3.4): 94/6 (V/V), komora nasycona.

3.18.5. Chloroform (3.2) / metanol (3.4): 97/3 (V/V), komora nasycona.

4. APARATURA I SPRZĘT

- 4.1. Rozdrabniacz.
- 4.2. Wstrząsarka lub mieszadło magnetyczne.
- 4.3. Karbowany sącze papierowy Schleicher i Schull Nr 588 lub podobny, średnica 24 cm.
- 4.4. Kolumna szklana do chromatografii (średnica wewnętrzna: 22 mm, długość: 300 mm), z kurkiem PTFE i zbiornikiem o pojemności 250 ml.
- 4.5. Odparowywacz próżniowy obrotowy z kolbą okrągłodenną o pojemności 500 ml.
- 4.6. Kolba stożkowa, o pojemności 500 ml, z korkiem szklanym.
- 4.7. Zestaw do chromatografii cienkowarstwowej.
- 4.8. Płytki szklane do chromatografii cienkowarstwowej, 200 x 200 mm, przygotowane w następujący sposób (ilość żelu wystarczająca do pokrycia 5 płytek):
Umieścić 30 g żelu krzemionkowego G-HR (3.15) w kolbie stożkowej. Dodać 60 ml wody, zamknąć korkiem i wstrząsać przez 1 minutę. Nanieść mieszaninę na płytki, tak aby uzyskać jednolitą warstwę grubości 0,25 mm. Pozostawić na powietrzu do wyschnięcia, a następnie przechowywać w eksykatorze zawierającym żel krzemionkowy. Z chwilą użycia aktywować płytki przez wstawienie do suszarki o temperaturze 110°C na 1 godzinę.
Płytki nadają się do użycia, jeżeli dają wyniki podobne do tych uzyskanych wcześniej, na płytkach przygotowanych jak powyżej.
- 4.9. Lampa UV o długiej fali (360 nm). Intensywność promieniowania lampy powinna umożliwić, z odległości 10 cm, rozróżnienie plamki zawierającej 1 ng aflatoksyny B₁ nałożonej na płytkę TLC.
- 4.10. Probówka skalowana o pojemności 10 ml, z polietylenowymi korkami.
- 4.11. Spektrofotometr UV.
- 4.12. Fluorodensytometr (do wyboru).

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbki

Rozdrobnić próbkę, tak aby w całości przechodziła przez 1 mm oczko sita.

Jeżeli po przygotowaniu próbki zawierają więcej niż 5% tłuszczów, należy je odtłuścić ropą naftową (temperatura wrzenia 40-60 °C). W takich przypadkach uzyskane wyniki należy przedstawić w odniesieniu do masy nieodtłuszczonej próbki.

5.2. Ekstrakcja

Umieścić 50 g rozdrobnionej, homogennej próbki w kolbie stożkowej o pojemności 500 ml (4.6). Dodać 25 g ziemi okrzemkowej (3.14), 25 ml wody i 250 ml chloroformu (3.2). Zamknąć kolbę, wstrząsać lub mieszać przez 30 minut na urządzeniu (4.2) i przesączyć przez karbowany sącze (4.3). Odrzucić pierwsze 10 ml przesączu, a następnie zebrać 50 ml.

5.3. Oczyszczanie na kolumnie

Umieścić w dolnym końcu szklanej kolumny chromatograficznej (4.4) zwitek bawełnianej lub szklanej waty (3.9), napęścić dwie trzecie rurki chloroformem (3.2) i dodać 5 g siarczanu sodu (3.10).

Sprawdzić, czy górna powierzchnia siarczanu sodowego jest płaska, następnie dodawać małymi porcjami 10 g żelu krzemionkowego (3.8). Lekko wstrząsnąć po każdym dodatku w celu usunięcia pęcherzyków powietrza. Pozostawić na 15 minut, a następnie ostrożnie dodać 15 g siarczanu sodowego (3.10). Pozwolić, aby poziom cieczy obniżył się do chwili, aż znajdzie się tuż nad warstwą siarczanu sodu.

Zmieszać 50 ml ekstraktu zebranego zgodnie z (5.2) z 100 ml n-heksanu (3.3) i przenieść ilościowo mieszaninę na kolumnę. Pozwolić, aby poziom cieczy obniżył się, aż znajdzie się nad warstwą siarczanu sodu. Wyciek z kolumny odrzucić. Następnie dodać 100 ml eteru dwuetylowego (3.5) i znowu pozwolić, aby poziom cieczy obniżył się, aż znajdzie się nad warstwą siarczanu sodu. W czasie tych czynności należy uważać, aby szybkość przepływu wynosiła od 8 do 12 ml na minutę i aby wypełnienie kolumny nie pozostawało suche. Odrzucić wyciek. Eluować kolumnę przy użyciu 150 ml mieszaniny chloroformu i metanolu (3.7) i zebrać cały eluat.

Odparować eluat prawie do sucha w temperaturze nie wyższej niż 50°C w strumieniu obojętnego gazu (3.11) na odparowywaczu obrotowym (4.5). Przenieść ilościowo pozostałość, przy użyciu chloroformu (3.2) lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu (3.6), do skalowanej probówki o pojemności 10 ml (4.10). Zatężyć roztwór przez odparowanie rozpuszczalnika w strumieniu obojętnego gazu (3.11), a następnie uzupełnić do 2 ml chloroformem (3.2) lub mieszaniną benzenu i acetonitrylu (3.6).

5.4. Chromatografia cienkowarstwowa

Nanieść na płytkę TLC (4.8), w odległości 2 cm od dolnego brzegu w odstępach co 2 cm, wskazane poniżej objętości roztworu wzorcowego i ekstraktu:

- 10, 15, 20, 30 i 40 µl roztworu wzorcowego aflatoksyny B₁ (3.16),
- 10 µl ekstraktu otrzymanego według (5.3) i, nałożonego w tym samym punkcie, 20 µl roztworu wzorcowego (3.16),
- 10 i 20 µl ekstraktu otrzymanego według (5.3).

Rozwinąć chromatogram w ciemności, stosując 1 z rozpuszczalników rozwijających (3.18). Wybór rozpuszczalnika powinien być dokonany wstępnie, po nałożeniu 25 µl roztworu wzorcowego do testów identyfikacyjnych (3.17) na płytkę i sprawdzeniu, że aflatoksyny B₁ i B₂ są zupełnie rozdzielone.

Pozwolić, aby rozpuszczalnik odparował z płytki w ciemności, a następnie naświetlić światłem UV, umieszczając płytkę w odległości 10 cm od źródła światła (4.9). Plamki aflatoksyny B₁ charakteryzują się niebieską fluorescencją.

5.5. Oznaczanie ilościowe

Oznaczyć zawartość wizualnie lub przy użyciu fluorodensytometru, jak podano poniżej.

5.5.1. Pomiar wizualny

Oznaczyć ilość aflatoksyny B₁ w ekstrakcie przez dobranie intensywności fluorescencji plamek ekstraktu z intensywnością fluorescencji plamek roztworu wzorcowego. Interpolować w przypadku konieczności. Fluorescencja otrzymana przez nałożenie ekstraktu na roztwór wzorcowy powinna być bardziej intensywna niż fluorescencja 10 µl ekstraktu. Nie może być

widoczna więcej niż jedna plamka. Jeżeli intensywność fluorescencji 10 µl ekstraktu jest większa niż 40 µl roztworu wzorcowego, rozcieńczyć ekstrakt od 10 do 100 razy chloroformem (3.2) lub mieszaniną benzenu i acetonitrylu (3.6) przed poddaniem go chromatografii cienkowarstwowej.

5.5.2. Pomiar fluorodenzytometryczny

Zmierzyć intensywność fluorescencji plamki aflatoksyny B₁ w fluorodenzytometrze (4.12), przy wzbudzeniu 365 nm i emisji 443 nm. Oznaczyć ilość aflatoksyny B₁ w ekstrakcie przez porównanie intensywności fluorescencji plamek z intensywnością plamek wzorca aflatoksyny B₁.

5.6. Potwierdzenie identyczności aflatoksyny B₁

Potwierdzić identyczność aflatoksyny B₁ w ekstrakcie w sposób podany poniżej.

5.6.1. Próba z kwasem siarkowym

Spryskać kwasem siarkowym (3.13) chromatogram otrzymany według (5.4). Fluorescencja plamek aflatoksyny B₁ powinna zmienić się z niebieskiej na żółtą pod lampą UV.

5.6.2. Dwukierunkowa chromatografia powodująca tworzenie hemiacetalu aflatoksyny B₁.

Czynności opisane poniżej przeprowadza się w sposób wskazany na rys. 3.

5.6.2.1. Nanoszenie roztworów

Wyciąć dwie proste linie na płytce (4.8) równoległe do dwóch przyległych boków (w odległości 6 cm od każdego z nich) w celu ograniczenia migracji czoła rozpuszczalnika. Nałożyć następujące roztwory na płytkę, stosując kapilarne pipety lub mikrostrzykawki:

- w punkcie A: oczyszczony ekstrakt próbki otrzymany zgodnie z (5.3), zawierający około 2,5 nm aflatoksyny B₁,
- w punkcie B i C: 25 µl wzorcowego roztworu (3.16).

5.6.2.2. Rozwinięcie

Rozwijać chromatogram w kierunku I w ciemności, wykorzystując rozpuszczalnik (3.18.1) (1 cm warstwa w nienasyconej komorze) do chwili, gdy czoło rozpuszczalnika osiągnie ograniczającą linię.

Wyjąć płytki z komory i pozostawić w celu wyschnięcia w ciemności, w temperaturze pokojowej, przez 5 minut. Następnie rozpylić kwas chlorowodorowy (3.12) wzdłuż pasa do wysokości 2,5 cm, pokrywającego punkty A i B (zakresowane pole na rys. 3), aż do ściemnienia, zabezpieczając pozostałą część płytki szklaną szybą. Pozostawić na 10 minut w ciemności i wysuszyć w strumieniu powietrza w temperaturze otoczenia. Następnie rozwinąć chromatogram w kierunku II w ciemności, stosując rozpuszczalnik rozwijający (3.18.1) (1 cm warstwa rozpuszczalnika w nienasyconej komorze) do czasu, gdy czoło rozpuszczalnika osiągnie linię ograniczającą. Wyjąć płytkę z komory i wysuszyć w temperaturze pokojowej.

5.6.2.3. Interpretacja chromatogramu

Zbadać chromatogram pod lampą UV i zaznaczyć następujące cechy.

- (a) Pojawienie się niebieskiej fluorescencji plamki aflatoksyny B₁ pochodzącej od roztworu wzorcowego nałożonego w punkcie C (migracja w kierunku I).
- (b) Pojawienie się niebieskiej fluorescencji plamki nieprzereagowanej (z kwasem chlorowodorowym) aflatoksyny B₁ i intensywniejszej, niebieskiej fluorescencji plamki hemiacetalu aflatoksyny B₁, pochodzących z roztworu wzorcowego nałożonego w punkcie B (migracja w kierunku II).
- (c) Pojawienie się plamek porównywalnych z opisanymi w lit. b, pochodzących z ekstraktu próbki nałożonego w punkcie A. Położenie tych plamek zależy przede wszystkim od długości drogi migracji aflatoksyny B₁ z punktu A w kierunku I (takiej samej, jaką przebył wzorec nałożony w punkcie C), a następnie od drogi migracji z tego punktu w kierunku II hemiacetalu aflatoksyny B₁ (takiej samej, jaką przebył wzorec nałożony w punkcie B). Intensywność fluorescencji plamki hemiacetalu pochodzących z ekstraktu i wzorca nałożonego w punkcie B powinna być większa.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

6.1. Na podstawie pomiarów wizualnych

Zawartość aflatoksyny B₁ w próbce w µg/kg obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{S \times Y \times V}{W \times X}$$

gdzie:

Y i X stanowią odpowiednio objętości w µl roztworu wzorcowego aflatoksyny B₁ (3.16) i ekstraktu charakteryzujących się podobną intensywnością fluorescencji,

S – stężenie aflatoksyny B₁, w µg/ml, w roztworze wzorcowym (3.16),

V – końcowa objętość ekstraktu, w µl, uwzględniając wszystkie konieczne rozcieńczenia,

W – masa próbki, w g, odpowiadająca objętości ekstraktu pobranego celem oczyszczenia na kolumnie.

6.2. Na podstawie pomiarów fluorodenzytometrycznych

Zawartość aflatoksyny B₁ w próbce, w µg/kg, obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{S \times V}{W \times Y}$$

gdzie:

Y – objętość, w µl, ekstraktu naniesionego na płytkę (10 lub 20 µl),

S – ilość, w ng, aflatoksyny B₁ w ekstrakcie naniesionym na płytkę (proporcjonalna do objętości ekstraktu Y), obliczona na podstawie pomiarów,

V – końcowa objętość ekstraktu w µl, uwzględniając wszystkie konieczne rozcieńczenia,

W – masa próbki w g, odpowiadająca objętości ekstraktu pobranego celem oczyszczenia na kolumnie.

7. PRZYGOTOWANIE I SPRAWDZANIE ROZTWORU WZORCOWEGO (3.16)**7.1. Oznaczanie stężenia aflatoksyny B₁**

Przygotować roztwór wzorcowy aflatoksyny B₁ w chloroformie (3.2) lub w mieszaninie benzenu i acetonitrylu (3.6) o stężeniu od 8 do 10 µg/ml. Określić spektrum absorbancji w zakresie od 330 do 370 nm przy użyciu spektrofotometru (4.11). Zmierzyć gęstość optyczną (A) przy 363 nm w przypadku roztworu chloroformowego lub przy 348 nm w przypadku roztworu uzyskanego po zmieszaniu benzenu z acetonitrylem.

Stężenie aflatoksyny B₁ w µg na ml roztworu obliczyć według następujących wzorów:

$$\frac{312 \times A \times 1000}{20600}$$

dla roztworu chloroformowego

$$\frac{312 \times A \times 1000}{19800}$$

dla roztworu benzenu i acetonitrylu

19800

Odpowiednio rozcieńczyć, chroniąc przed światłem dziennym, w celu otrzymania roboczego roztworu wzorcowego o zawartości aflatoksyny B₁ około 0,1 µg/ml. Roztwór przechowywany w lodówce w temperaturze 4°C zachowuje trwałość przez 2 tygodnie.

7.2. Badanie czystości chromatograficznej

Nanieść na płytkę (4.8) 5 µl roztworu wzorcowego aflatoksyny B₁ o stężeniu od 8 do 10 µg/ml (7.1). Rozwinąć chromatogram jak podano w (5.4). W świetle UV chromatogram powinien wykazywać tylko jedną plamkę, a w miejscu nałożenia roztworu wzorcowego nie powinny być widoczne ślady fluorescencji.

8. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

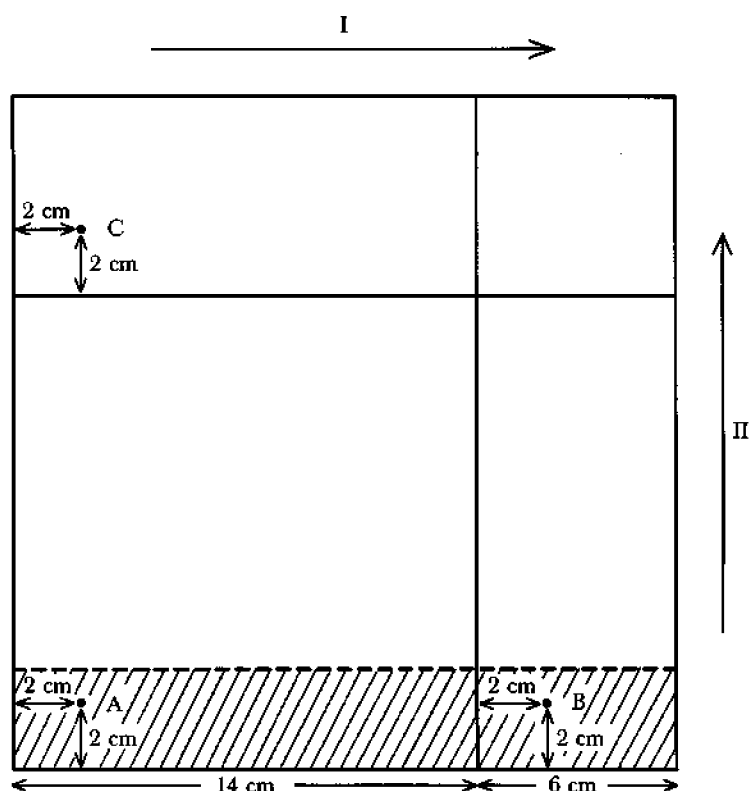
Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

- 25% najwyższego wyniku, dla zawartości aflatoksyny B₁ od 10 do 20 µg/kg,
- 5 µg wartości bezwzględnej, dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 20 do 50 µg/kg,
- 10% najwyższego wyniku, dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 50 µg/kg.

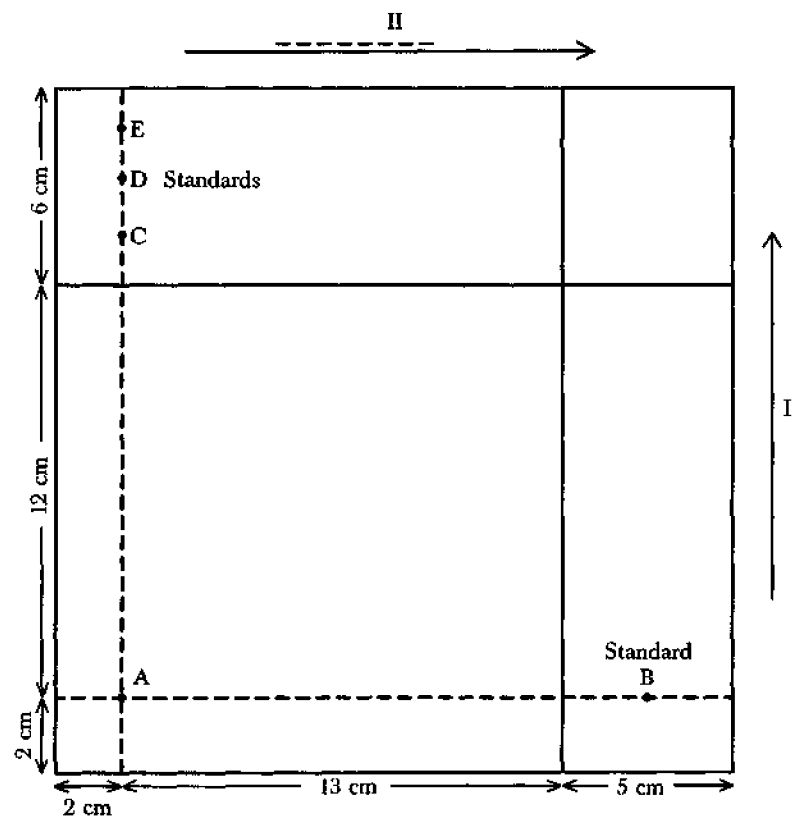
9. OBJAŚNIENIA

Odtwarzalność wyników metody, tj. zmienność pomiędzy wynikami badania tej samej próbki uzyskanymi przez 2 lub więcej laboratoriów, powinna wynosić:

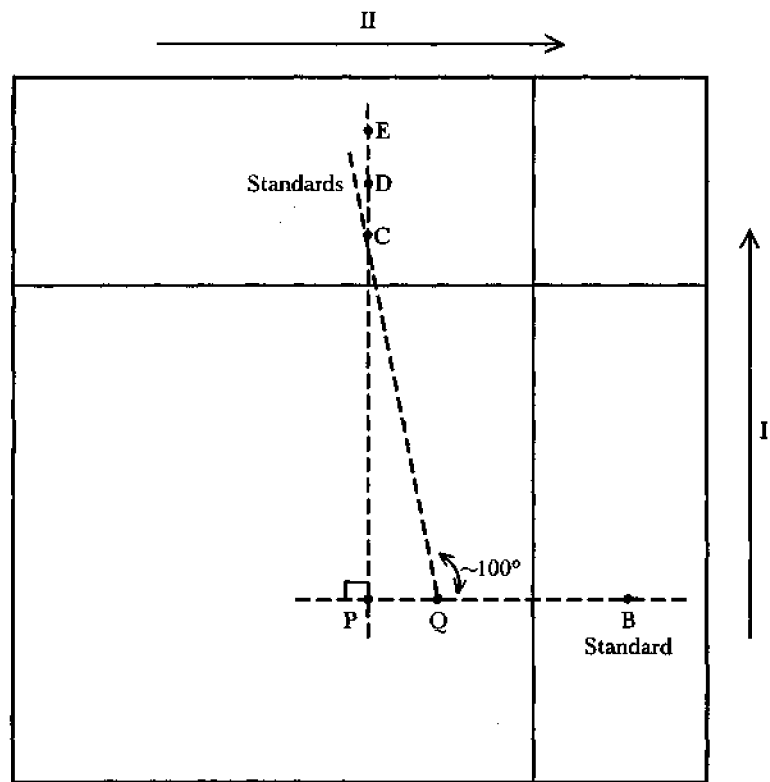
- ± 50% średniej wartości, dla zawartości aflatoksyny B₁ od 10 do 20 µg/kg,
- ± 10 µg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 20 µg/kg do 50 µg/kg,
- ± 20% średniej wartości, dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 50 µg/kg.



Rysunek 3.



Rysunek 4.



Rysunek 5.

8.2. OZNACZANIE AFLATOKSYNY B₁ METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości aflatoksyny B₁ w paszach, łącznie z paszami zawierającymi pulpe cytrusową. Granica oznaczalności metody wynosi 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. ZASADA METODY

Próbka jest ekstrahowana chloroformem, ekstrakt sączony, a jego część jest oczyszczana na mikrokolumnach wypełnionych fazą Florisil i C₁₈. Końcowy rozdział i oznaczanie jest prowadzone przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC) na kolumnie wypełnionej fazą C₁₈, po której następuje derywatywizacja pokolumnowa przy użyciu wody jodowej i fluorometryczny pomiar.

Mikotoksyny są niezwykle toksycznymi substancjami. Czynności z ich użyciem powinny być wykonywane pod digestorium. Szczególne środki ostrożności powinny być podjęte przy czynnościach z toksynami w suchej postaci, ze względu na ich elektrostatyczne właściwości i tendencję do rozprzestrzeniania się w środowisku pracy.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Chloroform stabilizowany alkoholem etylowym w ilości od 0,5 do 1,0% wagowego (8.1).

3.2. Metanol, do HPLC, do przygotowania roztworu (3.6).

3.3. Aceton.

3.4. Acetonitryl, do HPLC.

3.5. Rozpuszczalniki eluujące: przygotować na dzień przed użyciem lub usunąć powietrze z rozpuszczalnika przy użyciu ultradźwięków.

3.5.1. Mieszanina acetonu (3.3) i wody, 98 + 2 (V + V).

3.5.2. Mieszanina wody i metanolu (3.2), 80 + 20 (V + V).

3.5.3. Mieszanina wody i acetonu (3.3), 85 + 15 (V + V).

3.6. Faza ruchoma do HPLC.

Mieszanina wody, metanolu (3.2) i acetonitrylu (3.4), 130 + 70 + 40 (V + V + V).

Skład fazy ruchomej może wymagać dostosowania, zależnie od charakterystyki użytej kolumny HPLC.

3.7. Nasycony roztwór jodu: dodać 2 g jodu do 400 ml wody. Mieszać co najmniej przez 90 minut i przesączyć przez sączonej membranowy (4.15). Chronić nasycony roztwór przed światłem w celu zapobiegnięcia fotodegradacji.

3.8. Celit 545 lub podobny, przemywany kwasem.

3.9. Mikrokolumna z wypełnieniem Florisil (Waters SEP-PAK) lub podobna.

3.10. Mikrokolumna wypełniona fazą C₁₈ (Waters SEP-PAK) lub podobna.

3.11. Gaz obojętny, np. azot.

3.12. Roztwór wzorcowy aflatoksyny B₁ w chloroformie, stężenie 10 µg/ml. Sprawdzić stężenie roztworu w następujący sposób: wykreślić spektrum absorpcji roztworu pomiędzy 330 i 370 nm przy użyciu spektrofotometru (4.23). Zmierzyć absorbancję (A) w maksimum przy 363 nm. Stężenie aflatoksyny B₁ w µg/ml roztworu obliczyć według następującego wzoru:

$$\text{Stężenie (µg/ml)} = \frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

3.12.1. Roztwór podstawowy aflatoksyny B₁ w chloroformie.

Przenieść ilościowo 2,5 ml roztworu wzorcowego aflatoksyny B₁ (3.12) do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełnić do kreski chloroformem (3.1). Przechowywać roztwór w chłodnym miejscu w temperaturze 4°C w ciemności, pod szczelnym zamknięciem i owinięty w folię.

3.13. Aflatoksyna B₁, roztwory kalibracyjne do HPLC.

Do przygotowania tych roztworów stosować sprzęt szklany myty kwasem (uwzględnić (4)).

3.13.1. Roztwór kalibracyjny 4 ng/ml.

Kolbę miarową zawierającą roztwór wzorcowy podstawowy (3.12.1) i owiniętą w aluminiową folię pozostawić przez kilka godzin do osiągnięcia temperatury pokojowej. Przenieść 400 µl roztworu wzorcowego podstawowego (200 ng aflatoksyny B₁) do kolby objętościowej o pojemności 50 ml i odparować do sucha w strumieniu gazu obojętnego (3.11).

Rozpuścić pozostałość w około 20 ml mieszaniny wody i acetonu (3.5.3), uzupełnić do kreski mieszaniną wody i acetonu i dobrze wymieszać.

3.13.2. Roztwór kalibracyjny 3 ng/ml.

Przenieść ilościowo 7,5 ml roztworu kalibracyjnego (3.13.1) do kolby miarowej o pojemności 10 ml, uzupełnić do kreski mieszaniną wody i acetonu (3.5.3) i dobrze wymieszać.

3.13.3. Roztwór kalibracyjny 2 ng/ml.

Przenieść ilościowo 25 ml roztworu kalibracyjnego (3.13.1) do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do kreski mieszaniną wody i acetonu (3.5.3) i dobrze wymieszać.

Ten roztwór jest także wzorcem odniesienia, stosowanym do wielokrotnych wstrzyknięć podczas HPLC (5.5).

3.13.4. Roztwór kalibracyjny 1 ng/ml.

Przenieść ilościowo 2,5 ml roztworu kalibracyjnego (3.13.1) do kolby miarowej o pojemności 10 ml, uzupełnić do kreski mieszaniną wody i acetonu (3.5.3) i dobrze wymieszać.

3.14. Ampułki zawierające mieszaninę aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ o stężeniach odpowiednio 1, 0,5, 1 i 0,5 µg/ml, w 1 ml chloroformu.

3.14.1. Roztwór testowy do chromatografii.

Przenieść zawartość ampułki (3.14) do próbówki zamykanej szklanym korkiem lub do naczynka z nakrętką. Następnie przenieść 40 µl tego roztworu do próbówki zamykanej szklanym korkiem (płukanej kwasem) (4.22). Odparować chloroform w strumieniu obojętnego gazu (3.11) i powtórnie rozpuścić w 10 ml mieszaniny wody i acetonu (3.5.3).

3.15. Odczynniki do potwierdzającego testu (6).

3.15.1. Chlorek sodu, roztwór nasycony.

3.15.2. Siarczan sodu bezwodny, granulowany.

4. APARATURA I SPRZĘT

Stosowanie sprzętu szklanego, który nie był myty w kwasie, do sporządzania wodnych roztworów aflatoksyn może być przyczyną zaniżonych wyników. Szczególną uwagę należy zwrócić na nowy sprzęt szklany oraz sprzęt będący w dyspozycji, taki jak naczynka do automatycznego podajnika próbek, pipety Pasteura. Dlatego sprzęt laboratoryjny, który kontaktuje się z wodnymi roztworami aflatoksyn, powinien być moczony w rozcieńczonym kwasie (np. siarkowym o stężeniu 2 mol/l) przez kilka godzin, następnie dokładnie płukany destylowaną wodą w celu usunięcia pozostałości kwasu (np. trzy razy, sprawdzić pH papierkiem). W praktyce, stosowanie tych zaleceń jest niezbędne w przypadku używania kolb okrągłodennych (4.4), kolb miarowych, cylindrów miarowych, naczynek lub probówek stosowanych do roztworów kalibracyjnych i końcowych ekstraktów (zwłaszcza naczynek do automatycznego podajnika próbek) i pipet Pasteura, jeżeli są używane do przenoszenia roztworów kalibracyjnych lub ekstraktów.

4.1. Rozdrabniacz.

4.2. Sito o 1 mm oczkach.

4.3. Mechaniczna wstrząsarka.

4.4. Obrótowy odparowywacz próżniowy, wyposażony w kolby okrągłodenne o pojemności 150 i 250 ml.

4.5. Wysokosprawny chromatograf cieczowy, dozownik z pętlą umożliwiającą zadozowanie 250 µl (zgodnie z instrukcją użytkowania dotyczącą częściowego lub całkowitego napełniania pętli).

4.6. Analityczna kolumna HPLC: faza C₁₈, 3 µm lub 5 µm.

4.7. Bezpulsacyjna pompa dostarczająca odczynnik jodowy do derywatyzacji pokolumnowej.

4.8. Zawór Valco o zerowej objętości martwej w kształcie litery T, ze stali nierdzewnej (1/16" · 0,75 mm).

4.9. Spirala reakcyjna teflonowa lub ze stali nierdzewnej. Wymiary 3000 x 0,5 mm do 5000 x 0,5 mm, odpowiednie do połączenia z kolumnami HPLC 5 µm lub 3 µm.

4.10. Łaźnia wodna kontrolowana termostatycznie, ustawiona na 60 °C, umożliwiająca regulację temperatury z dokładnością większą niż 0,1 °C.

4.11. Detektor fluorescencyjny o wzbudzeniu: 365 nm i emisji: 435 nm długości fali. (W przypadku aparatów wyposażonych w filtry – emisja długości fali jest powyżej 400 nm). Możliwy poziom oznaczalności powinien wynosić co najmniej 0,05 ng aflatoksyny B₁. Wskazana jest możliwość uzyskania ciśnienia zwrotnego (np. przy użyciu restryktora, spirali teflonowej lub ze stali nierdzewnej podłączonej u wylotu detektora) w celu usunięcia pęcherzyków powietrza z kuwety przepływowej.

