

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI¹⁾

z dnia 6 marca 2006 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 (Dz. U. z 2005 r. Nr 255, poz. 2143) zarządza się, co na-
23 sierpnia 2001 r. o środkach żywienia zwierząt stępuje:

¹⁾ Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rolnictwo, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 1 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 31 października 2005 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 220, poz. 1892).

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, str. 13; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 1, str. 237);
- 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, str. 7; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 1, str. 277);
- 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 123 z 29.05.1972, str. 6; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 1, str. 306);
- 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 83 z 30.03.1973, str. 21; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 2, str. 12);
- 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, str. 8; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 3, str. 28);
- 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 206 z 29.07.1978, str. 43; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 3, str. 250);
- 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, str. 38; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 5, str. 76);
- 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, str. 34; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 6, str. 111);
- 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, str. 17; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 15, str. 67);
- 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, str. 54; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 15, str. 254);
- 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 257 z 19.09.1998, str. 14; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 23, str. 433);

§ 1. Ustala się metodykę postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych, stanowiącą załącznik do rozporządzenia.

§ 2. Traci moc rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 2 grudnia 2004 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie okre-

ślenia zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych (Dz. U. Nr 271, poz. 2688).

§ 3. Rozporządzenie wchodzi w życie po upływie 14 dni od dnia ogłoszenia.

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi: *K. Jurgiel*

-
- 12) dyrektywy Komisji 1999/27/WE z dnia 20 kwietnia 1999 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analiz dotyczących oznaczania amprolium, diklazurilu 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, str. 36; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 25, str. 235);
 - 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, str. 13; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 26, str. 250);
 - 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, str. 32; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 30, str. 12);
 - 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, str. 15; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 36, str. 430);
 - 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. UE L 339 z 24.12.2003, str. 78).
- Dane dotyczące ogłoszenia dyrektyw dotyczą ich ogłoszenia w Polskim wydaniu specjalnym Dziennika Urzędowego Unii Europejskiej.

**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	2246
1.1.	Przygotowanie próbek do badań	2246
1.2.	Wytyczne dotyczące odczynników i aparatury używanej w metodyce postępowania analitycznego	2246
1.3.	Stosowanie metodyki postępowania analitycznego i wyrażanie wyników	2247
ROZDZIAŁ 2	Badanie podstawowych składników pokarmowych	2247
2.1.	Oznaczanie białka surowego metodą Kjeldahla	2247
2.2.	Oznaczanie surowych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym	2248
2.2.1.	Oznaczanie aktywności pepsyny	2249
2.3.	Oznaczanie wilgotności	2251
2.4.	Oznaczanie wilgotności olejów i tłuszczów	2253
2.5.	Oznaczanie popiołu surowego	2253
2.6.	Oznaczanie popiołu nierozpuszczalnego w kwasie chlorowodorowym	2254
2.7.	Oznaczanie włókna surowego	2255
2.8.	Oznaczanie surowego oleju i tłuszczu	2256
2.9.	Oznaczanie skrobi metodą polarymetryczną	2258
2.10.	Oznaczanie cukrów	2259
2.11.	Oznaczanie laktozy	2262
ROZDZIAŁ 3	Badanie aminokwasów	2263
3.1.	Oznaczanie aminokwasów	2263
3.2.	Oznaczanie tryptofanu	2269
ROZDZIAŁ 4	Badanie składników mineralnych	2273
4.1.	Oznaczanie wapnia	2273
4.2.	Oznaczanie sodu	2274

4.3.	Oznaczanie potasu	2275
4.4.	Oznaczanie chlorków	2276
4.5.	Oznaczanie magnezu	2277
4.6.	Oznaczanie całkowitej zawartości fosforu metodą fotometryczną	2278
4.7.	Oznaczanie węglanów	2279
4.8.	Oznaczanie żelaza, miedzi, manganu i cynku	2281
ROZDZIAŁ 5	Badanie witamin	2284
5.1.	Oznaczanie witaminy A metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	2284
5.2.	Oznaczanie witaminy E metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	2288
ROZDZIAŁ 6	Badanie stymulatorów wzrostu	2292
6.1.	Oznaczanie wirginiamycyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	2292
6.2.	Oznaczanie Zn-bacytracyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	2294
6.3.	Oznaczanie flawofosfolipolu metodą dyfuzji w żelu agarowym	2297
6.4.	Oznaczanie spiramycyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	2301
6.5.	Oznaczanie awoparcyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	2303
6.6.	Oznaczanie soli sodowej monenzyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	2306
6.7.	Oznaczanie tylozyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	2309
6.8.	Oznaczanie karbadoksu	2310
6.9.	Oznaczanie olaquindoksu	2314
ROZDZIAŁ 7	Badanie kokcydiostatyków i innych produktów leczniczych	2316
7.1.	Oznaczanie metylobenzoquatu	2316
7.2.	Oznaczanie halofuginonu	2319
7.3.	Oznaczanie robenidyny	2322
7.4.	Oznaczanie amprolium metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	2325
7.5.	Oznaczanie diklazurilu	2328
7.6.	Oznaczanie soli sodowej lasalocidu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	2331
ROZDZIAŁ 8	Badanie substancji i materiałów niepożądanych i szkodliwych	2334
8.1.	Oznaczanie aflatoksyny B ₁ metodą jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej	2334
8.2.	Oznaczanie aflatoksyny B ₁ metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	2339
8.3.	Oznaczanie kwasu cyjanowodorowego	2346
8.4.	Szacowanie aktywności ureazy w produktach sojowych	2347
8.5.	Oznaczanie gossypolu	2347
8.6.	Wytyczne dotyczące mikroskopowej identyfikacji i oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego	2350

8.7.	Oznaczanie lotnych związków azotowych	2353
8.8.	Oznaczanie poziomów dioksyn i dioksynopodobnych PCB	2355
ROZDZIAŁ 9	Badanie niebiałkowych związków azotowych	2359
	Oznaczanie mocznika	2359

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 STOSOWANIA METODY

W rozdziale opisano tryb postępowania przy przygotowaniu próbki do badań ze średniej próbki laboratoryjnej przesyłanej do laboratorium upoważnionego do prowadzenia badań w ramach kontroli urzędowej zgodnie z przepisami rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 17 czerwca 2004 r. w sprawie szczegółowych warunków i sposobu pobierania próbek środków żywienia zwierząt i pasz leczniczych do badań oraz postępowania z pobranymi próbkami w ramach kontroli urzędowej (Dz. U. Nr 158, poz. 1654). 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 do badań podczas pracy nie powinny być stosowane. W przypadku środków żywienia zwierząt szczególnie wrażliwych na ciepło zaleca się ręczne rozdrabnianie. Ponadto zastosowany sprzęt nie powinien stanowić źródła zanieczyszczenia środka żywienia zwierząt mikroelementami. W przypadku gdy przygotowanie próbki do badań nie może być przeprowadzone bez znacznych zmian poziomu wilgotności średniej próbki laboratoryjnej, oznaczyć poziom jej wilgotności przed i po przygotowaniu próbki do badań zgodnie z metodą oznaczania wilgotności.

3. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Średnia próbka laboratoryjna jest dokładnie mieszana mechanicznie albo ręcznie, a następnie dzielona na dwie równe części i jeżeli jest to 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 sito o oczkach w kształcie kwadratu i boku wielkości 1 mm, zgodnie z zaleceniem ISO R565. Unikać nadmiernego rozdrobnienia. Przesianą próbkę zamieszać i umieścić w odpowiednim, czystym i suchym pojemniku wyposażonym w hermetyczny korek. Bezpośrednio przed odważeniem próbki do badań zamieszać powtórnie.

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 metodyce oznaczania wilgotności. Następnie postępować w sposób określony w ust. 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 badań dokładnie zamieszać.

3.4. Inne pasze.

Próbki, które nie mogą być przygotowane w jeden z wyżej opisanych sposobów, powinny być przygotowane w 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. W przypadku gdy w metodyce postępowania analitycznego nie podano konkretnego rozpuszczalnika lub rozcieńczalnika, w przypadku czynności wymagających przygotowania roztworów, rozcieńczania, sflukiwania lub przemywania stosować wodę. Jako podstawową przyjąć zasadę, że powinna być stosowana woda destylowana lub demineralizowana. W szczególnych przypadkach, wymienianych w metodach oznaczania, mogą być zalecane specjalne sposoby oczyszczania wody.

1.2.3. Oprócz aparatury i sprzętu wymienionego w metodyce postępowania analitycznego stosować aparaturę i sprzęt powszechnie stosowane w laboratorium, ponieważ w metodyce postępowania analitycznego wymienione zostały tylko ta aparatura i sprzęt, które wymagają szczególnego zastosowania. Wszystkie urządzenia powinny być czyste, zwłaszcza wtedy, gdy są oznaczane bardzo małe ilości substancji.

1.3. STOSOWANIE METODYKI POSTĘPOWANIA ANALITYCZNEGO I WYRAŻANIE WYNIKÓW

1.3.1. Jedna metoda oznaczania jest zalecana do analizy zawartości każdej substancji w środku żywienia zwierząt. Jeżeli mogą być zastosowane inne metody 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 oddzielnych części tej samej próbki do badań i powinien charakteryzować się zadowalającą powtarzalnością. Wynik powinien być wyrażony w sposób podany w metodyce postępowania analitycznego, zawierać odpowiednią liczbę cyfr znaczących i – jeżeli to konieczne – powinien być skorygowany do wilgotności średniej próbki laboratoryjnej przed przygotowaniem.

1.3.3. W przypadku substancji niepożądanych, o których mowa w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 28 czerwca 2004 r. w sprawie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszach (Dz. U. Nr 162, poz. 1704 oraz z 2005 r. Nr 151, poz. 1267), w tym dioksyn i dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB), uznaje się, że produkt przeznaczony do żywienia zwierząt jest niezgodny pod względem ustalonej zawartości maksymalnej, w przypadku gdy wynik analizy wskazuje na przekroczenie zawartości maksymalnej z uwzględnieniem rozszerzonej niepewności pomiaru i poprawki na stopień odzysku. Badane stężenie po uwzględnieniu poprawki i odjęciu rozszerzonej niepewności pomiaru stanowi podstawę oceny zgodności. Ma to zastosowanie jedynie w przypadkach, gdy stosowana metoda analizy pozwala na ustalenie wartości niepewności pomiaru i stopnia odzysku i dlatego nie jest to możliwe między innymi w przypadku analizy mikroskopowej.

Wynik analizy przedstawia się, jeżeli stosowana metoda analizy pozwala na ustalenie wartości niepewności pomiaru i stopnia odzysku w sposób następujący:

- 1) jako skorygowany lub nieskorygowany na stopień odzysku, powinien być wskazany sposób przedstawienia sprawozdania oraz stopień odzysku;
- 2) jako $x \pm U$, gdzie x oznacza wynik analizy, a U rozszerzoną niepewność pomiaru, stosując współczynnik rozszerzenia $k=2$, który daje wynik w przedziale ufności 95 %.

ROZDZIAŁ 2

BADANIE PODSTAWOWYCH SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH

2.1. OZNACZANIE BIAŁKA SUROWEGO METODĄ KJELDAHLA

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest mineralizowana kwasem siarkowym w obecności katalizatora. Kwaśny roztwór jest alkalizowany przy użyciu wodorotlenku sodu. Amoniak oddestylowany z zasadowego roztworu jest zbierany w znanej ilości roztworu kwasu siarkowego, którego nadmiar jest następnie 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, $\rho_{20} = 1,84$ g/ml.
- 3.5. Kwas siarkowy $c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5$ mol/l.
- 3.6. Kwas siarkowy $c(1/2 \text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1$ mol/l.
- 3.7. Czerwień metylowa, wskaźnik:
rozpuścić 300 mg czerwieni metylowej w 100 ml etanolu, $\sigma = 95 - 96$ % (V/V).
- 3.8. Wodorotlenek sodu (może być techniczny), roztwór o stężeniu 40 g w 100 ml (m/V: 40 %).
- 3.9. Wodorotlenek sodu, roztwór o stężeniu $c = 0,25$ mol/l.
- 3.10. Wodorotlenek sodu, roztwór o stężeniu $c = 0,1$ mol/l.
- 3.11. Granulowany pumeks, przemyty kwasem chlorowodorowym i wyprażony.
- 3.12. Acetanilid (temperatura topnienia = 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, 1g próbki i przenieść do kolby aparatu do mineralizacji. Dodać 15 g siarczanu potasu, o którym mowa w ust. 3.1, odpowiednią ilość katalizatora, o którym mowa w ust. 3.2, czyli od 0,3 do 0,4 g tlenku miedzi(II) lub od 0,9 do 1,2 g pentahydratu siarczanu miedzi(II), 25 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.4, kilka granul pumeksu, o którym mowa w ust. 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 się na ściankach kolby. Zapobiegać

miejscowemu przegrzewaniu się materiału i przylepianiu cząstek organicznych do tych miejsc. Od chwili, gdy roztwór stanie się klarowny i przyjmie jasnozieloną barwę, kontynuować ogrzewanie przez 2 godziny, a następnie pozostawić do schłodzenia.

5.2. Destylacja.

Ostrożnie dodać do kolby ilość wody wystarczającą do całkowitego rozpuszczenia siarczanów. Pozostawić do schłodzenia, a następnie dodać kilka granulek cynku, o których mowa w ust. 3.3. Umieścić w odbieralniku aparatu destylacyjnego odmierzone 25 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.5 lub w ust. 3.6, zależnie od przewidywanej zawartości azotu. Dodać kilka kropli wskaźnika czerwieni metylowej, o którym mowa w ust. 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. Przy wykonywaniu tej czynności uwzględnić ust. 8.3. Ostrożnie wlać 100 ml roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.8, do kolby mineralizacyjnej, nie dopuszczając do strat amoniaku. Przy wykonywaniu tej czynności uwzględnić ust. 8.1. Ogrzewać kolbę aż do całkowitego oddestylowania amoniaku.

5.3. Miareczkowanie.

Odmiareczkować nadmiar kwasu siarkowego w kolbie odbieralnika roztworem wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.9 lub w ust. 3.10, w zależności od stężenia zastosowanego kwasu siarkowego, do uzyskania punktu końcowego.

5.4. Ślepa próba.

W celu potwierdzenia, że zastosowane odczynniki nie zawierają azotu, przeprowadzić ślepe próby, w której skład wchodzi mineralizacja, destylacja i miareczkowanie, stosując 1 g sacharozy, o której mowa w ust. 3.13, zamiast próbki.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość białka surowego obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

gdzie:

V_0 – objętość w ml wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.9 lub w ust. 3.10, zużytego do ślepej próby,

V_1 – objętość w ml wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.9 lub w ust. 3.10, zużytego do miareczkowania próbki,

c – stężenie w mol/l roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.9 lub w ust. 3.10,

m – masa w 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, w której skład wchodzi mineralizacja, destylacja i miareczkowanie, stosując od 1,5 do 2,0 g acetanilidu, o którym mowa w ust. 3.12, w obecności 1 g sacharozy, o której mowa w ust. 3.13; 1 g acetanilidu zużywa 14,80 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 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. W przypadku konieczności przeniesienia zastosowanego urządzenia pomiędzy etapami mineralizacji i destylacji czynność ta powinna być wykonana bez jakichkolwiek strat reagentów. Jeżeli kolba aparatu destylacyjnego nie jest wyposażona we wkraplacz, dodać wodorotlenek sodu natychmiast przed podłączeniem kolby do chłodnicy, pozwalając, aby ciecz spływała powoli po ściankach.

8.2. Jeżeli roztwór przechodzi w postać stałą, ponownie przeprowadzić oznaczenie, stosując większe ilości kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.4, niż podano wyżej.

8.3. W przypadku analizy produktów o niskiej zawartości azotu objętość kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.6, która ma zostać dodana do kolby odbieralnika, może, w miarę potrzeby, być zmniejszona do 10 lub 15 ml i uzupełniona wodą do objętości 25 ml.

2.2. OZNACZANIE SUROWYCH BIAŁEK ROZPUSZCZONYCH PEPSYNĄ I KWASEM CHLOROWODOROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA 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). Aktywność pepsyny została określona w metodzie opisanej w rozdziale 2 w części 2.2.1. i powinna być określona zgodnie z tą metodą.

3.4. Około 0,2 % (m/V) świeżo przygotowanego roztworu pepsyny w kwasie chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.2, o aktywności 400 jednostek na litr (U/l).

3.5. Emulsja zapobiegająca spienieniu, proponuje się zastosować silikon.

3.6. Wszystkie odczynniki i roztwory określone w metodzie oznaczania białka surowego metodą Kjeldahla, opisanej w rozdziale 2 w części 2.1 w ust. 3.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Łaźnia wodna lub inkubator nastawiona na $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2. Kolba Kjeldahla.

4.3. Zestaw do destylacji.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie roztworu.

Przy przygotowaniu roztworu uwzględnić ust. 8.2.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2 g próbki i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 450 ml roztworu pepsyny, o którym mowa w ust. 3.4, uprzednio podgrzanego do $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, i zawartość wstrząsnąć, aby uniknąć zbrzylenia. Sprawdzić, czy pH zawiesiny jest mniejsze niż 1,7. Kolbę umieścić w łaźni wodnej lub w inkubatorze, o którym mowa w ust. 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, o którym mowa w ust. 3.1, i ostudzić do $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i przefiltrować.

5.2. Mineralizacja.

Odmierzyć 250 ml filtratu i umieścić w kolbie Kjeldahla. Dodać 15 g siarczanu potasu, odpowiednią ilość katalizatora – 0,3 do 0,4 g tlenku miedzi(II) lub 0,9 do 1,2 g pentahydratu siarczanu miedzi(II), 25 ml kwasu siarkowego – $\rho_{20} = 1,84\text{ g/ml}$, kilka granul pumeksu przemycygo kwasem chlorowodorowym i wyprażonego. Zamieszać je i doprowadzić do wrzenia. Jeżeli pojawi się piana, dodać kilka kropli emulsji zapobiegającej spienieniu. Kontynuować wrzenie aż do niemal całkowitego odparowania wody. Ostrożnie usunąć resztki wody, zmniejszając intensywność grzania. Kiedy roztwór stanie się klarowny i bezbarwny lub jasnozielony, w przypadku użycia katalizatora miedziowego, kontynuować ogrzewanie jeszcze przez godzinę, a następnie pozostawić do ostygnięcia.

5.3. Destylacja i miareczkowanie.

Postępować według metody oznaczania białka surowego metodą Kjeldahla, opisanej w rozdziale 2 w części 2.1 w ust. 5.2 i 5.3.

5.4. Ślepa próba.

Przeprowadzić ślepa próbę według tego samego sposobu 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 %.

8. OBJAŚNIENIA

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

8.2. Produkty o zawartości oleju lub tłuszczu przekraczającej 10 % poddać odtłuszczeniu poprzez ekstrakcję przy użyciu eteru ropy naftowej w temperaturze wrzenia od 40 do $60\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI PEPSYNY

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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 czasie minuty, w warunkach, w jakich jest przeprowadzana ta metoda, taką ilość grup hydroksyarylowych, która po zabarwieniu odczynnikiem Folin-Ciocalteu ma gęstość optyczną odpowiadającą 1 μmol tyrozyny potraktowanej w ten sam sposób.

3. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Hemoglobinę traktuje się roztworem pepsyny w kwasie chlorowodorowym. Niezhydrolizowaną frakcję białek strąca się kwasem trichlorooctowym. Do filtratu dodaje się wodorotlenek sodu i odczynnik Folin-Ciocalteu. Pomiaru absorbancji tego roztworu dokonuje się przy długości fali 750 nm, a 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 0,2 N.

4.2. Kwas chlorowodorowy 0,06 N.

4.3. Kwas chlorowodorowy 0,025 N.

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

4.5. Roztwór wodorotlenku sodu 0,5 N.

4.6. Odczynnik Folin-Ciocalteu:

Umieścić 100 g 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 ($d = 1,71$) i 100 ml stężonego kwasu chlorowodorowego ($d = 1,19$). Kolbę podłączyć do chłodnicy zwrotnej, doprowadzić roztwór do wrzenia i utrzymywać w stanie wrzenia, delikatnie gotując 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 przelać roztwór do kolby miarowej o pojemności 1 litra. Uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby, zamieszać i filtrować. Dopuszczalny jest każdy kolor roztworu, z wyjątkiem zielonkawego. Przed użyciem jedną objętość odczynnika rozcieńczyć dwoma objętościami wody.

4.7. Roztwór hemoglobiny:

Odważyć hemoglobinę, około 2 g substratu białkowego oznaczonego zgodnie z metodą Ansona, która odpowiada 354 mg azotu¹⁾, a następnie umieścić w kolbie o pojemności 200 ml z dopasowanym szlifem. Dodać kilka ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 4.2, połączyć kolbę z pompą próżniową i wstrząsać zawartość aż do zupełnego rozpuszczenia hemoglobiny. Odłączyć pompę i ciągle wstrząsając, rozcieńczać kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 4.2, do uzyskania objętości 100 ml. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

4.8. Roztwór wzorcowy tyrozyny:

W celu uzyskania podstawowego roztworu wzorcowego w kolbie miarowej o pojemności 1 litra rozpuścić 181,2 mg tyrozyny w rozcieńczonym kwasie chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 4.1, i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym kwasem. Następnie pobrać pipetą 20,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozcieńczyć zawartość kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 4.1, i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym kwasem. 1 ml tego roztworu zawiera 0,2 μmol tyrozyny.

5. APARATURA I SPRZĘT

5.1. Łaźnia wodna z termostatem umożliwiającym utrzymanie temperatury $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$.

5.2. Spektrometr.

5.3. Chronometr z odczytem co 1 sekundę.

5.4. Pehametr.

5.5. Szklana bagietka z jednej strony wyciągnięta.

6. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

6.1. Przygotowanie roztworu.

Przy przygotowaniu roztworu uwzględnić ust. 8.1.

Rozpuścić 150 mg pepsyny w 100 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 4.2. Odpipetować 2 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełnić rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 4.3, do pełnej objętości kolby. Sprawdzone pH-metrem pH roztworu powinno wynosić $1,6 \pm 0,1$. Kolbę zanurzyć w łaźni wodnej, o której mowa w ust. 5.1.

6.2. Hydroliza.

Odpipetować 5,0 ml roztworu hemoglobiny, o którym mowa w ust. 4.7, do probówki. Probówkę umieścić w łaźni wodnej, o której mowa w ust. 5.1, dodać 1 ml roztworu pepsyny otrzymanego w sposób określony w ust. 6.1 i wymieszać szklaną bagietką, o której mowa w ust. 5.5, około 10 razy w obydwie strony. Probówkę umieścić w łaźni wodnej ustawionej na $25\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1\text{ }^\circ\text{C}$ i trzymać przez 10 minut, licząc od dodania roztworu pepsyny. Temperaturę i czas dokładnie kontrolować. Następnie dodać 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego, o którym mowa w ust. 4.4, uprzednio podgrzanego do temperatury $25\text{ }^\circ\text{C}$, wymieszać i przefiltrować przez suchy filtr.

6.3. Wywołanie barwy i pomiar gęstości optycznej.

Odpipetować 5,0 ml filtratu do kolby Erlenmeyera o pojemności 50 ml, dodać 10,0 ml roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.5, i wstrząsając, dodać 3 ml rozcieńczonego odczynnika Folin-Ciocalteu, o którym mowa w ust. 4.6. Po upływie od 5 do 10 minut zmierzyć gęstość optyczną roztworu względem wody przy długości fali 750 nm, używając spektrometru i 1 cm kuwet.

6.4. Ślepa próba.

Dla każdego oznaczania przeprowadzić ślepa próbę w następujący sposób:

Odpipetować 5,0 ml roztworu hemoglobiny, o którym mowa w ust. 4.7, do probówki. Probówkę umieścić w łaźni wodnej, o której mowa w ust. 5.1, dodać 10,0 ml roztworu kwasu trichlorooctowego, o którym mowa w ust. 4.4, uprzednio ogrzanego do temperatury $25\text{ }^\circ\text{C}$, wymieszać i dodać 1,0 ml roztworu pepsyny otrzymanego w sposób określony w ust. 6.1. Zmieszać szklaną bagietką i wstawić probówkę do łaźni wodnej, o której mowa w ust. 5.1, o temperaturze $25\text{ }^\circ\text{C}$ na 10 minut. Wymieszać i przefiltrować przez suchy filtr. Następnie postępować w sposób określony w ust. 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 podzielną ilość wzorcowego roztworu tyrozyny, o której mowa w ust. 4.8, co odpowiada kolejno 0,2 μmol , 0,4 μmol , 0,6 μmol , 0,8 μmol i 1,0 μmol tyrozyny. Uzupełnić partię roztworem odniesienia wolnym od tyrozyny. Uzupełnić do objętości 5 ml kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 4.1. Do każdej kolby dodać po 10,0 ml roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.5, i ciągle wstrząsając po 3,0 ml rozcieńczonego odczynnika Folin-Ciocalteu, o którym mowa w ust. 4.6. Po upływie od 5 do 10 minut zmierzyć gęstość optyczną roztworu względem wody przy długości fali 750 nm, używając spektrometru i 1 cm kuwet. Wykreślić krzywą kalibracyjną w układzie zależności gęstości optycznej od ilości tyrozyny.

¹⁾ Oznaczyć zawartość azotu, stosując półmikrometodę Kjeldahla. Teoretyczna zawartość azotu wynosi 17,7 %.

7. OBLICZANIE WYNIKÓW

Z krzywej kalibracyjnej odczytać, w μmol ach, ilość tyrozyny, która odpowiada gęstości optycznej zabarwionego roztworu, skorygowaną o wynik ślepej próby.

Aktywność pepsyny wyrażoną w μmol ach tyrozyny na mg i na minutę, w temperaturze 25 °C, obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

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

P – jest ilością pepsyny odważoną w mg, dodanej w ilości, o której mowa w ust. 6.2.

8. OBJAŚNIENIA

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

8.2. 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 czasie 10 minut w temperaturze 35,5 °C).

2.3. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania wilgotności pasz. Metody nie stosuje się do badania produktów mlecznych występujących jako materiały paszowe, związki mineralne, mieszaniny składające się głównie ze związków mineralnych oraz nasion i owoców roślin oleistych określonych w rozporządzeniu Rady nr 865/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie wspólnej organizacji rynku oliwy z oliwek i oliwek stołowych oraz zmieniającym rozporządzenie (EWG) nr 827/68 (Dz. Urz. L 161 z 30.04.2004, str. 97; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 45, str. 153).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA 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 stałe zawierają duże ilości wilgotności.

3. APARATURA I SPRZĘT

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

3.2. Waga analityczna, ważąca z dokładnością do 0,5 mg.

3.3. Suche pojemniki z nierdzewnego metalu lub szkła z przykrywkami umożliwiającymi hermetyczne zamknięcie, o powierzchni roboczej umożliwiającej równomierne rozprowadzenie badanej próbki w warstwie $0,3 \text{ g/cm}^2$.

3.4. Suszarka elektryczna z termostatem ($\pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$), dobrze wentylowana i pozwalająca na szybką regulację temperatury²⁾.

3.5. Termostatowana suszarka próżniowa zaopatrzona w pompę olejową oraz mechanizm umożliwiający nawiew gorącego powietrza lub wprowadzenie czynnika suszącego; proponuje się zastosować tlenek 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 otwarciu opakowania próbki. Analiza powinna być wykonana co najmniej w dwóch powtórzeniach.

4.1. Przygotowanie.

4.1.1. Pasje inne niż określone w ust. 4.1.2 i w ust. 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 wilgotności, uwzględniając ust. 7.

4.1.2. Zboża i kasze.

Pobrać co najmniej 50 g próbki. Rozdrobnić na cząstki, które przechodzą przez oczka sita o średnicy 0,5 mm co najmniej w 50 % i pozostają w ilości nie większej niż 10 % na sicie o oczkach o średnicy 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 bezwodnego piasku, odważonego z dokładnością do 10 mg, i zmieszać do uzyskania homogennego produktu.

4.2. Suszenie.

4.2.1. Pasje inne niż określone w ust. 4.2.2 i w ust. 4.2.3.

Zważyć naczynko z przykrywką, o którym mowa w ust. 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 podgrzanej do temperatury 103 °C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, 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, o którym mowa w ust. 3.6, na 30 do 45 minut

²⁾ W celu suszenia ziarna zbóż, mąki, kasz i mączek stosować suszarki, które po wstępnym nastawieniu na temperaturę 131 °C powrócą do tej temperatury w czasie krótszym niż 45 minut po umieszczeniu w nich maksymalnej liczby próbek do jednoczesnego wysuszenia. Wentylacja powinna być taka, aby wyniki suszenia maksymalnej liczby próbek pszenicy pospolitej po 2 godzinach nie różniły się więcej niż 0,15 % w porównaniu do wyników uzyskanych po 4 godzinach suszenia.

i zważyć z dokładnością do 1 mg. Pasze 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, mąki, kasze i mączki.

Zważyć naczynko z przykrywką, o którym mowa w ust. 3.3, 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, o którym mowa w ust. 3.6, na od 30 do 45 minut w celu schłodzenia i zważyć z dokładnością do 1 mg.

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

Zważyć naczynko z przykrywką, o którym mowa w ust. 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, o której mowa w ust. 3.5, podgrzanej do temperatury od 80 do 85 °C. Aby zapobiec nadmiernemu spadkowi temperatury, umieścić naczynko w suszarce tak szybko, jak to możliwe. Podwyższyć ciśnienie do 100 Torr i pozostawić na 4 godziny pod działaniem tego ciśnienia, osuszając powietrze albo stosując czynnik suszący, około 300 g na 20 próbek. W drugim przypadku odłączyć pompę próżniową po uzyskaniu odpowiedniego ciśnienia. Czas suszenia liczyć od chwili, gdy suszarka osiągnie ponownie temperaturę od 80 do 85 °C. Ostrożnie zrównać ciśnienie w suszarce z ciśnieniem atmosferycznym. Otworzyć suszarkę, szybko nałożyć przykrywkę na naczynko i usunąć je z suszarki. Pozostawić do schłodzenia w eksykatorze, o którym mowa w ust. 3.6, przez od 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 określone w ust. 4.3.2.

Pasze stałe o wysokim poziomie wilgotności, trudne do rozdrabniania, poddać wstępnemu suszeniu w następujący sposób: Odważyć 50 g nierozdrobnionej próbki, przy czym pasze sprasowane lub zbrylone mogą wymagać wstępnego rozdrobnienia, z dokładnością do 10 mg, do odpowiedniego naczynia, w tym 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 poziom wilgotności obniży się do 8 – 12 %. Wyjąć próbkę z suszarki, pozostawić bez przykrycia do schłodzenia w laboratorium przez godzinę i zważyć z dokładnością do 10 mg. Szybko rozdrobnić, postępując w sposób określony w ust. 4.1.1, i suszyć w sposób określony w ust. 4.2.1 lub w ust. 4.2.3 w zależności od rodzaju paszy.

4.3.2. Zboża.

Ziarno zbóż o wilgotności wyższej niż 17 % poddać wstępnemu suszeniu w następujący sposób:

Odważyć 50 g nierozdrobnionego ziarna, z dokładnością do 10 mg, do odpowiedniego naczynia, w tym 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 bez przykrycia do schłodzenia w laboratorium przez 2 godziny i zważyć z dokładnością do 10 mg. Szybko rozdrobnić, postępując w sposób określony w ust. 4.1.2, i suszyć w sposób określony w ust. 4.2.2.

5. OBLICZANIE WYNIKÓW

Poziom wilgotności, w procentach wagowych, obliczyć według następujących wzorów:

5.1. Suszenie bez wstępnego podsuszania:

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

gdzie:

E – początkowa masa w g badanej próbki,
m – masa w g badanej próbki po wysuszeniu.

5.2. Suszenie z podsuszaniem:

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

gdzie:

E – początkowa masa w g badanej próbki,
M – masa w g badanej próbki po wstępnym podsuszaniu,
M' – masa w g badanej próbki po rozdrobnieniu,
m – masa w g badanej próbki po wysuszeniu.

6. SPRAWDZENIE METODY

6.1. Powtarzalność.

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

7. OBJASNIENIA

Jeżeli rozdrabnianie próbki jest konieczne i wpływa na poziom wilgotności w produkcji, wyniki analizy składników paszowych powinny być skorygowane o poziom wilgotności w początkowym stanie próbki.

2.4. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI OLEJÓW I TŁUSZCZÓW

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest suszona 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 około 3 cm.

3.2. Termometr rtęciowy z wzmocnionym zbiornikiem i nadmiarową rurką w górnym końcu, z podziałką od 80 °C do 110 °C lub więcej 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, o którym mowa w ust. 3.1, zawierającego termometr, o którym mowa w ust. 3.2. Ogrzewać na łaźni piaskowej lub płycie grzewczej, o których mowa w ust. 3.3, ciągle mieszając termometrem, tak aby uzyskać wzrost temperatury do 90 °C w czasie około 7 minut.

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

W celu całkowitego odparowania wilgotności 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, o którym mowa w ust. 3.4, i zważyć. Powtarzać ogrzewanie, dopóki ubytek masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie będzie większy niż 2 mg.