4.12. Rejestrator.

4.13. Elektroniczny integrator (zamiennie).

4.14. Karbowany sącze bibułowy: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 lub podobny.

4.15. Filtr membranowy o wielkości porów 0,45 µm, Milipore HAWP04700 lub podobny.

4.16. Kolba stożkowa ze szklanym korkiem o pojemności 500 ml.

4.17. Kolumna szklana (średnica wewnętrzna około 1 cm, długość około 30 cm), wyposażona w końcówkę Luera.

4.18. Kurek Luera odporny na chloroform (np. Bio-rad 7328017, Analytichem Al 6078, J.T.Baker 4514 lub podobny).

4.19. Strzykawka odporna na działanie substancji chemicznych, wyposażona w 10 ml nasadkę Luera.

4.20. Strzykawka do HPLC, odpowiednia do zadozowania 250 µl, z uwzględnieniem (4.5).

4.21. Mikrostrzykawka 100 µl do przygotowania roztworów kalibracyjnych (sprawdzić metodą wagową, czy jej dokładność mieści się w przedziale 2%).

4.22. Kalibrowane próbówki z korkiem szklanym o pojemności 10 ml.

4.23. Spektrofotometr, umożliwiający pomiary absorbancji w zakresie widma UV.

4.24. Wyposażenie do przeprowadzenia testu sprawdzającego (6).

4.24.1. Rozdzielacz o pojemności 100 ml, wyposażony w teflonowy kurek, myty kwasem.

4.24.2. Blok grzejny, zapewniający temperaturę od 40 do 50 °C.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbek.

Rozdrobnić próbkę, tak aby przechodziła przez sito (4.2).

5.2. Badana część próbki.

Odważyć 50 g przygotowanej próbki do kolby stożkowej (4.16).

5.3. Ekstrakcja

Do odważki (5.2) dodać 25 g Celitu (3.8), 250 ml chloroformu i 25 ml wody. Zamknąć kolbę i wytrząsać przez 30 minut na mechanicznej wstrząsarce (4.3). Przesączyć przez karbowany sącze (4.14). Zebrać 50 ml filtratu. Jeżeli konieczne, pobrać mniejszą ilość filtratu i rozcieńczyć do 50 ml chloroformem, tak aby stężenie aflatoksyny B₁ nie było wyższe niż 4 ng/ml.

5.4. Oczyszczanie (postępowanie powinno być prowadzone bez istotnych przerw)

W czasie wykonywania analizy chronić pomieszczenia laboratoryjne przed dziennym światłem. Można to uzyskać poprzez założenie na okna folii pochłaniającej promieniowanie UV z równoczesnym przytłumieniem dostępu światła (brak dostępu światła słonecznego) oraz poprzez założenie zasłon lub żaluzji w połączeniu ze sztucznym światłem (akceptowane jest światło jarzeniowe).

Roztwory zawierające aflatoksyny powinny być zabezpieczone przed światłem najlepiej jak to możliwe (roztwory powinny być przechowywane w ciemności w kolbach zabezpieczonych aluminiową folią).

5.4.1. Oczyszczanie przy użyciu mikrokolumny Florisil SEP-PAK

5.4.1.1. Przygotowanie zestawu kolumny szklanej i mikrokolumny

Podłączyć kurek (4.18) do krótszej końcówki mikrokolumny z wypełnieniem Florisil (3.9) (rys. 6). Przepłynąć mikrokolumnę stosując 10 ml chloroformu (3.1), przepuszczając szybko 8 ml przez kurek i mikrokolumnę przy użyciu strzykawki (4.19). Podłączyć dłuższą końcówkę mikrokolumny do szklanej kolumny (4.17) i przepuścić pozostałe 2 ml chloroformu przez mikrokolumnę do kolumny. Zamknąć kurek. Odłączyć strzykawkę.

5.4.1.2. Oczyszczanie

Wprowadzić przesącz otrzymany zgodnie z (5.3) do kolumny z przyłączoną mikrokolumną i odsączyć. Sflukać kolumnę przy użyciu 5 ml chloroformu (3.1) i 20 ml metanolu (3.2). Odrzucić eluat. W czasie tych czynności nie wolno dopuścić, aby wypełnienie mikrokolumny pozostawało suche.

Eluować aflatoksynę B₁ przy użyciu 40 ml mieszaniny acetonu i wody (3.5.1) i zebrać całkowicie eluat do kolby okrągłodennej odparowywacza obrotowego (4.4). Zatrzymać eluat na odparowywaczu obrotowym (4.4) w temperaturze od 40 do 50°C aż do całkowitego oddestylowania acetonu (*Około 0,5 ml cieczy pozostaje w kolbie w tym momencie. Badania wykazały, że dalsze odparowywanie nie wpływa na wyniki, a w 0,5 ml pozostałości nie występują istotne ilości acetonu. Pozostałości acetonu mogą powodować straty aflatoksyny B₁ na mikrokolumnie wypełnionej fazą C₁₈*).

Dodać 1 ml metanolu (3.2), poruszać kolbą ruchem okrężnym w celu rozpuszczenia aflatoksyny B₁ ze ścianek kolby, dodać 4 ml wody i zamieszać. Odłączyć i odrzucić mikrokolumnę. Sflukać wodą kolumnę szklaną i przejść do etapu oczyszczania na mikrokolumnach z wypełnieniem C₁₈.

5.4.2. Oczyszczanie przy użyciu mikrokolumny SEP-PAK C₁₈.

5.4.2.1. Przygotowanie zestawu kolumny i mikrokolumny.

Podłączyć kurek (4.18) do krótszej końcówki mikrokolumny z wypełnieniem C₁₈ (3.10) (rys. 6). Napełnić mikrokolumnę, usuwając pęcherzyki powietrza, stosując 10 ml metanolu (3.2), przepuszczając szybko metanol przez kurek i mikrokolumnę przy użyciu strzykawki (4.19) (pęcherzyki powietrza w mikrokolumnie są widoczne jako jasne punkty na szarym tle).

Pobrać 10 ml wody i przepuścić 8 ml przez mikrokolumnę (nie dopuścić do wprowadzenia powietrza do mikrokolumny przy przejściu od metanolu do wody). Podłączyć dłuższą końcówkę mikrokolumny do kolumny szklanej (4.17) i przepuścić pozostałe 2 ml chloroformu przez mikrokolumnę do kolumny. Zamknąć kurek. Odłączyć strzykawkę.

5.4.2.2. Oczyszczanie

Przenieść ilościowo ekstrakt uzyskany według (5.4.1.2) do kolumny szklanej (4.17), sflukując kolbę dwukrotnie przy użyciu 5 ml mieszaniny wody i metanolu (3.5.2) i przesączyć. Podczas tych czynności zwrócić uwagę, aby wypełnienie mikrokolumny nie pozostawało suche. (W przypadku gdy w pobliżu mikrokolumny utworzą się pęcherzyki powietrza, należy przerwać przesączanie i, lekko uderzając w górny koniec kolumny, doprowadzić do usunięcia powietrza. Następnie kontynuować pracę). Eluować przy użyciu 25 ml mieszaniny wody i metanolu. Odrzucić eluat. Eluować aflatoksynę B₁ przy użyciu 50 ml mieszaniny wody i acetonu (3.5.3) i zebrać cały eluat do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Uzupełnić do kreski wodą i zamieszać. Uzyskany roztwór jest stosowany do chromatografii (5.5).

Sączenie końcowego ekstraktu przed chromatografią HPLC zwykle nie jest konieczne. Jeżeli jednak okaże się to niezbędne, nie należy stosować sączków celulozowych ze względu na możliwe straty aflatoksyny B₁. Można stosować filtry teflonowe.

5.5. Wysokosprawna chromatografia cieczowa.

Na rys. 7 podano sposób połączenia zestawu. Pozwolić na ustabilizowanie warunków pracy aparatu.

- Szybkości przepływu fazy ruchomej i odczynnika jodowego po kolumnie są tylko wskaźnikowe. Parametry te powinny być ustalone w zależności od charakterystyki kolumny HPLC.

- Przy oznaczaniu aflatoksyny B₁ sygnał detektora zależy od temperatury, dlatego należy skompensować dryf temperaturowy (rys. 8). Dozując na kolumnę chromatograficzną określone ilości aflatoksyny B₁ poprzez wzorzec (3.13.3) w regularnych odstępach czasu (np. co trzecie wstrzyknięcie), piki aflatoksyny B₁ mogą być skorygowane poprzez uśrednienie sygnału, w przypadku gdy różnice pomiędzy kolejnymi porównawczymi wzorcami są bardzo małe (< 10%). Dozowanie roztworów badanych i wzorcowych powinno być prowadzone bez przerw. Jeżeli przerwa jest nieunikniona, ostatnie dozowanie przed przerwą i pierwsze dozowanie po przerwie powinno być uznawane jako odnośnik (3.13.3). Z uwagi na prostoliniowość krzywej kalibracyjnej i przechodzenie przez początek układu współrzędnych, zawartości aflatoksyny B₁ w badanych ekstraktach są określone przez bezpośrednie odniesienie do roztworów wzorcowych.

5.5.1. Ustawianie pompy HPLC

Ustawić pompę HPLC (4.5) na przepływ 0,5 lub 0,3 ml/min odpowiednio dla 5 µm lub 3 µm kolumny HPLC (4.6), stosując fazę ruchomą (3.6).

5.5.2. Ustawianie pompy pokolumnowej

Ustawić pompę (4.7) na przepływ nasyconego, wodnego roztworu jodu (3.7) od 0,2 do 0,4 ml/min. Uwzględnić następującą regułę: przepływy 0,4 lub 0,2 ml/min są polecane w powiązaniu z odpowiednimi przepływami fazy ruchomej (3.6), 0,5 i 0,3 ml/min.

5.5.3. Detektor fluorescencyjny

Ustawić detektor fluorescencyjny (4.11) na wzbudzenie = 365 nm i emisję = 435 nm (w aparatach wyposażonych w filtry powyżej 400 nm). Ustawić wzmacnienie detektora na takim poziomie, aby wychylenie pisaka wynosiło 80% skali dla 1 ng aflatoksyny B₁.

5.5.4. Dozownik

W przypadku wszystkich roztworów dozować 250 µl ilości, zgodnie z instrukcją obsługi dozownika.

5.5.5. Ustawianie chromatograficznego rozdziału

Zadozować roztwór (3.14.1). Doliny pomiędzy pikami powinny stanowić mniej niż 5% sumy wysokości kolejnych pików.

5.5.6. Sprawdzanie stabilności układu

Przed każdą serią oznaczeń, dozować kolejno roztwór wzorcowy odniesienia (3.13.3) aż do uzyskania powtarzalnych powierzchni pików (*piki kolejnych dozowań nie mogą się różnić więcej niż 6%*). Przeprowadzić niezwłocznie sprawdzian liniowości (5.5.7).

5.5.7. Sprawdzenie liniowości

Dozować roztwory kalibracyjne aflatoksyny B₁ od (3.13.1) do (3.13.4). Za każdym trzecim razem dozować wzorzec odnośnikowy (3.13.3) w celu korekty dryfu (*sygnały pochodzące od wzorca odnośnikowego (3.13.3) nie mogą się różnić więcej niż o 10% w czasie 90 minut*). Skorygować dryf według wzoru opisanego w (7). Wykres kalibracyjny powinien być liniowy i przechodzić przez początek układu współrzędnych przyjmując podwójny standardowy błąd szacowania Y. Znalezione wartości nie mogą się różnić więcej niż o 3% od wartości nominalnych. Jeżeli te warunki są spełnione, kontynuować oznaczanie. Jeżeli nie, określić i skorygować źródła rozbieżności przed kontynuacją.

5.5.8. Dozowanie próbek ekstraktów

Dozować oczyszczone próbki ekstraktów (5.4.2.2). Po zadozowaniu każdego dwóch próbek ekstraktu, powtarzać dozowanie wzorca odnośnikowego (3.13.3) zgodnie z poniższą sekwencją: wzorzec odniesienia, ekstrakt, ekstrakt, wzorzec odniesienia itp.

6. TEST POTWIERDZAJĄCY

6.1. Dalszy etap postępowania z ekstraktem (5.4.2.2)

Dodać 5 ml roztworu chlorku sodu (3.15.1) do końcowego ekstraktu otrzymanego według (5.4.2.2). Ekstrahować trzykrotnie stosując każdorazowo po 2 ml chloroformu (3.1) w czasie 1 minuty, w rozdzielniku (4.24.1). Nanosić chloroformowe ekstrakty na warstwę siarczanu sodu (3.15.2) i zbierać w probówce o pojemności 10 ml. Do ekstrakcji należy użyć małego rozdzielnika (średnica 4 cm) przy czym siarczan sodu nałożyć na zwitek waty.

Przemyć siarczan sodu przy użyciu kilku ml chloroformu i zebrać popłuczyny w tej samej probówce. Odparować chloroformowy ekstrakt do sucha z tej samej próbki przy użyciu bloku grzejnego (4.24.2) i ponownie rozpuścić pozostałość w 1 ml chloroformu.

6.2. Przygotowanie cienkowarstwowej chromatografii połączonej z derywatyzacją

Postępować zgodnie z metodą podaną w Rozdziale 8 w (8.1) i w (5.6.2).

7. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość aflatoksyny B₁ w µg/kg w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$\text{zawartość aflatoksyny B}_1 \text{ w } \mu\text{g/kg} = \frac{m \times V_{\text{czt}}}{V_m \times M \times V_f / V_c}$$

gdzie:

m - ilość aflatoksyny B₁ w ng odpowiadająca zarejestrowanemu pikowi, obliczona w następujący sposób:

$$m = \frac{P(\text{próbka})}{P(st_1) + P(st_2)} \times 2 r(st)$$

P (próbka) - pole powierzchni pików aflatoksyny B₁ odpowiadające badanej próbce,

P (st₁) - pole powierzchni pików aflatoksyny B₁ odpowiadające poprzedniemu zadozowaniu wzorca odniesienia (3.13.3),

P (st₂) - pole powierzchni pików aflatoksyny B₁ odpowiadające następnemu zadozowaniu wzorca odniesienia (3.13.3),

r (st) - ilość aflatoksyny B₁ w ng zadozowana na kolumnę z wzorcem odniesienia (3.13.3),

V_m - objętość zadozowanego na kolumnę ekstraktu próbki w ml,

V_{czt} - końcowa objętość ekstraktu próbki w ml, uwzględniająca wszelkie rozcieńczenia w toku postępowania (5.3),

M - masa próbki w g,

V_f - objętość przesącza przeniesiona na mikrokolumnę z wypełnieniem Florosil (5.4.1.2) w ml,

V_c - objętość chloroformu użyta do ekstrakcji próbki w ml.

Jeżeli sposób postępowania jest zgodny z podanym, wzór upraszcza się do postaci:

Zawartość aflatoksyny B₁ w µg/kg = 20 x m

7.1. Obliczanie wyników można prowadzić na podstawie pomiaru wysokości pików.

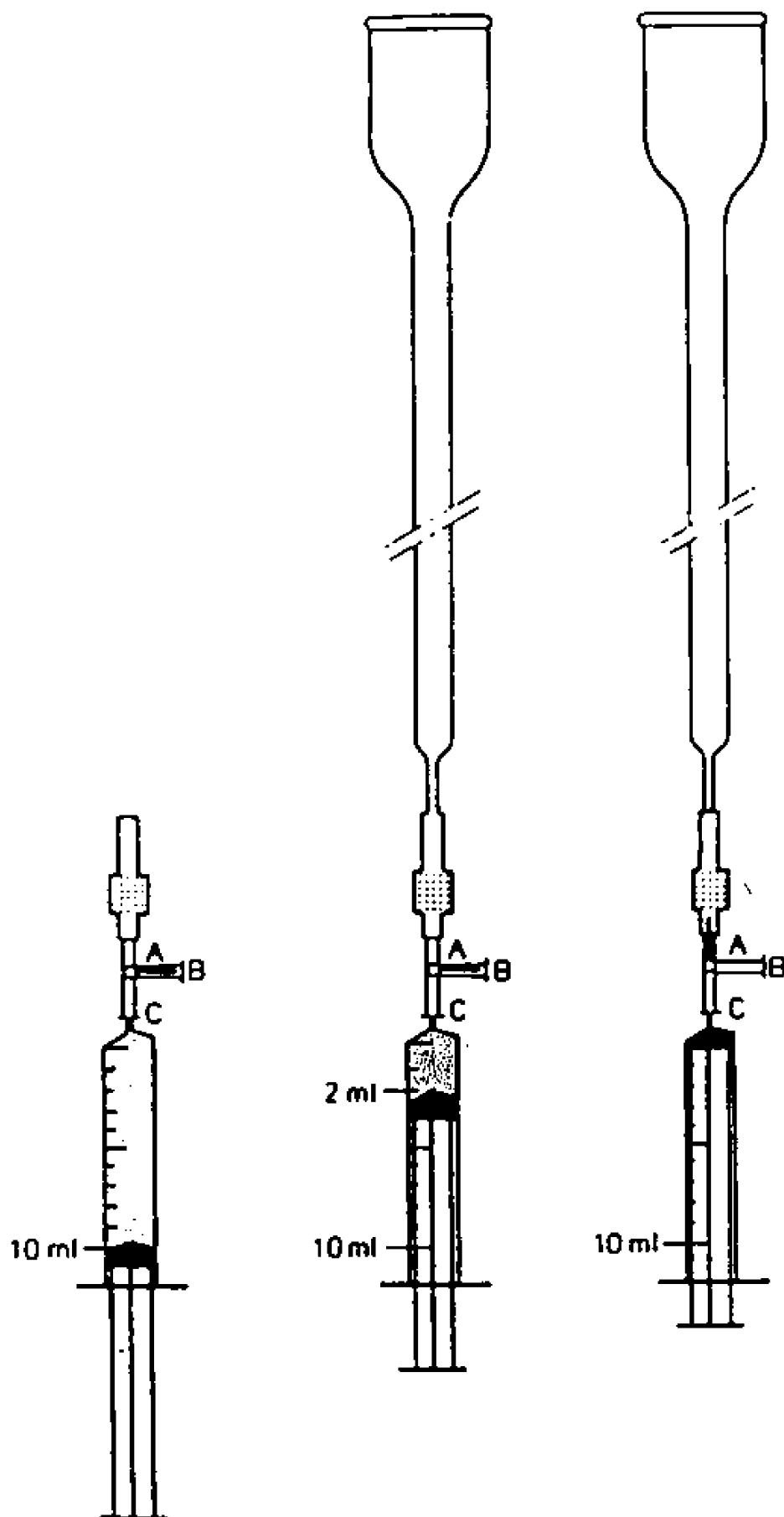
8. OBJAŚNIENIA

8.1. Stabilizacja chloroformu (3.1)

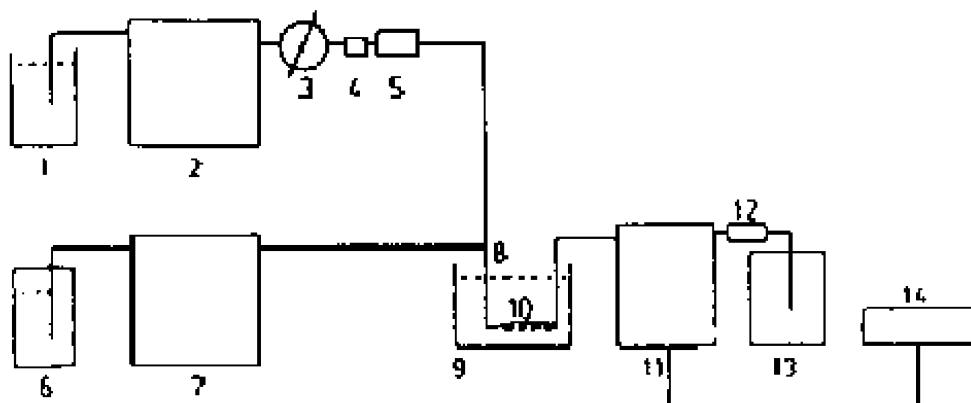
Charakterystyki absorpcji na Florosilu mogą się zmienić przy stosowaniu stabilizatorów innych niż etanol. Gdy zalecany chloroform jest niedostępny, należy sprawdzić wynik analizy zgodnie z zaleceniami podanymi w (8.2).

8.2. Dokładność

Poprawność wykonania oznaczenia przy użyciu niniejszej metody może być sprawdzona poprzez wykonywanie wielokrotnych pomiarów certyfikowanego materiału odniesienia. Jeżeli taki materiał nie jest dostępny, dokładność oznaczania powinna być zweryfikowana poprzez oznaczanie stopnia odzysku aflatoksyny B₁ dodanej do próbki paszy niezawierającej aflatoksyn. Procentowa zmienność stopnia odzysku powinna zawierać się w przedziale od -20% do +10% w stosunku do rzeczywistej zawartości.

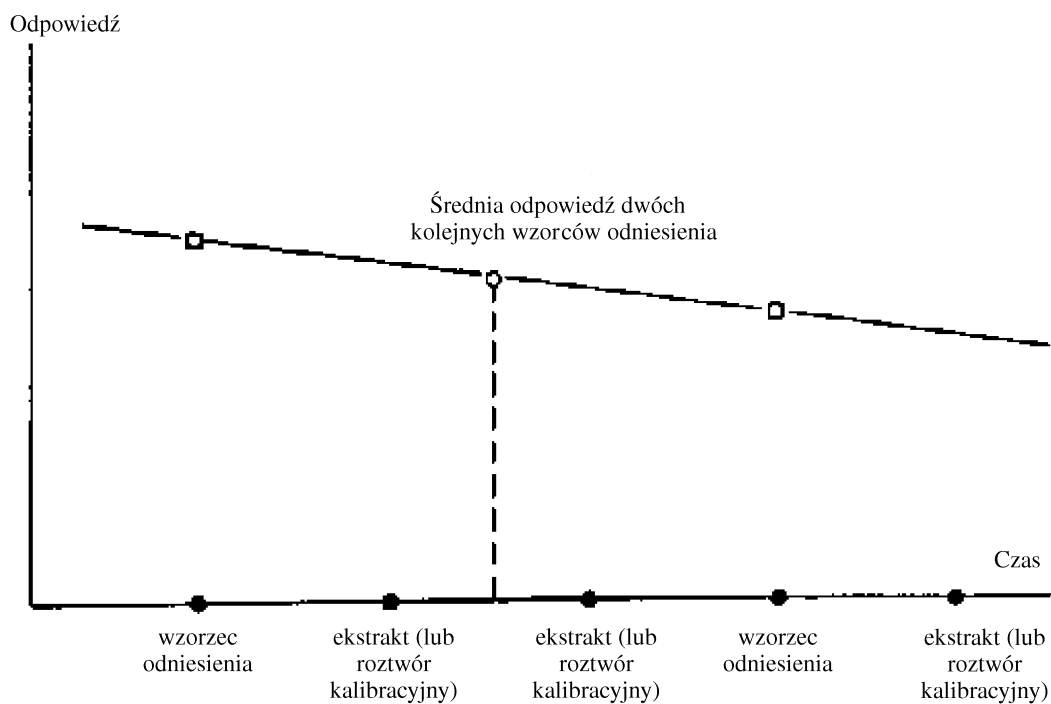


Rysunek 6. Zestaw kolumnowy z mikrokolumną



Rysunek 7. Przepływowy diagram systemu LC z derywatyzacją pokolumnową

1. Faza ruchoma
2. Pompa
3. Zawór dozownika
4. Przedkolumna
5. Kolumna analityczna HPLC
6. Nasycony roztwór jodu
7. Pompa odczynnikowa
8. Łącznik T
9. Termostatowana łaźnia
10. Spirala reakcyjna
11. Detektor fluorescencyjny
12. Restryktor
13. Odciek
14. Rejestrator lub integrator



Rysunek 8. Kompensacja dryfu przy oznaczaniu aflatoksyny B₁ poprzez dozowanie wzorca odniesienia (3.13.3) w regularnych odstępach

8.3. OZNACZANIE KWASU CYJANOWODOROWEGO

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości kwasu cyjanowodorowego, występującego w postaci wolnej, jak również w połączeniu z glukozydami, w paszach, a w szczególności w produktach pochodzących z nasion lnu, mąki manioku i niektórych gatunków nasion strączkowych.

2. ZASADA METODY

Po utworzeniu zawiesiny próbki w wodzie uwalnia się kwas cyjanowodorowy pod wpływem enzymów, a następnie oddziela się w drodze destylacji z parą wodną i zbiera w odpowiedniej objętości zakwaszonego roztworu azotanu srebra. Powstały cyjanek srebra oddziela się na sączku, a nadmiar azotanu srebra miareczkuje się roztworem tiocyjanianu amonu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Suspensja ze słodkich migdałów. Rozdrobnić 20 wyłuskanych słodkich migdałów i wrzucić do 100 ml wody o temperaturze od 37 do 40°C. Sprawdzić, czy w zawiesinie nie ma kwasu cyjanowodorowego w ten sposób, że 10 ml zawiesiny nanieść na papierik pikrynowy lub wykonując ślepą próbę, jak opisano w (5).

3.2. Roztwór octanu sodu, 10% (m/V), obojętny wobec fenoloftaleiny.

3.3. Emulsja przeciwpieniąca (np. silikonowa).

3.4. Kwas azotowy, $d = 1,4$.

3.5. Roztwór azotanu srebra o stężeniu 0,02 N.

3.6. Roztwór tiocyjanianu amonu o stężeniu 0,02 N.

3.7. Nasycony roztwór siarczynu żelaza i amonu.

3.8. Amoniak, $d = 0,958$.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Suszarka z termostatem ustawionym na 38°C.

4.2. Aparatura do destylacji z parą wodną z zakrzywionym końcem.

4.3. Kolby płaskodenne ze szklanymi korkami, o pojemności 1000 ml.

4.4. Łaźnia olejowa.

4.5. Biureta z podziałką w zakresie 1/20 ml.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć 20 g próbki, z dokładnością do 5 mg, umieścić w kolbie płaskodennej o pojemności 1 litra, dodać kolejno 50 ml wody i 10 ml zawiesiny słodkich migdałów (3.1). Zamknąć kolbę i umieścić na 16 godzin w suszarce w temperaturze 38°C. Następnie ochłodzić do temperatury pokojowej i dodać 80 ml wody, 10 ml roztworu octanu sodu (3.2) i kroplę emulsji przeciwpieniącej (3.3).

Połączyć kolbę z aparaturą do destylacji z parą wodną i umieścić w łaźni olejowej, którą należy uprzednio rozgrzać do temperatury 100°C. Oddestylować od 200 do 300 ml cieczy z parą wodną i łagodnie ogrzewając kolbę. Destylat zebrać w zlewce Erlenmeyera osłoniętej od światła i zawierającej dokładnie 50 ml roztworu azotanu srebra o stężeniu 0,02 N (3.5) i 1 ml kwasu azotowego (3.4). Upewnić się, że koniec chłodnicy jest zanurzony w roztworze azotanu srebra.

Zawartość kolby Erlenmeyera przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml i uzupełnić kolbę do kreski wodą, wymieszać i przesączyć. Odrzucić 250 ml filtratu i dodać około 1 ml roztworu siarczynu żelaza i amonu (3.7), a nadmiar azotanu srebra miareczkować roztworem tiocyjanianu amonu (3.6) z biurety z podziałką w zakresie 1/20 ml.

Ślepą próbę przeprowadza się tą samą techniką, używając 10 ml zawiesiny słodkich migdałów (3.1), pomijając analizowaną próbkę.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Jeżeli ślepa próba wykaże, że roztwór azotanu srebra został zużyty, należy odjąć jego objętość od objętości zużytej przez destylat z próbki. 1 ml AgNO_3 0,02 N odpowiada 0,54 mg HCN. Wynik wyrazić w procentach wagowych.

7. OBJAŚNIENIA

Jeżeli próbka zawiera znaczne ilości siarczków (np. strączkowe), wytrąca się czarny osad siarczku srebra, który zostaje na sączku wraz z osadem cyjanku srebra. Tworzenie siarczku srebra powoduje straty roztworu azotanu srebra 0,02 N i wartość tę należy odjąć od objętości użytej do obliczania zawartości HCN. Czynność tę należy wykonać w poniższy sposób.

Pozostały na sączku osad zadać 50 ml amoniaku (3.8) w celu rozpuszczenia cyjanku srebra. Pozostałość przemyć rozcieńczonym amoniakiem i następnie oznaczyć w niej zawartość srebra. Przeliczyć otrzymaną wartość na ilość ml roztworu azotanu srebra 0,02 N.

Zawartość HCN w próbce można też oznaczyć, miareczkując zakwaszony amoniakalny przesącz kwasem azotowym.

8.4. SZACOWANIE AKTYWNOŚCI UREAZY W PRODUKTACH SOJOWYCH

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania aktywności ureazy w produktach sojowych celem wykazania, czy te produkty były poddawane obróbce termicznej przez wystarczająco długi okres.

2. ZASADA METODY

Aktywność ureazy jest określana na podstawie oznaczenia ilości uwolnionego azotu amonu z roztworu mocznika, w przeliczeniu na 1 g produktu na minutę, w temperaturze 30°C.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy o stężeniu 0,1 N.

3.2. Roztwór wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 N.

3.3. Roztwór fosforanowy o stężeniu 0,05 M, zawierający w 1000 ml 4,45 g dwuhydratu wodorofosforanu(V) dwusodu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 3,40 g dwuwodorofosforanu(V) potasu (KH_2PO_4).

3.4. Roztwór mocznika, świeżo przygotowany, zawierający 30,0 g mocznika w 1000 ml roztworu fosforanowego (3.3), pH 6,9 – 7,0.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Aparatura do miareczkowania potencjometrycznego lub pehametr o wysokiej czułości (0,02 pH), z mieszadłem magnetycznym.

4.2. Łaźnia wodna z termostatem ustawiona dokładnie na 30°C.