Wzrost masy próbki po powtórным ogrzewaniu wskazuje na utlenienie się tłuszczu. W takim przypadku do obliczenia wyniku wziąć ostatnią masę próbki, zanim wzrosła jej masa.

5. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wilgotność, w procentach wagowych, obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

M_0 – masa w g badanej próbki,

M_1 – masa w g naczynia z zawartością przed ogrzewaniem,

M_2 – masa w g naczynia z zawartością po ogrzewaniu.

Wyniki oznaczania niższe od 0,05 % zapisać, używając określenia „niższe od 0,05 %”.

6. SPRAWDZENIE METODY

6.1. 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 STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości popiołu surowego w paszach.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Spopielanie 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 grzewcza.

4.2. Elektryczny piec do spalań z termostatem.

4.3. Tygły do spalań platynowe lub ze stopu platyny i złota o zawartości 10 % Pt, 90 % Au, prostokątne o wymiarach 60 x 40 x 25 mm lub okrągłe o średnicy 60 – 75 mm i wysokości 20 – 25 mm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki lub 2,5 g w przypadku substancji pęczniejących i umieścić w wyprazonym tyglu do spalań o stałej masie. Tygiel postawić na płycie grzewczej i ogrzewać stopniowo aż do zwęglenia.

Następnie wstawić go do pieca o temperaturze ustawionej na 550 °C ± 5 °C. Utrzymywać w tej temperaturze aż do uzyskania popiołu o barwie białej, jasnoszarej lub jasnoczerwonej, świadczącej o niewystępowaniu cząsteczek 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 w g tygla z próbką po spaleniu,

b – masa w g tygla,

m – masa w g próbki.

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 spopielać, powinny być wstępnie spopielać, przez co najmniej 3 godziny, schłodzone, a następnie dodać do nich, ostrożnie, w taki sposób, aby nie spowodować strat popiołu i tworzenia się zbryleń, kilka kropli 20 % roztworu azotanu amonu. Po wysuszeniu kontynuować zwęglanie w piecu. Powtarzać czynność aż do całkowitego spopielenia.

7.2. W przypadku gdy badane produkty trudno poddają się postępowaniu określone w ust. 7.1, postępuje się w następujący sposób:

Po spopieleniu przez 3 godziny popiół umieścić w ciepłej wodzie i przefiltrować przez mały bezpopiołowy filtr. Spopielić filtr z zawartością w tyglu. Filtrat umieścić w schłodzonym tyglu, odparować do 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 spaleniu pozostałość zwilżyć małą ilością wody. Wysuszyć i spopielać w sposób określony w ust. 5.

2.6. OZNACZANIE POPIOŁU NIEROZPUSZCZALNEGO W KWASIE CHLOROWODOROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

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

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

2.2. Metoda B: próbka jest traktowana kwasem chlorowodorowym. Roztwór filtruje się, pozostałość spopiela i z otrzymanym popiołem postępuje się w sposób opisany w metodzie A.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, roztwór 3 N.

3.2. 20 % roztwór w m/V kwasu trichlorooctowego.

3.3. 1 % roztwór w m/V kwasu trichlorooctowego.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Płyta grzewcza.

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem.

4.3. Tygle do spaleń platynowe lub ze stopu platyny i złota o zawartości 10 % Pt, 90 % Au, prostokątne o wymiarach 60 x 40 x 25 mm lub okrągłe o średnicy 60 – 75 mm i wysokości 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 do badania. Przenieść popiół do zlewki o pojemności od 250 do 400 ml przy użyciu 75 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1. Powoli doprowadzić do wrzenia i gotować ostrożnie przez 15 minut. Przefiltrować gorący roztwór przez bibułę bez popiołu i przemywać pozostałość gorącą wodą, aż reakcja z kwasem przestanie być widoczna. Filtr z osadem wysuszyć i spopielić w uprzednio wytarowanym tyglu 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, o którym mowa w ust. 3.1, wymieszać i odczekać, aż roztwór przestanie się burzyć. Dodać kolejne 50 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1. Odczekać do ulotnienia się gazu, następnie umieścić zlewkę we wrzącej łaźni wodnej i trzymać ją tam przez 30 minut lub dłużej w celu całkowitej hydrolizy skrobi.

Gorący roztwór przefiltrować przez bibułę bez popiołu i przemyć 50 ml gorącej wody, uwzględniając ust. 7. Filtr z osadem umieścić w tyglu do spaleń, wysuszyć i spopielać w temperaturze nie niższej od 550 °C i nie wyższej od 700 °C. Popiół umieścić w zlewce o pojemności 250 do 400 ml przy użyciu 75 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1. Powoli doprowadzić do wrzenia i gotować ostrożnie przez 15 minut. Przefiltrować gorący roztwór przez bibułę bez popiołu i przemywać pozostałość gorącą wodą, aż reakcja z kwasem przestanie być widoczna. Filtr z osadem wysuszyć i spopielić w uprzednio wytarowanym tyglu w temperaturze nie niższej od 550 °C i nie wyższej od 700 °C. Ostudzić w ekzykatorze i zważyć.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Masę pozostałości obliczyć, odejmując tarę. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. OBJAŚNIENIA

Jeżeli filtracja ma trudny przebieg, zaleca się powtórne przeprowadzenie analizy, zastępując 50 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, 50 ml kwasu trichlorooctowego, o którym mowa w ust. 3.2, i przemywając filtr ciepłym roztworem kwasu trichlorooctowego, o którym mowa w ust. 3.3.

2.7. OZNACZANIE WŁÓKNA SUROWEGO

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbkę, w razie konieczności odtłuszczoną, gotuje się w roztworach kwasu siarkowego i wodorotlenku potasu o odpowiednim stężeniu. Pozostałość jest rozdzielana przez filtrację na filtrze ze szklanego spieku, przemywana, suszona, ważona i spopieleną 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, proponuje się zastosować n-oktanol.

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

3.4. Aceton.

3.5. Eter naftowy, o temperaturze 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. Urządzenie grzewcze do roztwarzania kwasem siarkowym lub roztworem wodorotlenku potasu, wyposażone w podstawkę mocującą tygiel filtracyjny, o którym mowa w ust. 4.2, i rurkę odprowadzającą z kranem służącą do ujęcia cieczy i próżni, ewentualnie ze sprężonym powietrzem. Przed użyciem każdego dnia podgrzać urządzenie, przemywając wrzącą wodą przez 5 minut.

4.2. Szklany tygiel filtracyjny ze spiekami o porach od 40 do 90 µm. Przed pierwszym użyciem ogrzewać przez kilka minut w temperaturze 500 °C i schłodzić, uwzględniając ust. 8.6.

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

4.4. Suszarka z termostatem.

4.5. Piec muflowy z termostatem.

4.6. Urządzenie do ekstrakcji składające się z podstawki mocującej tygiel filtracyjny, o którym mowa w ust. 4.2, i z rurki odprowadzającej z kranem służącej do ujęcia cieczy i próżni.

4.7. Pierścienie łączące, służące do połączenia urządzenia grzewczego, o którym mowa w ust. 4.1, tygla filtracyjnego, o którym mowa w ust. 4.2, cylindra, o którym mowa w ust. 4.3, oraz do połączenia urządzenia ekstrakcyjnego do ekstrakcji na zimno, o którym mowa w ust. 4.6, i tygla.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, 1 g przygotowanej próbki do tygla, o którym mowa w ust. 4.2, uwzględniając informacje określone w ust. 8.1, 8.2 i 8.3, i dodać 1 g materiału wspomagającego filtrowanie, o którym mowa w ust. 3.3. Podłączyć tygiel, o którym mowa w ust. 4.2, do urządzenia grzewczego, o którym mowa w ust. 4.1, a następnie przyłączyć cylinder, o którym mowa w ust. 4.3, do wcześniej wspomnianego tygla. Wlać 150 ml wrzącego kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.1, do cylindra połączonego z tygłem i, w razie potrzeby, dodać kilka kropli odczynnika przeciwpieniącego, o którym mowa w ust. 3.2. Doprowadzić ciecz do wrzenia w czasie 5 ± 2 minut i gotować przez 30 minut.

Otworzyć kran rurki odprowadzającej, o której mowa w ust. 4.1, i w warunkach próżni filtrować kwas siarkowy przez tygiel filtracyjny i przemyć pozostałość trzykrotnie 30 ml porcjami wrzącej wody, upewniając się, że pozostałość przefiltrowano do sucha po każdym przemyciu. Zamknąć ujście kranu i wlać 150 ml wrzącego roztworu wodorotlenku potasu, o którym mowa w ust. 3.7, do cylindra połączonego z tygłem i dodać kilka kropli odczynnika przeciwpieniącego, o którym mowa w ust. 3.2. Doprowadzić ciecz do wrzenia w czasie 5 ± 2 minut i gotować przez 30 minut. Przefiltrować i powtórzyć procedurę przemywania wykorzystaną w odniesieniu do kwasu siarkowego.

Po ostatnim przemyciu i wysuszeniu odłączyć tygiel i jego zawartość i podłączyć go do urządzenia do zimnej ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.6. W warunkach próżni przemywać pozostałość w tyglu trzema kolejnymi porcjami 25 ml acetonu, o którym mowa w ust. 3.4, upewniając się, że pozostałość przefiltrowano do sucha po każdym przemyciu.

Wysuszyć tygiel do stałej masy w suszarce ustawionej na temperaturę 130 °C. Po każdym suszeniu schłodzić w ekssykatorze i niezwłocznie zważyć. Umieścić tygiel w piecu muflowym i spopielać do stałej masy w temperaturze od 475 do 500 °C przez co najmniej 30 minut.

Przed ważeniem po każdym ogrzewaniu najpierw schłodzić w piecu, a następnie w ekssykatorze.

Przeprowadzić test ślepej próby bez próbki. Ubytek masy po spopieleniu nie może przekraczać 4 mg.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Procentową zawartość włókna surowego w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{(b - c) \times 100}{a}$$

gdzie:

a – masa próbki, w g,

b – ubytek masy po spopieleniu, w trakcie oznaczania, w g,

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

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. 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 % względem wyższego wyniku dla zawartości włókna surowego równej lub wyższej niż 10 %.

8. OBJASNIENIA

8.1. Pasze zawierające ponad 10 % tłuszczu surowego przed oznaczeniem odtłuścić eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.5. Podłączyć tygiel filtracyjny, o którym mowa w ust. 4.2, wraz z jego zawartością do elementu służącego do ekstrakcji na zimno, o którym mowa w ust. 4.6, zastosować próżnię i przemyć pozostałość trzykrotnie 30 ml porcjami eteru naftowego, upewniając się, że pozostałość jest sucha. Podłączyć tygiel wraz z jego zawartością do urządzenia grzewczego, o którym mowa w ust. 4.1, i postępować w sposób określony w ust. 5.

8.2. Pasze zawierające tłuszcze, które nie mogą być bezpośrednio ekstrahowane eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.5, odtłuścić, w sposób określony w ust. 8.1, i ponownie odtłuścić po gotowaniu w kwasie.

Po gotowaniu z kwasem, a następnie przemyciu, podłączyć tygiel wraz z jego zawartością do zestawu do elementu służącego do ekstrakcji na zimno, o którym mowa w ust. 4.6, i przemyć trzykrotnie 30 ml acetonu, a następnie trzykrotnie 30 ml porcjami eteru naftowego. Przefiltrować w warunkach próżni do sucha i postępować w sposób określony w ust. 5, rozpoczynając postępowanie z wodorotlenkiem potasu.

8.3. W przypadku gdy pasze zawierają ponad 5 % węglanów, wyrażonych jako węglan wapnia, podłączyć tygiel, o którym mowa w ust. 4.2, z odważoną próbką do urządzenia grzewczego, o którym mowa w ust. 4.1. Przemyć próbkę trzykrotnie 30 ml porcjami kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.6. Po dodaniu każdej porcji kwasu pozostawić próbkę na około minutę przed filtrowaniem. Przemyć 30 ml wody i postępować w sposób określony w ust. 5.

8.4. Jeżeli używana jest aparatura stojąca, a w szczególności kilka tygli jest podłączonych do jednego urządzenia grzewczego, nie wykonywać dwóch pojedynczych oznaczeń tej samej próbki w tej samej partii.

8.5. Jeżeli po gotowaniu filtrowanie roztworu kwasowego i zasadowego jest trudne, przepuścić sprężone powietrze przez rurkę podłączaną do urządzenia grzewczego i następnie kontynuować filtrowanie.

8.6. Temperatura spopielenia nie powinna przekraczać 500 °C ze względu na wytrzymałość szklanego tygla. Postępować w taki sposób, aby uniknąć szoku termicznego podczas ogrzewania i schładzania.

2.8. OZNACZANIE SUROWEGO OLEJU I TŁUSZCZU

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości surowych olejów i tłuszczów w paszach. Metody nie stosuje się do analizy nasion i owoców roślin oleistych określonych w rozporządzeniu Rady nr 865/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie wspólnej organizacji rynku oliwy z oliwek i oliwek stołowych oraz zmieniającym rozporządzenie (EWG) nr 827/68 (Dz. Urz. L 161 z 30.04.2004, str. 97; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 45, str. 153).

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

1.1. Postępowanie A – Bezpośrednio ekstrahowane oleje i tłuszcze.

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

1.2. Postępowanie B – Całkowite surowe oleje i tłuszcze.

Postępowanie ma zastosowanie do materiałów paszowych pochodzenia zwierzęcego i wszystkich mieszanek paszowych. Jest stosowane do tych wszystkich materiałów, z których oleje i tłuszcze nie mogą być w całości wyekstrahowane bez uprzedniej hydrolizy, a w szczególności do glutenu, drożdży, białka ziemniaczanego i produktów poddanych przetwarzaniu, w szczególności poprzez ekstruzję, płatkowanie, ogrzewanie.

1.3. Interpretacja wyników.

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA 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 filtrowana. Pozostałość jest przemywana i suszona, a następnie poddawana oznaczeniu przy zastosowaniu postępowania 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/100 ml.

3.2. Siarczan sodu bezwodny.

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

3.4. Materiał wspomagający filtrację; proponuje się zastosować Kieselguhr, Hyflo-superpel.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Aparat do ekstrakcji. Jeżeli jest wyposażony w syfon tak jak aparat Soxhleta, szybkość skraplania powinna wynosić około 10 cykli na godzinę. Jeżeli aparat nie ma syfonu, wówczas szybkość skraplania powinna wynosić około 10 ml na minutę.

4.2. Gilzy do ekstrakcji niezawierające substancji rozpuszczalnych w eterze naftowym i o porowatości odpowiadającej wymaganiom określonym w ust. 4.1.

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

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Postępowanie A.

Przy postępowaniu A uwzględnić ust. 8.1.

Odważyć 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, przenieść do gilzy ekstrakcyjnej, o której mowa w ust. 4.2, i przykryć beztluszczowym zwitkiem waty bawełnianej. Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.1, i ekstrahować przez 6 godzin eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.1. Zebrać ekstrakt eterowy do suchej, zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu³⁾.

Oddestylować rozpuszczalnik. Suszyć pozostałość, umieszczając kolbę w suszarce, o której mowa w ust. 4.3, na 1,5 godziny. Ochłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczów, przy czym straty masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie powinny przekraczać 1 mg.

5.2. Postępowanie B.

Przy uwzględnieniu ust. 8.2 odważyć 2,5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, umieścić w zlewce o pojemności 400 ml lub w kolbie stożkowej o pojemności 300 ml i dodać 100 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.3, oraz kawałki pumeksu. Przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym lub dopasować kolbę stożkową z chłodnicą zwrotną. Doprowadzić mieszaninę do spokojnego wrzenia w małym płomieniu palnika lub na płytce grzewczej i utrzymywać wrzenie przez godzinę. Nie dopuszczać do osadzania się produktu na ścianach naczynia.

Ochłodzić i dodać materiał wspomagający filtrację, o którym mowa w ust. 3.4, w ilości zapobiegającej jakimkolwiek stratom oleju i tłuszczu podczas filtracji. Przefiltrować przez zwilżony, beztluszczowy podwójny filtr papierowy. Przemycać pozostałość zimną wodą do uzyskania obojętnego filtratu. Sprawdzić, czy filtrat nie zawiera śladów olejów lub tłuszczów. Ich obecność wskazuje na konieczność przeprowadzenia przed hydrolizą ekstrakcji eterem naftowym przy zastosowaniu postępowania A.

Umieścić na szkiełku zegarkowym podwójny filtr papierowy z pozostałością i suszyć przez 1,5 godziny w suszarce nawiewnej, o której mowa w ust. 4.3, w temperaturze $100 \text{ °C} \pm 3 \text{ °C}$.

Umieścić podwójny filtr papierowy zawierający suchą pozostałość w gilzie ekstrakcyjnej, o której mowa w ust. 4.2, i przykryć beztluszczowym zwitkiem waty bawełnianej. Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.1, i postępować w sposób określony w ust. 5.1.

6. WYRAŻENIE WYNIKÓW

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

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność.

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

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

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Jeżeli produkty mają wysoką zawartość olejów i tłuszczów, które są trudne do rozdrobnienia lub osiągnięcia homogenności badanej próbki, postępować w sposób podany poniżej.

Odważyć 20 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i zmieszać z 10 g lub więcej bezwodnego siarczanu sodu, o którym mowa w ust. 3.2. Ekstrahować eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.1, jak określono w ust. 5.1. Otrzymany ekstrakt uzupełnić do objętości 500 ml eterem, o którym mowa w ust. 3.1, i zmieszać. Pobrać 50 ml roztworu i przenieść do małej, suchej i zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu³⁾. Oddestylować rozpuszczalnik. Suszyć pozostałość, umieszczając kolbę w suszarce, o której mowa w ust. 4.3, na 1,5 godziny. Ochłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczów, przy czym straty masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie mogą przekraczać 1 mg.

Usunąć rozpuszczalnik z pozostałości po ekstrakcji w gilzie, rozdrobnić pozostałość na 1 mm cząstki, ponownie umieścić w gilzie, nie dodając siarczanu sodu. Umieścić gilzę w aparacie do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.1, i ekstrahować przez 6 godzin eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.1. Zebrać ekstrakt eterowy do suchej, zważonej kolby zawierającej kawałki pumeksu³⁾.

Oddestylować rozpuszczalnik. Suszyć pozostałość, umieszczając kolbę w suszarce, o której mowa w ust. 4.3, na 1,5 godziny. Ochłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczów, przy czym straty masy pomiędzy dwoma kolejnymi ważeniami nie mogą przekraczać 1 mg.

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

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

³⁾ W przypadkach gdy tłuszcz lub olej powinien być poddany dalszym badaniom jakościowym, zastąpić pumeks kuleczkami szklanymi.

gdzie:

a – masa w g pozostałości po pierwszej ekstrakcji, podzielonej części ekstraktu,

b – masa w g pozostałości po drugiej ekstrakcji.

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

8.3. W przypadku karmy dla zwierząt domowych o wysokiej zawartości wody może wystąpić potrzeba zmieszania tej karmy przed hydrolizą i ekstrakcją z bezwodnym siarczanem sodu przy zastosowaniu postępowania B.

8.4. W przypadku postępowania B określonego w ust. 5.2 do przemywania pozostałości po filtracji lepiej użyć wody gorącej zamiast zimnej.

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

8.6. Jeżeli zawartość surowego oleju lub tłuszczu jest większa niż 15 %, zaleca się wstępną ekstrakcję przy zastosowaniu postępowania A przed hydrolizą i powtórna ekstrakcję przy zastosowaniu postępowania B. W pewnym stopniu postępowanie to zależy od rodzaju paszy i rodzaju oleju lub tłuszczu w paszy.

2.9. OZNACZANIE SKROBI METODĄ POLARYMETRYCZNĄ

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do polarymetrycznego oznaczania zawartości skrobi i wysokocząsteczkowych produktów jej rozkładu w paszach w celu sprawdzenia zgodności z rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 12 maja 2005 r. w sprawie dodatkowych informacji umieszczanych na oznakowaniu pasz (Dz. U. Nr 92, poz. 773).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Metoda składa się z dwóch oznaczeń. W pierwszym ciepła próbka jest traktowana rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym. Po sklarowaniu i przefiltrowaniu mierzy się polarymetrycznie skręcalność optyczną roztworu.

W drugim oznaczeniu próbka jest ekstrahowana 40 % etanolem. Po zakwaszeniu filtratu kwasem chlorowodorowym, sklarowaniu i przefiltrowaniu mierzy się tak jak w pierwszym oznaczeniu skręcalność optyczną.

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, (m/V) 1,128 %.

Stężenie sprawdzić poprzez miareczkowanie przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu 0,1 mol/l w obecności czerwieni metylowej 0,1 % (m/V) w 94 % (V/V) etanolu. 10 ml = 30,94 ml NaOH o stężeniu 0,1 mol/l.

3.3. Roztwór Carreza I:

Rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

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 objętości 1 litra 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 szklanym i chłodnicą zwrotną.

4.2. Polarymetr lub sacharymetr.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbki.

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

5.2. Oznaczanie całkowitej skręcalności optycznej (P lub S), przy uwzględnieniu ust. 7.1.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2,5 g rozdrobnionej próbki i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml. Dodać 25 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, wstrząsając do równomiernego rozprowadzenia próbki i dodać następną porcję 25 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 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 pozostawała w stanie wrzenia, gdy jest w niej zanurzona kolba. Nie wyjmować kolby z wody w trakcie wstrząsania. Po 15 minutach wyjąć kolbę z łaźni wodnej, dodać 30 ml zimnej wody i natychmiast schłodzić do temperatury 20 °C.

Dodać 5 ml roztworu Carreza I, o którym mowa w ust. 3.3, i wstrząsać przez minutę. Następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II, o którym mowa w ust. 3.4, i ponownie wstrząsać przez minutę. Uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby, zmieszać i przefiltrować. W tym rzadkim przypadku, gdy filtrat nie jest idealnie klarowny, powtórzyć oznaczanie przy użyciu większej ilości roztworów Carreza I i II; proponuje się zastosować 10 ml.

Zmierzyć skręcalność optyczną roztworu w 200 mm rurce przy zastosowaniu 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, o którym mowa w ust. 3.5, uwzględniając ust. 7.2. Pozostawić kolbę na godzinę w temperaturze pokojowej, wstrząsając w tym czasie sześciokrotnie kolbą, tak aby próbka została dobrze zmieszana z etanolem. Uzupełnić etanolem, o którym mowa w ust. 3.5, do pełnej objętości kolby, zmieszać i przefiltrować. Pobrać pipetą 50 ml filtratu, co jest równe 2,5 g próbki, do kolby Erlenmeyera o pojemności 250 ml, dodać 2,1 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, i energicznie wstrząsnąć. Przymocować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera i zanurzyć tę kolbę we wrzącej łaźni wodnej. Po 15 minutach wyjąć kolbę Erlenmeyera z łaźni, przenieść zawartość do kolby miarowej o pojemności 100 ml, spuścić kolbę Erlenmeyera niewielką ilością zimnej wody i schłodzić do temperatury 20 °C. Sklarować przy użyciu

roztworów Carreza I, o którym mowa w ust. 3.3, i Carreza II, o którym mowa w ust. 3.4, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby, zmieszać, przefiltrować i zmierzyć skręcalność optyczną w sposób określony w drugim i trzecim akapicie ust. 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 kątowych,

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

$[\alpha]^{20}_D$ – określona skręcalność optyczna czystej skrobi; umowne wartości liczbowe przyjęte dla współczynnika 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 mieszaniny 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 w g sacharozy w 100 ml wody ulegająca skręcalności optycznej 100 stopni sacharymetrycznych, podczas pomiaru przy użyciu rurki o długości 200 mm:

16,29 – dla sacharymetrów francuskich,

26,00 – dla sacharymetrów niemieckich,

20,00 – dla sacharymetrów połączonych,

$[\alpha]^{20}_D$ – określona skręcalność optyczna czystej skrobi przy uwzględnieniu ust. 6.1.

6.3. Powtarzalność.

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

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

– 1,1 % odpowiednio dla zawartości skrobi równej lub wyższej niż 40 %.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Jeżeli próbka zawiera więcej niż 6 % węglanów, w przeliczeniu na węglan wapnia, zniszczyć je przy użyciu odpowiedniej ilości rozcieńczonego kwasu siarkowego przed określeniem całkowitej skręcalności optycznej.

7.2. W przypadku produktów o wysokiej zawartości laktozy, takich jak mleko w proszku serum lub półtłuste mleko w proszku, postępować w następujący sposób: po dodaniu 80 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.5, przymocować chłodnicę zwrotną do kolby i kolbę tę zanurzyć w łaźni wodnej o temperaturze 50 °C na 30 minut. Pozostawić do ochłodzenia i kontynuować analizę w sposób określony w ust. 5.3.

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

- produkty z buraków cukrowych takie, jak wysłodki buraczane, melasa buraczana, wysłodki buraczane melasowane, wywar buraczany melasowany,
- miazga (pulpa, wysłodki) cytrusowa,
- siemię lniane, ekspelery z siemienia lnianego, siemię lniane ekstrahowane,
- nasiona rzepaku, ekspelery z nasion rzepaku, ekstrahowane nasiona rzepaku, łuski nasion rzepaku,
- nasiona słonecznika, ekstrahowane nasiona słonecznika, nasiona słonecznika częściowo huskane, ekstrahowane,
- ekspelery kopry, kopra ekstrahowana,
- miazga (pulpa) ziemniaczana,
- drożdże odwodnione,
- produkty bogate w inulinę, a w szczególności chipsy i mączka z karczochów jerozolimskich,
- skwarki.

2.10. OZNACZANIE CUKRÓW

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości cukrów redukujących i całkowitej zawartości cukrów po inwersji wyrażonych jako glukoza lub w razie potrzeby jako sacharoza, przeliczając przez współczynnik 0,95. Metoda jest stosowana do mieszanek paszowych. Dla innych pasz stosuje się specjalne metody. W razie potrzeby laktozę mierzy się oddzielnie, uwzględniając ją w obliczeniach.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Cukry ekstrahuje się w rozcieńczonym etanolu. Otrzymany roztwór 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), $d = 0,948$ g/ml przy temperaturze 20 °C, obojętny wobec fenoloftaleiny.

3.2. Roztwór Carreza I:

Rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.3. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić do objętości 1 litra 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:

Ostrożnie mieszając, dodać roztwór kwasu cytrynowego, o którym mowa w ust. 3.8.2, do roztworu węglanu sodu, o którym mowa w ust. 3.8.3. Następnie dodać roztwór siarczanu miedzi, o którym mowa w ust. 3.8.1, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą. Zostawić na noc do osadzenia i przefiltrować. Sprawdzić normalność otrzymanego odczynnika (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2 N). pH roztworu powinno wynosić około 9,4.

3.8.1. Roztwór siarczanu miedzi:

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

3.8.2. Roztwór kwasu cytrynowego:

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

3.8.3. Roztwór węglanu sodu:

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

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

3.10. Roztwór skrobi:

Do 1 litra wrzącej wody dodać 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody. Gotować 3 minuty, pozostawić do schłodzenia, a jeżeli to konieczne dodać 10 mg jodku rtęci jako środka konserwującego.

3.11. Kwas siarkowy 6 N.

3.12. 30 % (m/V) roztwór jodku potasu.

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

3.14. 3-metylobutan-1-ol.

4. APARATURA I SPRZĘT

Mikser lub tumbler: od 35 do 40 obr/min.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Ekstrakcja próbki.

Odważyć 2,5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 200 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, zmieszać w mikserze przez godzinę. Dodać 5 ml roztworu Carreza I, o którym mowa w ust. 3.2, i mieszać przez minutę. Dodać 5 ml roztworu Carreza II, o którym mowa w ust. 3.3, i ponownie mieszać przez minutę. Uzupełnić do pełnej objętości kolby etanolem, o którym mowa w ust. 3.1, homogenizować i przefiltrować. Pobrać 200 ml filtratu i odparować do około połowy objętości w celu usunięcia większości etanolu. Przenieść ilościowo pozostałość po odparowaniu do kolby miarowej o pojemności 200 ml przy użyciu ciepłej wody, schłodzić, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, homogenizować i, jeżeli to konieczne, przefiltrować. Roztwór ten będzie użyty do oznaczenia zawartości cukrów redukujących i, po inwersji, całkowitej zawartości cukrów.

5.2. Oznaczanie cukrów redukujących.

Używając pipety, pobrać nie więcej niż 25 ml roztworu zawierającego mniej niż 60 mg cukrów redukujących wyrażonych jako glukoza. Jeżeli to konieczne, uzupełnić do objętości 25 ml wodą destylowaną i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luff-Schoorla. Wynik wyrazić jako procentową zawartość glukozy w próbce.

5.3. Oznaczenie całkowitej zawartości cukrów po inwersji.

Używając pipety, pobrać 50 ml roztworu i przenieść go do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Dodać kilka kropli roztworu oranżu metylowego, o którym mowa w ust. 3.4, i następnie, ostrożnie mieszając, dodać kwas chlorowodorowy, o którym mowa w ust. 3.5, aż do zmiany barwy cieczy na czerwoną. Dodać 15 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.6, zanurzyć kolbę we wrzącej łaźni wodnej na 30 minut. Szybko schłodzić do temperatury około 20 °C i dodać 15 ml roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.7. Uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą i homogenizować. Pobrać nie więcej niż 25 ml roztworu zawierającego mniej niż 60 mg cukrów redukujących wyrażonych jako glukoza. Jeżeli to konieczne, uzupełnić kolbę do objętości 25 ml wodą destylowaną i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luff-Schoorla. Wynik wyrazić jako procentową zawartość glukozy lub, jeżeli to konieczne – sacharozy, mnożąc przez współczynnik 0,95.

5.4. Miareczkowanie metodą Luff-Schoorla.

Używając pipety, pobrać 25 ml odczynnika Luff-Schoorla, o którym mowa w ust. 3.8, i przenieść go do kolby Erlenmayera o pojemności 300 ml, dodać 25 ml klarownego roztworu cukru. Dodać 2 granulki pumeksu, o których mowa w ust. 3.13, ogrzewać nad średnim płomieniem, ręcznie mieszając, i doprowadzić ciecz do wrzenia w czasie około 2 minut. Natychmiast postawić kolbę na siatce azbestowej z otworem o średnicy około 6 cm, pod którym pali się płomień. Płomień powinien być tak ustawiony, aby ogrzewane było tylko dno kolby. Dopasować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmayera. Gotować 10 minut. Schłodzić natychmiast zimną wodą i po około 5 minutach miareczkować w następujący sposób:

Dodać 10 ml roztworu jodku potasu, o którym mowa w ust. 3.12, i od razu po tej czynności, zachowując ostrożność ze względu na ryzyko powstania piany, dodać 25 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.11. Miareczkować roztworem

tiosiarczaniu(VI) sodu, o którym mowa w ust. 3.9, do pojawienia się mętnej żółtej barwy, dodać wskaźnik skrobiowy, o którym mowa w ust. 3.10, i dokończyć miareczkowanie.

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie na mieszaninie 25 ml odczynnika Luff-Schoorla, o której mowa w ust. 3.8, i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasu, o którym mowa w ust. 3.12, i 25 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 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 tiosiarczaniu(VI) sodu 0,1 N.

Wynik wyrazić jako udział procentowyw próbce.

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 wrzenia

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 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	
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

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. W przypadku pasz bogatych w melasę i innych pasz, które nie są szczególnie homogenizowane, odważyć 20 g próbki i umieścić z 500 ml wody w kolbie miarowej o pojemności 1 litra. Mieszać przez godzinę w mikserze. Sklarować odczynnikami Carreza I, o których mowa w ust. 3.2, i Carreza II, o których mowa w ust. 3.3, w sposób określony w ust. 5.1 przy użyciu czterokrotnie większych ilości każdego odczynnika. Uzupełnić kolbę do objętości 80 % etanolem (V/V). Homogenizować i przefiltrować. Usunąć etanol w sposób określony w ust. 5.1. Jeżeli nie ma dekstrynowanej skrobi, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą destylowaną.

7.2. W przypadku melasy i materiałów paszowych bogatych w cukier i prawie wolnych od skrobi, takich jak chleb świętojański, suszone krajane buraki ćwikłowe, odważyć 5 g próbki, umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml, dodać 200 ml wody destylowanej, mieszać w mikserze przez godzinę lub, jeśli to konieczne, dłużej. Roztwór klarować odczynnikami Carreza I, o których mowa w ust. 3.2, i Carreza II, o których mowa w ust. 3.3, w sposób określony w ust. 5.1. Uzupełnić zimną wodą do pełnej objętości kolby, homogenizować i przefiltrować. Następnie postępować w sposób określony w ust. 5.3, w celu określenia zawartości cukrów.

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Aby zapobiec powstawaniu piany, dodaje się niezależnie od objętości około 1 ml 3-metylobutan-1-olu, o którym mowa w ust. 3.14, przed gotowaniem z odczynnikami Luff-Schoorla.

8.2. Różnica pomiędzy zawartością całkowitą cukrów po inwersji, wyrażonych jako glukoza, a zawartością cukrów redukujących, wyrażonych jako glukoza, pomnożona przez 0,95 daje procentową zawartość sacharozy.