4.3. Probówki ze szklanymi korkami o wymiarach 150 x 18 mm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Rozdrobnić około 10 g próbki, tak aby przesiewała się przez 0,2 mm oczko sita. Odważyć ponad 0,2 g rozdrobnionej próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w probówce ze szklanym korkiem, następnie dodać 10 ml roztworu mocznika (3.4). Natychmiast zamknąć korkiem i wstrząsnąć energicznie. Probówkę umieścić w łaźni wodnej nastawionej dokładnie na 30°C i utrzymywać dokładnie przez 30 minut. Szybko dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), szybko schłodzić do temperatury 20°C i przenieść ilościowo zawartość próbki do naczynia do miareczkowania, przemywając dwukrotnie wodą w ilości po 5 ml. Stosując elektrodę szklaną (4.1), szybko miareczkować potencjometrycznie do pH 4,7 roztworem wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 N (3.2).

Przeprowadzić test ślepej próby w następujący sposób. Szybko umieścić 0,2 g próbki, odważonej z dokładnością do 1 mg, w probówce ze szklanym korkiem, dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego o stężeniu 0,1 N (3.1), a następnie 10 ml roztworu mocznika (3.4). Szybko oziębć probówkę w łaźni lodowej i pozostawić na 30 minut. W warunkach opisanych powyżej przenieść zawartość próbki do naczynia filtracyjnego, używając roztworu wodorotlenku sodu o stężeniu 0,1 N (3.2) do uzyskania pH 4,7.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Aktywność ureazy obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{\text{mg N}}{\text{g x min}} \text{ w temperaturze } 30^\circ\text{C} = \frac{1,4 (b - a)}{30 \times E}$$

gdzie:

a – objętość roztworu 0,1 N wodorotlenku sodowego zużytego na miareczkowanie próbki, ml,

b – objętość roztworu 0,1 N wodorotlenku sodowego zużytego na miareczkowanie ślepej próby, ml,

E – masa próbki, g.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Metoda jest odpowiednia do oznaczania aktywności ureazy do 1 mg N/g/min w temperaturze 30°C. Dla produktów o większej aktywności ureazy należy zmniejszyć próbkę analityczną do 50 mg.

7.2. Produkty zawierające więcej niż 10% tłuszczu surowego powinny być najpierw odtłuszczone na zimno.

8.5. OZNACZANIE GOSSYPOŁU

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości wolnego gossypolu, całkowitego gossypolu i chemicznie związanych substancji w nasionach bawełny, mączce bawełnianej i w komponentach paszowych zawierających te substancje w ilości ponad 20 ppm.

2. ZASADA METODY

Wolny gossypol ekstrahuje się w obecności 3-aminopropan-1-olu lub mieszaniny propan-2-olu z heksanem lub dwumetyloformamidem w celu oznaczenia całkowitego gossypolu. Gossypol łączy się z aniliną, tworząc barwny związek gossypol-dianilinę. Absorbancję mierzy się przy 440 nm.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Mieszanina 1-propan-2-ol-heksan:

Zmieszać 40 części objętościowych propan-2-olu z 40 częściami objętościowymi n-heksanu.

3.2. Rozpuszczalnik A:

Umieścić w kolbie o pojemności 1 litra 500 ml mieszaniny propan-2-ol-heksan (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-olu, 8 ml lodowatego kwasu octowego i 50 ml wody. Uzupełnić do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1). Odczynnik jest stabilny przez 1 tydzień.

3.3. Rozpuszczalnik B:

Odpipetować 2 ml 3-aminopropan-1-olu i 10 ml lodowatego kwasu octowego do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Oziębć do temperatury pokojowej i uzupełnić kolbę do kreski N,N-dwumetyloformamidem. Odczynnik jest stabilny przez 1 tydzień.

3.4. Anilina:

Jeżeli gęstość optyczna ślepej próby przekracza 0,022, należy przedestylować anilinę nad proszkiem cynku, odrzucając pierwsze i ostatnie 10% destylatu. Schłodzić i przechowywać w brązowej butelce zamkniętej korkiem. Odczynnik można przechowywać przez kilka miesięcy.

3.5. Roztwór wzorcowy gossypolu A:

27,9 mg octanu gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Rozpuścić i uzupełnić kolbę do kreski rozpuszczalnikiem (3.2). Odpipetować 50 ml roztworu do kolby miarowej o pojemności 250 ml i uzupełnić do kreski rozpuszczalnikiem A. Stężenie gossypolu w tym roztworze wynosi 0,02 mg/ml. Przed użyciem pozostawić na 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

3.6. Roztwór wzorcowy gossypolu B:

27,9 mg octanu gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić i uzupełnić kolbę do kreski rozpuszczalnikiem B (3.3). Stężenie gossypolu w roztworze wynosi 0,5 mg/ml.

Wzorcowe roztwory gossypolu A i B nadają się do użycia przez 24 godziny, jeżeli są chronione przed światłem.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Mikser (tumbler): około 35 obr/min.

4.2. Spektrofotometr.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA**5.1. Analiza próbki**

Masa próbki analitycznej pobrana do analizy zależy od przewidywanej zawartości gossypolu w próbce. Zalecana jest praca na małych ilościach próby i stosunkowo dużej ilości przesącza po to, aby wykonać w miarę możliwości precyzyjny pomiar. W przypadku oznaczania wolnego gossypolu w nasionach bawełny, mączce bawełnianej masa próbki do analizy nie może przekraczać 1 g. W przypadku komponentów paszowych może wynosić do 5 g. 10 ml porcja przesącza w większości przypadków jest wystarczająca. Powinna ona zawierać od 50 do 100 µg gossypolu. Jeżeli oznaczamy całkowitą zawartość gossypolu, ilość badanej próbki może wynosić 0,5 – 5 g i wtedy 2 ml przesącza będzie zawierało od 40 do 200 µg gossypolu. Analizę należy przeprowadzać w temperaturze 20°C.

5.2. Oznaczanie wolnego gossypolu

Umieścić próbkę w kolbie okrągłodennej o pojemności 250 ml. Dno kolby pokryć pokruszonym szkłem. Przy użyciu pipety dodać dokładnie 50 ml rozpuszczalnika A (3.2), zamknąć kolbę korkiem i mieszać przez 1 godzinę. Przesączyć przez suchy sączek i przesączyć zebrać do małej kolby okrągłodennej. Podczas sączenia przykryć lejek szkiełkiem zegarkowym. Odmierzyć pipetą dwie identyczne porcje przesącza zawierającego od 50 do 100 µg gossypolu i umieścić w dwóch kolbach okrągłodennych o pojemności 25 ml (A i B). Jeżeli zajdzie potrzeba, dodać do kolby 10 ml rozpuszczalnika A (3.2). Następnie uzupełnić kolbę (A) do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1). Roztwór będzie użyty jako roztwór odniesienia dla roztworu z próbki. Odpipetować po 10 ml rozpuszczalnika (3.2) do dwóch kolb miarowych o pojemności 25 ml (C i D). Kolbę C uzupełnić do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1). Roztwór ten będzie używany jako roztwór odniesienia względem pomiaru roztworu ślepej próby. Dodać po 2 ml aniliny (3.4) do każdej z kolb (D) i (B). Ogrzewać na wrzącej łaźni przez 30 minut, do wywołania reakcji barwnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić kolbę mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1), zhomogenizować i odstawić na 1 godzinę. Zmierzyć absorbancję roztworu ślepej próby (D), używając odpowiedniego roztworu (C) jako roztworu odniesienia. Następnie zmierzyć gęstość optyczną roztworu (B) przez porównanie z odpowiednim roztworem (A). Pomiary wykonać w spektrofotometrze przy 440 nm, stosując 1 cm kuwety. Od wartości gęstości optycznej roztworu z próbą badaną odjąć gęstość optyczną ślepej próby. Dopiero przy użyciu tej różnicy obliczyć zawartość wolnego gossypolu, jak podano w (6).

5.3. Oznaczanie całkowitego gossypolu

Próbkę zawierającą od 1 do 5 mg gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 50 ml i dodać 10 ml rozpuszczalnika B (3.3). W tym samym czasie przygotować ślepą próbę, umieszczając 10 ml rozpuszczalnika B (3.3) w następnej kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Ogrzewać obie kolby przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Następnie oziębić do temperatury pokojowej i uzupełnić kolby do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1). Zhomogenizować i odstawić na 10 do 15 minut. Następnie przesączyć i przesączyć zebrać do kolb płaskodennych. Odpipetować po 2 ml przesącza z próbki do każdej z dwu 25 ml kolb miarowych. Uzupełnić kolby o pojemności 25 ml do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1). Roztwory te będą używane jako roztwory odniesienia. Dodać po 2 ml aniliny (3.4) do dwu pozostałych kolb miarowych. Ogrzewać obie kolby przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej do wywołania barwy. Oziębić do temperatury pokojowej, uzupełnić do 25 ml mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1), wymieszać i pozostawić na 1 godzinę. Zmierzyć gęstość optyczną tak jak w (5.2). Obliczyć całkowitą zawartość gossypolu zgodnie z (6).

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wyniki mogą być obliczone na podstawie absorbancji właściwej (6.1) lub na podstawie krzywej wzorcowej (6.2).

6.1. Na podstawie absorbancji właściwej

W podanych warunkach absorbancje właściwe są następujące:

$$\text{Gossypol wolny} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Gossypol całkowity} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Zawartość gossypolu wolnego lub całkowitego w próbce jest określona według następującego wzoru:

$$\text{Gossypol \%} = \frac{E \times 1250}{E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} \times p \times a}$$

gdzie:

E – absorbancja określona według (5.2),

p – masa próbki, w g,

a – część przesącza, w ml.

6.2. Na podstawie krzywej wzorcowej

6.2.1. Gossypol wolny

Przygotować dwie serie po 5 kolb miarowych o pojemności 25 ml. Do każdej serii wprowadzić pipetą do kolb odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego A gossypolu (3.5). Uzupełnić objętości do 10 ml rozpuszczalnikiem A (3.2). Uzupełnić każdą serię próbką odniesienia zawierającą jedynie 10 ml rozpuszczalnika A (3.2) w kolbie o pojemności 25 ml.

Uzupełnić do 25 ml objętości roztworów w pierwszej serii (w tym roztwór kontrolny) mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1) (seria odniesienia).

Dodać po 2 ml aniliny (3.4) do każdej kolby drugiej serii (w tym do roztworu kontrolnego). Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej celem wywołania barwy. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1), wymieszać i odstawić na 1 godzinę.

Zmierzyć absorbancję roztworów serii wzorcowej w warunkach podanych w (5.2) w odniesieniu do odpowiadających roztworów serii odniesienia. Wykreślić krzywą wzorcową, odnosząc wartości absorbancji do ilości gossypolu w μg .

6.2.2. Gossypol całkowity

Przygotować 6 kolb miarowych o pojemności 50 ml. Do pierwszej kolby dodać 10 ml rozpuszczalnika B (3.3), a do pozostałych odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego B gossypolu (3.6). Uzupełnić objętości w każdej kolbie do 10 ml rozpuszczalnikiem B (3.3). Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1) i wymieszać.

Wprowadzić po 2 ml tych roztworów do dwóch serii po 6 kolb miarowych o pojemności 25 ml. Uzupełnić do 25 ml objętości kolb pierwszej serii mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1) (seria odniesienia).

Dodać po 2 ml aniliny (3.4) do każdej kolby drugiej serii. Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej celem wywołania barwy. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do kreski mieszaniną propan-2-ol-heksan (3.1), wymieszać i odstawić na 1 godzinę (seria wzorcowa).

Zmierzyć absorbancję roztworów serii wzorcowej w warunkach podanych w (5.2) w odniesieniu do odpowiadających roztworów serii odniesienia. Wykreślić krzywą wzorcową, odnosząc wartości absorbancji do ilości gossypolu w μg .

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 15% wartości względnej, dla zawartości gossypolu poniżej 500 mg/kg,
- 75 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości gossypolu powyżej 500 do 750 mg/kg,
- 10% wartości względnej, dla zawartości gossypolu powyżej 750 mg/kg.

8.6. WYTYCZNE DO MIKROSKOPOWEJ IDENTYFIKACJI I OZNACZANIA SKŁADNIKÓW POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości składników pochodzenia zwierzęcego (rozumianych jako produkty pozyskane podczas przetwarzania tusz lub części tusz ssaków, drobiu i ryb) w paszach za pomocą badania mikroskopowego. Dodatkowo, w celu zwiększenia wykrywalności lub aby określić pochodzenie pewnych rodzajów składników pochodzenia zwierzęcego można przeprowadzić inne badanie, stosując metody wariantowe lub alternatywne. W przypadku badania zawartości specyficznych składników pochodzenia zwierzęcego, takich jak badania zawartości plazmy lub kości w łoju, można ponadto zastosować procedurę opisaną w (9).

2. CZUŁOŚĆ

Metodą mogą być wykrywane bardzo małe ilości składników pochodzenia zwierzęcego ($< 0,1\%$), zależnie od rodzaju tych składników.

3. ZASADA METODY

Do badań wykorzystywana jest reprezentatywna próbka, która podlega odpowiedniemu przygotowaniu. Metoda ma zastosowanie do pasz o wilgotności do 14%. Pasza o wilgotności wyższej niż 14% powinna być wysuszona (zagęszczona) przed obróbką. Pasze lub materiały paszowe takie jak tłuszcze, oleje wymagają określonej obróbki (9). Składniki pochodzenia zwierzęcego są identyfikowane na podstawie typowych, mikroskopowo identyfikowalnych cech charakterystycznych (tj. włókien mięśniowych i innych cząstek tkanki mięsnej, chrząstki, kości, rogów, włosów, szczeciny, krwi, piór, skorup jaj, ości ryb, łusek). Identyfikacji należy poddać zarówno frakcję sitową (6.1), jak i zagęszczony osad (6.2) próbki.

4. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

4.1. Odczynniki zanurzeniowe.

4.1.1. Hydrat chlorału (roztwór wodny, 60% m/V) .

4.1.2. Ług (NaOH 2,5%, m/V lub KOH 2,5%, m/V) do badania frakcji sitowych.

4.1.3. Olej parafinowy lub gliceryna (lepkość: 68-81) do badania osadu.

4.2. Odczynniki chemiczne do płukania.

4.2.1. Alkohol, 96%.

4.2.2. Aceton.

4.3. Odczynnik zagęszczający.

Czterochloroetylen (gęstość 1,62).

4.4. Odczynniki barwiące.

4.4.1. Roztwór jodu w jodku potasu:

Rozpuścić 2 g jodku potasu w 100 ml wody i dodać 1 g jodu, często wstrząsając.

4.4.2. Czerwień alizarynowa (rozcieńczyć 2,5 ml 1M kwasu chlorowodorowego w 100 ml wody i dodać 200 mg czerwieni alizarynowej).

4.4.3. Odczynnik cystynowy (2 g octanu ołowiu, 10 g NaOH/100 ml H₂O).

4.4.4. Roztwór jodu w jodku potasu (rozpuszczony w 70% etanolu).

4.5. Odczynnik bielący.

Handlowy roztwór podchlorynu sodowego (9,6% aktywnego chloru).

5. APARATURA I SPRZĘT

5.1. Waga analityczna (dokładność 0,01 g, a dla badania zagęszczonego osadu – 0,001 g).

5.2. Sprzęt do rozdrabniania (młynek mielący lub móżdziej, szczególnie w przypadku paszy zawierającej >15% tłuszczu).

5.3. Sito o 0,50 mm oczkach.

5.4. Rozdzielacz lub zlewka osadowa ze stożkowym dnem.

5.5. Mikroskop stereoskopowy (powiększenie minimum 40 x).

5.6. Mikroskop optyczny (powiększenie minimum 400 x), światło przechodzące lub spolaryzowane.

5.7. Standardowe szkło laboratoryjne.

Cały sprzęt szklany powinien być starannie umyty. Rozdzielacze i szkło wymagają mycia w zmywarce. Sita czyści się przy użyciu szczotki o twardym włosiu.

6. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Granulowane pasze mogą być wstępnie przesiane, jeżeli obie frakcje są analizowane jako oddzielna próbka.

Obróbce należy poddać co najmniej 50 g próbki (starannie zmielonej, z zastosowaniem sprzętu do rozdrabniania (5.2), jeżeli to konieczne dla uzyskania odpowiedniego rozdrobnienia). Ze zmielonego materiału pobrać dwie reprezentatywne próbki – jedną do badania frakcji sitowej (co najmniej 5 g) (6.1), a drugą do badania zagęszczonego osadu (co najmniej 5 g) (6.2). Dodatkowo, dla identyfikacji można zastosować barwienie odczynnikami barwiącymi (6.3).

Aby wykazać charakter białek zwierzęcych i pochodzenie cząsteczek, można zastosować system Aries.

6.1. Identyfikacja składników pochodzenia zwierzęcego we frakcjach sitowych

Przesiać przez sito (5.3) co najmniej 5 g próbki w celu otrzymania dwóch frakcji.

Frakcję sitową zawierającą duże cząstki (lub reprezentatywną część frakcji) rozsypać równomiernie na odpowiednim podłożu i przeglądać systematycznie pod mikroskopem stereoskopowym (5.5) pod różnymi powiększeniami, poszukując składników pochodzenia zwierzęcego.

Preparaty wykonane z frakcji sitowej drobnej przeglądać systematycznie pod mikroskopem optycznym (5.6) pod różnymi powiększeniami, poszukując składników pochodzenia zwierzęcego.

6.2. Identyfikacja składników pochodzenia zwierzęcego w zagęszczonym osadzie

Odważyć co najmniej 5 g próbki, z dokładnością do 0,01 g, przenieść do rozdzielacza lub zlewki osadowej o stożkowym dnem oraz dodać co najmniej 50 ml czterochloroetyleny (4.3.1). Mieszaninę należy wielokrotnie wstrząsać lub mieszać.

Jeżeli stosowany jest zamknięty rozdzielacz, osad należy pozostawić na co najmniej 3 minuty przed oddzieleniem osadu. Powtórzyć wytrząsanie i pozostawić osad na co najmniej 3 minuty. Osad powinien oddzielić się ponownie.

Jeżeli stosuje się zlewkę otwartą, osad powinien być pozostawiony na co najmniej 5 minut, zanim osad się oddzieli.

Cały uzyskany osad wysuszyć i następnie zważyć, z dokładnością do 0,001 g. Ważenie jest konieczne tylko w przypadku ilościowego oznaczania. Jeżeli osad zawiera wiele dużych cząstek, może być przesiany przez sito (5.3) w dwóch frakcjach. Z badać wysuszony osad na obecność składników kostnych pod mikroskopem stereoskopowym (5.5) i mikroskopem optycznym (5.6).

6.3. Stosowanie odczynników zanurzeniowych i barwiących

Identyfikacja mikroskopowa składników pochodzenia zwierzęcego może być wspomagana przez zastosowanie specjalnych środków zanurzeniowych i odczynników do barwienia.

Hydrat chloralu (4.1.1):

Ostrożnie ogrzewając, można zobaczyć wyraźniej struktury komórkowe, ponieważ ziarna skrobi żelują i niepożądana zawartość komórek zostaje usunięta.

Ług (4.1.2):

Wodorotlenek sodu albo wodorotlenek potasu oczyszcza materiał paszowy, wspomagając wykrycie włókien mięśniowych, włosów i innych keratynowych struktur.

Olej parafinowy i gliceryna (4.1.3):

Składniki kostne mogą być dobrze zidentyfikowane, gdyż większość lakun wypełnia się powietrzem i są widoczne jako czarne otwory o rozmiarach 5-15 µm.

Roztwór jodu w jodku potasu (4.4.1):

Stosowany do wykrywania zawartości skrobi (kolor niebiesko-fioletowy) i białka (kolor żółtopomarańczowy). Roztwory można rozcieńczyć, jeżeli to konieczne.

Roztwór czerwieni alizarynowej (4.4.2):

Czerwonoróżowe zabarwienie kości, ości ryb i łusek. Przed wysuszeniem osadu (6.2), cały osad należy przenieść do szklanej probówki i przepłukać dwukrotnie około 5 ml alkoholu (4.2.1) (každorazowo należy zastosować wytrząsarkę typu Vortex, pozostawić rozpuszczalnik przez 1 minutę do osadzenia osadu i następnie go odlać). Przed zastosowaniem tego odczynnika, osad należy wybielić przez dodanie co najmniej 1 ml roztworu podchlorynu sodowego (4.5.1). Należy pozwolić na bieg reakcji przez 10 minut. Probówkę napełnić wodą, osad powinien osadzać się przez 2 do 3 minut, a wodę z zawieszonymi cząsteczkami należy wylać. Osad przepłukać dwukrotnie około 10 ml wody (zastosować wirowanie, pozwolić na osadzenie się osadu i każdorazowo wylać wodę). Dodać od 2 do 10 lub więcej kropli (zależnie od ilości pozostałości) roztworu czerwieni alizarynowej. Mieszaninę wytrząsać i pozwolić na bieg reakcji przez kilka sekund. Zabarwiony osad przepłukać dwukrotnie około 5 ml alkoholu (4.2.1), a następnie 1 raz acetonem (4.2.2) (každorazowo stosować wirowanie, pozwolić na osadzenie się rozpuszczalnika przez 1 minutę i wylać go). Osad jest wówczas gotowy do wysuszenia.

Odczynnik cystynowy (4.4.3):

Po ostrożnym ogrzewaniu, składniki zawierające cystynę (w szczególności włosy, pióra) przybierają czarnobrazową barwę.

6.4. Badanie paszy na obecność mączki rybnej

Należy zbadać pod mikroskopem optycznym co najmniej 1 preparat z frakcji sitowej drobnej i z frakcji osadu (6.1) i (6.2). Jeżeli na etykiecie jest informacja, że w składzie jest mączka rybna lub gdy istnieje podejrzenie obecności mączki rybnej lub została ona wykryta w badaniu wstępnym, należy dodatkowo zbadać co najmniej 2 preparaty z drobnej frakcji sitowej i cały osad.

7. OBLICZANIE WYNIKÓW

W przypadku przeprowadzania oceny ilościowej składników pochodzenia zwierzęcego należy postępować zgodnie z poniższymi wskazaniami.

Obliczenia ilościowe mogą być przeprowadzane tylko w przypadku, jeżeli składniki pochodzenia zwierzęcego zawierają fragmenty kostne.

Fragmenty kostne lądowych gatunków zwierząt stałocieplnych (ssaków i ptaków) można odróżnić od różnych typów ości rybnych na podstawie występowania typowych lakun. Proporcję składników pochodzenia zwierzęcego w materiale próbki szacuje się, biorąc pod uwagę:

- oszacowaną proporcję (% wagowy) fragmentów kości w zagęszczonym osadzie,
- proporcję kości (% wagowy) w składnikach pochodzenia zwierzęcego.

Szacowania składników pochodzenia zwierzęcego w materiale próbki należy dokonać z wykorzystaniem co najmniej trzech preparatów, jeżeli to możliwe, zawierających co najmniej 5 pól każdy. W mieszankach paszowych, zagęszczony osad zawiera zwykle nie tylko fragmenty kości zwierząt lądowych i fragmenty ości ryb, ale także inne drobiny o specyficznym ciężarze właściwym, w szczególności związki mineralne, piasek, fragmenty zdrewniałych roślin i podobne.

7.1. Oszacowanie procentowej zawartości fragmentów kości oraz fragmentów ości i łusek ryb

$$\% \text{ zawartość fragmentów kości zwierząt lądowych} = \frac{S \times c}{W}$$

$$\% \text{ zawartość fragmentów ości i łusek ryb} = \frac{S \times d}{W}$$

gdzie:

S – masa osadu (mg),

c – współczynnik korekcyjny (%) dla szacowanej części kości zwierząt lądowych w osadzie,

d – współczynnik korekcyjny (%) dla szacowanej części ości i łusek ryb w osadzie,

W – masa materiału próbki służącej do wytworzenia osadu (mg).

7.2. Szacowanie zawartości składników pochodzenia zwierzęcego

Proporcja kości w produktach zwierzęcych może znacznie się zmieniać. Zawartość kości w przypadku mączek kostnych wynosi od 50 do 60%, a w przypadku mączek mięsnych od 20 do 30%; w przypadku mączek rybnych zawartości ości i łusek zmieniają się, w zależności od kategorii i pochodzenia mączki rybnej wynoszą zwykle od 10 do 20%.

Jeżeli rodzaj mączki zwierzęcej obecnej w próbce jest znany, możliwe jest szacunkowe określenie zawartości:

$$\text{Szacunkowa zawartość składników produktów pochodzących od zwierząt lądowych (\%)} = \frac{S \times c}{W \times f} \times 100$$

$$\text{Szacunkowa zawartość składników produktów rybnych} = \frac{S \times d}{W \times f} \times 100$$

gdzie:

S – masa osadu (mg),

c – współczynnik korekcyjny (%) dla szacowanej części kości zwierząt lądowych w osadzie,

d – współczynnik korekcyjny (%) dla szacowanej części ości ryb i łusek w osadzie,

f – współczynnik korekcyjny (%) dla proporcji kości w składnikach pochodzenia zwierzęcego w badanej próbce,

W – masa materiału próbki służącej do wytworzenia osadu (mg).

8. WYRAŻANIE WYNIKÓW

Sprawozdanie powinno zawierać co najmniej informacje na temat obecności składników pochodzących od zwierząt lądowych i z mączki rybnej. Informacje należy sformułować w podany niżej sposób:

8.1. W odniesieniu do obecności składników pochodzących od zwierząt lądowych:

– na tyle, na ile było to dostrzegalne przy użyciu mikroskopu, żadne składniki pochodzące od zwierząt lądowych nie zostały znalezione w przedstawionej próbce,

albo

– na tyle, na ile było to dostrzegalne przy użyciu mikroskopu, składniki pochodzące od zwierząt lądowych zostały znalezione w przedstawionej próbce.

8.2. W odniesieniu do obecności mączki rybnej:

– na tyle, na ile było to dostrzegalne przy użyciu mikroskopu, żadne składniki pochodzące z mączki rybnej nie zostały znalezione w przedstawionej próbce,

albo:

– na tyle, na ile było to dostrzegalne przy użyciu mikroskopu, składniki pochodzące z mączki rybnej zostały znalezione w przedstawionej próbce.

W przypadku gdy zostaną znalezione składniki pochodzące od ryb lub zwierząt lądowych, w sprawozdaniu z badań, jeżeli to konieczne, należy wskazać oszacowaną ilość znalezionych składników (x%, < 0,1%, 0,1–0,5%, 0,5–5% lub >5%), dalszą specyfikację typu zwierzęcia lądowego, jeżeli to jest możliwe, oraz zidentyfikowane składniki zwierzęce (włókna mięśniowe, chrząstka, kości, rogi, sierść, szczecina, pióra, krew, skorupy jaj, ości ryb, łuski).

W przypadku gdy szacuje się ilość składników zwierzęcych, należy wymienić zastosowany współczynnik korekcyjny f.

W przypadku gdy zidentyfikowane są składniki kostne zwierząt lądowych, w sprawozdaniu należy umieścić dodatkową informację w brzmieniu:

„Nie można wykluczyć, że powyższe składniki pochodzą od ssaków”.

Dodatkowa informacja nie jest konieczna, w przypadku gdy fragmenty kostne zwierząt lądowych zostały wyszczególnione jako fragmenty kości drobiu lub ssaków.

9. PROCEDURA W PRZYPADKU ANALIZY TŁUSZCZU LUB OLEJU

W celu dokonania analizy tłuszczu lub oleju można zastosować następującą procedurę:

Jeżeli tłuszcz jest w postaci stałej, ogrzewać (na przykład w kuchence mikrofalowej) aż do uzyskania postaci płynnej.

Przy użyciu pipety przenieść 40 ml tłuszczu z dna próbki do probówki wirówkowej.

Wirować przez 10 minut przy 4 000 obr/min.

Jeżeli tłuszcz jest zestalony po odwirowaniu, należy go ogrzać jeszcze raz (na przykład w kuchence mikrofalowej) aż do uzyskania postaci płynnej. Ponownie wirować przez 5 minut przy 4 000 obr/min.

Za pomocą małej łyżki lub łopatkę laboratoryjnej, przenieść połowę zdekantowanych zanieczyszczeń na płytkę Petriego lub na szkiełko mikroskopowe w celu dokonania mikroskopowej identyfikacji ewentualnej zawartości składników zwierzęcych, takich jak włókna mięśniowe, pióra, fragmenty kostne. Jako środek zanurzeniowy stosowany w badaniach mikroskopowych zaleca się olej parafinowy lub glicerynę.

Pozostałe zanieczyszczenia poddać sedymentacji w sposób podany w (6.2).

8.7. OZNACZANIE LOTNYCH ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH

A. METODA MIKRODYFUZYJNA

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości lotnych związków azotowych, w przeliczeniu na amoniak, w paszach.

2. ZASADA METODY

Próbka jest ekstrahowana wodą, a uzyskany roztwór klarowany i sączony. Lotne zasady azotowe są oddzielane metodą mikrodyfuzji przy zastosowaniu roztworu węglanu potasu, zbierane w roztworze kwasu bornego i miareczkowane kwasem siarkowym.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas trójchłorooctowy, roztwór 20% (m/V).

3.2. Wskaźnik:

Rozpuścić 33 mg zieleni bromokrezolowej i 65 mg czerwieni metylowej w 100 ml alkoholu etylowego o stężeniu 95 – 96% (m/V).

3.3. Kwas borny, roztwór:

W kolbie miarowej o pojemności 1 litra rozpuścić 10 g kwasu bornego w 200 ml etanolu o stężeniu 95 – 96% (m/V) i 700 ml wody. Dodać 10 ml wskaźnika (3.2). Zamieszać i, jeżeli to konieczne, doprowadzić barwę roztworu do jasnoczerwonej przez dodanie roztworu wodorotlenku sodu. 1 ml tego roztworu będzie pochłaniał maksymalnie 300 µg NH₃.

3.4. Węglan potasu, roztwór nasycony:

Rozpuścić 10 g węglanu potasu w 100 ml wrzącej wody. Schłodzić i przesączyć.