8.3. Aby oznaczyć zawartość cukrów redukujących, z wyłączeniem laktozy, można zastosować dwie następujące metody:

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

8.3.2. Aby dokładnie obliczyć zawartość cukrów redukujących, z wyłączeniem laktozy, ta sama próbka powinna być użyta do dwóch końcowych oznaczeń. Jedną analizę przeprowadza się na części roztworu otrzymanego w sposób określony w ust. 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, a różnica jest wyrażana jako udział procentowy próbki.

Przykład

Dwie pobrane objętości odpowiadają próbce o masie próbki 250 mg, dla każdego oznaczenia.

W pierwszym przypadku 17 ml 0,1 N roztworu tiosiarczianu(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:

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

2.11. OZNACZANIE LAKTOZY

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Suspensja drożdży *Saccharomyces cerevisiae*:

25 g świeżych drożdży umieścić w 100 ml wody. Zawiesinę przechowywać w lodówce nie dłużej niż przez tydzień od jej sporządzenia.

3.2. Roztwór Carreza I:

Rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynku, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzpełnić kolbę do objętości 1 litra wodą.

3.3. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Uzpełnić kolbę do objętości 1 litra wodą.

3.4. Odczynnik Luff-Schoorla:

Ostrożnie mieszając, dodać roztwór kwasu cytrynowego, o którym mowa w ust. 3.4.2, do roztworu węglanu sodu, o którym mowa w ust. 3.4.3. Następnie dodać roztwór siarczianu miedzi, o którym mowa w ust. 3.4.1, i uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą. Zostawić na noc do osadzenia i przefiltrować. Sprawdzić normalność otrzymanego odczynnika (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2 N). pH roztworu powinno wynosić około 9,4.

3.4.1. Roztwór siarczianu miedzi:

Rozpuścić 25 g siarczianu miedzi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ wolnego od żelaza w 100 ml wody.

3.4.2. 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.

3.4.3. Roztwór węglanu sodu:

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

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

3.6. 30 % roztwór jodku sodu (m/V).

3.7. Kwas siarkowy 6 N.

3.8. Roztwór tiosiarczianu sodu 0,1 N.

3.9. Roztwór skrobi:

Do 1 litra wrzącej wody dodać 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody. Gotować 3 minuty, pozostawić do schłodzenia, a jeżeli to konieczne dodać 10 mg jodku rtęci jako środka konserwującego.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Łaźnia wodna z termostatem umożliwiającym utrzymanie temperatury od 38 do 40 °C.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

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. Umieścić kolbę we wrzącej łaźni wodnej na 30 minut, a następnie schłodzić do temperatury około 35 °C. Dodać 5 ml zawiesiny drożdży, o której mowa w ust. 3.1, i homogenizować. Pozostawić kolbę na 2 godziny w łaźni wodnej o temperaturze od 38 do 40 °C. Schłodzić do temperatury około 20 °C.

Dodać 2,5 ml roztworu Carreza I, o którym mowa w ust. 3.2, i mieszać przez 30 sekund, następnie dodać 2,5 ml roztworu Carreza II, o którym mowa w ust. 3.3, i ponownie mieszać przez 30 sekund. Uzpełnić kolbę do objętości 1 litra wodą, zmieszać i przefiltrować. Używając pipety, pobrać nie więcej niż 25 ml filtratu, który zawiera od 40 do 80 mg laktozy, i umieścić go w kolbie Erlenmeyera o pojemności 300 ml. W miarę potrzeby uzupełnić kolbę do objętości 25 ml wodą.

W ten sam sposób przeprowadzić test ślepej próby z 5 ml suspensji drożdżowej, o której mowa w ust. 3.1.

Oznaczyć zawartość laktozy według Luff-Schoorla w następujący sposób:

Dodać 25 ml odczynnika Luff-Schoorla, o którym mowa w ust. 3.4, i dwie granulki pumeksu, o którym mowa w ust. 3.5. Ogrzewać nad średnim płomieniem, ręcznie mieszając, i doprowadzić ciecz do wrzenia w czasie około 2 minut. Natychmiast postawić kolbę Erlenmeyera na siatce azbestowej z otworem o średnicy około 6 cm, pod którym pali się płomień. Płomień

powinien być tak ustawiony, aby ogrzewane było tylko dno kolby Erlenmeyera. Dopasować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera. Gotować 10 minut. Schłodzić natychmiast zimną wodą i po około 5 minutach miareczkować w następujący sposób:

Dodać 10 ml roztworu jodku sodu, o którym mowa w ust. 3.6, i niezwłocznie, zachowując ostrożność ze względu na ryzyko powstania piany, dodać 25 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.7. Miareczkować roztworem tiosiarczanu sodowego, o którym mowa w ust. 3.8, do pojawienia się mętnej żółtej barwy, dodać kilka kropli wskaźnika skrobiowego, o którym mowa w ust. 3.9, i dokończyć miareczkowanie.

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie na odmierzonej mieszance 25 ml odczynnika Luff-Schoorla, o którym mowa w ust. 3.4, i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku sodu, o którym mowa w ust. 3.6, i 25 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.7, bez gotowania.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wykorzystując tabelę 1, określić ilość laktozy w mg, która odpowiada różnicy między wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonych w ml roztworu tiosiarczanu sodu 0,1 N. Wynik wyrazić jako udział procentowy bezwodnej laktozy w próbce.

7. OBJAŚNIENIA

W przypadku produktów zawierających ponad 40 % fermentujących cukrów dodać więcej niż 5 ml zawiesiny drożdży, o której mowa w ust. 3.1.

ROZDZIAŁ 3

BADANIE AMINOKWASÓW

3.1. OZNACZANIE AMINOKWASÓW

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości wolnych, syntetycznych i naturalnych, oraz całkowitych, związanych i wolnych peptydów, 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 lub hydroksyanalogów aminokwasów.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

2.1. Wolne aminokwasy.

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

2.2. Aminokwasy całkowite.

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

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Stosować wodę destylowaną lub podobnej czystości o przewodności $< 10 \mu\text{S}$.

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

3.2. Kwas mrówkowy, $w = 98 - 100 \%$.

3.3. Fenol.

3.4. Dwusiarczyn 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 o temperaturze wrzenia 40 – 60 °C.

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

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

3.15. 1-oktanol.

3.16. Aminokwasy.

3.16.1. Substancje wzorcowe określone w ust. 1. Czyste związki niezawierające wody krystalizacyjnej. Suszyć w warunkach próżni w obecności P_2O_5 lub H_2SO_4 przez tydzień przed użyciem.

3.16.2. Kwas cysteinowy.

3.16.3. Sulfon metioniny.

3.17. Roztwór wodorotlenku sodu, $c = 7,5$ mol/l:

Rozpuścić 300 g wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.5, w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą.

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

Rozpuścić 40 g wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.5, w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą.

3.19. Roztwór wodny kwasu mrówkowego i fenolu:

Zmieszać 889 g kwasu mrówkowego, o którym mowa w ust. 3.2, z 111 g wody i dodać 4,73 g fenolu, o którym mowa w ust. 3.3.

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

Dodać 1 g fenolu, o którym mowa w ust. 3.3, do 492 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, i uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą.

3.21. Mieszanina ekstrakcyjna, $c = 0,1$ mol HCl/l, zawierająca 2 % tiowęglikolu:

Pobrać 8,2 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, rozpuścić w około 900 ml wody, dodać 20 ml tiowęglikolu, o którym mowa w ust. 3.9, i uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą, nie mieszać bezpośrednio odczynników określonych w ust. 3.7 i ust. 3.9.

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

Rozpuścić 60 g kwasu 5-sulfosalicylowego, o którym mowa w ust. 3.6, w wodzie i uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą.

3.23. Mieszanina utleniająca (kwas nadmanganowy – fenol):

Zmieszać w małej zlewce 0,5 ml nadtlenku wodoru, o którym mowa w ust. 3.1, z 4,5 ml roztworu kwasu mrówkowego i fenolu, o którym mowa w ust. 3.19. Inkubować w temperaturze od 20 do 30 °C przez godzinę w celu utworzenia kwasu nadmanganowego, następnie schłodzić w lodowej łaźni wodnej przez 15 minut przed dodaniem do próbek.

Wykonując powyższe czynności, unikać kontaktu ze skórą i nosić odzież ochronną.

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

Rozpuścić 19,61 g cytrynianu sodu, o którym mowa w ust. 3.8, 5 ml tiowęglikolu, o którym mowa w ust. 3.9, 1 g fenolu, o którym mowa w ust. 3.3, i 16,50 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, w około 800 ml wody. Dostosować pH do 2,20. Uzupełnić kolbę do objętości 1 litra wodą.

3.25. Bufor wymyjący, przygotowany zgodnie z warunkami stosowanego analizatora, o którym mowa w ust. 4.9.

3.26. Odczynnik ninhydrynowy, przygotowany zgodnie z warunkami stosowanego analizatora, o którym mowa w ust. 4.9.

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

3.27.1. Podstawowy wzorcowy roztwór aminokwasów, o których mowa w ust. 3.16.1, każdy o stężeniu $c = 2,5$ μ mol/ml, w kwasie chlorowodorowym. Mogą być stosowane gotowe wzorce.

3.27.2. Podstawowe wzorcowe roztwory kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny, $c = 1,25$ μ mol/ml.

Rozpuścić 0,2115 g kwasu cysteinowego, o którym mowa w ust. 3.16.2, i 0,2265 sulfonu metioniny, o którym mowa w ust. 3.16.3, w buforze cytrynianowym, o którym mowa w ust. 3.24, w kolbie miarowej o pojemności 1 litra i uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej niż 12 miesięcy. Roztworu nie stosuje się, jeżeli podstawowy wzorcowy roztwór, o którym mowa w ust. 3.27.1, zawiera kwas cysteinowy i sulfon metioniny.

3.27.3. Podstawowy wzorcowy roztwór wzorca wewnętrznego; proponuje się zastosować norleucynę, $c = 20$ μ mol/ml.

Rozpuścić 0,6560 g norleucyny, o której mowa w ust. 3.13, w buforze cytrynianowym, o którym mowa w ust. 3.24, w kolbie miarowej i uzupełnić kolbę do objętości 250 ml buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej niż 6 miesięcy.

3.27.4. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do użycia z hydrolizatami, $c = 5$ nmol/50 μ l kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny i $c = 10$ nmol/50 μ l innych aminokwasów.

Rozpuścić 2,2 g chlorku sodu, o którym mowa w ust. 3.10, w zlewce o pojemności 100 ml z 30 ml buforu cytrynianowego, o którym mowa w ust. 3.24. Dodać 4,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego aminokwasów, o którym mowa w ust. 3.27.1, 4,00 ml podstawowego roztworu wzorcowego kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny, o których mowa w ust. 3.27.2, i, jeżeli jest stosowany, 0,50 ml podstawowego roztworu wzorcowego wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.27.3. Dostosować pH do 2,20 przy użyciu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.18. Przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym, o którym mowa w ust. 3.24, i zmieszać. Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej niż 3 miesiące. Przy wykonywaniu powyższych czynności uwzględnić ust. 9.1.

3.27.5. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do stosowania z hydrolizatami przygotowanymi w sposób określony w ust. 5.3.3.1 i do użycia z ekstraktami, o których mowa w ust. 5.2. Roztwór kalibracyjny przygotowywać w sposób określony w ust. 3.27.4, z pominięciem chlorku sodu. Przechowywać w temperaturze poniżej 5 °C nie dłużej 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 lub teflonem; proponuje się zastosować Duran, Scott, do stosowania w suszarce.

4.3. Suszarka z silnym nawiewem i możliwością regulacji temperatury z dokładnością większą niż ± 2 °C.

4.4. Pehametr z pomiarem do trzech miejsc po przecinku.

4.5. Filtr membranowy (0,2 μ m).

4.6. Wirówka.

4.7. Obrotowa wyparka próżniowa.

4.8. Mieszadło magnetyczne lub mechaniczna wytrząsarka.

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

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

W niektórych analizatorach aminokwasów mogą być stosowane metody hydrolizy, w których hydrolizat zawiera stężenie sodu $c = 0,8$ mol/l i 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 po hydrolizie do objętości około 5 ml i przed ustaleniem pH. Odparowywanie powinno być prowadzone w warunkach próżni w temperaturze nie wyższej niż $40\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbek.

Rozdrobnić próbkę, tak aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy $0,5$ mm. próbki o dużej zawartości wilgotności przed rozdrobieniem wysuszyć albo suchym powietrzem o temperaturze nieprzekraczającej $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, albo przez zamrożenie. próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed rozdrobieniem poddaje się ekstrakcji eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.12.

5.2. Oznaczenie wolnych aminokwasów w paszach i premiksach.

Odważyć, z dokładnością do $0,2$ mg, od 1 do 5 g próbki przygotowanej w sposób określony w ust. 5.1 do kolby stożkowej i dodać $100,0$ ml mieszaniny ekstrakcyjnej, o której mowa w ust. 3.21. Wstrząsać mieszaninę przez 60 minut, używając wytrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego, o którym mowa w ust. 4.8. Odstawić do sedimentacji osadu i pobrać pipetą $10,0$ ml supernatantu roztworu do zlewki o objętości 100 ml.

Dodać, mieszając, $5,0$ ml roztworu kwasu sulfosalicylowego, o którym mowa w ust. 3.22, i kontynuować mieszanie przy użyciu mieszadła magnetycznego przez 5 minut. Przefiltrować lub odwirować supernatant w celu usunięcia osadu. Umieścić $10,0$ ml otrzymanego roztworu w zlewce o objętości 100 ml, dostosować pH do $2,20$ przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.18, przenieść do wolumetrycznej kolby, o której mowa w ust. 4.1, o odpowiedniej pojemności, przy użyciu buforu cytrynianowego, o którym mowa w ust. 3.24, i uzupełnić roztworem buforu cytrynianowego do pełnej objętości tej kolby.

Jeżeli jest stosowany wzorec wewnętrzny, dodać $1,0$ ml roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.27.3, na każde 100 ml końcowego roztworu i uzupełnić roztworem buforu cytrynianowego, o którym mowa w ust. 3.24, do pełnej objętości kolby, o której mowa w ust. 4.1. Przeprowadzić rozdział chromatograficzny w sposób określony w ust. 5.4. Jeżeli ekstrakty nie będą oznaczane tego samego dnia, przechowywać je w temperaturze poniżej $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3. Oznaczenie całkowitej zawartości aminokwasów.

5.3.1. Utlenianie.

Odważyć, z dokładnością do $0,2$ mg, od $0,1$ g do 1 g próbki przygotowanej w sposób określony w ust. 5.1 do:

- kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml, o której mowa w ust. 4.1, do hydrolizy otwartej określonej w ust. 5.3.2.3 lub
- kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml, o której mowa w ust. 4.1, jeżeli wymagane jest niskie stężenie sodu w przypadku określonym w ust. 5.3.3.1, lub
- butelki o pojemności 100 ml z nakrętką, o których mowa w ust. 4.2, w przypadku hydrolizy zamkniętej określonej w ust. 5.3.2.4.

Odważona próbka powinna zawierać około 10 mg azotu, a poziom wilgotności nie powinien przekraczać 100 mg.

Umieścić kolbę lub butelkę w lodowej łaźni wodnej i oziębić do temperatury $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, dodać 5 ml mieszaniny utleniającej, o której mowa w ust. 3.23, i zmieszać, używając szklanej bagietki z wygiętym końcem. Uszczelnić kolbę lub butelkę wraz z bagietką przy zastosowaniu hermetycznego filmu, umieścić wraz z lodową łaźnią wodną w lodówce o temperaturze $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pozostawić na 16 godzin. Po 16 godzinach wyjąć z lodówki i rozłożyć nadmiar odczynnika utleniającego przez dodanie $0,84$ g dwusiarczyny sodu, o którym mowa w ust. 3.4. Następnie postępować w sposób określony w ust. 5.3.2.1.

5.3.2. Hydroliza.

5.3.2.1. Hydroliza próbek utlenionych.

Do utlenionej próbki, przygotowanej w sposób określony w ust. 5.3.1, dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej, o której mowa w ust. 3.20, zwracając uwagę, aby zmyć pozostałości próbki przywierające do bocznych ścianek naczynia i bagietki. W zależności od sposobu przeprowadzonej hydrolizy, postępować w sposób określony w ust. 5.3.2.3 lub ust. 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 próbki otrzymanej w sposób określony w ust. 5.1 do kolby okrągłodennej o pojemności 100 ml lub 250 ml, o której mowa w ust. 4.1, lub do butelki z nakrętką o pojemności 100 ml, o której mowa w ust. 4.2. Odważona próbka powinna zawierać około 10 mg azotu. Ostrożnie dodać 25 ml mieszaniny hydrolizującej, o której mowa w ust. 3.20, i zmieszać z próbką. Następnie postępować w sposób określony w ust. 5.3.2.3 lub ust. 5.3.2.4.

5.3.2.3. Hydroliza otwarta.

Do kolby z mieszaniną, przygotowaną w sposób określony w ust. 5.3.2.1 lub ust. 5.3.2.2, dodać 3 szklane perełki i gotować, utrzymując stan wrzenia ze zwrotem skroplin przez 23 godziny. Po zakończonej hydrolizie przemyć chłodnicę od dołu 5 ml buforu cytrynianowego, o którym mowa w ust. 3.24. Odłączyć kolbę i schłodzić w łaźni lodowej. Następnie postępować w sposób określony w ust. 5.3.3.

5.3.2.4. Hydroliza zamknięta.

Umieścić butelkę zawierającą mieszaninę, przygotowaną w sposób określony w ust. 5.3.2.1 lub ust. 5.3.2.2, w suszarce, o której mowa w ust. 4.3, w temperaturze $110\text{ }^{\circ}\text{C}$. W czasie pierwszej godziny hydrolizy, aby uniknąć gwałtownego wzrostu ciśnienia, w wyniku powstawania substancji gazowych, i wybuchu, umieścić nakrętkę na naczyniu. **Nie zamykać naczynia korkiem.** Po godzinie dokręcić nakrętkę i pozostawić w suszarce, o której mowa w ust. 4.3, przez 23 godziny.

Po zakończeniu hydrolizy wyjąć butelkę z suszarki, ostrożnie odkręcić nakrętkę i umieścić butelkę w lodowej łaźni wodnej. Pozostawić do schłodzenia.

W zależności od sposobu dostosowania pH, o którym mowa w ust. 5.3.3, przenieść ilościowo zawartość butelki do zlewki lub kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml, stosując bufor cytrynianowy, o którym mowa w ust. 3.24. Następnie postępować w sposób określony w ust. 5.3.3.

5.3.3 Dostosowanie pH.

W zależności od tolerancji analizatora aminokwasów, o którym mowa w ust. 4.9, na sól, pH dostosowuje się w sposób określony w ust. 5.3.3.1 lub ust. 5.3.3.2.

5.3.3.1. Dla systemów chromatograficznych, o których mowa w ust. 4.9, wymagających niskiego stężenia sodu:

wskazane jest zastosowanie roztworu podstawowego wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.27.3, gdy analizatory aminokwasów wymagają niskiego stężenia sodu, w przypadku gdy należy zredukować objętość kwasu.

W tym przypadku dodać 2,00 ml roztworu podstawowego wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.27.3, do hydrolizatu przed odparowaniem. Dodać 2 krople 1-oktanolu, o którym mowa w ust. 3.15, do hydrolizatu otrzymanego w sposób określony w ust. 5.3.2.3 lub ust. 5.3.2.4. Stosując obrotową wyparkę próżniową, o której mowa w ust. 4.7, zmniejszyć objętość do 5 – 10 ml, w warunkach próżni w temperaturze 40 °C. Jeżeli objętość roztworu zostanie przypadkowo zredukowana poniżej 5 ml, hydrolizat wyrzucić i powtórzyć analizę. Dostosować pH do 2,20 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.18, i postępować w sposób określony w ust. 5.3.4.

5.3.3.2. Dla wszystkich innych analizatorów aminokwasów, o których mowa w ust. 4.9, pobrać hydrolizaty otrzymane w sposób określony w ust. 5.3.2.3 lub ust. 5.3.2.4 i częściowo je zneutralizować, mieszając ostrożnie, dodając 17 ml roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.17, zwracając uwagę, aby temperatura roztworu nie przekraczała 40 °C.

Dostosować pH do 2,20 w temperaturze pokojowej, dodając roztwór wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.17, a pod koniec roztwór wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.18. Następnie postępować w sposób określony w ust. 5.3.4.

5.3.4. Przygotowanie roztworu próbki do analizy chromatograficznej.

Przenieść ilościowo hydrolizaty o pH dostosowanym w sposób określony w ust. 5.3.3.1 lub ust. 5.3.3.2 przy użyciu buforu cytrynianowego, o którym mowa w ust. 3.24, do kolby miarowej o pojemności 200 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym, o którym mowa w ust. 3.24. Jeżeli wcześniej nie dodawano wzorca wewnętrznego, dodać 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.27.3, i uzupełnić buforem cytrynianowym, o którym mowa w ust. 3.24, do pełnej objętości kolby. Dokładnie zmieszać. Następnie wykonać analizę chromatograficzną, o której mowa w ust. 5.4. Jeżeli roztwory próbek nie będą analizowane tego samego dnia, przechowywać je w temperaturze poniżej 5 °C.

5.4. Chromatografia.

Przed analizą chromatograficzną doprowadzić ekstrakt, otrzymany w sposób określony w ust. 5.2, lub hydrolizat, otrzymany w sposób określony w ust. 5.3.4, do temperatury pokojowej. Wstrząsnąć mieszaniną i przefiltrować jej odpowiednią ilość przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.5. Otrzymany klarowny roztwór jest przeznaczony do chromatografii jonowymiennej przy wykorzystaniu analizatora aminokwasów, o którym mowa w ust. 4.9.

Dozowanie wykonuje się ręcznie lub automatycznie. Na kolumnę nanosi się takie same ilości roztworów z dokładnością $\pm 0,5\%$ zarówno w przypadku analizy wzorców, jak i badanych próbek, z wyjątkiem gdy jest stosowany wzorzec wewnętrzny, oraz aby stosunek sodu do aminokwasu w roztworze badanej próbki był podobny jak w roztworze wzorcowym. Częstość przeprowadzania kalibracji zależy od stabilności odczynnika ninhydrinowego i od systemu analitycznego. Wzorzec lub próbka są wymywane buforem cytrynianowym, o którym mowa w ust. 3.24, tak aby powierzchnia pików wzorca odpowiadała 30 – 200 % powierzchni pików badanej próbki aminokwasu.

Analiza chromatograficzna aminokwasów będzie różnić się nieznacznie w zależności od typu stosowanego analizatora i żywic. Wybrany system powinien mieć zdolność oddzielenia od siebie aminokwasów oraz od innych substancji dających z ninhydriną reakcje. W badanym zakresie stosowany system chromatograficzny powinien dawać liniową odpowiedź na zmiany ilości aminokwasów dodawanych na kolumnę.

W czasie analizy chromatograficznej opisany poniżej stosunek doliny do wysokości pików odnosi się do przypadku, gdy jest analizowany równomolowy roztwór oznaczanego aminokwasu. Równomolowy roztwór aminokwasu powinien zawierać co najmniej 30 % maksymalnej zawartości każdego aminokwasu, który można aktualnie oznaczyć z użyciem danego analizatora aminokwasów, o którym mowa w ust. 4.9.

Dla oddzielenia treoniny od seryny stosunek doliny do wysokości pików niższego z pokrywających się aminokwasów na chromatografie nie powinien przekraczać 2:10 w przypadku, gdy oznaczane są tylko cystyna (cysteina), metionina, treonina i lizyna; niewystarczające oddzielenie od sprzężonych pików będzie ujemnie wpływać na oznaczenie. Dla wszystkich innych aminokwasów rozdział powinien być lepszy niż 1:10.

System powinien zapewniać oddzielenie lizyny od „artefaktów lizyny” i od ornityny.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Powierzchnię pików próbki i wzorca mierzy się dla każdego pojedynczego aminokwasu, a zawartość aminokwasu w g/kg próbki jest obliczana według następującego wzoru:

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

Jeżeli jest stosowany wzorzec 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, roztworu wzorca kalibracyjnego,

MW – masa cząsteczkowa oznaczanego aminokwasu,

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

W – masa próbki w g przeliczona na masę oryginalnej próbki w przypadku odtłuszczenia lub podsuszania,

F – hydrolizat ogółem w ml otrzymany w sposób określony w ust. 5.3.4 lub obliczona ogólna objętość w ml rozcieńczonego ekstraktu.

Cystyna i cysteina są oznaczane jako kwas cysteinowy w hydrolizatach utlenionej próbki, ale są obliczane jak cystyna - $C_6H_{12}N_2O_4S_2$, MW 240,30 przez zastosowanie MW 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Metionina jest oznaczana jako sulfon metioniny w hydrolizatach utlenionej próbki, ale jest obliczana jak metionina przez zastosowanie MW metioniny: 149,21.

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

Ogólną objętość rozcieńczonych ekstraktów (F) w przypadku oznaczania zawartości wolnych aminokwasów, o których mowa w ust. 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. OCENA METODY

Międzynarodowe badania porównawcze metody były przeprowadzone w 1990 r. przy użyciu czterech pasz, w tym mieszanki paszowej dla świń, mieszanki paszowej dla brojlerów, koncentratu białkowego i premiksu. Po odrzuceniu wyników odbiegających średnie wyniki i odchylenia standardowe są przedstawione w poniższej tabeli 2:

Tabela 2. Średnie wielkości 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
Mieszanka paszowa dla brojlerów	9,31 n = 16	3,92 n = 18	5,08 n = 18	13,93 n = 16
Koncentrat białkowy	22,32 n = 16	5,06 n = 17	12,01 n = 17	47,74 n = 15
Premiks	58,42 n = 16	–	90,21 n = 16	98,03 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

7.1. Powtarzalność.

Powtarzalność wyrażona jako „odchylenie standardowe wewnątrz laboratorium” omawianego powyżej porównawczego badania jest przedstawiona w tabeli 3 i 4.

Tabela 3. Odchylenie standardowe wewnątrz laboratorium (S_r) 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
Mieszanka paszowa 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 wewnątrz laboratorium (S_i)

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
Mieszanka paszowa dla brojlerów	2,1 n = 16	2,8 n = 18	3,1 n = 18	2,1 n = 16
Koncentrat białkowy	2,7 n = 16	2,6 n = 17	2,2 n = 17	2,4 n = 15
Premiks	2,2 n = 16	–	2,4 n = 16	2,1 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

7.2. Odtwarzalność.

Wyniki odchylenia standardowego między laboratoriami otrzymane w wyniku przeprowadzenia omawianego powyżej porównawczego badania są przedstawione w tabeli 5 i 6.

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
Mieszanka paszowa 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
Mieszanka paszowa dla brojlerów	5,2 n = 16	8,8 n = 18	10,9 n = 18	5,4 n = 16
Koncentrat białkowy	3,8 n = 16	12,3 n = 17	13,0 n = 17	3,0 n = 15
Premiks	4,3 n = 16	–	6,9 n = 16	6,7 n = 16

n = liczba uczestniczących laboratoriów

8. SPRAWDZENIE METODY

Prawidłowe stosowanie metody weryfikować poprzez wykonywanie powtarzalnych oznaczeń certyfikowanych materiałów odwoławczych, jeżeli takie są dostępne. Zalecana jest także kalibracja z zastosowaniem certyfikowanych kalibracyjnych roztworów aminokwasów.

9. OBJAŚNIENIA

9.1. Z powodu różnic pomiędzy analizatorami aminokwasów końcowe stężenia kalibracyjnych roztworów aminokwasów wzorcowych określonych w ust. 3.27.4 i ust. 3.27.5 oraz hydrolizatu określonego w ust. 5.3.4 traktować jako przykładowe. Zakres liniowej odpowiedzi aparatu powinien zostać sprawdzony dla wszystkich aminokwasów.

Roztwór wzorcowy jest rozcieńczany buforem cytrynianowym, tak aby otrzymać powierzchnię pików o średnim zasięgu.

9.2. Jeżeli do analizy produktów hydrolizy wykorzystywany jest wysokosprawny chromatograf cieczowy, zoptymalizować warunki doświadczalne analizy zgodnie z zaleceniami producenta.

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

3.2. OZNACZANIE TRYPTOFANU

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości całkowitego i wolnego tryptofanu w paszach. Metoda niewyróżnienia form D i L.

2. SPOŚÓB PRZEPROWADZENIA METODY

W celu oznaczenia całkowitego tryptofanu próbka jest hydrolizowana w środowisku zasadowym przy użyciu nasyconego roztworu wodorotlenku baru i ogrzewana do 110 °C przez 20 godzin. Po hydrolizie dodany jest wzorec wewnętrzny.

W celu oznaczenia wolnego tryptofanu próbka jest ekstrahowana w warunkach lekko kwaśnych w obecności wzorca wewnętrznego. Tryptofan i wzorec wewnętrzny w hydrolizacie lub w ekstrakcie jest oznaczony metodą HPLC z detekcją fluorescencyjną.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Woda podwójnie destylowana lub woda o porównywalnej jakości o przewodnictwie < 10 µS/cm.

3.2. Substancja wzorcowca: tryptofan (czystość / zawartość ≥ 99 %) suszony w próżni nad pięciotlenkiem fosforu.

3.3. Substancja wzorcowca wewnętrzna: α-metylo-tryptofan (czystość / zawartość ≥ 99 %) suszony w próżni nad pięciotlenkiem fosforu.

3.4. Wodorotlenek baru, oktahydrat.

Nie wystawiać $Ba(OH)_2 \cdot 8H_2O$ na nadmierne działanie powietrza, aby uniknąć tworzenia się $BaCO_3$, który mógłby utrudniać oznaczenie. Uwzględnić ust. 9.3.

3.5. Wodorotlenek sodu.

3.6. Kwas ortofosforowy, w = 85 %.

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

3.8. Metanol do HPLC.

3.9. Eter naftowy o temperaturze wrzenia od 40 do 60 °C.

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

Rozpuścić 40,0 g wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.5, w wodzie i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

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

Odmierzyć 492 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

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

Odmierzyć 82 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

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

Odmierzyć 8,2 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

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

Odmierzyć 34 ml kwasu ortofosforowego, o którym mowa w ust. 3.6, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.15. Stężony roztwór tryptofanu, o którym mowa w ust. 3.2, c = 2,50 µmol/ml:

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

3.16. Stężony roztwór wzorca wewnętrznego, c = 2,50 µmol/ml:

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2728 g α-metylo-tryptofanu, o którym mowa w ust. 3.3, w kwasie chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.13, i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym kwasem. 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, o którym mowa w ust. 3.15, i 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α-metylo-tryptofanu), o którym mowa w ust. 3.16. Rozcieńczyć wodą, o której mowa w ust. 3.1, i metanolem, o którym mowa w ust. 3.8, w przybliżeniu do tej samej objętości i tego samego stężenia metanolu (10 – 30 %) jak w końcowym hydrolizacie.

Roztwór przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

Chronić przed bezpośrednim działaniem światła podczas przygotowywania.

3.18. Kwas octowy.

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

3.20. Etanoloamina > 98 %.

3.21. Roztwór 1 g 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu, o którym mowa w ust. 3.19, w 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.8.

3.22. Faza ruchoma do HCLP: mieszanina 3,00 g kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.18, 900 ml wody, o której mowa w ust. 3.1, i 50,0 ml roztworu, o którym mowa w ust. 3.21. Dostosować pH do 5,00, stosując etanoloaminy, o której mowa w ust. 3.20. Uzpełnić do objętości 1 litra wodą.

4. APARATURA I SPRZĘT

- 4.1. Wyposażenie HPLC z detektorem spektrofluorometrycznym.
- 4.2. Kolumna do chromatografii cieczerwowej, 125 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 3 µm lub równoważne.
- 4.3. Pehametr.
- 4.4. Kolby propylenowe o pojemności 125 ml, z szeroką szyjką i wkręcaną nakrętką.
- 4.5. Filtr membranowy, 0,45 µm.
- 4.6. Autoklaw, 110 (±2) °C, 1,4 (±0,1) bar.
- 4.7. Wstrząsarka mechaniczna lub mieszadło magnetyczne.
- 4.8. Mieszadło Vortex.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbek.

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 0,5 mm. Próbki o dużej zawartości wilgotności przed rozdrobnieniem wysuszyć albo na powietrzu w temperaturze nieprzekraczającej 50 °C, albo przez wymrażanie. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed rozdrobnieniem poddać ekstrakcji eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.9.

5.2. Oznaczanie wolnego tryptofanu (ekstrakt).

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, od 1 g do 5 g próbki przygotowanej w sposób określony w ust. 5.1 do kolby stożkowej. Dodać 100,0 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.13, i 5,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrzznego, o którym mowa w ust. 3.16. Wstrząsać lub mieszać przez 60 minut przy użyciu wstrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego, o których mowa w ust. 4.7. Pozostawić do oddzielenia się osadu i przenieść pipetą 10,0 ml supernatantu roztworu do zlewki. Dodać 5 ml kwasu ortofosforowego, o którym mowa w ust. 3.14. Dostosować pH do 3,0 przy użyciu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.10. Dodać taką ilość metanolu, o którym mowa w ust. 3.8, aby uzyskać stężenia od 10 do 30 % metanolu w końcowej objętości. Przenieść do kolby miarowej o odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do objętości właściwej dla chromatografii, odpowiadającej objętości kalibracyjnego roztworu wzorcowego określonego w ust. 3.17. Przelfiltrować kilka ml roztworu przez filtr membranowy 0,45 µm, o którym mowa w ust. 4.5, przed dozowaniem na kolumnę HPLC. Przeprowadzić chromatografię w sposób określony w ust. 5.4.

Roztwór wzorcowy i ekstrakty chronić przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Jeżeli niemożliwe jest dokonanie analizy ekstraktów tego samego dnia, ekstrakty przechowuje się w temperaturze 5 °C nie dłużej niż przez 3 dni.

5.3. Oznaczanie całkowitego tryptofanu (hydrolizat).

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 do 1 g próbki, otrzymanej w sposób określony w ust. 5.1, do kolby propylenowej, o której mowa w ust. 4.4. Odważona próbka powinna zawierać około 10 mg azotu. Dodać 8,4 g oktahydratu wodorotlenku baru, o którym mowa w ust. 3.4, i 10 ml wody. Mieszać przy użyciu mieszadła Vortex, o którym mowa w ust. 4.8, lub mieszadła magnetycznego, o którym mowa w ust. 4.7. Pozostawić osłonięty teflonem magnes w mieszaninie. Spłukać ściany naczynia przy użyciu 4 ml wody. Nałożyć nakrętkę i zamknąć luźno naczynie. Przenieść kolbę do autoklawu, o którym mowa w ust. 4.6, z wrzącą wodą i parą i utrzymywać ją w czasie od 30 do 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 Ba(OH)₂ · 8H₂O dodać do ciepłej mieszaniny 30 ml wody o temperaturze pokojowej. Łagodnie wstrząsać lub mieszać. Dodać 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrzznego (α-metylo-tryptofanu), o którym mowa w ust. 3.16. Studzić naczynia w łaźni wodnej lub lodowej przez 15 minut.

Następnie dodać 5 ml kwasu ortofosforowego, o którym mowa w ust. 3.14. Utrzymując naczynie w zimnej łaźni, zobojętnić przy użyciu kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.11, mieszając, i dostosować pH do 3,0 przy użyciu kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.12. Dodać ilość metanolu niezbędną do uzyskania stężenia od 10 do 30 % metanolu w końcowej objętości. Przenieść do kolby miarowej o odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do objętości niezbędnej do chromatografii; proponuje się zastosować 100 ml Duran, Scott. Dodanie metanolu nie powinno powodować wytrącania. Przelfiltrować kilka ml roztworu przez filtr membranowy 0,45 µm, o którym mowa w ust. 4.5, przed dozowaniem na kolumnę HPLC. Przeprowadzić chromatografię w sposób określony w ust. 5.4.

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

5.4. Oznaczanie HPLC.

Poniższe parametry izokratycznej elucji są przykładowe. Przy oznaczaniu HPLC uwzględnić ust. 9.1 i ust. 9.2:

Kolumna do chromatografii cieczerwowej, o której mowa 125 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 3 µm lub równoważne w ust. 4.2:

Temperatura kolumny:

temperatura pokojowa

Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.22:

Mieszanina 3,00 g kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.18, 900 ml wody, o której mowa w ust. 3.1, i 50,0 ml roztworu, o którym mowa w ust. 3.21. Dostosować pH do 5,00 przy użyciu etanoloaminy, o której mowa w ust. 3.20. Uzpełnić do objętości 1 litra wodą, o której mowa w ust. 3.1

Szybkość przepływu:	1 ml/min
Całkowity czas analizy chromatograficznej:	około 34 minuty
Długość fali przy detekcji:	wzbudzenie: 280 nm, emisja: 356 nm

Dozowana objętość: 20 μ l
Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

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

gdzie:

A – powierzchnia piku wzorca wewnętrznego, kalibracyjny roztwór wzorcowy, o którym mowa w ust. 3.17,

B – powierzchnia piku tryptofanu, ekstraktu, o którym mowa w ust. 5.2, lub hydrolizatu, o którym mowa w ust. 5.3,

C – objętość w ml (2 ml) stężonego roztworu tryptofanu, o którym mowa w ust. 3.15, dodanego do roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.17,

D – stężenie w μ mol/ml (= 2,50) stężonego roztworu tryptofanu, o którym mowa w ust. 3.15, dodanego do roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.17,

E – objętość w ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.16, dodanego przy ekstrakcji (= 5,00 ml), o której mowa w ust. 5.2, lub do hydrolizatu (= 2,00 ml), o którym mowa w ust. 5.3,

F – powierzchnia piku wzorca wewnętrznego, ekstraktu, o którym mowa w ust. 5.2, lub hydrolizatu, o którym mowa w ust. 5.3,

G – powierzchnia piku tryptofanu, kalibracyjnego roztworu wzorca, o którym mowa w ust. 3.17,

H – objętość w ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.16, dodanego do kalibracyjnego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.17,

W – naważka próbki w g, skorygowana względem masy wyjściowej, w przypadku gdy była podsuszana lub odtuszczana,

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

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność.

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

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

We Wspólnocie przeprowadzono badania porównawcze (czwarte porównanie wyników różnych laboratoriów), w których trzy próbki były analizowane przez 12 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy. Na każdej próbce powtórzono analizę pięciokrotnie. Jej wyniki są przedstawione w tabeli 7.

Tabela 7. Tabela badań porównawczych wykonanych w celu sprawdzenia metody hydrolizy

	Próbka 1 Pasza dla świń	Próbka 2 Pasza dla świń uzupełniona L-tryptofanem	Próbka 3 Koncentrat paszowy dla świń
L	12	12	12
n	50	55	50
Średnia [g/kg]	2,42	3,40	4,22
s_t [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_t [%]	1,9	1,6	1,9
s_R [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
CV_R [%]	6,3	6,0	2,2

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochrańa, próba wartości oddalonych Dixona); s_t – odchylenie standardowe powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; r – powtarzalność wyników; R – odtwarzalność wyników; CV_t – współczynnik zmienności powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

W kolejnym badaniu porównawczym we Wspólnocie (trzecie porównanie wyników różnych laboratoriów) dwie próbki były analizowane przez 13 laboratoriów w celu sprawdzenia metody ekstrakcji wolnego tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizę pięciokrotnie. Jej wyniki są przedstawione w tabeli 8.

Tabela 8. Tabela badań porównawczych wykonanych w celu sprawdzenia metody ekstrakcji wolnego tryptofanu

	Próbka 4 Mieszaneczka pszenicy i soi	Próbka 5 Mieszaneczka pszenicy i soi (= próbka 4) z dodatkiem tryptofanu (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Średnia [g/kg]	0,391	0,931
s_r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV_r [%]	1,34	1,34
s_R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV_R [%]	4,71	5,11

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochraha, próba wartości oddalonych Dixona); s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; r – powtarzalność wyników; R – odtwarzalność wyników; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

W kolejnym badaniu porównawczym we Wspólnocie cztery próbki były analizowane przez 7 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizę pięciokrotnie. Jej wyniki są przedstawione w tabeli 9.

Tabela 9. Tabela badań porównawczych wykonanych w celu sprawdzenia metody hydrolizy tryptofanu

	Próbka 1 Mieszaneczka paszowa dla świń (CRM 117)	Próbka 2 Niskotłuszczowa mączka rybna (CRM 118)	Próbka 3 Mączka sojowa (CRM 119)	Próbka 4 Odtłuszczone mleko w proszku (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Średnia [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s_r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV_r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
s_R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV_R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochraha, próba wartości oddalonych Dixona); s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; r – powtarzalność wyników; R – odtwarzalność wyników; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

9. OBJASNIENIA

9.1. Lepszy rozdział tryptofanu i α -metylo-tryptofanu może nastąpić przy uwzględnieniu następujących parametrów: Izokratyczna elucja po gradientowym czyszczeniu kolumny:

Kolumna do chromatografii cieczowej:	125 mm x 4 mm, C_{18} , wypełnienie 5 μ m lub równoważne
Temperatura kolumny:	32 °C
Faza ruchoma:	A: Mieszanina, w stosunku 95 + 5 (V+V): 0,01 mol/l KH_2PO_4 i metanolu 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
Szybkość przepływu:	1,2 ml/min
Całkowity czas analizy chromatograficznej:	około 33 minuty

9.2. Analiza chromatograficzna będzie się zmieniać w zależności od typu HPLC i materiału użytego do wypełnienia kolumny. Wybrany system powinien umożliwić uzyskanie oddzielającej linii bazowej pomiędzy tryptofanem i wzorcem wewnętrznym. Produkty degradacji powinny zostać dobrze oddzielone od tryptofanu i wzorca wewnętrznego. Hydrolizaty bez wzorca wewnętrznego powinny być poddane analizie w celu sprawdzenia linii bazowej stosownie do wzorca wewnętrznego względem zanieczyszczeń. Czas analizy powinien być wystarczająco długi dla elucji wszystkich produktów degradacji, w przeciwnym razie ostatnie eluujące piki na chromatogramie mogą zakłócać kolejną analizę.

W zakresie badanych stężeń układ chromatograficzny powinien zapewniać liniową odpowiedź. Liniową odpowiedź mierzyć przy stałym (normalnym) stężeniu wzorca wewnętrznego i zmieniających się stężeniach tryptofanu. Wielkość pików tryptofanu i wzorca wewnętrznego powinna zawierać 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 zmienionej wielkości próbki lub jej objętości końcowej.

9.3. Wodorotlenek baru.

Ze względu na fakt, że wodorotlenek baru z czasem jest coraz trudniejszy do rozpuszczenia, wpływa to na nieklarowność roztworu do oznaczania HPLC, która może być przyczyną zanizania wyników oznaczania tryptofanu.

ROZDZIAŁ 4

BADANIE SKŁADNIKÓW MINERALNYCH

4.1. OZNACZANIE WAPNIA

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania całkowitej zawartości wapnia w paszach.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Wapń jest spopieliany, popiół traktowany jest kwasem chlorowodorowym, a wapń wytrącony jako szczawian wapnia. Osad jest rozpuszczany w kwasie siarkowym i miareczkowany kwasem szczawiovym, który powstaje wraz z 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. 30 % roztwór kwasu cytrynowego, (m/V).

3.7. 5 % roztwór chlorku amonu, (m/V).

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

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

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Elektryczny piec muflowy z termostatem i możliwością cyrkulacji powietrza.

4.2. Tygły do spalań platynowe, kwarcowe lub porcelanowe.

4.3. Szklane tygły ze spiekami o porowatości G_4 .

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć około 5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, spopielić w temperaturze 550°C i przenieść popiół do zlewki o pojemności 250 ml.

Dodać 40 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, 60 ml wody i kilka kropli kwasu azotowego, o którym mowa w ust. 3.2. Doprowadzić do wrzenia i utrzymywać w temperaturze wrzenia przez 30 minut. Schłodzić i przenieść roztwór do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Przepłukać i uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, homogenizować i przefiltrować.

Przy zastosowaniu pipety przenieść do zlewki o pojemności 250 ml podzielną część roztworu zawierającą od 10 do 40 mg wapnia zgodnie z przewidywaną zawartością. Dodać 1 ml roztworu kwasu cytrynowego, o którym mowa w ust. 3.6, i 5 ml roztworu chlorku amonu, o którym mowa w ust. 3.7.

Uzupełnić do objętości około 1 litra wodą. Doprowadzić do wrzenia, dodać 8 do 10 kropli roztworu zieleni bromokrezolowej, o którym mowa w ust. 3.8, i 30 ml gorącego roztworu szczawianu amonu, o którym mowa w ust. 3.5. Jeżeli pojawi się osad, rozpuścić go, dodając kilka kropli kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1.

Zubożnąć bardzo wolno amoniakiem, o którym mowa w ust. 3.4, ciągle mieszając, do dostosowania pH od 4,4 do 4,6, co jest sygnalizowane zmianą barwy wskaźnika. Umieścić zlewkę we wrzącej łaźni wodnej i utrzymywać przez 30 minut do strącenia osadu. Usunąć zlewkę z łaźni wodnej. Pozostawić na godzinę do odstania osadu i przefiltrować przez tygiel filtracyjny, o którym mowa w ust. 4.3.

Przemywać wodą zlewkę i tygiel do całkowitego usunięcia nadmiaru szczawianu amonowego. Nieobecność chlorków w roztworze po przemyciu świadczy o tym, że osad został zupełnie przemyty.

Osad wytrącony na filtrze rozpuścić w 50 ml gorącego kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.3. Splukać tygiel gorącą wodą i uzupełnić filtrat do około 100 ml. Podgrzać do temperatury od 70 do 80 °C i miareczkować, kroplami, roztworem manganianu(VII) potasu, o którym mowa w ust. 3.9, do pojawienia się różowego zabarwienia utrzymującego się co najmniej przez minutę.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

1 ml 0,1 N manganianu(VII) potasu odpowiada 2,004 mg wapnia.

Wynik wyrazić jako udział procentowy próbki.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Przy małych zawartościach wapnia postępować w następujący sposób:

Osad szczawianu wapnia przefiltrować przez filtr bezpopiołowy. Po przemyciu filtr wysuszyć i spopielić w platynowym tyglu w temperaturze 550 °C. Rozpuścić pozostałość w kilku kroplach kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.3, odparować do sucha, wstawić ponownie do pieca, w którym panuje temperatura 550 °C, i po wyjęciu z pieca zważyć. Jeżeli W jest masą otrzymanego siarczanu wapnia, to podzielną część zawartości wapnia pobrana jako próbka stanowi $W \times 0,2944$.

7.2. Jeżeli próbka składa się jedynie z substancji mineralnych, rozpuścić ją w kwasie chlorowodorowym bez uprzedniego spopielenia. W przypadku produktów takich jak fosforan(V) wapniowo-glinowy, które trudno rozpuszczają się w kwasie, przed rozpuszczeniem stopić je w procesie alkalicznym w następujący sposób:

W tyglu platynowym umieścić analizowaną próbkę i dokładnie ją zmieszać z mieszaniną o masie równej pięciokrotnej masie próbki, składającej się z równych ilości węglanu potasu i węglanu sodu. Delikatnie ogrzewać do całkowitego stopienia mieszaniny. Schłodzić i rozpuścić w kwasie chlorowodorowym.

7.3. Jeżeli próbka zawiera podwyższoną zawartość magnezu, powtórnie strącić szczawian wapnia.

4.2. OZNACZANIE SODU**1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY**

Metoda służy do oznaczania zawartości sodu w paszach.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest spopielenia, a 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 innych 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 sodu, bezwodny.

3.5. Czynniki obciążający:

Rozpuścić w wodzie 50 g chlorku cezu, o którym mowa w ust. 3.2, i 250 g azotanu glinu, o którym mowa w ust. 3.3, uzupełnić do objętości 1 litra wodą i homogenizować. Przechowywać w plastikowej butelce.

3.6. Roztwór wzorcowy sodu:

Rozpuścić w wodzie 2,542 g chlorku sodu, o którym mowa w ust. 3.4, dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, uzupełnić do objętości 1 litra wodą i homogenizować. Przechowywać w plastikowej butelce. 1 ml tego roztworu zawiera 1,0 mg sodu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Tygły do spalań platynowe, kwarcowe lub porcelanowe, z pokrywkami.

4.2. Elektryczny piec muflowy 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, o którym mowa w ust. 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 50 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1. Po ustaniu wydzielania się dwutlenku węgla roztwór ogrzać i utrzymywać przez 2 godziny w temperaturze około 90°C, od czasu do czasu mieszając. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, wstrząsnąć i przefiltrować. W kolbie miarowej o pojemności 100 ml umieścić podzielną część filtratu zawierającą nie więcej niż 1,0 mg sodu, dodać 10,0 ml czynnika obciążającego, o którym mowa w ust. 3.5, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą i homogenizować. W przypadku wyższej zawartości sodu rozcieńczyć w odpowiedniej proporcji analizowany roztwór przed dodaniem czynnika obciążającego. W tabeli 10 podano przykład dla próbki o masie około 10 g.

Tabela 10. Przykład dla próbki o masie około 10 g

Zakładana zawartość sodu w próbce (% Na)	Współczynnik rozcieńczenia	Podzielna część roztworu, w ml
do 0,1	—	50
powyżej 0,1 do 0,5	—	10
powyżej 0,5 do 1,0	—	5
powyżej 1,0 do 5,0	1 : 10	10
powyżej 5,0 do 10,0	1 : 10	5
powyżej 10,0 do 20,0	1 : 20	5

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

5.2. Krzywa kalibracyjna.

Odmierzyć 10 ml roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.6, i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Uzupelnąć wodą do pełnej objętości kolby i homogenizować. 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 zawartości sodu. Do partii kolb dodać dodatkową kolbę niezawierającą roztworu wzorcowego. Dodać do każdej kolby 10 ml czynnika obciążającego, o którym mowa w ust. 3.5, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i homogenizować. Przeprowadzić oznaczenie w sposób określony w ust. 5.1. Krzywa kalibracyjna ma przebieg liniowy względem stężenia sodu 1 mg w 100 ml roztworu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. W przypadku produktów zawierających ponad 4 % sodu wskazane jest spopielenie substancji przez 2 godziny w tyglu z pokrywką. Po schłodzeniu dodać wody, utworzyć z popiołu zawiesinę przy zastosowaniu drucika platynowego, wysuszyć i ponownie spopielać przez 2 godziny w tyglu z pokrywką.

7.2. Jeżeli próbka zawiera wyłącznie substancje mineralne, rozpuścić ją bez spopielenia.

4.3. OZNACZANIE POTASU

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości potasu w paszach.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest spopieleniana, 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 innych 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. Czynniki obciążający:

Rozpuścić w wodzie 50 g chlorku cezu, o którym mowa w ust. 3.2, i 250 g azotanu glinu, o którym mowa w ust. 3.3, uzupełnić do objętości 1 litra wodą i homogenizować. Przechowywać w plastikowej butelce.

3.6. Roztwór wzorcowy potasu:

Rozpuścić w wodzie 1,907 g chlorku potasu, o którym mowa w ust. 3.4, dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, uzupełnić do objętości 1 litra wodą i homogenizować. Przechowywać w plastikowej butelce. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg potasu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Tygły do spalań platynowe, kwarcowe lub porcelanowe, z pokrywkami.

4.2. Elektryczny piec mufłowy 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, o którym mowa w ust. 4.1, i spopielać przez 3 godziny w temperaturze 450 °C. 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, o którym mowa w ust. 3.1. Po całkowitym ustaniu wydzielania się dwutlenku węgla ogrzać roztwór i utrzymywać przez 2 godziny w temperaturze około 90 °C, od czasu do czasu mieszając. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby, wstrząsnąć i przefiltrować. W kolbie miarowej o pojemności 100 ml umieścić podzielną część filtratu zawierającą nie więcej niż 1 mg potasu, dodać 10,0 ml czynnika obciążającego, o którym mowa w ust. 3.5, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i homogenizować. W przypadku wyższej zawartości potasu rozcieńczyć w odpowiedniej proporcji analizowany roztwór przed dodaniem czynnika obciążającego. W tabeli 11 podano przykład dla próbki o masie około 10 g.

Tabela 11. Przykład dla próbki o masie około 10 g

Zakładana zawartość potasu w próbce (% K)	Współczynnik rozcieńczenia	Podzielna część roztworu, w ml
do 0,1	–	50
powyżej 0,1 do 0,5	–	10
powyżej 0,5 do 1,0	–	5
powyżej 1,0 do 5,0	1 : 10	10
powyżej 5,0 do 10,0	1 : 10	5
powyżej 10,0 do 20,0	1 : 20	5

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

5.2. Krzywa kalibracyjna.

Odmierzyć 10 ml roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.6, i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i homogenizować. 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 zawartości potasu. Do partii kolb dodać dodatkową kolbę niezawierającą roztworu wzorcowego. Do każdej kolby dodać 10 ml czynnika obciążającego, o którym mowa w ust. 3.5, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i homogenizować. Przeprowadzić oznaczenie w sposób określony w ust. 5.1. Krzywa kalibracyjna ma przebieg liniowy względem stężenia potasu 1 mg na 100 ml roztworu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. OBJAŚNIENIA

Dodawanie czynnika obciążającego, o którym mowa w ust. 3.5, w celu wyeliminowania interferencji innych pierwiastków nie zawsze jest konieczne.

4.4. OZNACZANIE CHLORKÓW

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości chloru w chlorkach rozpuszczalnych w wodzie, umownie wyrażanego jako chlorek sodu w paszach.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Roztwór tiocyjanianu amonu, 0,1 N.

3.2. Roztwór azotanu srebra, 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, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.8. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.9. Węgiel aktywny, wolny od chlorków i nieabsorbujący chlorków.

4. APARATURA I SPRZĘT

Mikser lub tumbler: od 35 do 40 obr/min.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie roztworu.

Zależnie od rodzaju próbki, przygotować roztwór, w sposób określony w jednej z metod opisanych w ust. 5.1.1, w ust. 5.1.2 lub w ust. 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 chloru w postaci chlorków. Odważkę umieścić z 400 ml wody o temperaturze około 20 °C w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Mieszać przez 30 minut w mikserze, uzupełnić do pełnej objętości kolby, homogenizować i przefiltrować.

5.1.2. Próbki zawierające substancje organiczne, z wyłączeniem przypadków opisanych w ust. 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, o którym mowa w ust. 3.7, wymieszać i dodać 5 ml roztworu Carreza II, o którym mowa w ust. 3.8. Mieszać przez 30 minut w mikserze, uzupełnić do pełnej objętości kolby, homogenizować i przefiltrować.

5.1.3. Pasze po obróbce cieplnej, makuchy lniane, mączka lniana, produkty bogate w mączkę lnianą i inne produkty bogate w śluz lub substancje koloidalne, w tym dekstryna skrobi.

Przygotować roztwór w sposób określony w ust. 5.1.2, ale nie filtrować. Zdekantować, jeżeli jest to konieczne, odwirować, pobrać 100 ml płynnego supernatantu i przenieść go do kolby miarowej o pojemności 200 ml. Zmieszać z acetonem, o którym mowa w ust. 3.6, i uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem, homogenizować i przefiltrować.

5.2. Miareczkowanie.

Przy użyciu pipety przenieść do kolby Erlenmeyera, w zależności od przewidywanej zawartości chlorku, od 25 do 100 ml filtratu, otrzymanego w sposób określony w ust. 5.1.1, ust. 5.1.2 lub ust. 5.1.3. Podzielna część nie powinna zawierać więcej niż 150 mg chloru. Rozcieńczyć w razie potrzeby wodą do objętości nie mniejszej niż 50 ml, dodać 5 ml kwasu azotowego, o którym mowa w ust. 3.4, 20 ml nasyconego roztworu, o którym mowa w ust. 3.3, i 2 krople roztworu tiocyjanianu amonu, o którym mowa w ust. 3.1, przeniesionego przy zastosowaniu biurety wypełnionej do znaku zero. Przy zastosowaniu biurety przenieść roztwór azotanu srebra, o którym mowa w ust. 3.2, tak aby nadmiar wyniósł 5 ml. Dodać 5 ml eteru dwuetylowego, o którym mowa w ust. 3.5, i mocno wstrząsać do skoagulowania się osadu.

Nadmiar azotanu srebra miareczkować roztworem tiocyjanianu amonu, o którym mowa w ust. 3.1, aż do uzyskania czerwono-brązowego odcienia utrzymującego się przez minutę.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Ilość chlorku (W), wyrażonego jako chlorek sodu, znajdującą się w filtracie pobranym do miareczkowania, obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

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

V_2 – objętość w ml użytego 0,1 N roztworu tiocyjanku amonu do miareczkowania.

Jeżeli ślepa próba wykaże, że 0,1 N roztwór azotanu srebra został zużyty, odjąć jego objętość 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 odtłuścić je eterem dwuetylowym lub eterem naftowym.

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

4.5. OZNACZANIE MAGNEZU

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości magnezu w paszach. Metoda powinna być stosowana do oznaczania zawartości magnezu poniżej 5 %.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest spopieleną i rozpuszczana w rozcieńczonym kwasie chlorowodorowym. Jeżeli próbka zawiera substancje nieorganiczne, 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 siarczanu magnezu wysuszony w temperaturze pokojowej.

3.4. Roztwór soli strontu (chlorek lub azotan), przy 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. Wzorcowy roztwór magnezu:

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 1 g magnezu, o którym mowa w ust. 3.3, oczyszczonego z powłoki tlenku lub równoważną ilość (10,143 g) heptahydratu siarczanu magnezu, o którym mowa w ust. 3.3. Odważkę umieścić w kolbie miarowej o pojemności 1 l, dodać 80 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, pozostawić do rozpuszczenia i uzupełnić wodą do pełnej objętości. 1 ml tego roztworu zawiera 1000 mg magnezu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Platynowe, kwarcowe lub porcelanowe tygle do spalań.

4.2. Elektryczny piec mufłowy 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, o którym mowa w ust. 3.1, doprowadzić ciecz do wrzenia i podtrzymywać stan wrzenia, łagodnie gotując przez 30 minut. Schłodzić, uzupełnić do pełnej objętości wodą, zmieszać i przefiltrować przez suchy karbowany filtr do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml filtratu. W przypadku obecności krzemu 5 g próbki potraktować od 15 do 30 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, odparować do sucha na łaźni wodnej i przenieść do suszarki ustawionej na temperaturę 105 °C na około godzinę. Pozostałość potraktować 10 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, i przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml przy użyciu ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia i uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby. Zmieszać i przefiltrować przez suchy karbowany filtr do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml filtratu.

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 mufłowym aż do uzyskania popiołu wolnego od cząsteczek węglowych, a następnie schłodzić. W celu usunięcia krzemionki dodać do popiołu od 15 do 30 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, odparować do sucha na łaźni wodnej i umieścić na godzinę w suszarce w temperaturze 105 °C. Pozostałość potraktować 10 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, i przenieść do kolby miarowej o pojemności 500 ml przy użyciu ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia i uzupełnić do objętości wodą. Zmieszać i przefiltrować przez suchy karbowany filtr do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml filtratu.

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 piecu mufłowym w temperaturze 550 °C aż do uzyskania popiołu wolnego od cząsteczek węglowych. W celu wytrącenia nierozpuszczalnej krzemionki popiół potraktować 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, odparować do sucha na łaźni wodnej i umieścić na godzinę w suszarce w temperaturze 105 °C. Popiół potraktować 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, i przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 ml przy użyciu ciepłej wody, doprowadzić do wrzenia, pozostawić do schłodzenia i uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby. Zmieszać i przefiltrować przez suchy karbowany filtr do suchej zlewki. Odrzucić pierwsze 30 ml filtratu.

5.2. Pomiar metodą absorpcji atomowej.

Rozcieńczając wodą roztwór wzorcowy, o którym mowa w ust. 3.5, przygotować co najmniej 5 roztworów odniesienia o wzrastających stężeniach odpowiadających optymalnemu zakresowi pomiaru na spektrofotometrze. Do każdego roztworu dodać po 10 ml roztworu soli strontu, o którym mowa w ust. 3.4, i uzupełnić do objętości 100 ml wodą. Rozcieńczyć wodą jedną podzielną część filtratu otrzymanego w sposób określony w ust. 5.1.1, ust. 5.1.2 lub ust. 5.1.3, tak aby otrzymać stężenie magnezu mieszczące się w zakresie stężeń roztworów odniesienia. Stężenie kwasu chlorowodorowego tego roztworu nie powinno przekraczać 0,4 N. Dodać 10 ml roztworu soli strontu, o którym mowa w ust. 3.4, i następnie uzupełnić do objętości 1 litra wodą. 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

7.1. Powtarzalność.

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

4.6. OZNACZANIE CAŁKOWITEJ ZAWARTOŚCI FOSFORU METODĄ FOTOMETRYCZNĄ

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości całkowitego fosforu w paszach. Metoda powinna być stosowana do analizy pasz o niskiej zawartości fosforu. W niektórych przypadkach, zwłaszcza w przypadku produktów bogatych w fosfor, dopuszcza się stosowanie metody wagowej.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest mineralizowana poprzez suche spalanie, zwłaszcza w przypadku pasz organicznych, lub przez rozpuszczenie kwasem, zwłaszcza w przypadku związków mineralnych i pasz ciekłych, a następnie wprowadzona do kwaśnego roztworu. Roztwór jest traktowany odczynnikami molibdenowanadowymi. Gęstość optyczna 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, o którym mowa w ust. 3.6.1, 200 ml roztworu wanadanu amonu, o którym mowa w ust. 3.6.2, i 134 ml kwasu azotowego, o którym mowa w ust. 3.4, w kolbie miarowej o pojemności 1 litra. Uzupełnić do pełnej objętości kolby 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 objętości 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, o którym mowa w ust. 3.4, (7 ml HNO_3 + 13 ml H_2O) i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

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

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

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Tygły kwarcowe lub porcelanowe.

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

4.3. Kolba Kjeldahla o pojemności 250 ml.

4.4. Kolby i pipety miarowe.

4.5. Spektrofotometr.

4.6. Probówki o średnicy 16 mm z korkiem o średnicy do 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 w sposób określony w ust. 5.1.1 lub ust. 5.1.2.

5.1.1. Kolejność wykonywania czynności.

Odważyć co najmniej 1 g próbki z dokładnością do 1 mg. Umieścić próbkę w kolbie Kjeldahla, dodać 20 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.5, wstrząsnąć do nasycenia całkowitego kwasem i niedopuszczenia do przyklejania cząstek do ścianek kolby, podgrzać i utrzymywać w stanie wrzenia przez 10 minut. Nieznacznie schłodzić, dodać 2 ml kwasu azotowego, o którym mowa w ust. 3.4, ostrożnie podgrzać, ponownie nieznacznie schłodzić i dodać nieco więcej kwasu azotowego, o którym mowa w ust. 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 Kjeldahla gorącą wodą. Schłodzić, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby, homogenizować i przefiltrować.

5.1.2. Probki zawierające substancje organiczne, wolne od dwuwodorofosforanu magnezu i wapnia.

Odważyć około 2,5 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w tygłu. Zmieszać dokładnie próbkę z 1 g węglanu wapnia, o którym mowa w ust. 3.1. Spopielać w piecu w temperaturze 550 ± 5 °C do uzyskania popiołu o jasnej lub szarej barwie, w którym dopuszcza się niewielkie ilości węgla drzewnego. Przenieść popiół do zlewki o pojemności 250 ml. Dodać

20 ml wody i kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, aż do zaprzestania pienienia się. Następnie dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2. Umieścić zlewkę na łaźni piaskowej i odparować do sucha do powstania nierozpuszczalnej krzemionki. Pozostałość rozpuścić w 10 ml kwasu azotowego, o którym mowa w ust. 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 wodą do pełnej objętości kolby, homogenizować i przefiltrować.

5.2. Wywołanie zabarwienia i gęstości optycznej.

Rozcieńczyć podzielną część filtratu otrzymanego w sposób określony w ust. 5.1.1 lub ust. 5.1.2 do uzyskania stężenia fosforu nie większego niż $40 \mu\text{g/ml}$. Umieścić 10 ml tego roztworu w probówce, o której mowa w ust. 4.6, i dodać 10 ml odczynnika molibdenowanadowego, o którym mowa w ust. 3.6. Homogenizować i pozostawić co najmniej na 10 minut w temperaturze 20°C . Zmierzyć gęstość optyczną w spektrofotometrze przy 430 nm w stosunku do roztworu otrzymanego przez dodanie 10 ml odczynnika molibdenowanadowego, o którym mowa w ust. 3.6, do 10 ml wody.

5.3. Krzywa kalibracyjna.

Z roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.7, przygotować roztwory zawierające odpowiednio 5, 10, 20, 30 i $40 \mu\text{g}$ fosforu w 1 ml. Pobrać 10 ml każdego z tych roztworów i dodać do nich po 10 ml odczynnika molibdenowanadowego, o którym mowa w ust. 3.6. Homogenizować i pozostawić co najmniej na 10 minut w temperaturze 20°C . Zmierzyć gęstość optyczną w sposób określony w ust. 5.2. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając wartości gęstości optycznej w stosunku do odpowiadającej jej ilości fosforu. W zakresie stężeń od 0 do $40 \mu\text{g/ml}$ krzywa jest liniowa.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Określić zawartość fosforu w badanej próbce przy zastosowaniu krzywej kalibracyjnej.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność.

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 3 % wartości względnej dla zawartości fosforu poniżej 5 % i 0,15 % wartości bezwzględnej dla zawartości fosforu równej lub wyższej niż 5 %.

4.7. OZNACZANIE WĘGLANÓW

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości węglanów, umownie wyrażanych jako na węglan wapnia, w większości pasz.