3.5. Kwas siarkowy o stężeniu 0,02 N.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Mikser (tumbler): od 35 do 40 obr/min.

4.2. Naczynko Conwaya, szklane lub plastikowe.

4.3. Mikrobiureta ze skalą 1/100 ml.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć 10 g próbki, z dokładnością do 1 mg, do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać 100 ml wody. Miksować w mikserze przez 30 minut. Dodać 50 ml roztworu kwasu trójchłorooctowego (3.1), uzupełnić do kreski wodą, energicznie wstrząsnąć i przesączyć przez karbowany sączek. Dodać przy użyciu pipety 1 ml roztworu kwasu borowego (3.3) do środkowej części naczynka Conwaya i 1 ml przesącza próbki na obrzeże naczynka. Przykryć częściowo zwilżoną smarem przykrywką. Dodać kroplami 1 ml nasyconego roztworu węglanu potasu (3.4) na obrzeże naczynka i szybko zamknąć pokrywką, tak aby naczynko było hermetyczne. Obracać ostrożnie naczynkiem w płaszczyźnie poziomej, aby doprowadzić do zmieszania dwóch odczynników. Inkubować przez co najmniej 4 godziny w temperaturze pokojowej lub 1 godzinę w temperaturze 40°C. Miareczkować lotne zasady zaabsorbowane w kwasie bornym, stosując roztwór kwasu siarkowego 0,02 N (3.5) przy użyciu mikrobiurety (4.3). Przeprowadzić ślepą próbę w ten sam sposób.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

1 ml H₂SO₄ o stężeniu 0,02 N odpowiada 0,34 mg amoniaku. Przedstawić wynik w procentach wagowych.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

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

- 10% wartości względnej, dla zawartości amoniaku poniżej 1,0%,
- 0,1% wartości bezwzględnej, dla zawartości amoniaku 1,0% i więcej.

8. OBJAŚNIENIA

Jeżeli zawartość amoniaku w próbce przekracza 0,6%, należy rozcieńczyć przesącz.

B. METODA DESTYLACYJNA

1. CEL I ZAKRES

Metoda służy do oznaczania zawartości lotnych związków azotowych, w przeliczeniu na amoniak, w mączkach rybnych niezawierających mocznika. Metoda ma zastosowanie dla zawartości amoniaku mniejszej niż 0,25%.

2. ZASADA METODY

Próbka jest ekstrahowana wodą, a uzyskany roztwór klarowany i sączony. Lotne zasady azotowe są oddzielane w punkcie wrzenia poprzez dodatek tlenku magnezu i zbierane w określonej ilości kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas trójchłorooctowy, roztwór 20% (m/V).

3.2. Tlenek magnezu.

3.3. Emulsja przeciw pienieniu się (np. silikonowa).

3.4. Kwas siarkowy, roztwór 0,1 N.

3.5. Wodorotlenek sodu, roztwór 0,1 N.

3.6. Czerwień metylowa, roztwór 0,3% (m/V) w alkoholu etylowym 95 – 96% (V/V).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Mikser (tumbler): około 35 – 40 obr/min.

4.2. Aparat do destylacji typu Kjeldahla.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć 10 g próbki, z dokładnością do 1 mg, do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać 100 ml wody. Miksować w mikserze przez 30 minut. Dodać 50 ml roztworu kwasu trójchlorooctowego (3.1), uzupełnić do kreski wodą, energicznie wstrząsnąć i przesączyć przez karbowany sącze. Pobrać taką ilość klarownego przesączu, która odpowiada spodziewanej zawartości lotnych związków azotowych (objętość 100 ml jest zwykle wystarczająca). Rozcieńczyć do 200 ml, dodać 2 g tlenku magnezu (3.2) i kilka kropli emulsji przeciw pienieniu się (3.3). Roztwór powinien wykazywać alkaliczność wobec papierka lakmusowego. Dodać ponownie nieco tlenku magnezu (3.2). Destylować około 150 ml roztworu w aparacie Kjeldahla i zebrać destylat w kolbie Erlenmeyera zawierającej dokładnie odmierzoną objętość (od 25 ml do 50 ml) kwasu siarkowego 0,01 N (3.4). W czasie destylacji chronić przed przegrzaniem. Gotować roztwór kwasu siarkowego przez 2 minuty, schłodzić i odmiareczkować nadmiar kwasu wodorotlenkiem sodu 0,1 N (3.5) w obecności czerwieni metylowej (3.6). Przeprowadzić ślepą próbę w ten sam sposób.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

1 ml H_2SO_4 o stężeniu 0,1 N odpowiada 1,7 mg amoniaku. Wynik podać w procentach wagowych próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10% wartości względnej, dla zawartości amoniaku.

8.8. OZNACZANIE POZIOMÓW DIOKSYN I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB**1. CEL I ZAKRES**

Metody służące do oznaczania zawartości poziomów dioksyn (polichlorowane dibenzo-p-dioksyny (PCDD) oraz polichlorowane dibenzofurany (PCDF)) oraz dioksynopodobnych polichlorowanych bifenili (PCB) w paszach obejmują:

1) monitorowanie obecności dioksyn, które może być dokonywane przy zastosowaniu metody wykrywania mającej na celu wyselekcjonowanie próbek o poziomie dioksyn i dioksynopodobnych PCB, który wynosi mniej niż 30-40 % poniżej lub powyżej dopuszczalnego poziomu; próbki, w których stwierdzono znaczne poziomy dioksyn, powinny być zanalizowane metodą potwierdzającą, która umożliwia ilościowe oznaczenie poziomu dioksyn oraz potwierdzenie ich tożsamości;

2) metody skriningowe (przesiewowe), które powinny umożliwić szybkie zbadanie wielu próbek w celu wytypowania tych próbek, które mogą potencjalnie zawierać wyższe poziomy dioksyn; metody te powinny cechować się przede wszystkim brakiem zdolności do uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych;

3) metody potwierdzające;

4) konieczność stosowania koncepcji tzw. współczynników równoważnej toksyczności - TEF (Toxicity Equivalency Factors) ze względu na obecność złożonych mieszanin różnych kongenerów dioksyn w próbkach środowiskowych i biologicznych (w tym próbki materiałów paszowych lub pasz), w celu uproszczenia szacowania ryzyka; współczynniki te zostały opracowane w celu lepszego wyrażenia stężeń mieszanin 2,3,7,8-podstawionych PCDD i PCDF, a także niektórych non-orto i mono-orto chloropodstawionych PCB oraz 2,3,7,8-TCDD, które mają właściwości podobne do dioksyn, w postaci równoważników toksyczności - TEQ (Toxicity Equivalent), wartości współczynników toksyczności (TEF) podane zostały w tabeli 14.

5) konieczność obliczania całkowitej zawartości związków dioksynopodobnych, wyrażonej w wartości TEQ, będącej sumą iloczynów otrzymanych poprzez mnożenie stężenia poszczególnych kongenerów oznaczonych w danej próbce przez ich TEF;

6) konieczność stosowania koncepcji granicy oznaczalności polegającej na przyjęciu odpowiednich granic oznaczalności wszystkich niewykrytych kongenerów do obliczenia ich udziału w wartości TEQ;

7) konieczność stosowania koncepcji zerowej, przy obliczeniu wartości TEQ, polegającej na przyjęciu wartości zero dla wszystkich niewykrytych kongenerów;

8) konieczność stosowania koncepcji połowy granicy oznaczalności polegającej na przyjęciu połowy wartości odpowiednich granic oznaczalności do obliczenia udziału wszystkich niewykrytych kongenerów w wartości TEQ.

Tabela 14. Wartości współczynników toksyczności (TEF) przyjętych w celu szacowania ryzyka dla zdrowia ludzi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO)³⁾

Kongener	Wartość TEF	Kongener	Wartość TEF
Dibenzo-p-dioksyny (PCDD)		„Dioksynopodobne” PCB: Non-orto PCB + Mono-orto PCB	
2,3,7,8-TCDD	1	Non-orto PCB	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		

³⁾ Tabelę przyjęto na spotkaniu, które odbyło się w Sztokholmie w dniach 15-18 czerwca 1997 r. (Van den Berg i wsp. (1998): Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106(12), 775).

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

Użyte skróty oznaczają: T – tetra (cztero); Pe – penta (pięcio); Hx – hexa (sześć); Hp – hepta (siedmio); O – octa (ośmio); CDD – chlorodibenzo-p-dioksyna; CDF – chlorodibenzofuran; CB – chlorobifenyl.

2. ZGODNOŚĆ PARTII LUB JEJ WYDZIELONEJ CZĘŚCI ZE SPECYFIKACJĄ

Należy powtórnie zanalizować próbkę laboratoryjną, jeżeli wynik pierwszej analizy jest mniejszy niż 20% poniżej lub powyżej wartości dopuszczalnej, i wyliczyć średnią wyników. Akceptuje się partię, jeżeli wynik pierwszej analizy jest ponad 20% poniżej maksymalnego dopuszczalnego poziomu, a w przypadku przeprowadzenia powtórnej analizy, jeżeli średnia wyników odpowiada dopuszczalnemu poziomowi, który jest określony w przepisach o dopuszczalnych zawartościach substancji niepożądanych w paszach.

3. WYMAGANIA W ZAKRESIE SPOSOBU PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO ANALIZY

Przy przygotowaniu próbek do analizy, oprócz zasad podanych w rozdziale 1 załącznika, przestrzega się następujących wytycznych:

- 1) próbki powinny być przechowywane i transportowane w pojemnikach:
 - a) szklanych,
 - b) aluminiowych,
 - c) polipropylenowych,
 - d) polietylenowych,
- 2) pojemnik na próbki powinien być wolny od pyłków papieru;
- 3) szkło laboratoryjne powinno być wypłukane rozpuszczalnikami, wcześniej zbadanymi na obecność dioksyn;
- 4) należy wykonać analizę próbki odczynnikowej, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej z wyłączeniem próbki;
- 5) masa próbki użytej do ekstrakcji powinna być odpowiednia dla wymagań czułości metody.

4. WYMAGANIA DOTYCZĄCE REALIZACJI METOD ANALITYCZNYCH

Metody analityczne powinny uwzględniać następujące kryteria:

- 1) należy osiągnąć biegłość w danej metodzie analitycznej w zakresie 50%, 100% czy 200% określonego poziomu zanieczyszczeń przy akceptowalnym względnym odchyleniu standardowym dla analiz powtarzanych, zgodnie z kryteriami podanymi w (6); potwierdzeniem biegłości laboratorium w zakresie danych analiz są pozytywne wyniki uzyskiwane w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości w zakresie oznaczania dioksyn i dioksynopodobnych PCB w odpowiednich próbkach żywności lub pasz;
- 2) granica oznaczalności ilościowej metody potwierdzającej powinna wynosić około 1/5 dopuszczalnego poziomu, aby zapewnić, że dopuszczalne współczynniki odchylenia nie przekroczą dopuszczalnego poziomu;
- 3) w ramach procedur wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości należy regularnie analizować próbki odczynnikowe i wzbogacone oraz próbki kontrolne (najlepiej na certyfikowanej substancji odniesienia, jeżeli takie substancje są dostępne).

5. WYMAGANIA DOTYCZĄCE PROCEDUR ANALITYCZNYCH

5.1. Wysoka czułość i niska granica wykrywalności poziomów zanieczyszczeń.

Ze względu na bardzo dużą toksyczność niektórych kongenerów metody oznaczania PCDD i PCDF powinny umożliwiać ich wykrywanie na poziomie pikogramów TEQ (10^{-12} g). Polichlorowane bifenyle występują w wyższych stężeniach niż PCDD i PCDF. Dla większości kongenerów dioksynopodobnych PCB wystarczająca jest czułość rzędu nanogramów (10^{-9} g). W przypadku oznaczania bardziej toksycznych dioksynopodobnych PCB kongenerów (w szczególności non-orto podstawione kongenery) niezbędne jest stosowanie metod o czułości takiej samej jak dla PCDD i PCDF.

5.2. Wysoka selektywność (specyficzność) stosowanych metod analitycznych.

W przypadku analizy PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB niezbędne jest ich odróżnienie od współekstrahujących się i interferujących substancji występujących w wyższych stężeniach różnych wielkości od analizowanych związków. Stosowane metody chromatografii gazowej z wykorzystaniem detektora masowego (GC/MS) powinny umożliwić rozróżnienie kongenerów toksycznych, tj. siedemnastu 2,3,7,8-podstawionych kongenerów PCDD i PCDF oraz dioksynopodobnych PCB od pozostałych. Zastosowanie testów biologicznych powinno umożliwić selektywne oznaczenie wartości równoważnika toksyczności TEQ jako sumy PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB.

5.3. Wysoka dokładność (poprawność i precyzja) stosowanych metod analitycznych.

Oznaczenie powinno dostarczyć wiarygodnego oszacowania wartości stężenia analitu w próbce. Wysoka dokładność pomiaru oznaczająca stopień zgodności między wynikiem badania a przyjętą wartością odniesienia jest warunkiem uniknięcia odrzucenia wyniku analizy próbki na podstawie słabej wiarygodności oszacowanej wartości TEQ. Dokładność charakteryzują 2 czynniki:

– poprawność rozumiana jako różnica między średnią wartością stężenia analitu zmierzoną w materiale certyfikowanym a deklarowaną, certyfikowaną wartością, wyrażoną jako jej odsetek, i

– precyzja wyrażana liczbowo jako wartość odchylenia standardowego w warunkach powtarzalności i odtwarzalności oraz określająca stopień zgodności między wynikami uzyskanymi przy wielokrotnym wykorzystaniu procedury badawczej.

5.4. Metody skринingowe (przesiewowe) mogą obejmować testy biologiczne oraz metody GC/MS. Metody potwierdzające wykorzystują metody wysokorozdzielczej chromatografii gazowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią mas (HRGC/HRMS). Przy oznaczaniu sumarycznej wartości TEQ powinny być spełnione kryteria podane w tabeli 15.

Tabela 15. Kryteria dla oznaczania sumarycznej wartości TEQ

	Metody skринingowe (przesiewowe)	Metody potwierdzające
Częstość wyników fałszywie negatywnych	< 1 %	
Poprawność		Od -20 % do +20 %
Względne odchylenie standardowe	< 30 %	< 15 %

6. WYMAGANIA DLA METOD GC/MS, W METODACH SKRININGOWYCH (PRZESIEWOWYCH) LUB POTWIERDZAJĄCYCH

6.1. W celu zwalidowania procedury analitycznej wzorce wewnętrzne 2,3,7,8-chloropodstawionych PCDD/F znakowane izotopem węgla ^{13}C oraz wzorce wewnętrzne dioksynopodobne znakowane izotopem węgla ^{13}C , jeżeli ta grupa związków ma być oznaczana, należy dodawać na wstępnych etapach metody lub na początku postępowania, w szczególności przed ekstrakcją. Należy dodać co najmniej 1 kongener dla każdego szeregu homologicznego, od tetra- do oktachloro PCDD/F, oraz co najmniej 1 kongener dla każdego szeregu homologicznego dioksynopodobnych PCB, jeżeli ta grupa związków ma być oznaczana, alternatywnie co najmniej 1 kongener na każdy jon masowy wykorzystywany przez spektrometr do selektywnego monitorowania PCDD/F i PCB.