W niektórych przypadkach, zwłaszcza w przypadku węglanu żelaza, zastosować inną metodę badawczą.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

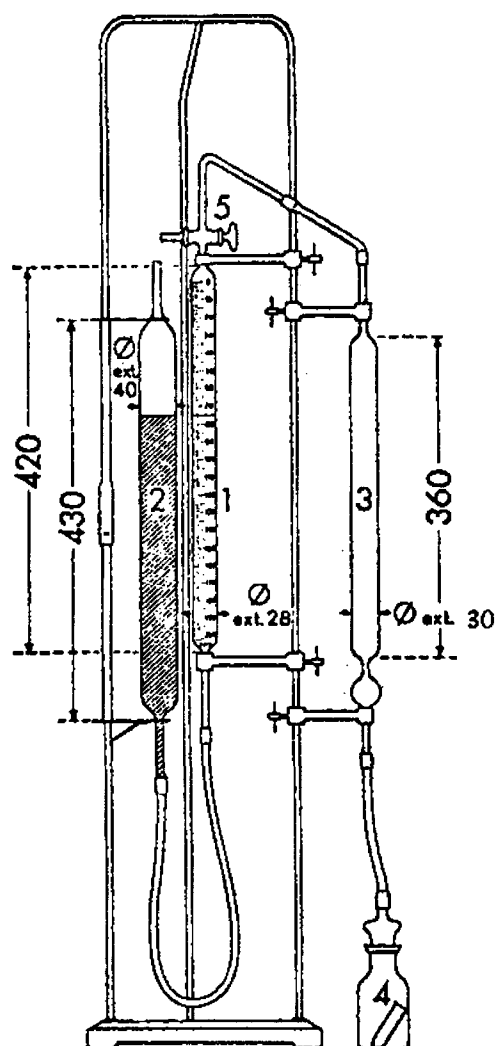
3.1. Kwas chlorowodorowy, $d = 1,10$.

3.2. Węglan wapnia.

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

4. APARATURA I SPRZĘT

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



rysunek 1. Aparat Scheiblera-Dietricha do oznaczania CO_2 . Skala 1:8. Wymiary podane w mm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

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

- 1) 0,5 g w przypadku produktu zawierającego powyżej 50 do 100 % węglanów, wyrażonych jako węglan wapnia;
- 2) 1 g w przypadku produktu zawierającego od 40 do 50 % węglanów, wyrażonych jako węglan wapnia;
- 3) 2 do 3 g w przypadku innych produktów.

Próbkę umieścić w specjalnej kolbie aparatu, oznaczonej cyfrą 4 na rysunku 1, wyposażonej w małą probówkę wykonaną z nietłukącego się szkła zawierającą 10 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, i podłączyć kolbę do aparatury. Kran trójdrożny, oznaczony cyfrą 5 na rysunku 1, ustawić tak, aby rurka, oznaczona cyfrą 1 na rysunku 1, była podłączona z wyjściem. Używając ruchomej rurki, oznaczonej cyfrą 2 na rysunku 1, wypełnionej barwnym kwasem siarkowym, o którym mowa w ust. 3.3, i połączonej z wykalibrowaną rurką, oznaczoną cyfrą 1 na rysunku 1, doprowadzić poziom cieczy do znaku zero, który jest wyznaczony na podziałce. Przekręcić kran, oznaczony cyfrą 5 na rysunku 1, tak, aby podłączyć rurkę oznaczoną cyfrą 1 na rysunku 1 z rurką oznaczoną cyfrą 3 na rysunku 1, i sprawdzić, czy poziom cieczy został doprowadzony do znaku zero.

Przechylając kolbę, oznaczoną cyfrą 4 na rysunku 1, powoli wlewać kwas chlorowodorowy, o którym mowa w ust. 3.1, do próbki. Wyrównać ciśnienie, obniżając rurkę oznaczoną cyfrą 2 na rysunku 1. Potrząsać kolbą, oznaczoną cyfrą 4 na rysunku 1, dopóki nie ustanie wydzielanie się dwutlenku węgla.

Przywrócić ciśnienie, doprowadzając ciecz w rurkach oznaczonych cyframi 1 i 2 na rysunku 1 do tego samego poziomu. Po kilku minutach, kiedy ustali się objętość gazu, wykonać odczyt.

Przeprowadzić test kontrolny w tych samych warunkach z 0,5 g węglanu wapnia, o którym mowa w ust. 3.2.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość węglanów, podaną w g, wyrazić jako procentową zawartość węglanu wapnia w próbce według następującego wzoru:

$$\frac{V \times 100}{T \times 2W}$$

gdzie:

V – ilość CO₂ w ml uwolniona z próbki,

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

W – masa w g próbki.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Jeżeli próbka jest większa niż 2 g, do kolby, oznaczonej cyfrą 4 na rysunku 1, wlać najpierw 15 ml wody destylowanej i zmieszać przed rozpoczęciem badania. Do testu kontrolnego zastosować taką samą objętość wody.

7.2. Jeżeli objętość zastosowanej aparatury różni się od objętości aparatu Scheiblera-Dietricha, dopasować porcje badanej próbki i substancji kontrolnej i obliczyć wyniki.

4.8. OZNACZANIE ŻELAZA, MIEDZI, MANGANU I CYNKU

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

żelaza (Fe): 20 mg/kg,

miedzi (Cu): 10 mg/kg,

manganu (Mn): 20 mg/kg,

cynku (Zn): 20 mg/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

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

Stosować odczynniki czyste do analizy. Nieobecność oznaczanych pierwiastków w stosowanych odczynnikach i roztworach powinna być sprawdzana poprzez ślepą próbę. Odczynnik, jeżeli to konieczne, poddaje się oczyszczeniu przed zastosowaniem.

Zamiast przygotowania wzorcowych roztworów opisanych poniżej dopuszcza się stosowanie innych dostępnych wzorcowych roztworów, pod warunkiem że zostały one sprawdzone przed użyciem.

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 poniżej 10 mg (jako siarczaniu)/litr.

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

3.6. Nadtlenek wodoru — 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, o którym mowa w ust. 3.2, dodać 16 ml nadtlenu wodoru, o którym mowa w ust. 3.6, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.7.1. Roboczy roztwór wzorcowy żelaza (100 µg Fe/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 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 kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, dodać 5 ml nadtlenu wodoru, o którym mowa w ust. 3.6, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.8.1. Roztwór wzorcowy roboczy miedzi (10 µg Cu/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.8, wodą w stosunku 1:9, a następnie przez ponowne rozcieńczenie uzyskanego roztworu wodą 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 kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.9.1. Roztwór wzorcowy roboczy manganu (10 µg Mn/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.9, wodą w stosunku 1:9, a następnie przez ponowne rozcieńczenie uzyskanego roztworu wodą 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 listka w 25 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.10.1. Roztwór wzorcowy roboczy cynku (10 µg Zn/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.10, wodą w stosunku 1:9, a następnie przez ponowne rozcieńczenie uzyskanego roztworu wodą 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 którym mowa w ust. 3.2, i uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Piec mufłowy z regulacją temperatury i rejestratorem.

4.2. Naczynie szklane z odpornego borokrzemowego szkła; zalecane jest stosowanie sprzętu wyłącznie do oznaczania mikroelementów.

4.3. Tygłe platynowe lub kwarcowe.

4.4. Spektrofotometr absorpcji atomowej o 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 roślinnej, która może zawierać mikroelementy i którą należy usunąć. Dlatego też w przypadku analizy takich pasz zastosować następujące, zmodyfikowane postępowanie.

Postępować w sposób określony w ust. 5.1.1.1 do etapu filtrowania. Przemycić dwukrotnie wrzącą wodą filtr zawierający nierozpuszczalną pozostałość i umieścić w platynowym tyglu, o którym mowa w ust. 4.3. Spopielać w piecu mufłowym w temperaturze poniżej 550 °C do całkowitego zaniku cząstek węgla. Pozostawić do schłodzenia, dodać kilka kropli wody, a następnie 10 do 15 ml kwasu fluorowodorowego, o którym mowa w ust. 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, o którym mowa w ust. 3.4, i odparować do sucha. Dodać 5 kropli kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.5, i ogrzewać aż do zaniku białych dymów. Po dodaniu 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, i około 30 ml wody podgrzać, przefiltrować roztwór do kolby miarowej o pojemności 250 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą tak, aby uzyskać stężenie HCl około 0,5 N. Kontynuować oznaczanie w sposób określony w ust. 5.1.2.

5.1.1.1. Odważyć od 5 do 10 g próbki, z dokładnością do 0,2 mg, i umieścić w kwarcowym lub platynowym tyglu, o którym mowa w ust. 4.3, przy czym masę próbki, która ma być spopieleną, szacuje się na podstawie przybliżonej zawartości mikroelementu w paszy, w stosunku do czułości stosowanego spektrofotometru. W przypadku pasz ubogich w mikroelementy może zaistnieć konieczność rozpoczęcia oznaczania od 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 mufłowego, o którym mowa w ust. 4.1. Zamknąć piec tak, aby spopielenie było prowadzone 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, najlepiej przez noc, w celu usunięcia związków węglowych, następnie otworzyć piec i pozostawić do schłodzenia, gdzie temperatura według wskazań pirometru nie powinna być wyższa niż 475 °C.

Przemycić tygiel przy użyciu około 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, a do zlewki dodawać powoli i ostrożnie pozostałą część kwasu, gdyż może zajść gwałtowna reakcja w wyniku powstania dwutlenku węgla. Dodawać kwas chlorowodorowy, o którym mowa w ust. 3.1, kroplami, mieszając, do zaniku burzenia się mieszaniny. Odparować do sucha, od czasu do czasu mieszając szklaną bagietką.

Następnie dodać do pozostałości 15 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, a następnie około 120 ml wody. Zamieszać szklaną bagietką, która powinna pozostać w zlewce, i przykryć zlewkę szkiełkiem zegarkowym.

Doprowadzić ostrożnie do wrzenia i pozostawić w tym stanie aż do całkowitego rozpuszczenia rozpuszczalnych cząstek popiołu. Przefiltrować przez bezpopiołowy filtr i zebrać filtrat w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Splukać zlewkę i filtr przy użyciu 5 ml gorącego kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, i dwukrotnie wrzącą wodą. Uzupełnić kolbę miarową, o której mowa powyżej, do pełnej objętości wodą tak, aby uzyskać stężenie HCl około 0,5 N.

5.1.1.2. Jeżeli pozostałość na filtrze jest czarna (węgiel), wstawić z powrotem do pieca i ponownie spopielać w temperaturze 450 – 475 °C. Spopielenie, które wymaga od 3 do 5 godzin, uważa się za zakończone, gdy popiół będzie miał barwę białą lub białawą. Rozpuścić pozostałość w około 2 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, odparować do sucha i dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2. Podgrzać, przefiltrować roztwór do kolby miarowej i uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą tak, aby uzyskać stężenie HCl około 0,5 N.

Przy oznaczaniu mikroelementów należy postępować tak, aby nie dopuścić do zanieczyszczenia, zwłaszcza cynkiem, miedzią i żelazem. Dlatego sprzęt stosowany podczas przygotowania próbek powinien być wolny od zanieczyszczeń tymi metalami.

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

5.1.2. Spektrofotometryczne oznaczenie.

5.1.2.1. Przygotowanie roztworów do kalibracji.

Dla każdego z oznaczanych mikroelementów przygotować, z roboczych roztworów wzorcowych określonych w ust. 3.7.1, ust. 3.8.1, ust. 3.9.1 i ust. 3.10.1, roztwory 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). Wybrane stężenia mikroelementów powinny mieścić się w zakresie czułości stosowanego spektrofotometru. W tabelach 12 – 15 podano przykładowy skład typowych zakresów stężeń kalibracyjnych roztworów; w zależności od typu i czułości stosowanego spektrofotometru może zachodzić konieczność wyboru innych stężeń.

Tabela 12. Żelazo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml roboczego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.7.1,							
(1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml HCl, o którym mowa w ust. 3.2	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu, o którym mowa w ust. 3.11, i uzupełnić wodą do objętości 100 ml							

Tabela 13. Miedź

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml roboczego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.8.1, (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml HCl, o którym mowa w ust. 3.2	8	8	8	8	8	8	8
uzupełnić wodą do objętości 100 ml							

Tabela 14. Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml roboczego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.9.1, (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml HCl, o którym mowa w ust. 3.2	7	7	7	7	7	7	7
+ 10 ml roztworu chlorku lantanu, o którym mowa w ust. 3.11, i uzupełnić wodą do objętości 100 ml							

Tabela 15. Cynk

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

5.1.2.2. Przygotowanie roztworu do analizy.

W przypadku oznaczania miedzi może być wykorzystany roztwór przygotowany w sposób określony w ust. 5.1.1. W przypadku konieczności dostosowania jego stężenia do zakresu stężeń kalibracyjnych roztworów pobrać pipetą podzielną część roztworu do kolby miarowej o pojemności 100 ml i uzupełnić kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.3, do pełnej objętości kolby.

Przy oznaczaniu żelaza, manganu i cynku pobrać pipetą podzielną część roztworu przygotowanego w sposób określony w ust. 5.1.1 do kolby miarowej o pojemności 100 ml, dodać 10 ml roztworu chlorku lantanu, o którym mowa w ust. 3.11, i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.3. Przy przygotowaniu roztworu do analizy uwzględnić ust. 8.

5.1.2.3. Ślepa próba.

Ślepa próbę przeprowadzić zgodnie z kolejnością wykonywania czynności metody, pomijając te czynności, w których materiał próbki został pominięty. Nie stosować roztworu kalibracyjnego „0” jako ślepej próby.

5.1.2.4. Pomiar absorpcji atomowej.

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

Fe : 248,3 nm,

Cu : 324,8 nm,

Mn : 279,5 nm,

Zn : 213,8 nm.

Każdy pomiar przeprowadzić czterokrotnie.

5.2. Pasze mineralne.

Jeżeli próbka paszy nie zawiera substancji organicznych, wcześniejsze spopielenie nie jest konieczne. Postępować w sposób określony w ust. 5.1.1.1, poczynając od akapitu drugiego. Można pominąć etap odparowania z kwasem fluorowodorowym.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Przy zastosowaniu krzywej kalibracyjnej obliczyć zawartość oznaczanego mikroelementu w roztworze do analizy i wyrazić wynik w mg mikroelementu na kg próbki (ppm).

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. 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 % wyższego 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 % wyższego 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 dodanie chlorku lantanu, o którym mowa w ust. 3.11. Jeżeli jednak w próbce stosunek wagowy $Ca + Mg / P > 2$, to dodanie roztworu chlorku lantanu, o którym mowa w ust. 3.11, do analizowanego roztworu i kalibracyjnych roztworów może być pominięte.

ROZDZIAŁ 5

BADANIE WITAMIN

5.1. OZNACZANIE WITAMINY A METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ
CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ**1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY**

Metoda służy do oznaczania zawartości witaminy A (retinol) w paszach i premiksach. Metoda pozwala na oznaczenie witaminy A obejmującej wszystkie formy alkoholowe *trans*-retinolu i wszystkie jej izomery *cis*. Zawartość witaminy A jest wyrażana w jednostkach międzynarodowych (IU) na kg. Jedna IU odpowiada aktywności 0,300 µg wszystkich form alkoholowych *trans*-witaminy A lub 0,344 µg wszystkich form octanowych *trans*-witaminy A, lub 0,550 µg wszystkich form palmitynianowych *trans*-witaminy A.

Granica oznaczalności metody wynosi 2000 IU witaminy A/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest hydrolizowana w etanolowym roztworze wodorotlenku potasu, a witamina A ekstrahowana eterem naftowym. Rozpuszczalnik jest usuwany przez odparowanie, a pozostałość rozpuszczana w metanolu i, w razie konieczności, rozcieńczana do wymaganego stężenia. Zawartość witaminy A jest oznaczana metodą wysokospawnej chromatografii cieczerwowej z fazą odwróconą (RP-HPLC) przy wykorzystaniu detektora UV lub detektora fluorescencyjnego. Parametry chromatograficzne zostały tak dobrane, że nie zachodzi rozdział pomiędzy wszystkimi formami alkoholowymi *trans*-witaminy A 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, $\beta = 50\text{ g}/100\text{ ml}$.

3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $\beta = 10\text{ g}/100\text{ ml}$, przy uwzględnieniu ust. 7.7.

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

3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5\text{ mol/l}$ w glicerolu, $\beta = 120\text{ g/l}$ (dla $x = 9$), przy uwzględnieniu ust. 7.8.

3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $\beta = 2\text{ g}/100\text{ ml}$ w etanolu, o którym mowa w ust. 3.1.

3.8. 2-propanol.

3.9. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina, w której proponuje się zastosować stosunek 980 + 20 (V + V): metanolu, o którym mowa w ust. 3.3, i wody. Dokładny współczynnik zostanie określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.

3.10. Azot wolny od tlenu.

3.11. Wszystkie formy octanowe *trans*-witaminy A, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności; proponuje się zastosować $2,80 \times 10^6\text{ IU/g}$.

3.11.1. Roztwór podstawowy wszystkich form octanowych *trans*-witaminy A. Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg octanu witaminy A, o którym mowa w ust. 3.11, do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu, o którym mowa w ust. 3.8, i uzupełnić tym samym rozpuszczalnikiem do pełnej objętości kolby. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość oznaczyć w sposób określony w ust. 5.6.3.1.

3.12. Wszystkie formy palmitynianowe *trans*-witaminy A, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności; proponuje się zastosować $1,80 \times 10^6\text{ IU/g}$.

3.12.1. Roztwór podstawowy wszystkich form palmitynianowych *trans*-witaminy A. Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 80 mg palmitynianu witaminy A, o którym mowa w ust. 3.12, do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu, o którym mowa w ust. 3.8, i uzupełnić tym samym rozpuszczalnikiem do pełnej objętości tej kolby. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość oznaczyć w sposób określony w ust. 5.6.3.2.

3.13. 2,6-dwu-tetr-butyl-4-metylofenol (BHT), przy uwzględnieniu ust. 7.5.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Rotacyjna wyparka próżniowa.

4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe.

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

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

4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1 l, ze szklanymi korkami.

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

4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa o długości płaszczka 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu.

4.4. Karbowany filtr bibułowy do rozdzielania faz o średnicy 185 mm; proponuje się zastosować Schleicher & Schuell 597 HY ½.

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, przy czym kryterium poprawności: pojedynczy pik dla wszystkich izomerów retinolu w warunkach HPLC.

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

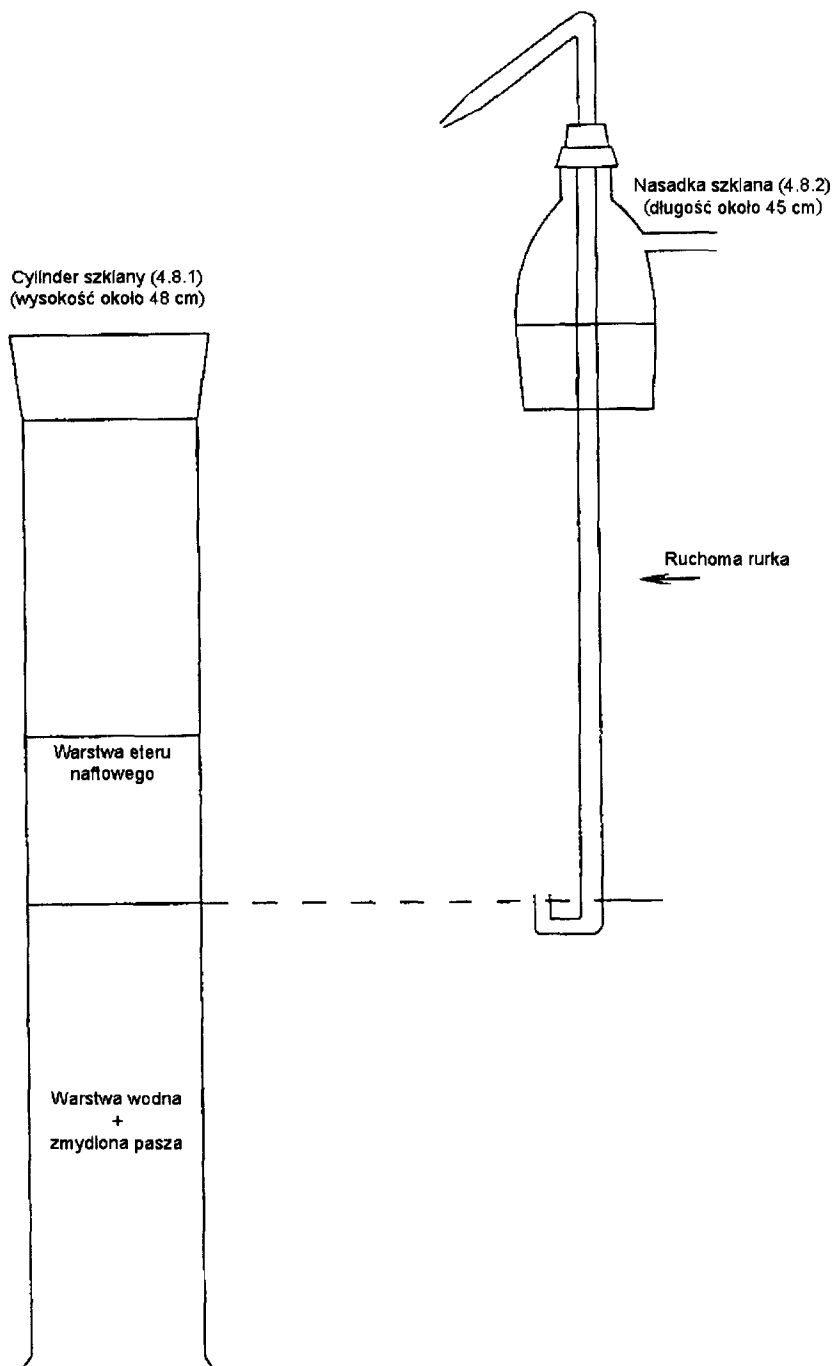
4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuetetami o długości drogi optycznej 10 mm.

4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym.

4.8. Aparat 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 boczniakiem 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.



rysunek 2. Aparat do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.8

Cylinder szklany, o którym mowa w ust. 4.8.1, o wysokości około 48 cm

Warstwa eteru naftowego

Warstwa wodna + zmydlona pasza

Nasadka szklana, o której mowa w ust. 4.8.2, o długości około 45 cm

Ruchoma rurka

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Z uwagi na fakt, że witamina A jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie, zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane bez dostępu 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. Zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając od czasu do czasu korki.

5.1. Przygotowanie próbki.

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 1 mm, uważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielano się ciepło. Aby zapobiec stratom witaminy A, rozdrabnianie powinno być przeprowadzone tuż przed ważeniem i zmydleniem.

5.2. Zmydlenie.

W zależności od zawartości witaminy A, zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 2 do 25 g próbki do kolby płaskodennej lub stożkowej, o której mowa w ust. 4.2.1. Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, około 100 mg BHT, o którym mowa w ust. 3.13, 2 ml roztworu askorbinianu sodu, o którym mowa w ust. 3.5, i 2 ml roztworu siarczku sodu, o którym mowa w ust. 3.6. Założyć chłodnicę, o której mowa w ust. 4.3, na kolbę i umieścić kolbę w łaźni wodnej z mieszałem magnetycznym, o której mowa w ust. 4.7. Ogrzać do wrzenia i skraplać przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu, o którym mowa w ust. 3.4, przez chłodnicę, o której mowa w ust. 4.3, i skraplać przez następne 25 minut, mieszając w trakcie powolnego przepływu 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 1 l, o którym mowa w ust. 4.2.3, lub do aparatu do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.8. Spłukać kolbę po zmydleniu kolejno 25 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, i 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, i przenieść popłuczyny do rozdzielacza lub do zestawu do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.8. Proporcja wody i etanolu w łączonych roztworach powinna wynosić około 2:1. Wstrząsać energicznie przez 2 minuty i pozostawić w celu wytrącenia się osadu na 2 minuty.

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza stożkowego, o którym mowa w ust. 4.2.3.

Po rozdzieleniu warstw, przy uwzględnieniu ust. 7.3, przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza, o którym mowa w ust. 4.2.3. Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, i dwukrotnie używając 50 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2.

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

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.8.

Jeżeli warstwy zostaną rozdzielone, przy uwzględnieniu ust. 7.3, zastąpić korek szklanego cylindra, o którym mowa w ust. 4.8.1, nasadką szklaną ze szlifem, o której mowa w ust. 4.8.2, i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U, tak aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez aplikację ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza o pojemności 1 l, o którym mowa w ust. 4.2.3. Do szklanego cylindra dodać 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, zamknąć i dobrze wstrząsnąć. Pozostawić do rozdzielenia się faz i przenieść górną warstwę do rozdzielacza w sposób opisany powyżej. Powtórzyć postępowanie ekstrakcyjne, stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, a następnie stosując dwukrotnie porcje 50 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, a następnie dodać warstwy eteru naftowego do rozdzielacza. Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego w sposób określony w ust. 5.3.1 i postępować w sposób określony w ust. 5.3.1.

5.4. Przygotowanie roztworu próbki do HPLC.

Pobrać pipetą podzielną część roztworu eteru naftowego, otrzymanego w sposób określony w ust. 5.3.1 lub w ust. 5.3.2, do kolby gruszkowej, o której mowa w ust. 4.2.4. Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na rotacyjnej wyparce próżniowej, o której mowa w ust. 4.1, przy obniżonym ciśnieniu na łaźni wodnej w temperaturze nie wyższej niż 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu, o którym mowa w ust. 3.10, i zdjąć kolbę z rotacyjnej wyparki próżniowej. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu, o którym mowa w ust. 3.10, i szybko rozpuścić pozostałość w od 10 do 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.3. Stężenie witaminy A powinno wynosić od 5 IU/ml do 30 IU/ml.

5.5. Oznaczanie HPLC.

Witamina A jest rozdzielana na kolumnie z fazą odwróconą C₁₈, o której mowa w ust. 4.5.1, a stężenie jest mierzone przy użyciu detektora UV (325 nm) lub detektora fluorescencyjnego o czułości – wzbudzenie: 325 nm, emisja: 475 nm, o którym mowa w ust. 4.5.2.

Zadocować podzielną część roztworu metanolowego, proponuje się zastosować 20 µl, otrzymanego w sposób określony w ust. 5.4 i wmywać fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.9. Obliczyć średnią wysokość (powierzchnię) piku kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) piku kilku dozowań kalibracyjnych roztworów, o którym mowa w ust. 5.6.2.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa w ust. 4.5.1: 250 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 5 lub 10 µm lub równoważne

Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.9:

Mieszanina, w której proponuje się zastosować stosunek 980 + 20 (V + V): metanolu, o którym mowa w ust. 3.3, i wody

Szybkość przepływu:

1 – 2 ml/min

Detektor, o którym mowa w ust. 4.5.2:

Detektor fluorescencyjny – wzbudzenie: 325 nm, emisja:
475 nm lub detektor UV – 325 nm

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.6. Kalibracja.

5.6.1. Przygotowanie roboczych roztworów wzorcowych.

Pobrać pipetą 20 ml podstawowego roztworu octanowej witaminy A, o którym mowa w ust. 3.11.1, lub 20 ml podstawowego roztworu palmitynianowej witaminy A, o którym mowa w ust. 3.12.1, do kolby płaskodennej lub stożkowej, o której mowa w ust. 4.2.1, i hydrolizować, w sposób określony w ust. 5.2, lecz bez dodawania BHT. Następnie ekstrahować eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.2, w sposób określony w ust. 5.3 i uzupełnić do objętości 500 ml eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.2. Odparować 100 ml tego ekstraktu na rotacyjnej wyparce próżniowej, przy uwzględnieniu ust. 5.4, prawie do sucha, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu, o którym mowa w ust. 3.10, i ponownie rozpuścić pozostałość w 10,0 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.3. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 560 IU witaminy A na 1 ml. Oznaczyć dokładną zawartość ekstraktu w sposób określony w ust. 5.6.3.3. Roztwór wzorcowy roboczy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Przenieść pipetą 2,0 ml tego roboczego roztworu wzorcowego do kolby miarowej o pojemności 20 ml, uzupełnić metanolem, o którym mowa w ust. 3.3, do pełnej objętości kolby i zmieszać. Nominalne stężenie tego rozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego wynosi 56 IU witaminy A na 1 ml.

5.6.2. Przygotowanie kalibracyjnych roztworów i krzywej kalibracyjnej.

Przenieść 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml rozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego do partii kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić metanolem, o którym mowa w ust. 3.3, do pełnej objętości kolb i zmieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,8, 5,6, 14,0 i 28,0 IU witaminy A na 1 ml.

Zadozować kilka razy 20 µl każdego z roztworów kalibracyjnych i określić średnie wysokości (powierzchnie) piku. Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) piku, wykreślić krzywą kalibracyjną, uwzględniając wyniki kontroli UV, o których mowa w ust. 5.6.3.3.

5.6.3. Standaryzacja UV wzorcowych roztworów.

5.6.3.1. Roztwór podstawowy octanowej witaminy A.

Pobrać pipetą 2,0 ml roztworu podstawowego octanowej witaminy A, o którym mowa w ust. 3.11.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, o której mowa w ust. 4.2.2, i uzupełnić 2-propanolem, o którym mowa w ust. 3.8, do pełnej objętości kolby. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 56 IU witaminy A na 1 ml. Pobrać pipetą 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu octanowej witaminy A do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić 2-propanolem, o którym mowa w ust. 3.8, do pełnej objętości kolby. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na 1 ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu, o którym mowa w ust. 3.8, w spektrofotometrze, o którym mowa w ust. 4.6, pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

IU witaminy A/1 ml = $E_{326} \times 19,0$

$E \frac{1\%}{1\text{ cm}}$ dla octanowej witaminy A = 1530 przy 326 nm w 2-propanolu)

5.6.3.2. Roztwór podstawowy palmitynianowej witaminy A.

Pobrać pipetą 2,0 ml roztworu podstawowego palmitynianowej witaminy A, o którym mowa w ust. 3.12.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, o której mowa w ust. 4.2.2, i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem, o którym mowa w ust. 3.8. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 56 IU witaminy A na 1 ml. Pobrać pipetą 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu palmitynianowej witaminy A do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem, o którym mowa w ust. 3.8. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na 1 ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu, o którym mowa w ust. 3.8, w spektrofotometrze, o którym mowa w ust. 4.6, pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

IU witaminy A/1 ml = $E_{326} \times 19,0$

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

5.6.3.3. Robocze roztwory wzorcowe witaminy A.

Pobrać pipetą 3,0 ml nierozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego witaminy A, przygotowanego w sposób określony w ust. 5.6.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, o której mowa w ust. 4.2.2, i uzupełnić 2-propanolem, o którym mowa w ust. 3.8, do pełnej objętości kolby. Pobrać pipetą 5,0 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do pełnej objętości kolby 2-propanolem, o którym mowa w ust. 3.8. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na 1 ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu, o którym mowa w ust. 3.8, w spektrofotometrze, o którym mowa w ust. 4.6, pomiędzy 300 nm a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

IU witaminy A/1 ml = $E_{325} \times 18,3$

$E \frac{1\%}{1\text{ cm}}$ dla alkoholowej witaminy A = 1821 przy 325 nm w 2-propanolu)

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików witaminy A roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w IU/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.6.2.

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

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

gdzie:

β – stężenie w IU/ml witaminy A w roztworze próbki, o którym mowa w ust. 5.4,

V_1 – objętość w ml roztworu próbki, o którym mowa w ust. 5.4,

V_2 – objętość w ml pobranej podzielonej części z roztworu próbki, o którym mowa w ust. 5.4,

m – masa w g próbki.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. W przypadku próbek o niskim stężeniu witaminy A wskazane jest połączenie ekstraktów eteru naftowego dwóch zmydlanych nawazek o wadze 25 g każda w jeden roztwór próbki przeznaczony do oznaczania HPLC.

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

7.3. Jeżeli nie dochodzi do rozdzielania faz, dodać około 10 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, aby rozbić emulsję.

7.4. W przypadku oleju z wątroby dorsza i 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 możliwe jest oddzielenie izomerów retinolu.

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

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

8. SPRAWDZENIE METODY

8.1. Powtarzalność.

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15 % względem wyższego wyniku.

9. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

Wyniki badań międzylaboratoryjnych przeprowadzonych przez grupę roboczą do spraw pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA). W tabeli 16 podano wyniki tych badań.

Tabela 16. Wyniki badań porównawczych

	Premiks	Pasza z premiksem	Mieszanka paszowa mineralna	Pasza białkowa	Prosięta
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
Średnia [IU/kg]	17,02 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁶	537 100	151 800	18 070
s _r [IU/kg]	0,51 x 10 ⁶	0,039 x 10 ⁶	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	1,43 x 10 ⁶	0,109 x 10 ⁶	61 824	34 384	1 910
CV _r [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s _R [IU/kg]	1,36 x 10 ⁶	0,069 x 10 ⁶	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	3,81 x 10 ⁶	0,193 x 10 ⁶	129 640	64 568	10 119
CV _R [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych wartości; s_r – odchylenie standardowe dla powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; r – powtarzalność wyników; R – odtwarzalność wyników; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

5.2. OZNACZANIE WITAMINY E METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

Granica oznaczalności metody wynosi 2 mg witaminy E/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

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, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.

- 3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$, przy uwzględnieniu ust. 7.7.
- 3.6. Siarczek sodu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x \text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$).
- 3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ w glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (dla $x = 9$), przy uwzględnieniu ust. 7.8.
- 3.7. Roztwór fenolofaleiny, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ w etanolu, o którym mowa w ust. 3.1.
- 3.8. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina, w której proponuje się zastosować stosunek $980 + 20 (V + V)$: metanolu, o którym mowa w ust. 3.3, i wody. 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 podstawowy octanu DL- α -tokoferolu:
Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg octanu DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.10, do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, i uzupełnić do objętości tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg octanu DL- α -tokoferolu. W przypadku kontroli UV uwzględnić ust. 5.6.1.3, natomiast w przypadku stabilizacji uwzględnić ust. 7.4.
- 3.11. DL- α -tokoferol, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności.
- 3.11.1. Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.10, do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, i uzupełnić do objętości tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg DL- α -tokoferolu. W przypadku kontroli UV uwzględnić ust. 5.6.2.3, natomiast w przypadku stabilizacji uwzględnić ust. 7.4.
- 3.12. 2,6-dwu-tetr-butyl-4-metylofenol (BHT), przy uwzględnieniu ust. 7.5.

4. APARATURA I SPRZĘT

- 4.1. Rotacyjna wyparka próżniowa.
- 4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe.
- 4.2.1. Kolba płaskodenno lub stożkowa o pojemności 500 ml, ze szlifem.
- 4.2.2. Kolby miarowe o wąskich szybkach o pojemnościach 10, 25, 100 i 500 ml, ze szklanymi korkami.
- 4.2.3. Rozdzielacze stożkowe o pojemności 1 l, ze szklanymi korkami.
- 4.2.4. Kolba gruszkowa o pojemności 250 ml, ze szlifem.
- 4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa o długości płaszczu 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu.
- 4.4. Karbowany filtr bibułowy do rozdzielania faz o średnicy 185 mm; proponuje się zastosować 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, 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 o długości drogi optycznej 10 mm.
- 4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym.
- 4.8. Aparat 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

Z uwagi na fakt, że witamina E jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie, zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane bez dostępu 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. Zapobiegać zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając od czasu do czasu korek.

5.1. Przygotowanie próbek.

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 1 mm, uważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielano się ciepła. Aby zapobiec stratom witaminy E, rozdrabnianie powinno być przeprowadzone tuż przed ważeniem i zmydleniem.

5.2. Zmydlenie.

W zależności od zawartości witaminy E zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 2 do 25 g próbki do kolby płaskodennej lub stożkowej, o której mowa w ust. 4.2.1. Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, około 100 mg BHT, o którym mowa w ust. 3.12, 2 ml roztworu askorbinianu sodu, o którym mowa w ust. 3.5, i 2 ml roztworu siarczku sodu, o którym mowa w ust. 3.6. Założyć chłodnicę, o której mowa w ust. 4.3, na kolbę i umieścić kolbę na łaźni wodnej, o której mowa w ust. 4.7. Ogrzać do wrzenia i skraplać przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu, o którym mowa w ust. 3.4, przez chłodnicę, o której mowa w ust. 4.3, i skraplać 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 którym mowa w ust. 4.2.3, lub do aparatu do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.8. Spłukać kolbę po zmydleniu kolejno 25 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, i 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 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, o którym mowa w ust. 4.2.3.

Po rozdzieleniu warstw, przy uwzględnieniu ust. 7.3, przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza, o którym mowa w ust. 4.2.3. Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, i używając dwukrotnie 50 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2.

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

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.8.

Jeżeli warstwy zostaną rozdzielone, przy uwzględnieniu ust. 7.3, zastąpić korek szklanego cylindra, o którym mowa w ust. 4.8.1, nasadką szklaną ze szlifem, o której mowa w ust. 4.8.2, i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U, tak aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez aplikację ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza, o którym mowa w ust. 4.2.3. Do szklanego cylindra dodać 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, zamknąć i dobrze wstrząsnąć. Pozostawić do rozdzielenia się faz i przenieść górną warstwę do rozdzielacza w sposób opisany powyżej. Powtórzyć postępowanie ekstrakcyjne, stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, a następnie stosując dwukrotnie porcję i 50 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, a następnie dodać warstwy eteru naftowego. Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego w sposób określony w ust. 5.3.1 i postępować w sposób określony w ust. 5.3.1.

5.4. Przygotowanie roztworu próbki do HPLC.

Pobrać pipetą część eteru naftowego roztworu, otrzymanego w sposób określony w ust. 5.3.1 lub ust. 5.3.2, do kolby, o której mowa w ust. 4.2.4. Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na rotacyjnej wyparce próżniowej, o której mowa w ust. 4.1, przy obniżonym ciśnieniu na łaźni wodnej w temperaturze nie wyższej niż 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu, o którym mowa w ust. 3.9, i zdjąć kolbę z rotacyjnej wyparki próżniowej. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu, o którym mowa w ust. 3.9, i szybko rozpuścić pozostałość w od 10 do 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.3. Stężenie DL- α -tokoferolu wynosiło od 5 $\mu\text{g/ml}$ do 30 $\mu\text{g/ml}$.

5.5. Oznaczanie HPLC.

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

Zadozować podzielną część roztworu metanolowego, proponuje się zastosować 20 μl , otrzymanego w sposób określony w ust. 5.4 i wymywać fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.8. Obliczyć średnie wysokości (powierzchnie) piku kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) piku kilku dozowań kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 5.6.2.

Warunki HPLC

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa w ust. 4.5.1: 250 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 5 lub 10 μm lub równoważne

Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.8: Mieszanina, w której proponuje się zastosować stosunek 980 + 20 (V + V): metanolu, o którym mowa w ust. 3.3, i wody

Szybkość przepływu: 1 – 2 ml/min

Detektor, o którym mowa w ust. 4.5.2: Detektor fluorescencyjny – wzbudzenie: 295 nm, emisja: 330 nm lub detektor UV – 292 nm

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

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

5.6.1. Wzorzec octanu DL- α -tokoferolu.

5.6.1.1. Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego.

Pobrać pipetą 25 ml podstawowego roztworu octanu DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.10.1, do kolby płaskodennej lub stożkowej, o której mowa w ust. 4.2.1, i hydrolizować, w sposób określony w ust. 5.2. Następnie ekstrahować eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.2, w sposób określony w ust. 5.3, i uzupełnić do objętości 500 ml eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.2. Odparować 25 ml tego ekstraktu na rotacyjnej wyparce próżniowej, przy uwzględnieniu ust. 5.4, prawie do sucha, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu, o którym mowa w ust. 3.9, i ponownie rozpuścić pozostałość w 25,0 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.3. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 45,5 μg DL- α -tokoferolu na 1 ml, co odpowiada 50 μg octanu DL- α -tokoferolu na 1 ml. Roztwór wzorcowy roboczy przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

5.6.1.2. Przygotowanie kalibracyjnych roztworów 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 objętości metanolem, o którym mowa w ust. 3.3, i zmieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,5, 5,0, 10,0 i 25,0 μg na 1 ml octanu DL- α -tokoferolu, co odpowiada 2,28, 4,55, 9,10 i 22,8 μg na 1 ml DL- α -tokoferolu.

Zadozować kilka razy 20 μl każdego roztworu kalibracyjnego i określić średnie wysokości (powierzchnie) piku.

Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) piku, wykreślić krzywą kalibracyjną.

5.6.1.3. Standaryzacja UV roztworu podstawowego octanu DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.10.1.

Rozcieńczyć 5,0 ml roztworu podstawowego octanu DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.10.1, w 25,0 ml etanolu i zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, w spektrofotometrze, o którym mowa w ust. 4.6, pomiędzy 250 nm i 320 nm.

Maksimum absorpcji powinno wystąpić przy 284 nm:

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

Przy tym rozcieńczeniu wartość wygaśnięcia powinna wynosić od 0,84 do 0,88.

5.6.2. Wzorzec DL- α -tokoferolu.

5.6.2.1. Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego.

Pobrać pipetą 2,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.11.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, rozpuścić w metanolu, o którym mowa w ust. 3.3, i uzupełnić do objętości 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. Wzorcowy roztwór roboczy przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

5.6.2.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej.

Przenieść 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do objętości metanolem, o którym mowa w ust. 3.3, i zmieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DL- α -tokoferolu, czyli 2,20, 4,40, 8,79 i 22,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ octanu DL- α -tokoferolu.

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

5.6.2.3. Standaryzacja UV roztworu podstawowego DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.11.1.

Rozcieńczyć 2,0 ml roztworu podstawowego DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.11.1, w 25,0 ml etanolu i zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, w spektrofotometrze, o którym mowa w ust. 4.6, pomiędzy 250 nm i 320 nm.

Maksimum absorpcji powinno wystąpić przy 292 nm.

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

Przy tym rozcieńczeniu wartość wygaśnięcia powinna wynosić 0,6.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików witaminy E roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w $\mu\text{g}/\text{ml}$, obliczonej jako octan DL- α -tokoferolu, z krzywej wzorcowej, o której mowa w ust. 5.6.1.2 lub w ust. 5.6.2.2.

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

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

gdzie:

β – stężenie w $\mu\text{g}/\text{ml}$ witaminy E w roztworze próbki, o której mowa w ust. 5.4,

V_1 – objętość w ml roztworu próbki, o którym mowa w ust. 5.4,

V_2 – objętość w ml podzielnej pobranej części z roztworu próbki, o którym mowa w ust. 5.4,

m – masa w g próbki.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. W przypadku próbek o niskim stężeniu witaminy E wskazane jest połączenie ekstraktów eteru naftowego z dwóch zmydlonych naważek o wadze 25 g każda w jeden roztwór próbki przeznaczony do oznaczania HPLC.

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

7.3. Jeżeli nie dochodzi do rozdzielenia faz, dodać około 10 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.1, aby usunąć emulsję.

7.4. Po pomiarze spektrofotometrycznym roztworu octanu DL- α -tokoferolu lub DL- α -tokoferolu, wykonanym odpowiednio w sposób określony w ust. 5.6.1.3 lub w ust. 5.6.2.3, dodać 10 mg BHT, o którym mowa w ust. 3.12, do roztworu, o którym mowa w ust. 3.10.1 lub w ust. 3.11.1, i roztwór przechowywać w lodówce nie dłużej niż 4 tygodnie.

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu zwykłej kolumny możliwe jest oddzielenie α -, β -, γ - i δ -tokoferolu.

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

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

8. SPRAWDZENIE METODY

8.1. Powtarzalność.

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15 % względem wyższego wyniku.

9. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

Wyniki badań międzylaboratoryjnych przeprowadzonych przez grupę roboczą do spraw pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA). W tabeli 17 podano wyniki tych badań.

Tabela 17. Wyniki badań porównawczych

	Premiksy	Pasza z premiksem	Mieszanka paszowa mineralna	Pasza białkowa	Prosięta
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
Średnia [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s _r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV _r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s _R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV _R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych wartości; s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; r – powtarzalność wyników; R – odtwarzalność wyników; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

ROZDZIAŁ 6

BADANIE STYMULATORÓW WZROSTU

6.1. OZNACZANIE WIRGINIAMYCYNY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości wirginiamycyny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 2 mg/kg (2 ppm).

1 mg wirginiamycyny odpowiada 1000 jednostek angielskich.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest ekstrahowana metanolem z Tween 80. Ekstrakt dekantuje się lub odwirowuje i rozcieńcza. Aktywność antybiotyku ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji wirginiamycyny w podłożu agarowym zaszczerpionym *Micrococcus luteus*. Dyfuzja objawia się tworzeniem stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia w antybiotyku w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Utrzymanie kultury macierzystej.

Szczepić *Micrococcus luteus* na skosy agarowe podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30 °C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze 4 °C i przeszczepiać na nowe skosy agarowe co 2 tygodnie.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej.

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego skosu agarowego, o którym mowa w ust. 3.1, przy użyciu od 2 do 3 ml roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3. Uzyskaną suspensją szczepić 250 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux i inkubować przez 18 do 20 godzin w temperaturze 30 °C. Zebrać hodowlę i umieścić w 25 ml roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3, i zmieszać. Rozcieńczyć suspensję w stosunku 1:10 roztworem chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3. Transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 650 nm w 1 cm naczynku w stosunku do roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3, powinna wynosić około 75 %. Suspensja może być przechowywana przez tydzień w temperaturze około 4 °C.

Mogą być zastosowane inne metody, jeżeli pozwalają uzyskać zawiesinę bakteryjną o podobnym składzie.

4. PODEŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoża do hodowli mikroorganizmów i ich analiza:

Pepton mięsa	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	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji)

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Bufor fosforanowy, pH 6:

Wodorofosforan dwupotasu K ₂ HPO ₄	2,0 g
Dwuwodorofosforan potasu KH ₂ PO ₄	8,0 g
Woda	do 1 l.

4.3. 0,8 % roztwór chlorku sodu, (m/V):

Rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do objętości 1 l. Sterylizować.

4.4. Metanol.

4.5. Mieszanina buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.2, i metanolu, o którym mowa w ust. 4.4: 80/20 (V/V).

4.6. Tween 80, metanolowy roztwór 0,5 % (m/V):

Rozpuścić 5 g Tween 80 w metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, i rozcieńczyć metanolem do objętości 1 l.

4.7. Substancja wzorcowa: wirginiamycyna o znanej aktywności.

5. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić dokładnie odważoną ilość substancji wzorcowej, o której mowa w ust. 4.7, w metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, i rozcieńczyć metanolem, o którym mowa w ust. 4.4, do uzyskania roztworu podstawowego zawierającego 1000 µg wirginiamycyny w 1 ml.

Roztwór przechowywany w zamkniętej kolbie w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do 5 dni.

Z tego podstawowego roztworu przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń, przy użyciu mieszaniny, o której mowa w ust. 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, o którym mowa w ust. 4.6, i wstrząsać przez 30 minut. Pozostawić w celu osadzenia lub odwirować, pobrać 20 ml supernatantu roztworu i odparować do około 5 ml w wyparce rotacyjnej w temperaturze nieprzekraczającej 40 °C. Rozcieńczyć pozostałość w mieszaninie, o której mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną zawartość wirginiamycyny 1 µg/ml (= U₈).

6.1.2. Produkty o zawartości wirginiamycyny wyższej niż 100 mg/kg.

Odważyć próbkę o masie nie większej niż 10,0 g i zawierającej od 1 do 50 mg wirginiamycyny, dodać 100 ml roztworu, o którym mowa w ust. 4.6, i wstrząsać przez 30 minut. Pozostawić w celu osadzenia lub odwirować, następnie rozcieńczyć supernatant roztworu mieszaniną, o której mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną zawartość wirginiamycyny 1 µg/ml (= U₈).

6.2. Roztwory do oznaczania.

Z roztworu U₈ przygotować roztwór: U₄, którego oczekiwana zawartość wynosi 0,5 µg/ml, U₂, którego oczekiwana zawartość wynosi 0,25 µg/ml, U₁, którego oczekiwana zawartość wynosi 0,125 µg/ml, metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1), przy użyciu mieszaniny, o której mowa w ust. 4.5.

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Szczepienie analizowanego podłoża.

Szczepić podłoże do hodowali mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, zawieszając bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze około 50 °C. Uwzględniając wstępne próby przeszczepu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.1, określić wymaganą ilość zawiesiny bakteryjnej, 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 wzorcowych roztworów (S₈, S₄, S₂, S₁) i czterech stężeniach analizowanych roztworów (U₈, U₄, U₂, U₁). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w podłożu agaru zrobić 8 wgłębień o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami wgłębień nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach z umieszczonym na ich górnej powierzchni aluminiowym lub plastikowym pierścieniem o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość podłoża, o którym mowa w ust. 4.1, zaszczepionego w sposób określony w ust. 7.1, aby otrzymać warstwę o grubości około 2 mm, co odpowiada 60 ml wylanym na płytkę o średnicy 200 mm. Pozostawić w pozycji poziomej, a następnie zrobić wgłębienia i umieścić w nich objętości analizowanych i wzorcowych roztworów, od 0,10 do 0,15 ml na wgłębienie, odpowiednio do średnicy. Aplikować każde stężenie co najmniej czterokrotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja.

Inkubować płytki przez od 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 stężeń od średnicy stref zahamowania. Wykreślić linie o najlepszej zgodności zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i ekstraktu. Proponuje się zastosować następujący przykład. Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu wzorcowego (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najwyższego poziomu wzorcowego (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć punkty o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), zastępując w powyższych wzorach S₁, S₂, S₄, S₈ – U₁, U₂, U₄, U₈.

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i połączyć je, uzyskując linię dla ekstraktu.

W przypadku braku interferencji linie powinny być równoległe. W praktyce linie mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10 % od ich średniej wartości.

Jeżeli linie nie spełniają warunku równoległości, wówczas w obliczeniach można pominąć albo U_1 i S_1 , albo U_8 i S_8 . Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można zastosować alternatywne wzory, dające alternatywne linie o „najlepszej zgodności”:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Zadowalające są takie same kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W końcowym sprawozdaniu z badań odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 poziomów.

Jeżeli linie spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby poziomów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 poziomów

$$(c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 poziomów

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

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 ekstraktu próbki = aktywność odpowiedniego wzorca x aktywność względna

$$U_8 = S_8 \times A$$

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktu lub, jeżeli nie jest to możliwe, dostosowując stężenia wzorcowych roztworów. Jeżeli względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, to uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Jeżeli linie uznane zostaną za niespełniające warunku równoległości, powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, oznaczenie uznaje się za niezadowalające.

Wynik wyrazić w mg wirginiamycyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność.

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

- 2 mg/kg w wartości bezwzględnej dla zawartości wirginiamycyny do 10 mg/kg,
- 20 % względem wartości najwyższej dla zawartości wirginiamycyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg w wartości bezwzględnej dla zawartości wirginiamycyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10 % względem wartości najwyższej dla zawartości wirginiamycyny powyżej 50 mg/kg.

6.2. OZNACZANIE ZN-BACYTRACINY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości Zn-bacytracyny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 5 mg/kg (5 ppm).

1 mg Zn-bacytracyny paszowej odpowiada 42 międzynarodowym jednostkom (i.u.).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest poddawana ekstrakcji przy pH 2 przy użyciu mieszaniny metanolu, wody, kwasu chlorowodorowego i roztworu siarczku sodu. Dodanie siarczku sodu służy do strącania rozpuszczalnych soli miedzi, które mogą interferować przy oznaczaniu. Ekstrakt jest dostosowywany do pH 6,5, stężony, jeżeli to konieczne, i rozcieńczany. Aktywność antybiotyczna ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji Zn-bacytracyny w podłożu agarowym zaszczerpionym *Micrococcus luteus* (flavus). Dyfuzja objawia się tworzeniem stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku, w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Micrococcus luteus* (FLAVUS) ATCC 10240

3.1. Utrzymanie kultury macierzystej.

Szczepić *Micrococcus luteus* (flavus) na skosy agarowe podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30 °C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze 4 °C i przeszczepiać na nowe skosy agarowe co 2 tygodnie.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej.

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego skosu agarowego, o którym mowa w ust. 3.1, przy użyciu od 2 do 3 ml roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3. Uzyskaną suspensją szczepić 250 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux i inkubować przez 18 do 20 godzin w temperaturze 30 °C. Zebrać hodowlę i umieścić w 25 ml roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3, i zmieszać. Rozcieńczyć suspensję w stosunku 1:10 roztworem chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3. Transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 650 nm w 1 cm naczynku w stosunku do roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3, powinna wynosić około 75 %. Suspensja może być przechowywana przez tydzień w temperaturze około 4 °C.

Mogą być zastosowane inne metody, jeżeli pozwalają uzyskać zawiesinę bakteryjną o podobnym składzie.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoża do hodowli mikroorganizmów:

Pepton mięsa	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	1 l
pH	6,5 do 6,6 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Analiza podłoża:

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	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.3. Roztwór chlorku sodu, 0,8 % (m/V):

Rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do objętości 1 l. Sterylizować.

4.4. Mieszanina: metanolu, wody i kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 4.6: 80/17,5/2,5 (V/V/V).

4.5. Bufor fosforanowy, pH 6,5:

Wodorofosforan dwupotasu K_2HPO_4	22,15 g
Dwuwodorofosforan 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 (1 M).

4.9. Siarczek sodu, roztwór w przybliżeniu 0,5 M.

4.10. Roztwór purpury bromokrezolowej, 0,04 % (m/V):

Rozpuścić 0,1 g purpury bromokrezolowej w 18,5 ml 0,01 M roztworu wodorotlenku sodu. Uzupełnić do objętości 2,5 litra wodą i zmieszać.

4.11. Substancja wzorcowa: Zn-bacytracyna o znanej aktywności (i.u.).

5. ROZTWORY WZORCOWE

Odważyć taką ilość wzorca Zn-bacytracyny, o którym mowa w ust. 4.11, która odpowiada 1050 i.u. zgodnie z podaną aktywnością. Dodać 5 ml 0,1 M kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 4.7, i pozostawić na 15 minut. Dodać 30 ml wody, dostosować do pH 4,5 przy użyciu około 4 ml buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.5, uzupełnić do objętości 50 ml wodą i dobrze zmieszać (1 ml = 21 i.u.).

Z tego roztworu przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń przy użyciu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 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 materiały paszowe pochodzenia mineralnego.

Odważyć od 2,0 do 5,0 g próbki, dodać 29,0 ml mieszaniny, o której mowa w ust. 4.4, 1 ml roztworu siarczku sodu, o którym mowa w ust. 4.9, i krótko wstrząsnąć. Sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Wstrząsać przez 10 minut, dodać 30 ml buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.5, ponownie wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Pobrać odpowiednią ilość supernatantu roztworu i dostosować pH do 6,5 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa

w ust. 4.8, sprawdzając przy użyciu pehametru lub wobec roztworu purpury bromokrezolowej, o którym mowa w ust. 4.10, jako wskaźnika. Rozcieńczyć buforem fosforanowym, o którym mowa w ust. 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, o której mowa w ust. 4.4, 1 ml roztworu siarczku sodu, o którym mowa w ust. 4.9, i krótko wstrząsać. Sprawdzić, czy pH wynosi około 2. Wstrząsać przez 10 minut. Dodać 50 ml buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.5, wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Pobrać odpowiednią ilość supernatantu roztworu i dostosować pH do 6,5 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.8, sprawdzając przy użyciu pehametru lub wobec roztworu purpury bromokrezolowej, o którym mowa w ust. 4.10, jako wskaźnika. Odparować do połowy objętości w wyparce rotacyjnej w temperaturze nie wyższej niż 35 °C. Rozcieńczyć buforem fosforanowym, o którym mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną zawartość Zn-bacytracyny 0,42 i.u./ml (= U_8).

6.1.3. Pozostałe pasze.

Odważyć 10 g próbki, w przypadku zaś gdy oczekiwana zawartość Zn-bacytracyny wynosi 5 mg/kg, odważyć 20,0 g. Dodać mieszaninę składającą się z 24,0 ml mieszaniny, o której mowa w ust. 4.4, i 1,0 ml roztworu siarczku sodu, o którym mowa w ust. 4.9, i homogenizować przez 10 minut. Dodać 25 ml buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.5, wstrząsać przez 15 minut i odwirować. Pobrać 20 ml supernatantu roztworu i dostosować pH do 6,5 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.8, sprawdzając przy użyciu pehametru lub wobec roztworu purpury bromokrezolowej, o którym mowa w ust. 4.10, jako wskaźnika. Odparować do objętości około 4 ml w wyparce rotacyjnej w temperaturze nie wyższej niż 35 °C. Rozcieńczyć pozostałość buforem fosforanowym, o którym mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną zawartość Zn-bacytracyny 0,42 i.u./ml (= U_8).

6.2. Roztwory do oznaczenia.

Z roztworu U_8 przygotować roztwór: U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,21 i.u./ml, U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,105 i.u./ml, U_1 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,0525 i.u./ml, metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.5.

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Szczepienie analizowanego podłoża.

Analizowane podłoże, o którym mowa w ust. 4.2, szczepić zawiesiną bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze około 50 °C. Poprzez wstępne próby przeszczipu na płytce z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.2, określić wymaganą ilość zawiesiny bakteryjnej, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń Zn-bacytracyny.

7.2. Przygotowanie płytek.

Dyfuzyja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeniach badanych roztworów (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Cztery stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w podłożu agaru zrobić 8 wgłębień o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami wgłębień nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach z umieszczonym na ich górnej powierzchni aluminiowym lub plastikowym pierścieniem o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość podłoża, o którym mowa w ust. 4.2, zaszczipionego w sposób określony w ust. 7.1, aby otrzymać warstwę o grubości około 2 mm, co odpowiada 60 ml na płytkę o średnicy 200 mm. Pozostawić w pozycji poziomej, a następnie zrobić wgłębienia i umieścić w nich objętości analizowanych i wzorcowych roztworów, od 0,10 do 0,15 ml na wgłębienie, odpowiednio do średnicy. Aplikować każde stężenie co najmniej czterokrotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja.

Inkubować płytki przez od 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 stężeń od średnicy stref zahamowania. Wykreślić linie o „najlepszej zgodności” zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i ekstraktu. Proponuje się zastosować następujący przykład. Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu wzorcowego (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najwyższego poziomu wzorcowego (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć punkty o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), zastępując w powyższych wzorach S_1 , S_2 , S_4 , S_8 – U_1 , U_2 , U_4 , U_8 .

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i połączyć je, uzyskując linię dla ekstraktu.

W przypadku braku interferencji linie powinny być równoległe. W praktyce linie mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10 % od ich średniej wartości.

Jeżeli linie nie spełniają warunku równoległości, wówczas w obliczeniach można pominąć albo U_1 i S_1 , albo U_8 i S_8 . Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można zastosować alternatywne wzory, dające alternatywne linie o „najlepszej zgodności”:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \text{ lub } \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \text{ lub } \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Zadawalające są takie same kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W końcowym sprawozdaniu z badań odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 poziomów, według których oceniano równoległość.

Jeżeli linie spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności ($\log A$) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby poziomów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 poziomów

$$(c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 poziomów

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

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 ekstraktu próbki = aktywność odpowiedniego wzorca x aktywność względna

$$U_8 = S_8 \times A$$

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktu lub, jeżeli nie jest to możliwe, dostosowując stężenia wzorcowych roztworów. Jeżeli względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, to uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Jeżeli linie zostaną uznane za niespełniające warunku równoległości, powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, oznaczenie uznaje się za niezadawalające.

Wynik wyrazić w mg Zn-bacytracyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność.

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

- 2 mg/kg w wartości bezwzględnej dla zawartości Zn-bacytracyny do 10 mg/kg,
- 20 % względem wartości najwyższej dla zawartości Zn-bacytracyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg w wartości bezwzględnej dla zawartości Zn-bacytracyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10 % względem wartości najwyższej dla zawartości Zn-bacytracyny powyżej 50 mg/kg.

6.3. OZNACZANIE FLAWOFOSFOLIPOLU METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości flawofosfolipolu w paszach, koncentratkach i premiksach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 1 mg/kg (1 ppm).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest ekstrahowana rozcieńczonym metanolem poprzez ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną. Po odwirowaniu ekstrakt zostaje oczyszczony, jeżeli jest to konieczne, poprzez traktowanie żywicami jonowymiennymi i rozcieńczenie. Jego aktywność antybiotyczna jest oznaczana przez pomiar dyfuzji flawofosfolipolu w zaszczipionym podłożu agarowym *Staphylococcus aureus*. Dyfuzja jest widoczna poprzez tworzenie postaci stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P

3.1. Utrzymanie kultury macierzystej.

Szczepić *Staphylococcus aureus* na skosy agarowe podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze około 4 °C i przeszczepiać na nowe skosy agarowe raz w miesiącu.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej.

Odstawić dwie próbki zawierające kulturę macierzystą, o której mowa w ust. 3.1, i przeszczepiać je raz w tygodniu. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 37 °C i przechowywać w lodówce w temperaturze około 4 °C. Na 24 godziny przed oznaczeniem przenieść tę hodowlę od 2 do 4 próbek zawierających skosy podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować przez 16 do 18 godzin w temperaturze 37 °C. Przechowywać suspensję hodowli

w roztworze chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3. Transmisja światła suspensji mierzona przy 578 nm w 1 cm naczynku w stosunku do roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3, powinna wynosić około 40 %.

Mogą być zastosowane inne metody, jeżeli pozwalają uzyskać zawiesinę bakteryjną o podobnym składzie.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do hodowli mikroorganizmów:

Pepton mięsa	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	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki, w tym oxid antibiotic medium 1 (CM 327) z dodatkiem agaru oxoid Nr 3 (L 13).

4.2. Analiza podłoża.

4.2.1. Warstwa bazowa:

Pepton mięsa	6,0 g
Ekstrakt drożdżowy	3,0 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Agar	10,0 g
Woda	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki, w tym oxoic antibiotic medium 2 (CM 335) z dodatkiem agaru Nr 3 (L 13).

4.2.2. Warstwa do posiewu.

Sporządzić w sposób określony w ust. 4.1, z dodatkiem 2,0 g emulsji silikonowej zapobiegającej pienieniu; proponuje się zastosować SE2 z Wacker Chemic Gm bH Monachium.

4.3. Roztwór chlorku sodu, 0,4 % (m/V):

Rozpuścić 4 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do objętości 1 l; poddać sterylizacji.

4.4. Metanol, czysty.

4.5. Metanol, 50 % (V/V):

Rozcieńczyć 500 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, przy użyciu wody o objętości 500 ml.

4.6. Metanol, 80 % (V/V):

Rozcieńczyć 800 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, przy użyciu wody o objętości 200 ml.

4.7. Tris(hydroksymetylo)aminometan.

4.8. Roztwór metanolowego chlorku potasu 1,5 % (m/V):

Rozcieńczyć 1,5 g chlorku potasu w 20 ml wody, uzupełnić metanolem, o którym mowa w ust. 4.4, do objętości 100 ml.

4.9. Wymiennik kationowy:

Dowex 50 W x 8, 20 do 50 mesh, forma sodowa (kat. Serva Nr 41600) lub podobna.

4.10. Wymiennik anionowy:

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, o którym mowa w ust. 4.6.

4.11. Wata szklana.

4.12. Papierek wskaźnikowy (pH od 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 o średnicy wewnętrznej 9 mm, długości od 150 do 200 mm, zakończona kranem na węższym, dolnym końcu i szlifem szklanym umożliwiającym podłączenie wkraplacza, o którym mowa w ust. 5.2, w górnym końcu.

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 zwrotna ze szlifem szklanym.

6. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić substancję wzorcową, o której mowa w ust. 4.14, w 50 % metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, i rozcieńczyć, uzyskując roztwór podstawowy zawierający 100 µg flawofosfolipolu w 1 ml. Roztwór przechowywany w zamkniętej kolbie w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do 2 miesięcy.

Z roztworu podstawowego przygotować metodą kolejnych rozcieńczeń 50 % metanolem, o którym mowa w ust. 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 materiały paszowe pochodzenia mineralnego.

Odważyć od 2,0 do 5,0 g próbki i dodać około 150 mg kwasu askorbinowego, o którym mowa w ust. 4.13. Homogenizować z 150 ml 50 % metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, w kolbie stożkowej, o której mowa w ust. 5.3, i dostawać pH do 8,1 – 8,2, przy użyciu około 400 mg tris(hydroksymetylo)aminometanu, o którym mowa w ust. 4.7. Sprawdzić pH papierkiem wskaźnikowym, o którym mowa w ust. 4.12. Pozostawić na 15 minut, następnie ponownie dostosować pH do 8,1 – 8,2 przy użyciu tris(hydroksymetylo)aminometanu, o którym mowa w ust. 4.7, i gotować przez 10 minut pod chłodnicą zwrotną, o której mowa w ust. 5.4, stale mieszając. Pozostawić do schłodzenia, odwirować mieszankę i zdekantować ekstrakt.

7.1.2. Pozostałe pasze.

Odważyć od 5,0 do 30,0 g próbki zawierającej co najmniej 30 µg flawofosfolipolu. Homogenizować z 150 ml 50 % metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, w kolbie stożkowej, o której mowa w ust. 5.3, i dostosować pH do 8,1 – 8,2, przy użyciu około 400 mg tris(hydroksymetylo)aminometanu, o którym mowa w ust. 4.7. Sprawdzić pH papierkiem wskaźnikowym, o którym mowa w ust. 4.12. Pozostawić na 15 minut, następnie ponownie dostosować pH do 8,1 – 8,2 przy użyciu tris(hydroksymetylo)aminometanu, o którym mowa w ust. 4.7, i gotować przez 10 minut pod chłodnicą zwrotną, o której mowa w ust. 5.4, stale wstrząsając. Pozostawić do schłodzenia, odwirować mieszankę i zdekantować ekstrakt.

7.2. Oczyszczanie, które może być pominięte w przypadku analizy koncentratów, premiksów i materiałów paszowych pochodzenia mineralnego.

Zmieszać 110 ml ekstraktu z 11 g wymiennika kationowego, o którym mowa w ust. 4.9, gotować przez minutę pod chłodnicą zwrotną, o której mowa w ust. 5.4, stale mieszając. Oddzielić wymiennik kationowy przez odwirowanie lub filtrowanie. Zmieszać 100 ml ekstraktu z 150 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, i roztwór przechowywać przez od 12 do 15 godzin w temperaturze 4 °C. Odfiltrować kłaczkowatą masę po ostygnięciu.