Dla metod potwierdzających zaleca się przede wszystkim stosować wszystkie siedemnaście 2,3,7,8-podstawionych wewnętrznych wzorców PCDD/F znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie dwanaście dioksynopodobnych PCB znakowane izotopem węgla ^{13}C , jeżeli ta grupa związków ma być oznaczana. Wykorzystując odpowiednie roztwory wzorcowe, należy również oznaczyć względne współczynniki odpowiedzi dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C .

6.2. Przed procedurą ekstrakcji, w przypadku pasz pochodzenia roślinnego oraz pasz pochodzenia zwierzęcego o zawartości tłuszczu poniżej 10%, obowiązkiem jest dodanie wzorców wewnętrznych. W przypadku pasz pochodzenia zwierzęcego o zawartości tłuszczu powyżej 10 % wzorce wewnętrzne mogą być dodane zarówno przed, jak i po ekstrakcji tłuszczu. Wydajność procedury ekstrakcji tłuszczu, w zależności od etapu, na którym dodaje się wzorce wewnętrzne, a także od tego, czy wyniki są wyrażane na jednostkę masy produktu czy tłuszczu, należy poddać walidacji.

6.3. Przed analizą GC/MS należy dodać do próbki 1 lub 2 wzorce odzysku.

6.4. Sprawdzenie odzysku jest niezbędne. Współczynniki odzysku dla poszczególnych wzorców wewnętrznych w metodach potwierdzających powinny zawierać się w granicach od 60 do 120 %. Dopuszczalne są niższe lub wyższe wartości odzysku dla poszczególnych kongenerów, w szczególności dla niektórych hepta- i oktachlorodibenzo-p-dioksyn i furanów, jeżeli ich udział w sumarycznej wartości równoważnika toksyczności TEQ nie przekracza 10 % TEQ (tylko dla PCDD/F). W przypadku metod skринingowych (przesiewowych) wartość współczynnika odzysku może zawierać się w granicach od 30 do 140 %.

6.5. Rozdzielenie dioksyn od interferujących chlorowanych związków, takich jak dioksynopodobne PCB czy polichlorowane difenyletery, można osiągnąć przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych przede wszystkim wykorzystujących florisil, tlenek glinu lub kolumny węglowe.

6.6. Sprawność rozdzielania izomerów przy chromatografii gazowej powinna być wystarczająca (< 25 % nakładania się pików 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF).

6.7. Oznaczanie powinno być wykonywane zgodnie z Metodą EPA 1613, korekta B: oznaczanie tetra- do oktachlorowanych dioksyn i furanów metodą rozcieńczania izotopowego HRGC/HRMS lub inną, o równoważnych parametrach.

6.8. Dla pasz o zawartości dioksyn równej lub wyższej niż dopuszczalna ich zawartość, różnica między wynikami obliczonymi zgodnie z koncepcją granicy oznaczalności i zerowej nie powinna przekraczać 20 %. W przypadku pasz o zawartości dioksyn niższej od dopuszczalnej ich zawartości, różnica ta może zawierać się w granicach od 25 do 40 %.

7. SKRININGOWE (PRZESIEWOWE) METODY ANALIZY

W ramach metod skринingowych (przesiewowych) rozróżnia się klasyczne metody wstępne oraz analizę ilościową.

7.1. Klasyczne metody wstępne. W tych metodach porównuje się wartość sygnału uzyskanego w próbce badanej z wartością sygnału uzyskanego w próbce referencyjnej zawierającej analit na określonym poziomie. Próbkę, dla której wartość sygnału jest mniejsza od wartości sygnału próbki referencyjnej, uznaje się za ujemne, natomiast próbki, dla których wartość sygnału jest większa od wartości sygnału próbki referencyjnej, uznaje się za potencjalnie pozytywne. Dla metod wstępnych przyjmuje się następujące wymagania:

7.1.1. W każdej serii badanych próbek powinna znaleźć się próbka odczynnikowa i referencyjna, które ekstrahuje się i bada w tym samym czasie, wykorzystując te same procedury analityczne. Wartość sygnału uzyskanego w próbce referencyjnej powinna być wyraźnie większa od wartości sygnału uzyskanego w próbce odczynnikowej.

7.1.2. W celu wykazania sprawności metody w określonym zakresie stężeń w badaniach kontrolnych należy zbadać dodatkowe próbki referencyjne zawierające 50 i 200 % określonego poziomu analitu.

7.1.3. W przypadku badania innych matryc należy wykazać, że stosowane próbki referencyjne są odpowiednie. Można to osiągnąć przez włączenie próbek, dla których przy użyciu metody HRGC/HRMS wykazano, że równoważnik toksyczności TEQ jest zbliżony do próbki referencyjnej lub odczynnikowej, wzbogaconej na tym samym poziomie.

7.1.4. Badanie powtarzalności pozwalającej na uzyskanie informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej serii próbek jest szczególnie istotne, w przypadku gdy w testach biologicznych niemożliwe jest zastosowanie wzorców wewnętrznych. Wartość względnego odchylenia standardowego nie może przekraczać 30 %.

7.1.5. W przypadku testów biologicznych należy zdefiniować badane związki, możliwe interferencje oraz najwyższą dopuszczalną wielkość sygnału próbki odczynnikowej.

7.2. Analiza ilościowa wymaga badania szeregu roztworów wzorcowych, dwu- lub trzystopniowego procesu oczyszczania próbek oraz oznaczania próbek odczynnikowych i wzbogaconych w celu kontroli odzysku. Wyniki mogą być wyrażone jako równoważnik toksyczności (TEQ) przy założeniu, że wszystkie związki dające odpowiedź detektora wnoszą swój udział do sumarycznego TEQ. Można to osiągnąć przez zastosowanie TCDD lub mieszaniny wzorców dioksyn lub furanów do sporządzenia krzywej wzorcowej umożliwiającej obliczenie poziomu TEQ w ekstrakcie oraz w próbce; wynik jest korygowany o wartość TEQ uzyskaną w wyniku analizy próbki odczynnikowej, uwzględniającą obecność zanieczyszczeń w rozpuszczalnikach i użytych odczynnikach, oraz współczynnik odzysku obliczony na podstawie wartości TEQ oznaczonej w próbce kontrolnej wzbogaconej określonym poziomem analitu. Część obserwowanych strat odzysku jest spowodowana efektami matrycy lub różnicami między wartościami współczynników toksyczności (TEF) wykorzystywanymi w testach biologicznych oraz oficjalnymi wartościami TEF przyjętymi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO).

8. OGÓLNE WYMAGANIA DLA SKRININGOWYCH (PRZESIEWOWYCH) METOD ANALIZY

8.1. Do badań skринingowych (przesiewowych) można stosować metody GC/MS oraz testy biologiczne. Należy przestrzegać wymagań dla metod GC/MS, które podano w (6). Wymagania dla biologicznych testów komórkowych podano w (9), a dla zestawów do testów biologicznych w (10).

8.2. Jest niezbędne podanie informacji o liczbie wyników fałszywie dodatnich i wyników fałszywie ujemnych, poniżej i powyżej maksymalnego, dopuszczalnego poziomu, uzyskanych w dużych seriach próbek w porównaniu z wartościami TEQ uzyskanymi za pomocą metod potwierdzających. Rzeczywista częstość występowania wyników fałszywie ujemnych nie powinna przekraczać 1 %. Częstość uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich powinna być na tyle niska, aby metody skринingowe (przesiewowe) można było uznać za korzystne.

8.3. Wyniki pozytywne należy zawsze potwierdzać za pomocą analizy potwierdzającej HRGC/HRMS. Oprócz tego wyniki z szerokiego zakresu TEQ, około 2 do 10 % próbek ujemnych, należy potwierdzać techniką HRGC/HRMS. Informacje na temat korelacji między wynikami uzyskanymi w testach biologicznych oraz uzyskanymi techniką HRGC/HRMS należy udostępnić.

9. SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA DLA BIOLOGICZNYCH TESTÓW KOMÓRKOWYCH

9.1. W czasie wykonywania testów biologicznych w każdej serii powinno się uwzględnić zestaw referencyjnych stężeń TCDD lub mieszaniny dioksyn lub furanów (pełna krzywa dawka-efekt, $R^2 > 0,95$). Dla celów badań skринingowych (przesiewowych) można zastosować rozszerzoną krzywą wzorcową dla próbek zawierających niskie poziomy analitu.

9.2. Do oceny sprawności testu biologicznego powinny służyć wyniki badania referencyjnego stężenia TCDD (około trzykrotna granica oznaczalności) nanoszone na karty kontrolne w stałych odstępach czasu. Względna odpowiedź próbki referencyjnej w porównaniu do krzywej kalibracji TCDD można rejestrować alternatywnie, ponieważ odpowiedź komórkowa może zależeć od wielu czynników.

9.3. W celu uzyskania pewności, że wyniki są zgodne z wymaganiami, należy prowadzić i sprawdzać zapisy wyników uzyskanych dla wszystkich próbek referencyjnych.

9.4. Przy oznaczeniach ilościowych należy zwracać uwagę, aby zastosowane rozcieńczenie próbki mieściło się w zakresie liniowości krzywej kalibracji. Próbki, których sygnał przekracza zakres liniowości krzywej kalibracji, należy rozcieńczyć i ponownie oznaczyć. Zaleca się jednoczesne badanie co najmniej trzech rozcieńczeń.

9.5. Względne odchylenie standardowe nie powinno być większe niż 15 % dla trzykrotnej analizy każdego rozcieńczenia oraz nie może przekraczać 30 % dla wyników uzyskanych w trzech niezależnych eksperymentach.

9.6. Granicę wykrywalności można ustalić liczbowo jako trzykrotne odchylenie standardowe próbki odczynnikowej lub sygnału tła. Inną metodą jest wykorzystanie sygnału wyższego od tła (współczynnik 5 x odchylenie standardowe próbki odczynnikowej) wyznaczonego na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia. Granicę oznaczalności można ustalić liczbowo jako pięcio- lub sześciokrotną wartość odchylenia standardowego próbki odczynnikowej lub sygnału tła lub wykorzystać sygnał powyżej tła (współczynnik 10 x odchylenie standardowe próbki odczynnikowej) wyznaczony na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia.

10. SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA DLA ZESTAWÓW DO TESTÓW BIOLOGICZNYCH

10.1. Należy przestrzegać dostarczonych przez producenta instrukcji przygotowania próbek i ich analizy.

10.2. Zestawy do testów biologicznych nie mogą być wykorzystywane po upływie daty ważności.

10.3. Nie wolno używać materiałów lub składników przeznaczonych do wykorzystania w innych zestawach.

10.4. Zestawy do testów biologicznych powinny być przechowywane oraz używane do badań w temperaturze podanej w instrukcji.

10.5. W przypadku testów immunologicznych granicę wykrywalności określa się jako sumę średniej i trzykrotnego odchylenia standardowego obliczonego na podstawie wyników 10 analiz próbek odczynnikowych oraz współczynnika nachylenia krzywej wzorcowej wyznaczonej równaniem regresji liniowej.

10.6. Należy stosować wzorce referencyjne w celu kontroli, czy ich odpowiedź mieści się w akceptowanym zakresie.

11. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

Wyniki analiz badań dioksyn i dioksynopodobnych PCB powinny uwzględniać:

- 1) wyniki zawartości pojedynczych kongenerów PCDD/F i PCB obliczone zgodnie z koncepcją zerową, koncepcją granicy oznaczalności i koncepcją połowy granicy oznaczalności, w celu zapewnienia jak największej ilości informacji w sprawozdaniu, jeżeli stosowana metoda analizy to umożliwia, dając w ten sposób możliwość interpretacji uzyskanych wyników w zależności od określonych wymagań;
- 2) informację o zawartości lipidów w próbce oraz sposób ich ekstrakcji;
- 3) informację na temat odzysku wszystkich zastosowanych wzorców wewnętrznych, w przypadku gdy wartości odzysku wykraczają poza granice podane w (6) lub w razie przekroczenia dopuszczalnej zawartości.

ROZDZIAŁ 9**BADANIE NIEBIAŁKOWYCH ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH****OZNACZANIE MOCNIKA****1. CEL I ZAKRES**

Metoda służy do oznaczania zawartości mocznika w paszach.

2. ZASADA METODY

Próbka tworzy zawiesinę wodną ze środkiem klarującym. Suspensja jest filtrowana.

Zawartość mocznika w filtracie oznaczana jest po dodaniu 4-dwumetyloaminobenzaldehydu (4-DMAB) poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali 420 nm.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Roztwór 4-dwumetyloaminobenzaldehydu:

Rozpuścić 1,6 g czystego 4-DMAB w 100 ml 96% etanolu i dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego ($d = 1,19$). Trwałość tego odczynnika wynosi maksymalnie 2 tygodnie.

3.2. Roztwór Carreza I:

Rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynkowego $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.3. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.4. Aktywny węgiel nieabsorbujący mocznika (sprawdzony).

3.5. Roztwór 0,1% (m/V) mocznika.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Mikser (tumbler): od 35 do 40 obr/min.

4.2. Probówki: 160 x 16 mm ze szklanymi, szlifowanymi korkami.

4.3. Spektrofotometr.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Analiza próbek

Odważyć 2 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić razem z 1 g aktywnego węgla (3.4) w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 400 ml wody i po 5 ml roztworu Carreza I (3.2) i II (3.3). Mieszać przez 30 minut w mieszarce bębnowej (4.1). Uzupełnić wodą do pełnej objętości, wstrząsnąć i przefiltrować.

Do probówek (4.2) odlać 5 ml przezroczystego, bezbarwnego filtratu, dodać 5 ml roztworu 4-DMAB (3.1) i wymieszać. Wstawić probówki do wody o temperaturze 20°C. Po 15 minutach zmierzyć gęstość optyczną roztworu próbki spektrofotometrem o długości fali 420 nm. Porównać z roztworem odczynników ze ślepej próby.

5.2. Krzywa wzorcowa

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml nalać 1, 2, 4, 5 i 10 ml roztworu mocznika (3.5) i uzupełnić do pełnej objętości wodą. Odlać 5 ml każdego z roztworów, a następnie dodać do każdej kolby 5 ml roztworu 4-DMAB (3.1), wymieszać i zmierzyć gęstość optyczną w podany wyżej sposób, porównując z roztworem kontrolnym zawierającym 5 ml 4-DMAB i 5 ml wody wolnej od mocznika. Wykreślić krzywą wzorcową.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie krzywej wzorcowej oznaczyć zawartość mocznika w próbce.

Wynik wyrazić w procentach wagowych.

7. UWAGI

7.1. W przypadku gdy zawartość mocznika przekracza 3%, zmniejszyć masę próbki do 1 g lub rozcieńczyć pierwotny roztwór, tak aby w 500 ml nie znajdowało się więcej niż 50 mg mocznika.

7.2. W przypadku zawartości mocznika do 3%, zwiększać masę próbki, dopóki filtrat pozostaje przezroczysty i bezbarwny.

7.3. Jeżeli próbka zawiera proste związki azotowe, takie jak aminokwasy, gęstość optyczną należy mierzyć przy długości fali 435 nm.