Umieścić zwitek waty szklanej, o którym mowa w ust. 4.11, na dole kolumny chromatograficznej, o której mowa w ust. 5.1, umieścić w kolumnie 5 ml wymiennika anionowego, o którym mowa w ust. 4.10, i przemyć kolumnę, stosując 100 ml 80 % metanolu, o którym mowa w ust. 4.6. Przy użyciu wkraplacza, o którym mowa w ust. 5.2, nanieść na kolumnę filtrat o objętości co najmniej 100 ml, zawierający około 16 µg flawofosfolipolu, przy czym 200 ml dla 30 g próbki paszy przy 1 ppm. Przed wprowadzeniem na kolumnę, jeżeli to konieczne, rozcieńczyć filtrat 80 % metanolem, o którym mowa w ust. 4.6, w celu otrzymania oczekiwanej zawartości flawomycyny 16 µg/100 ml. Dostosować wielkość przepływu na około 2 ml na minutę. Odrzucić eluent. Następnie przemywać kolumnę 50 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.6, i ponownie odrzucić eluent.

Eluować flawofosfolipol roztworem chlorku potasu metanolowego, o którym mowa w ust. 4.8, utrzymując przepływ na około 2 ml na minutę. Zebrać 50 ml eluatu w kolbie miarowej, dodać 30 ml wody i zmieszać. Zawartość flawofosfolipolu w tym roztworze powinna wynosić 0,2 µg/ml (= U_8).

7.3. Roztwory do oznaczania.

Gdy etap oczyszczania został pominięty, rozcieńczyć otrzymany ekstrakt w sposób określony w ust. 7.1.1 przy użyciu metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną zawartość flawofosfolipolu 0,2 µg/ml (= U_8).

Z roztworu U_8 przygotować roztwór: U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,1 µg/ml, U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,05 µg/ml, i U_1 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,025 µg/ml, metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu metanolu, o którym mowa w ust. 4.5.

8. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

8.1. Szczepienie podłoża.

Szczepić podłoże, o którym mowa w ust. 4.2.2, zawieszoną bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze około 50 °C. Poprzez wstępne próby przeszczepu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.2.2, określić wymaganą ilość zawiesiny bakteryjnej, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń flawofosfolipolu (około 30 ml/l).

8.2. Przygotowanie przeszczepu na płytki.

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeniach analizowanych podłoży (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w podłożu agaru zrobić 8 wgłębień o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami wgłębień nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach z umieszczonym na ich górnej powierzchni aluminiowym lub plastikowym pierścieniem o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość podłoża, o którym mowa w ust. 4.2.1, aby otrzymać warstwę o grubości około 1,5 mm, co odpowiada 45 ml na płytkę o średnicy 200 mm. Pozostawić w pozycji poziomej, a następnie nanieść górną warstwę podłoża, o którym mowa w ust. 4.2.2, szczepioną w sposób określony w ust. 8.1, aby uzyskać warstwę o grubości 1 mm, co odpowiada 30 ml na płytkę o średnicy 200 ml. Ponownie pozostawić w pozycji poziomej, zrobić wgłębienia i umieścić w nich objętości analizowanych i wzorcowych roztworów, od 0,10 do 0,15 ml na wgłębienie, odpowiednio do średnicy.

Aplikować każde stężenie co najmniej czterokrotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało 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 stężeń od średnicy stref zahamowania. Wykreślić linie o „najlepszej zgodności” zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i ekstraktu. Proponuje się zastosować następujący przykład.

Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu wzorcowego (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najwyższego poziomu wzorcowego (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć punkty o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), zastępując w powyższych wzorach S_1, S_2, S_4, S_8 — U_1, U_2, U_4, U_8 .

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i połączyć je, uzyskując linię dla ekstraktu.

W przypadku braku interferencji linie powinny być równoległe. W praktyce linie mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10 % od ich średniej wartości.

Jeżeli linie nie spełniają warunku równoległości, wówczas w obliczeniach można pominąć albo U_1 i S_1 , albo U_8 i S_8 . Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można zastosować alternatywne wzory, dające alternatywne linie o „najlepszej zgodności”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Zadawalające są takie same kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W końcowym sprawozdaniu z badań odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 poziomów, według których oceniano równoległość.

Jeżeli linie spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów:

Dla 4 poziomów

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 poziomów

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

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 linie nie spełniają warunku równoległości, powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według wzoru (c). Otrzymany w ten sposób wynik uważać za przybliżony i odnotować to w końcowym sprawozdaniu.

10. SPRAWDZENIE METODY

10.1. Powtarzalność.

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

- 0,5 mg/kg w wartościach bezwzględnych dla zawartości flawofosfolipolu od 1 do 2 mg/kg,
- 25 % względem najwyższej wartości dla zawartości flawofosfolipolu powyżej 2 do 10 mg/kg,
- 20 % względem najwyższej wartości dla zawartości flawofosfolipolu powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg w wartościach bezwzględnych dla zawartości flawofosfolipolu powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10 % względem najwyższej wartości dla zawartości flawofosfolipolu powyżej 50 mg/kg.

6.4. OZNACZANIE SPIRAMYCYNY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości spiramycyny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 1 mg/kg (1 ppm). 1 mg spiramycyny odpowiada 3200 międzynarodowym jednostkom (IU).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Metoda polega na ekstrakcji próbki przy użyciu mieszaniny metanolu i roztworu buforu fosforanowo-wodorowęglanowego o pH 8. Ekstrakt jest dekantowany lub odwirowywany, a następnie rozcieńczany. Aktywność antybiotyczna ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji spiramycyny w podłożu agaru zaszczerpionym *Micrococcus luteus*. Dyfuzja objawia się tworzeniem stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

3.1. Utrzymanie kultury macierzystej.

Szczepić *Micrococcus luteus* na skosy agarowe podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 30 °C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze około 4 °C i przeszczepiać na nowe skosy agarowe co 2 tygodnie.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej.

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego skosu agarowego, o którym mowa w ust. 3.1, przy użyciu od 2 do 3 ml roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3. Uzyskaną suspensją szczepić 250 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux i inkubować przez 18 do 20 godzin w temperaturze 30 °C. Zebrać hodowlę i umieścić w 25 ml roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3, i zmieszać. Rozcieńczyć suspensję w stosunku 1:10 roztworem chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3. Transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 650 nm w 1 cm naczynku w stosunku do roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 4.3, powinna wynosić około 75 %. Suspensja może być przechowywana przez tydzień w temperaturze około 4 °C.

Mogą być zastosowane inne metody, jeżeli pozwalają uzyskać zawiesinę bakteryjną o podobnym składzie.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do hodowli mikroorganizmów:

Pepton mięsa	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	1 l
pH	6,5 do 6,6 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Analiza podłoża:

Trypton	5,0 g
Ekstrakt drożdżowy	4,0 g
Ekstrakt mięsny	3,0 g
Agar	10,0 do 20,0 g
Woda	1 l
pH	8,0 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.3. Roztwór chlorku sodu, 0,8 % (m/V).

Rozpuścić 8 g chlorku sodu w wodzie i rozcieńczyć do objętości 1 l. Sterylizować.

4.4. Bufor fosforanowo-węglanowy, pH 8,0:

Wodorofosforan dwupotasu K_2HPO_4	16,7 g
Dwuwodorofosforan potasu KH_2PO_4	0,5 g
Wodorowęglan sodu $NaHCO_3$	20,0 g
Woda	do 1 l.

4.5. Mieszanina: metanolu i buforu fosforanowo-węglanowego, o którym mowa w ust. 4.4, w stosunku 50/50 (V/V).

4.6. Substancja wzorcowa: spiramycyna o znanej aktywności (IU).

5. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić substancję wzorcową, o której mowa w ust. 4.6, w mieszaninie, o której mowa w ust. 4.5, i rozcieńczyć tą samą mieszaniną, aby uzyskać roztwór podstawowy zawierający 1000 IU spiramycyny w 1 ml. Roztwór przechowywany w zamkniętej kolbie w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do 5 dni.

Z tego roztworu przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń przy użyciu mieszaniny, o której mowa w ust. 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 pasz i od 1,0 do 20,0 g w przypadku premiksów. Dodać 100 ml mieszaniny, o której mowa w ust. 4.5, i wstrząsać przez 30 minut. Odwirować lub zdekantować i rozcieńczyć roztwór supernatantu przy użyciu mieszaniny, o której mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną zawartość 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, o której mowa w ust. 4.5, i wstrząsać przez 30 minut. Wirować przez kilka minut, pobrać 50 ml supernatantu i odparować do objętości około 4 ml w wyparce rotacyjnej w temperaturze nie wyższej niż 40 °C. Rozcieńczyć pozostałość mieszaniną, o której mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną zawartość spiramycyny 1 IU/ml (= U_8).

6.2. Roztwory do badań.

Z roztworu U_8 przygotować roztwór: U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,5 IU/ml, U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,25 IU/ml, i U_1 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,125 IU/ml, metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu mieszaniny, o której mowa w ust. 4.5.

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA**7.1. Szczepienie analizowanego podłoża.**

Szczepić podłoże do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.2, zawiesiną bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze około 50 °C. Uwzględniając wstępne próby przeszczepu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.1, określić wymaganą 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 wzorcowych roztworów (S_8, S_4, S_2, S_1) i czterech stężeniach analizowanych roztworów (U_8, U_4, U_2, U_1). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w podłożu agaru zrobić 8 wgłębień o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami wgłębień nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach z umieszczonym na ich górnej powierzchni aluminiowym lub plastikowym pierścieniem o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość podłoża, o którym mowa w ust. 4.2, zaszczerpionego w sposób określony w ust. 7.1, aby otrzymać warstwę o grubości około 2 mm, co odpowiada 60 ml wylanym na płytkę o średnicy 200 mm. Pozostawić w pozycji poziomej, a następnie zrobić wgłębienia i umieścić w nich objętości analizowanych i wzorcowych roztworów, od 0,10 do 0,15 ml na wgłębienie, odpowiednio do średnicy. Aplikować każde stężenie co najmniej czterokrotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja.

Inkubować płytki przez od 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 stężeń od średnicy stref zahamowania. Wykreślić linie o „najlepszej zgodności” zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i ekstraktu. Proponuje się zastosować następujący przykład. Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu wzorcowego (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najwyższego poziomu wzorcowego (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć punkty o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), zastępując w powyższych wzorach S_1, S_2, S_4, S_8 — U_1, U_2, U_4, U_8 .

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i połączyć je, uzyskując linię dla ekstraktu.

W przypadku braku interferencji linie powinny być równoległe. W praktyce linie mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10 % od ich średniej wartości.

Jeżeli linie nie spełniają warunku równoległości, wówczas w obliczeniach można pominąć albo U_1 i S_1 , albo U_8 i S_8 . Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można zastosować alternatywne wzory, dające alternatywne linie o „najlepszej zgodności”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Zadowalające są takie same kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W końcowym sprawozdaniu z badań odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 poziomów, według których oceniono równoległość.

Jeżeli linie spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności ($\log A$) według jednego z następujących wzorów, w zależności od liczby poziomów, według których oceniano równoległość:

Dla 4 poziomów

$$(c) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 poziomów

$$(d) \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

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, powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktu lub, jeżeli nie jest to możliwe, dostosowując stężenia wzorcowych roztworów. Jeżeli względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, to uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Jeżeli linie uznane zostaną za niespełniające warunku równoległości, powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, oznaczenie uznaje się za niezadowalające.

Wynik wyrazić w mg spiramycyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność.

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

- 2 mg/kg w wartościach bezwzględnych dla zawartości spiramycyny do 10 mg/kg,
- 20 % względem najwyższej wartości dla zawartości spiramycyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg w wartościach bezwzględnych dla zawartości spiramycyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10 % względem wartości najwyższej dla zawartości spiramycyny powyżej 50 mg/kg.

6.5. OZNACZANIE AWOPARCYNINY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości awoparcyniny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 2 mg/kg (2 ppm). Obecność antybiotyków polieteryowych może interferować przy oznaczaniu.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Metoda polega na ekstrakcji awoparcyniny przy użyciu mieszaniny acetonu, wody i kwasu chlorowodorowego. Aktywność antybiotyczna ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji awoparcyniny w podłożu agaru zaszczerpionym *Bacillus subtilis*. Dyfuzja objawia się tworzeniem stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku, w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Utrzymanie kultury macierzystej.

Szczepić *Bacillus subtilis* na skosy agarowe podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować przez noc w temperaturze 30 °C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze około 4 °C i przeszczepiać na nowe skosy agarowe raz w miesiącu.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej.

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego skosu agarowego, o którym mowa w ust. 3.1, przy użyciu od 2 do 3 ml sterylnej wody. Uzyskaną suspensją szczepić 300 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux i inkubować przez od 3 do 5 dni w temperaturze 30 °C. Zebrać hodowlę 15 ml etanolu, o którym mowa w ust. 4.2, po uprzednim sprawdzeniu pod mikroskopem i zmieszać. Suspensja może być przechowywana co najmniej przez 5 miesięcy w temperaturze około 4 °C.

Mogą być zastosowane inne metody, jeżeli pozwalają uzyskać zawiesinę bakteryjną o podobnym składzie.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do hodowli mikroorganizmów:

Pepton mięsa	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	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Etanol 20 % (V/V):

Rozcieńczyć 200 ml etanolu w wodzie o objętości 800 ml.

4.3. Kwas chlorowodorowy (d = od 1,18 do 1,19).

4.4. Roztwór wodorotlenku sodu, 2 M.

4.5. Bufor fosforanowy, 0,1 M:

Dwuwodorofosforan potasu KH_2PO_4	13,6 g
Woda	do 1 000 ml
pH dostosować do	4,5

4.6. Mieszanina: acetonu, wody i kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 4.3, w stosunku 65/32,5/2,5 (V/V/V).

4.7. Substancja wzorcowa: awoparcyna o znanej aktywności.

5. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić w buforze fosforanowym, o którym mowa w ust. 4.5, 10 mg substancji wzorcowej, o której mowa w ust. 4.7, a następnie rozcieńczać tym buforem tak, aby otrzymać roztwór podstawowy zawierający 100 µg awoparcyny w 1 ml. Roztwór przechowywany w zamkniętej kolbie, w lodówce, w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do 7 dni.

5.1. Dla premiksów.

Z roztworu podstawowego przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń przy użyciu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 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 przy użyciu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 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, w której zawartych jest od 10 do 100 mg awoparcyny. Umieścić ją w kolbie miarowej o pojemności 100 ml zawierającej 60 ml mieszaniny, o której mowa w ust. 4.6, a następnie mieszać i wstrząsać przez 15 minut przy zastosowaniu wstrząsarki mechanicznej. Sprawdzić pH i, jeżeli to konieczne, dostosować je do 2, przy użyciu kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 4.3. Uzupełnić kolbę do objętości mieszaniną, o której mowa w ust. 4.6, i zmieszać. Przefiltrować porcję przez odpowiedni filtr (proponuje się zastosować filtr Whatman Nr 1), odrzucając pierwsze 5 ml filtratu. Pobrać podzielną część próbki i dostosować pH do 4,5 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.4. Rozcieńczyć roztwór buforem, o którym mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną stężenie awoparcyny 4 µg/ml (= U_8). Z tego roztworu przygotować roztwór: U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 2 µg/ml, U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 1 µg/ml, i U_1 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,5 µg/ml, metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) przy użyciu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.5.

6.2. Pasze.

Odważyć próbkę o masie 50 g i wstrząsać przez 30 minut ze 100 ml mieszaniny, o której mowa w ust. 4.6, przy zastosowaniu wstrząsarki mechanicznej. Sklarować ekstrakt przez odwirowanie, używając zakorkowanych probówek. Następnie pobrać podzielną część sklarowanego ekstraktu, przy uwzględnieniu tabeli 18, i dostosować pH do 4,5 przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.4. Rozcieńczyć tę podzielną część buforem, o którym mowa w ust. 4.5, aby otrzymać oczekiwaną wartość U_8 . Uwzględnić tabelę 18. Z tego roztworu przygotować roztwór: U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 1 µg/ml, U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,5 µg/ml, U_1 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,25 µg/ml, metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) buforem, o którym mowa w ust. 4.5.

Tabela 18. Przykład dla roztworu U_8

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 w ml mieszaniny, o której mowa w ust. 4.6	100	100	100	100	100	100
Objętość w ml sklarowanego ekstraktu	20	15	20	15	20	10
Końcowa objętość w ml U_8	25	25	50	50	100	100
Oczekiwane stężenie w µg/ml U_4	2	około 2	2	około 2	2	2

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Szczepienie analizowanego podłoża.

Szczepić podłoże do hodowali mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, zawieszając bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze od 50 do 60 °C. Uwzględniając wstępne próby przeszczerpu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.1, określić wymaganą 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 wzorcowych roztworów (S_8, S_4, S_2, S_1) i czterech stężeniach analizowanych roztworów (U_8, U_4, U_2, U_1). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w podłożu agaru zrobić 8 wgłębień o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami wgłębień nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach z umieszczonym na ich górnej powierzchni aluminiowym lub plastikowym pierścieniem o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytce taką ilość podłoża, o którym mowa w ust. 4.1, zaszczerpionego w sposób określony w ust. 7.1, aby otrzymać warstwę o grubości około 2 mm, co odpowiada 60 ml wylanym na płytkę o średnicy 200 mm. Pozostawić w pozycji poziomej, a następnie zrobić wgłębienia i umieścić w nich objętości analizowanych i wzorcowych roztworów, od 0,10 do 0,15 ml na wgłębienie, odpowiednio do średnicy. Aplikować każde stężenie co najmniej czterokrotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja.

Inkubować płytki przez od 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 stężeń od średnicy stref zahamowania. Wykreślić linie o „najlepszej zgodności” zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i ekstraktu. Proponuje się zastosować następujący przykład. Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu wzorcowego (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najwyższego poziomu wzorcowego (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć punkty o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), zastępując w powyższych wzorach S_1, S_2, S_4, S_8 — U_1, U_2, U_4, U_8 .

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla ekstraktu.

W przypadku braku interferencji linie powinny być równoległe. W praktyce linie mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10 % od ich średniej wartości.

Jeżeli linie nie spełniają warunku równoległości, wówczas w obliczeniach można pominąć albo U_1 i S_1 , albo U_8 i S_8 . Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można zastosować alternatywne wzory, dające alternatywne linie o „najlepszej zgodności”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Zadawalające są takie same kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W końcowym sprawozdaniu z badań odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 poziomów, według których oceniano równoległość.

Jeżeli linie spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności ($\log A$) według jednego z następujących wzorów.

Dla 4 poziomów

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 poziomów

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

lub

$$(d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktów lub, jeżeli nie jest to możliwe, wzorcowych roztworów. Jeżeli względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, to uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Jeżeli linie uznane zostaną za niespełniające warunku równoległości, powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, oznaczenie uznaje się za niezadowalające.

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność.

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

- 2 mg/kg w wartości bezwzględnej dla zawartości awoparcyny od 2 do 10 mg/kg,
- 20 % względem najwyższej wartości dla zawartości awoparcyny powyżej 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg w wartości bezwzględnej dla zawartości awoparcyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10 % względem najwyższej wartości dla zawartości awoparcyny powyżej 50 mg/kg.

6.6. OZNACZANIE SOLI SODOWEJ MONENZYNY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości soli sodowej monenzyny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 10 mg/kg (10 ppm). 1 mg soli sodowej monenzyny odpowiada 1000 UK jednostek.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Metoda polega na ekstrakcji próbki 90 % metanolem. Następnie, w zależności od zawartości monenzyny w próbce, ekstrakt poddać odpowiedniemu postępowaniu. Aktywność antybiotyczna jest oznaczana przez pomiar dyfuzji monenzyny sodowej w podłożu agarowym zaszczerpionym *Bacillus subtilis*. Dyfuzja objawia się tworzeniem stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku w zakresie stosowanych stężeń antybiotyku. Czulość tej metody zmniejszają jony sodu.

3. MIKROORGANIZM: *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIB 8054)

3.1. Utrzymanie kultury macierzystej.

Szczepić *Bacillus subtilis* na skosy agarowe podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować przez noc w temperaturze 30 °C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce w temperaturze około 4 °C i przeszczepiać na nowe skosy agarowe raz w miesiącu.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej.

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego agaru, o którym mowa w ust. 3.1, przy użyciu od 2 do 3 ml sterylnej wody. Uzyskaną suspensją szczepić 300 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux i inkubować od 3 do 5 dni w temperaturze 30 °C. Po uprzednim sprawdzeniu pod mikroskopem zebrać hodowlę 15 ml etanolu, o którym mowa w ust. 4.3, i zmieszać. Suspensja ta może być przechowywana co najmniej przez 5 miesięcy w temperaturze około 4 °C.

Mogą być zastosowane inne metody, jeżeli pozwalają uzyskać zawiesinę bakteryjną o podobnym składzie.

4. PODŁOŻA I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże do hodowli mikroorganizmów:

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	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Analizowane podłoże:

Glukoza	10,0 g
Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Wodorofosforan dwupotasowy K_2HPO_4	0,69 g
Dwuwodorofosforan potasowy KH_2PO_4	0,45 g
Agar	10,0 – 20,0 g
Woda	1 l
pH	6 (po sterylizacji).

4.3. Etanol 20 % (V/V):

Rozcieńczyć 200 ml etanolu wodą o objętości 800 ml.

4.4. Metanol, bezwodny.

4.5. Metanol 90 % (V/V):

900 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, rozcieńczyć wodą o objętości 100 ml.

4.6. Metanol 50 % (V/V):

500 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, rozcieńczyć wodą o objętości 500 ml.

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 (proponuje się zastosować tę z International Laboratory for Biological Standards, Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK-Surrey KT 15 3 NB).

5. APARATURA I SPRZĘT

5.1. Rotacyjna wyparka próżniowa z okrągłodenną kolbą o pojemności 250 ml.

5.2. Szklana kolumna chromatograficzna o średnicy wewnętrznej 25 mm, długości 400 mm, otwartym końcu o średnicy 2 mm.

5.3. Szklana kolumna chromatograficzna o średnicy wewnętrznej 11 mm, długości około 300 mm, otwartym końcu o średnicy 2 mm.

6. ROZTWORY WZORCOWE

Rozpuścić taką ilość substancji wzorcowej, o której mowa w ust. 4.8, w metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, aby otrzymać roztwór podstawowy zawierający 800 µg monenzyny w 1 ml. Roztwór przechowywany w zamkniętej kolbie w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do 2 tygodni.

Z roztworu podstawowego przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń metanolem, o którym mowa w ust. 4.6, następujące roztwory:

S_8 8,0 µg/ml

S_4 4,0 µg/ml

S_2 2,0 µg/ml

S_1 1,0 µg/ml

7. PRZYGOTOWANIE EKSTRAKTU

7.1. Ekstrakcja.

7.1.1. Premiksy.

Odważyć 2 g próbki, dodać 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, zhomogenizować i wirować przez kilka minut. Roztwór supernatantu rozcieńczyć 50% metanolem, tak aby uzyskać zawartość monenzyny 8 µg/ml (= U_8).

7.1.2. Pasze zawierające 50 i więcej ppm monenzyny.

Odważyć próbkę o masie od 10 do 20 g, dodać 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, homogenizować przez 15 minut i odstawić. Wąski koniec kolumny, o której mowa w ust. 5.2, zatkać watą bawełnianą i dodać tlenek glinu, o którym mowa w ust. 4.7, delikatnie dozując, aż kolumna napełni się do wysokości 75 – 80 mm. Dekantować ekstrakt na kolumnie tlenku glinu i zebrać filtrat. 30 ml filtratu rozcieńczyć wodą do objętości 50 ml. Przeprowadzić następne rozcieńczenie metanolem, o którym mowa w ust. 4.6, tak aby otrzymać oczekiwaną zawartość monenzyny 8 µg/ml (= U_8).

7.1.3. Pasze zawierające od 10 ppm do poniżej 50 ppm monenzyny.

Odważyć próbkę o masie od 10 do 20 g, dodać 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, homogenizować przez 15 minut. Wirować w celu sklarowania. W przypadku próbki zawierającej 20 ppm monenzyny pobrać 40 ml supernatantu cieczy. W przypadku próbki zawierającej 10 ppm pobrać 80 ml i odparować do wysuszenia na rotacyjnej wyparce próżniowej, o której mowa w ust. 5.1, w temperaturze nie wyższej niż 40 °C. Pozostałość rozpuścić w 10 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.5.

Wąski koniec kolumny, o której mowa w ust. 5.3, zatkać bawełnianą watą i dodać tlenek glinu, o którym mowa w ust. 4.7, delikatnie dozując, aż kolumna napełni się do wysokości 75 – 80 mm. Dekantować pozostałość roztworu metanolowego na kolumnie tlenku glinu i zebrać filtrat. Przemyc kolumnę 10 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, i roztwór pochodzący z przemycia połączyć z filtratem. Roztwór odparować do sucha na rotacyjnej wyparce próżniowej, o której mowa w ust. 5.1, w temperaturze nie wyższej niż 40 °C. Pozostałość rozpuścić w 10 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, i uzupełnić wodą do objętości 20 ml. Roztwór odwirowywać przy 4000 obr/min przez co najmniej 5 minut. Następne rozcieńczenie sporządzić przy użyciu metanolu, o którym mowa w ust. 4.6, tak aby otrzymać oczekiwaną zawartość monenzyny 8 µg/ml (= U_8).

7.2. Roztwory badane.

Z roztworu U_8 , poprzez odpowiednie rozcieńczenia (1+1) przy użyciu 50 % metanolu, przygotować roztwór: U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 4 µg/ml, U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 2 µg/ml, U_1 , którego oczekiwana zawartość wynosi 1 µg/ml.

8. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

8.1. Szczepienie analizowanego podłoża.

Szczepić podłoże do hodowali mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.2, zawiesiną bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze od 50 do 60 °C. Uwzględniając wstępne próby przeszczerpu na płytce z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.2, określić wymaganą ilość zawiesiny bakteryjnej, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń wirginiamycyny.

8.2. Przygotowanie płytek.

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i czterech stężeniach analizowanych roztworów (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w podłożu agaru zrobić 8 wgłębień o średnicy od 10 do 13 mm i o odległości pomiędzy środkami wgłębień nie mniejszej niż 30 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach z umieszczonym na ich górnej powierzchni aluminiowym lub plastikowym pierścieniem o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Rozlać na płytki taką ilość podłoża, o którym mowa w ust. 4.2, zaszczerpionego w sposób określony w ust. 8.1, aby otrzymać warstwę o grubości około 2 mm, co odpowiada 60 ml wylanym na płytkę o średnicy 200 mm. Pozostawić w pozycji poziomej, a następnie zrobić wgłębienia i umieścić w nich objętości analizowanych i wzorcowych roztworów, od 0,10 do 0,15 ml na wgłębienie, odpowiednio do średnicy. Aplikować każde stężenie co najmniej czterokrotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

8.3. Inkubacja.

Inkubować płytki przez 18 godzin w temperaturze od 35 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 stężeń od średnicy stref zahamowania. Wykreślić linie o „najlepszej zgodności” zarówno dla roztworu wzorcowego, jak i ekstraktu. Proponuje się zastosować następujący przykład. Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu wzorcowego (SL) według następującego wzoru:

$$(a) \quad SL = \frac{7 S_1 + 4 S_2 + S_4 - 2 S_8}{10}$$

Wyznaczyć punkt o „najlepszej zgodności” dla najwyższego poziomu wzorcowego (SH) według następującego wzoru:

$$(b) \quad SH = \frac{7 S_8 + 4 S_4 + S_2 - 2 S_1}{10}$$

Podobnie obliczyć punkty o „najlepszej zgodności” dla najniższego poziomu ekstraktu (UL) oraz dla najwyższego poziomu ekstraktu (UH), zastępując w powyższych wzorach S_1, S_2, S_4, S_8 — U_1, U_2, U_4, U_8 .

Nanieść obliczone wartości SL i SH na ten sam papier i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla roztworu wzorcowego. Podobnie nanieść wartości UL i UH i połączyć je, uzyskując linię o „najlepszej zgodności” dla ekstraktu.

W przypadku braku interferencji linie powinny być równoległe. W praktyce linie mogą być uznane za równoległe, jeżeli wartości (SH-SL) i (UH-UL) nie różnią się więcej niż o 10 % od ich średniej wartości.

Jeżeli linie nie spełniają warunku równoległości, wówczas w obliczeniach można pominąć albo U_1 i S_1 , albo U_8 i S_8 . Do obliczenia wartości SL, SH, UL i UH można zastosować alternatywne wzory, uzyskując alternatywne linie o „najlepszej zgodności”:

$$(a') \quad SL = \frac{5 S_1 + 2 S_2 - S_4}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_2 + 2 S_4 - S_8}{6}$$

$$(b') \quad SH = \frac{5 S_4 + 2 S_2 - S_1}{6} \quad \text{lub} \quad \frac{5 S_8 + 2 S_4 - S_2}{6}$$

i podobnie dla UL i UH. Zadowalające są takie same kryteria równoległości, jakie zastosowano powyżej. W końcowym sprawozdaniu z badań odnotować, że wyniki obliczono na podstawie 3 poziomów, według których oceniano równoległość.

Jeżeli linie spełniają warunek równoległości, obliczyć logarytm względnej aktywności (log A) według jednego z następujących wzorów:

Dla 4 poziomów

$$(c) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602}{U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2}$$

Dla 3 poziomów

$$(d) \quad \log A = \frac{(U_1 + U_2 + U_4 - S_1 - S_2 - S_4) \times 0,401}{U_4 + S_4 - U_1 - S_1}$$

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

Jeżeli względna aktywność nie mieści się w przedziale od 0,5 do 2,0, powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężeń ekstraktu lub, jeżeli nie jest to możliwe, wzorcowych roztworów. Jeżeli względna aktywność nie mieści się nadal w wymaganym przedziale, to uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować w końcowym sprawozdaniu z badań.

Jeżeli proste uznane zostaną za niespełniające warunku równoległości, powtórzyć oznaczenie. Jeżeli warunek równoległości nie jest nadal spełniany, oznaczenie uznaje się za niezadowalające.

10. SPRAWDZENIE METODY

10.1. Powtarzalność.

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

- 20 % względem najwyższego wyniku dla zawartości soli sodowej monenzyny od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg w wartości bezwzględnej dla zawartości soli sodowej monenzyny powyżej 25 do 50 mg/kg,
- 10 % względem najwyższego wyniku dla zawartości soli sodowej monenzyny powyżej 50 mg/kg.

6.7. OZNACZANIE TYLOZYNY METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczenia zawartości tylozyny w paszach, koncentratkach i premiksach, przy zawartości wyższej niż 2,0 ppm.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest traktowana roztworem buforu fosforanowego o pH 8, wcześniej ogrzanym do temperatury 80 °C, a następnie ekstrahowana metanolem. Po odwirowaniu ekstrakt zostaje rozcieńczony. Aktywność antybiotyczna jest oznaczana przez pomiar dyfuzji tylozyny w podłożu agarowym zaszczerpionym *Sarcina lutea*. Dyfuzja objawia się tworzeniem stref zahamowania mikroorganizmu. Średnica tych stref zahamowania jest wprost proporcjonalna do logarytmu stężenia antybiotyku.

3. MIKROORGANIZM: *Sarcina lutea* ATTC nr 9341

3.1. Utrzymanie kultury macierzystej.

Szczepić *Sarcina lutea* na skosy agarowe podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Dostosować pH do 7,0. Inkubować przez noc w temperaturze około 35 °C. Przechowywać kulturę bakteryjną w lodówce i przeszczepiać na nowe skosy agarowe raz w miesiącu.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej.

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego skosu agarowego, o którym mowa w ust. 3.1, przy użyciu od 2 do 3 ml roztworu soli fizjologicznej, o której mowa w ust. 4.4. Uzyskaną suspensją szczepić 250 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux, dostosowanej do pH 7,0. Inkubować przez 24 godziny w temperaturze 35 °C. Zebrać hodowlę i umieścić w 25 ml roztworu soli fizjologicznej, o której mowa w ust. 4.4. Homogenizować i rozcieńczyć suspensję tak, aby transmisja światła przez suspensję, mierzona przy 650 nm, wynosiła około 75 %. Suspensja przechowywana w lodówce zachowuje trwałość przez tydzień.

Poprzez wstępne próby przeszczepu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.1, określić wymaganą ilość inokulatu, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń tylozyny. Podłoże do hodowli mikroorganizmów szczepić w temperaturze od 48 do 50 °C.

4. PODŁOŻE I ODCZYNNIKI

4.1. Podłoże podstawowe:

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 dostosować do 7,0, co jest niezbędne do utrzymania szczepu macierzystego i suspensji bakteryjnej, a w przypadku oznaczania pH dostosować do 8,0.

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki.

4.2. Roztwór buforu fosforanowego, 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. Roztwór buforu fosforanowego, 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) metanol.

4.7. Mieszanina roztworu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.2, i czystego metanolu, w stosunku objętościowym 60:40.

4.8. Substancja wzorcowa: tylozyna o znanej aktywności.

5. ROZTWORY WZORCOWE

Suszyć substancję wzorcową, o której mowa w ust. 4.8, przez 3 godziny w piecu próżniowym (5 mm słupa rtęci) w temperaturze 60 °C. Następnie odważyć do kolby miarowej 10–50 mg tej substancji, rozpuścić w 5 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, i rozcieńczyć roztworem buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.3, aby otrzymać roztwór podstawowy tylozyny o stężeniu 1 000 µg w 1 ml. Z otrzymanego roztworu podstawowego przygotować roztwór wzorcowy roboczy S₈ zawierający 2,0 µg tylozyny w 1 ml, rozcieńczając mieszaniną, o której mowa w ust. 4.7. Następnie z tego roztworu przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń (1+1), przy użyciu mieszaniny, o której mowa w ust. 4.7, następujące stężenia:

S₄ 1,0 µg/ml

S₂ 0,5 µg/ml

S₁ 0,25 µg/ml.

6. EKSTRAKCJA

W przypadku koncentratu przygotować próbkę o wadze 10 g, w przypadku premiksu lub paszy o wadze 20 g. Dodać 60 ml roztworu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 4.2, wcześniej ogrzanego do temperatury 80 °C i homogenizować przez 2 minuty, używając kuchennego miksera lub urządzenia o podobnym działaniu. Pozostawić na 10 minut, dodać 40 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.5, i homogenizować przez 5 minut. Ekstrakt odwirować i rozcieńczyć podzielną część mieszaniną, o której mowa w ust. 4.7, aby otrzymać stężenie tylozyny wynoszące około 2,0 µg w 1 ml (= U₈). Następnie przygotować stężenia U₄, U₂ i U₁, metodą kolejnych rozcieńczeń (1+1), przy użyciu mieszaniny, o której mowa w ust. 4.7. W przypadku stężeń niższych niż 10 ppm odparować ekstrakt do sucha na wyparce rotacyjnej w temperaturze 35 °C, a następnie pozostałość rozpuścić w metanolu, o którym mowa w ust. 4.6.

7. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

7.1. Szczepienie podłoża do hodowli mikroorganizmów.

Szczepić podłoże, o którym mowa w ust. 4.1, o pH = 8 zawiesiną bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze od 48 do 50 °C.

7.2. Przygotowanie płytek.

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy czterech stężeniach wzorcowych roztworów (S₈, S₄, S₂, S₁) i czterech stężeniach ekstraktu (U₈, U₄, U₂, U₁). Te cztery stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płytce. W tym celu wybrać płytki o takich rozmiarach, aby można było w podłożu agaru zrobić 8 wgłębień o średnicy od 10 do 13 mm. Obliczyć ilość szczepionego podłoża, o którym mowa w ust. 7.1, potrzebnego do jednolitego pokrycia tacki warstwą o grubości około 2 mm. Badania mogą być prowadzone na szklanych płytkach z umieszczonym na ich górnej powierzchni aluminiowym lub plastikowym pierścieniem o średnicy 200 mm i wysokości 20 mm.

Do każdego wgłębienia odpipetować odmierzone objętości roztworu antybiotyku, od 0,10 do 0,15 ml na wgłębienie, odpowiednio do średnicy. Aplikować każde stężenie co najmniej czterokrotnie; tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja.

Inkubować płytki przez noc w temperaturze od 35 do 37 °C.

8. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania, najlepiej metodą rzutowania. Nanieść średnie wartości na papier o skali półlogarytmicznej, zaznaczając zależność stężenia logarytmu i odpowiadającą mu średnicę stref zahamowania. Wyznaczyć linie dla roztworu wzorcowego i dla ekstraktu. Linie nie powinny w żadnym punkcie przecinać się ze sobą, lecz przebiegać równolegle.

Logarytm aktywności względnej obliczyć według następującego wzoru:

$$(U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602$$

$$U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2$$

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność.

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10 % w wartości względnej.

6.8. OZNACZANIE KARBADOKSU

(metylo 3-(2-chinoksalinylo)metyleno)pikrynian N¹, N⁴-dwutlenek)

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości karbadoksu w paszach, premiksach i preparatach. Granica wykrywalności wynosi 1 mg/kg, a granica oznaczalności wynosi 10 mg/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest równoważona wodą i poddawana ekstrakcji przy użyciu mieszaniny metanolu i acetonitrylu. W przypadku pasz podzielną część przefiltrowanego ekstraktu zostaje oczyszczona na kolumnie z tlenkiem glinu. W przypadku premiksów i preparatów podzielną część przefiltrowanego ekstraktu zostaje rozcieńczona do odpowiedniego stężenia wodą, metanolem i acetonitrylem. Zawartość karbadoksu oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitryl do 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, o którym mowa w ust. 3.1, z 500 ml acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.2.

3.6. Kwas octowy, $\sigma = 10\%$.

Rozcieńczyć 10 ml kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.3, wodą do objętości 100 ml.

3.7. Octan sodu, CH_3COONa .

3.8. Woda do HPLC.

3.9. Roztwór buforu octanowego, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6,0$.

Rozpuścić 0,82 g octanu sodu, o którym mowa w ust. 3.7, w 700 ml wody, o której mowa w ust. 3.8, i dostosować pH do wartości 6,0 kwasem octowym, o którym mowa w ust. 3.6. Przenieść do kolby miarowej o pojemności 1 litra, uzupełnić wodą, o której mowa w ust. 3.8, do pełnej objętości kolby i zmieszać.

3.10. Faza ruchoma do HPLC.

Zmieszać 825 ml roztworu buforu octanowego, o którym mowa w ust. 3.9, i 175 ml acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.2. Przefiltrować przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.5, i odgazować roztwór. Do tej czynności proponuje się zastosować łaźnię ultradźwiękową 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, $100 \mu\text{g/ml}$, przy uwzględnieniu ust. 5.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej, o której mowa w ust. 3.11, do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Rozpuścić w mieszaninie metanolu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.5, na łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.7. Po zastosowaniu ultradźwięków doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną metanolu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.5, i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub zastosować ciemne szklane naczynie laboratoryjne i przechowywać w lodówce. Roztwór w temperaturze do 4°C zachowuje stabilność przez miesiąc.

3.11.2. Roztwory kalibracyjne.

Przenieść 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego karbadoksu, o którym mowa w ust. 3.11.1, do partii kolb miarowych o pojemności 100 ml. Dodać 30 ml wody, uzupełnić mieszaniną metanolu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.5, do pełnej objętości kolb i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 2,0, 5,0, 10,0 i 20,0 $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu. Roztwory kalibracyjne sporządza się bezpośrednio przed użyciem.

Do oznaczenia karbadoksu w paszach zawierających poniżej 10 mg/kg sporządza się roztwory kalibracyjne o stężeniu poniżej 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

3.12. Mieszanina wody i mieszaniny metanolu z acetonitrylem, o której mowa w ust. 3.5, w stosunku 300 + 700 (V + V).

Zmieszać 300 ml wody z 700 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.5.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wstrząsarka laboratoryjna lub mieszadło magnetyczne.

4.2. Filtr szklany, Whatman GF/A lub podobny.

4.3. Szklana kolumna o długości od 300 do 400 mm, wewnętrznej średnicy około 10 mm, ze spiekami szklanym oraz zaworem odpływowym.

Dopuszcza się użycie szklanej kolumny 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 systemem do dozowania umożliwiającym dozowanie 20 μl .

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 300 mm x 4 mm, C_{18} , wypełnienie 10 μm lub równoważne.

4.4.2. Detektor UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy pracujący w zakresie do 225 do 400 nm.

4.5. Filtr membranowy, 0,22 μm .

4.6. Filtr membranowy, 0,45 μm .

4.7. Łaźnia ultradźwiękowa.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Z uwagi na fakt, że karbadoks jest wrażliwy na działanie światła, zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane przy ograniczonym dostępie światła lub z zastosowaniem szkła oranżowego lub szkła zabezpieczonego folią aluminiową.

5.1. Wskazówki ogólne.

5.1.1. Ślepa próba paszy.

Do badania odzysku przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona ani karbadoksu, ani substancji interferujących.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności karbadoksu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku.

Badanie odzysku przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy, o której mowa w ust. 5.1.1, fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości karbadoksu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 50 mg/kg, dodać 5,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego karbadoksu, o którym mowa w ust. 3.11.1, do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Odparować roztwór w strumieniu azotu do objętości około 0,5 ml. Dodać 10 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji, o którym mowa w ust. 5.2.

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy podobnej do badanej próbki, uwzględniając ust. 5.1.1, badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest

fortyfikowana przez dodanie znanej ilości karbadoksu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. Ekstrakcja.

5.2.1. Pasze.

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 10 g próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Dodać 15,0 ml wody, zmieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35,0 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.5, zamknąć korkiem i wstrząsać przez 30 minut przy zastosowaniu wstrząsarki lub mieszadła magnetycznego, o których mowa w ust. 4.1. Przefiltrować roztwór przez filtr szklany, o którym mowa w ust. 4.2. Roztwór zachowuje się do etapu oczyszczania, o którym mowa w ust. 5.3.

5.2.2. Premiksy o zawartości od 0,1 do 2,0 % karbadoksu.

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 1 g niezmielonej próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Dodać 15,0 ml wody, zmieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 35 ml mieszaniny metanolu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.5, zamknąć korkiem i wstrząsać przez 30 minut przy użyciu wstrząsarki lub mieszadła magnetycznego, o których mowa w ust. 4.1. Przefiltrować ten roztwór przez filtr szklany, o którym mowa w ust. 4.2. Pipetą przenieść podzielną część filtratu do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 15,0 ml wody, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną metanolu z acetonitrylem, o której mowa w ust. 3.5, i zmieszać. Stężenie karbadoksu w roztworze końcowym powinno wynieść około 10 µg/ml. Podzielną część roztworu przefiltrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.6. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.4.

5.2.3. Preparaty o zawartości powyżej 2,0 % karbadoksu.

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 0,2 g niezmielonej próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać 45,0 ml wody, zmieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 105,0 ml mieszaniny metanolu z acetonitrylem, o której mowa w ust. 3.5, zamknąć korkiem i homogenizować. Poddać próbkę działaniu ultradźwięków przez 15 minut, a następnie wstrząsać przy zastosowaniu wstrząsarki lub mieszadła magnetycznego, o których mowa w ust. 4.1, przez 15 minut. Przefiltrować roztwór przez filtr szklany, o którym mowa w ust. 4.2. Rozcieńczyć podzielną część filtratu mieszaniną wody i mieszaniną metanolu z acetonitrylem, o której mowa w ust. 3.12, aby uzyskać ostateczne stężenie karbadoksu od 10 do 15 µg/ml; w przypadku preparatów 10 % współczynnik rozcieńczenia wynosi 10. Podzielną część przefiltrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.6. Przystąpić do analizy HPLC, o której mowa w ust. 5.4.

5.3. Oczyszczanie.

5.3.1. Przygotowanie kolumny tlenu glinu.

Odważyć 4 g tlenu glinu, o którym mowa w ust. 3.4, i przenieść do szklanej kolumny, o której mowa w ust. 4.3.

5.3.2. Czyszczenie próbki.

Umieścić 15 ml odfiltrowanego ekstraktu, o którym mowa w ust. 5.2.1, w kolumnie z tlenkiem glinu i usunąć pierwsze 2 ml eluatu. Następnie zebrać kolejne 5 ml i przefiltrować podzielną część przez filtr, o którym mowa w ust. 4.6. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.4.

5.4. Oznaczanie HPLC.

5.4.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa

w ust. 4.4.1:

Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.10:

300 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne
Mieszanina, w stosunku 825 + 175 (V + V): buforu octanowego, o którym mowa w ust. 3.9, i acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.2

Szybkość przepływu:

1,5 – 2 ml/min

Długość fali przy detekcji:

365 nm

Dozowana objętość:

20 µl

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilka razy roztwór kalibracyjny, o którym mowa w ust. 3.11.2, zawierający 5,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) pików i czasów retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna.

Zadobować kilka razy każdy z wzorcowych roztworów, o których mowa w ust. 3.11.2, i określić wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki.

Zadobować kilka razy ekstrakt próbki otrzymany dla pasz, o których mowa w ust. 5.2.1, dla premiksów, o których mowa w ust. 5.2.2, oraz dla preparatów, o których mowa w ust. 5.2.3, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików dla pików karbadoksu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików karbadoksu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.4.2.

6.1. Pasze.

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\delta \times V_1}{m}$$

gdzie:

δ – stężenie w $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu w ekstrakcie próbki, o którym mowa w ust. 5.3.2,

V_1 – objętość w ml ekstraktu; w przypadku pasz proponuje się zastosować 50 ml,

m – masa w g próbki.

6.2. Premiksy i preparaty.

Zawartość karbadoksu w próbce, wyrażoną w mg/kg, obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\delta \times V_2 \times f}{m}$$

gdzie:

δ – stężenie w $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu w ekstrakcie próbki, o którym mowa w ust. 5.2.2 lub w ust. 5.2.3,

V_2 – objętość w ml ekstraktu; 50 ml w przypadku premiksów lub 150 ml w przypadku preparatów,

f – współczynnik rozcieńczenia zgodny z ust. 5.2.2 w przypadku premiksów lub zgodny z ust. 5.2.3 w przypadku preparatów,

m – masa w g próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości.

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.11.2, zawierającego 10,0 $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu.

7.1.1. Kochromatografia.

Ekstrakty próbki fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.11.2. Płóć dodanego karbadoksu powinna odpowiadać ilości karbadoksu w ekstrakcie próbki. Powinna zwiększyć się tylko wysokość pików karbadoksu po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach $\pm 10\%$ pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa.

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

- 1) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji. W przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach $\pm 2\text{ nm}$;
- 2) w zakresie pomiędzy 225 a 400 nm próbki i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorcowego analitu;
- 3) w zakresie od 225 do 400 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie powinny różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

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

7.2. Powtarzalność.

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15 % najwyższego wyniku dla zawartości karbadoksu równej lub wyższej niż 10 mg/kg.

7.3. Odzysk.

W przypadku fortyfikacji ślepej próby paszy lub próby paszy odzysk powinien wynosić co najmniej 90 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy ośmiu laboratoriów przeprowadzono analizę sześciu próbek pasz, czterech premiksów i trzech preparatów. Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie⁴⁾. W tabeli 19 i 20 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 19. Wyniki badań porównawczych dla pasz

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Średnia [mg/kg]	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
s_r [mg/kg]	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV_r [%]	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
s_R [mg/kg]	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV_R [%]	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Zawartość nominalna [mg/kg]	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

⁴⁾ Bardziej szczegółowe informacje dotyczące tej analizy można znaleźć w *Dzienniku AOAC International*, tom 71, 1988, str. 484–490.

Tabela 20. Wyniki badań porównawczych dla premiksów i preparatów

	Premiksy				Preparaty		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Średnia [mg/kg]	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
s _r [mg/kg]	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV _r [%]	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
s _R [mg/kg]	0,37	0,28	0,40	0,55	5,4	6,4	7,7
CV _R [%]	4,2	3,0	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Zawartość nominalna [mg/kg]	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych wartości; s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

6.9. OZNACZANIE OLAQUINDOKSU

2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksalino-N¹,N⁴-dioksyd)

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości olaquindoksu w paszach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 5 mg/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest ekstrahowana mieszaniną wody i metanolu. Zawartość olaquindoksu jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z fazą odwróconą przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Metanol.

3.2. Metanol do HPLC.

3.3. Woda do HPLC.

3.4. Faza ruchoma do HPLC:

Mieszanina: w stosunku 900 + 100 (V + V): wody, o której mowa w ust. 3.3, i metanolu, o którym mowa w ust. 3.2.

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, o którym mowa w ust. 3.5, do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać około 190 ml wody. Następnie umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.1, na 20 minut. Po zastosowaniu ultradźwięków roztwór doprowadzić do temperatury pokojowej, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i zmieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową i przechowywać w lodówce. Roztwór powinien być przygotowywany raz w miesiącu.

3.5.2. Roztwór wzorcowy pośredni olaquindoksu, 25 µg/ml.

Przenieść 10 ml podstawowego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.5.1, do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.4, i zmieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową. Roztwór powinien być przygotowywany codziennie.

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, o którym mowa w ust. 3.5.2. Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.4, i zmieszać. Przykryć kolbę folią aluminiową. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5, i 10 µg olaquindoksu/ml. Roztwory powinny być przygotowywane codziennie.

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 o wymiarach 250 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne.

4.4. Filtr membranowy, 0,45 µm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Z uwagi na fakt, że olaquindoks jest wrażliwy na działanie światła, zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane przy ograniczonym dostępie światła lub z zastosowaniem szkła oranżowego.

5.1. Wskazówki ogólne.

5.1.1. Podać analizie ślepą próbę paszy w celu potwierdzenia braku olaquindoksu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości olaquindoksu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 50 mg/kg, przenieść 10 ml podstawowego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.5.1, do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby paszy, dokładnie zmieszać i pozostawić na 10 minut, kilkakrotnie mieszając przed przejściem do etapu ekstrakcji, o którym mowa w ust. 5.2.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności olaquindoksu.

5.2. Ekstrakcja.

Odważyć, z dokładnością 0,01 g, około 50 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 1 l, dodać 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.1, i umieścić kolbę na 5 minut w łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.1. Dodać 410 ml wody i pozostawić w łaźni ultradźwiękowej na następne 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez 30 minut przy użyciu wstrząsarki mechanicznej, o której mowa w ust. 4.2, następnie przefiltrować przez pofalowany filtr. Przenieść 10 ml filtratu do kolby miarowej o pojemności 20 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Przefiltrować podzielną część przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.4, przy uwzględnieniu ust. 9. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.3.

5.3. Oznaczanie HPLC.

5.3.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna chromatograficzna, o której mowa w ust. 4.3.1:	250 mm x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.4:	mieszanina, w stosunku 900 + 100 (V + V): wody, o której mowa w ust. 3.3, i metanolu, o którym mowa w ust. 3.2
Szybkość przepływu:	1,5 – 2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	380 nm
Dozowana objętość:	20 µl – 100 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny, o którym mowa w ust. 3.5.3, zawierający 2,5 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości pików i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna.

Zadozować kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 3.5.3, i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki.

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.2, stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików dla pików olaquindoksu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików olaquindoksu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.3.2.

Zawartość olaquindoksu w próbce w mg/kg obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 1000}{m}$$

gdzie:

c – stężenie w µg/ml olaquindoksu w ekstrakcie próbki, o którym mowa w ust. 5.2,

m – masa w g próbki, o której mowa w ust. 5.2.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości.

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki, o którym mowa w ust. 5.2, i roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.5.3, zawierającego 5 µg/ml olaquindoksu.

7.1.1. Kochromatografia.

Ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.2, fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.5.3. Ilość dodanego olaquindoksu powinna odpowiadać ilości olaquindoksu w ekstrakcie próbki.

Powinno zwiększyć się tylko wysokość pików olaquindoksu po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach ±10 % pierwotnej szerokości pików niefortyfikowanego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa.

Wyniki ocenia się według następujących kryteriów:

1) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji; w przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ±2 nm;

2) w zakresie pomiędzy 220 a 400 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorcowego analitu;

3) w zakresie od 220 do 400 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie powinny różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie zostanie 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 200 mg/kg.

7.3. Odzysk.

Odzysk olaquindoksu dodanego do ślepej próby paszy nie może być niższy od 90 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy trzynastu laboratoriów przeprowadzono analizę czterech próbek. Były to próbki pobrane z paszy dla prosiąt, w tym jedna ślepa próba. W tabeli 21 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 21. Wyniki badań porównawczych

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Średnia [mg/kg]	–	14,6	48,0	95,4
s_r [mg/kg]	–	0,82	2,05	6,36
s_R [mg/kg]	–	1,62	4,28	8,42
CV_r [%]	–	5,6	4,3	6,7
CV_R [%]	–	11,1	8,9	8,8
Zawartość nominalna [mg/kg]	–	15	50	100
Odzysk [%]	–	97,3	96,0	95,4

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych wartości; s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności wyników; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności powtarzalności

9. OBJAŚNIENIA

Metoda nie była sprawdzana dla pasz zawierających więcej niż 100 mg/kg olaquindoksu, zakłada się jednak otrzymanie zadowalających wyników poprzez zmniejszenie odważki analitycznej lub rozcieńczenie ekstraktu, o którym mowa w ust. 5.2, w celu utrzymania stężenia w zakresie krzywej kalibracyjnej, o którym mowa w ust. 5.3.2.

ROZDZIAŁ 7**BADANIE KOKCYDIOSTATYKÓW I INNYCH PRODUKTÓW LECZNICZYCH****7.1. OZNACZANIE METYLOBENZOQUATU**

(7-benzylloksy-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon)

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości metylobenzoquatu w paszach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 1 mg/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Metylobenzoquat ekstrahuje się z próbki metanolem w roztworze kwasu metanosulfonowego. Ekstrakt oczyszcza się dwuchlorometanem metodą chromatografii jonowymiennej, a następnie ponownie dwuchlorometanem. Zawartość metylobenzoquatu jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconą fazą (HPLC) przy użyciu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Dwuchlorometan.

3.2. Metanol do HPLC.

3.3. Faza ruchoma HPLC:

Mieszanina, w stosunku 75 + 25 (V+V): metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, i wody do HPLC.

Przefiltrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.5, i odgazować roztwór, przy czym proponuje się poddać roztwór działaniu ultradźwięków przez 10 minut.

3.4. Roztwór kwasu metanosulfonowego, $s = 2\%$.

Rozcieńczyć 20,0 ml kwasu metanosulfonowego metanolem, o którym mowa w ust. 3.2, do objętości 1 litra.

3.5. Roztwór kwasu chlorowodorowego, $s = 10\%$.

Rozcieńczyć 100 ml kwasu chlorowodorowego ($\rho_{20} = 1,18$ g/ml) wodą do objętości 1 litra.

3.6. Żywica kationowymienna Amberlit CG-120 (Na), 100 do 200 oczek.

Żywicę częściowo przygotowuje się przed użyciem, sporządzając zawiesinę ze 100 g żywicy i 500 ml roztworu kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.5, i ogrzewając na płycie grzewczej do wrzenia, ciągle mieszając. Pozostawić do schłodzenia i zdekantować kwasem. Przefiltrować w warunkach próżni na filtrze z bibuły. Żywicę przemyć dwukrotnie 500 ml porcjami wody, a następnie 250 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2. Przemyć ponownie żywicę 250 ml metanolu i wysuszyć, przepuszczając powietrze przez warstwę żywicy na filtrze. Wysuszoną żywicę przechowywać w zakorkowanej butelce.

3.7. Substancja wzorcowa: czysty metylobenzoquat (7-benzylotksy-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon).

3.7.1. Roztwór wzorcowy podstawowy metylobenzoquatu, 500 µg/ml.

Odważyć 50 mg substancji wzorcowej, o której mowa w ust. 3.7, z dokładnością do 0,1 mg, rozpuścić w roztworze kwasu metanosulfonowego, o którym mowa w ust. 3.4, w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić tym kwasem do pełnej objętości kolby i zmieszać.

3.7.2. Rozwór wzorcowy pośredni metylobenzoquatu, 50 µg/ml.

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml przenieść 5 ml podstawowego roztworu wzorcowego metylobenzoquatu, o którym mowa w ust. 3.7.1, uzupełnić metanolem, o którym mowa w ust. 3.2, do pełnej objętości kolby i zmieszać.

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, o którym mowa w ust. 3.7.2. Uzupełnić zawartość do pełnej objętości kolb fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.3, i zmieszać. Roztwory te mają odpowiednio stężenia 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 µg/ml metylobenzoquatu. Roztwory te przygotować bezpośrednio przed użyciem.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wstrząsarka laboratoryjna.

4.2. Próżniowa wyparka rotacyjna.

4.3. Kolumna szklana (250 mm x 15 mm) z kranem i zbiornikiem o pojemności około 200 ml.

4.4. Sprzęt 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 w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona zarówno metylobenzoquatu, jak i substancji interferujących.

5.1.2. Przeprowadzić badanie odzysku, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości metylobenzoquatu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby fortyfikować na poziomie 15 mg/kg, dodać 600 µl wzorcowego roztworu podstawowego, o którym mowa w ust. 3.7.1, do 20 g ślepej próby paszy, zmieszać i odczekać 10 minut do rozpoczęcia ekstrakcji, o której mowa w ust. 5.2.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności metylobenzoquatu.

5.2. Ekstrakcja.

Odważyć około 20 g przygotowanej próby z dokładnością do 0,01 g i umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać 100,0 ml roztworu kwasu metanosulfonowego, o którym mowa w ust. 3.4, i wstrząsać mechanicznie przy zastosowaniu wstrząsarki, o której mowa w ust. 4.1, przez 30 minut. Roztwór filtrować przez filtr z bibuły i zachować filtrat do rozdziału w układzie ciecz – ciecz, o którym mowa w ust. 5.3.

5.3. Rozdział w układzie ciecz – ciecz.

Do rozdzielacza o pojemności 500 ml zawierającego 100 ml roztworu kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.5, wprowadzić 25 ml otrzymanego wcześniej filtratu, o którym mowa w ust. 5.2. Dodać do rozdzielacza 100 ml dwuchlorometanu, o którym mowa w ust. 3.1, i wstrząsać przez minutę. Pozostawić do rozdzielenia się warstw, a następnie dolną warstwę (dwuchlorometanową) spuścić do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję fazy wodnej, dodając dwie następne porcje 40 ml dwuchlorometanu i połączyć je z pierwszym ekstraktem w kolbie okrągłodennej. Odparować ekstrakt dwuchlorometanu do sucha na próżniowej wyparce rotacyjnej, o której mowa w ust. 4.2, przy zmniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C. Pozostałość rozpuścić w od 20 do 25 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, zamknąć kolbę i zachować całość ekstraktu do chromatografii jonowymiennej, o której mowa w ust. 5.4.

5.4. Chromatografia jonowymienna.

5.4.1. Przygotowanie kolumny kationowowymiennej.

Dolny koniec kolumny, o której mowa w ust. 4.3, zatkać zwitkiem waty szklanej. Przygotować zawiesinę 5 g żywicy kationowowymiennej, o której mowa w ust. 3.6, i 50 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.5. Włączyć ją do kolumny i pozostawić do ustabilizowania się. Zlać nadmiar kwasu znad powierzchni żywicy i przemywać kolumnę wodą do obojętnego odczynu wycieku wobec lakmusu. Przenieść 50 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, do kolumny i pozwolić, aby przesączył się do powierzchni żywicy.

5.4.2. Chromatografia kolumnowa.

Filtrat uzyskany w sposób, o którym mowa w ust. 5.3, przenieść ostrożnie pipetą do kolumny. Kolbę okrągłodenną przemyć dwoma porcjami od 5 do 10 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, a następnie roztwór z przemycia nanieść na kolumnę. Poczekać, aż ekstrakt dojdzie do powierzchni żywicy, następnie przemyć kolumnę 50 ml metanolu, zapewniając, że szybkość wzbierania ekstraktu nie jest większa niż 5 ml na minutę. Wyciek odrzucić. Metylobenzoquat wymyć z kolumny przy użyciu 150 ml roztworu kwasu metanosulfonowego, o którym mowa w ust. 3.4, i zebrać eluat w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml.

5.5. Rozdział w układzie ciecz – ciecz.

Eluat otrzymany w sposób określony w ust. 5.4.2 przenieść do rozdzielacza o pojemności 1 litra. Przemyć kolbę stożkową od 5 do 10 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, i roztwór po przemyciu dołączyć do zawartości rozdzielacza. Dodać 300 ml roztworu kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.5, i 130 ml dwuchlorometanu, o którym mowa w ust. 3.1. Wstrząsać przez minutę i pozostawić do rozdzielenia faz. Dolną warstwę (dwuchlorometan) przenieść do kolby okrągłodennej o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję fazy wodnej następnymi dwoma porcjami 70 ml dwuchlorometanu i ekstrakt dołączyć do zawartości pierwszej kolby okrągłodennej.

Ekstrakt dwuchlorometanu odparować do sucha na próżniowej wyparce rotacyjnej, o której mowa w ust. 4.2, przy zmniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C. Pozostałość rozpuścić w kolbie zawierającej około 5 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, i roztwór przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Przemyć 2 razy kolbę okrągłodenną następnymi dwoma porcjami 1 do 2 ml metanolu, a następnie przenieść do kolby miarowej. Uzpełnić metanolem do pełnej objętości kolby i zmieszać. Podzielna część jest filtrowana przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.6. Roztwór zachować do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.6.

5.6. Oznaczanie HPLC.

5.6.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa w ust. 4.4.1:

300 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne

Faza ruchoma do HPLC:

mieszanina, w stosunku 75 + 25 (V+V): metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, i wody do HPLC

Szybkość przepływu:

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 kilkakrotnie roztwór wzorcowy do kalibracji, o którym mowa w ust. 3.7.3, zawierający 4 µg/ml, aż do ustalenia stałych wysokości (powierzchni) pików i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.6.2. Krzywa kalibracyjna.

Zadocować kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 3.7.3, i określić wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych oraz odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.6.3. Badany roztwór próbki.

Zadocować kilka razy ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.5, stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i wyznaczyć średnią wysokość (powierzchnię) pików metylobenzoquatu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików metylobenzoquatu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.6.2.

Zawartość metylobenzoquatu w mg/kg w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

gdzie:

c – stężenie w µg/ml metylobenzoquatu w roztworze próbki,

m – masa w g badanej próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzanie tożsamości.

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.7.3, zawierającego 10 µg/ml metylobenzoquatu.

7.1.1. Kochromatografia.

Ekstrakt próbki jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości pośredniego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.7.2. Ilość dodanego metylobenzoquatu powinna być podobna do ilości metylobenzoquatu w ekstrakcie próbki.

Powinna zwiększyć się tylko wysokość pików metylobenzoquatu, po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości nie powinna przekraczać około 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa.

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

1) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji; w przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm;

2) w zakresie pomiędzy 220 a 350 nm próbki i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorcowego analitu;

3) w zakresie od 220 do 350 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie powinny różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

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

7.2. Powtarzalność.

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10 % względem wyższego wyniku dla zawartości metylobenzoquatu od 4 do 20 mg/kg.

7.3. Odzysk.

W przypadku fortyfikowanej ślepej próby odzysk nie powinien być mniejszy niż 90 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy dziesięciu laboratoriów przeprowadzono analizę pięciu próbek. Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. W tabeli 22 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 22. Wyniki badań porównawczych

	Ślepa próba	Mączka 1	Granulat 1	Mączka 2	Granulat 2
Średnia [mg/kg]	n.w.	4,50	4,50	8,90	8,70
s_r [mg/kg]	-	0,30	0,20	0,60	0,50
CV_r [%]	-	6,70	4,40	6,70	5,70
s_R [mg/kg]	-	0,40	0,50	0,90	1,0
CV_R [%]	-	8,90	11,10	10,10	11,50
Odzysk [%]	-	92,00	93,00	92,00	89,00

n.w. – nie wykryto; s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

7.2. OZNACZANIE HALOFUGINONU

(dl-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetylo]-chinazolinu-4-(3H)-1 bromowoderek)

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Acetonitryl do HPLC.

3.2. Żywica Amberlite XAD-2.

3.3. Octan amonu.

3.4. Octan etylu.

3.5. Lodowaty kwas octowy.

3.6. Substancja wzorcowa halofuginonu (dl-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetylo]-chinazolinu-4-(3H)-1 bromowoderek, E 764).

3.6.1. Roztwór wzorcowy podstawowy halofuginonu, 100 µg/ml:

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg halofuginonu, o którym mowa w ust. 3.6, do kolby miarowej o pojemności 500 ml, rozpuścić w roztworze buforu octanu amonu, o którym mowa w ust. 3.18, uzupełnić do pełnej objętości kolby roztworem buforu i zmieszać. Roztwór jest stabilny przez 3 tygodnie, jeżeli jest przechowywany bez dostępu światła w temperaturze 5 °C.

3.6.2. Roztwory kalibracyjne.

Do partii kolb miarowych o pojemności 100 ml przenieść kolejno 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, i 6,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego halofuginonu, o którym mowa w ust. 3.6.1. Po uzupełnieniu do pełnej objętości kolb fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.21, zmieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 i 6,0 µg/ml halofuginonu. Roztwory te przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.7. Kwas chlorowodorowy (ρ_{20} = około 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Azotan srebra.

3.10. Askorbinian sodu.

3.11. Węglan sodu.

3.12. Chlorek sodu.

3.13. EDTA (etylenodwuaminoczworoctowy kwas, sól dwusodowa).

3.14. Woda do HPLC.

3.15. Roztwór węglanu sodu, $V = 10$ g/100 ml.

3.16. Roztwór chlorku sodu nasyconego węglanem sodu, $V = 5$ g/100 ml.

Rozpuścić 50 g węglanu sodu, o którym mowa w ust. 3.11, w wodzie, rozcieńczyć do objętości 1 litra i dodać chlorek sodu, o którym mowa w ust. 3.12, aż do otrzymania roztworu nasyconego.

3.17. Kwas chlorowodorowy, stężenie około 0,1 mol/l.

Rozcieńczyć 10 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, wodą do objętości 1 litra.

3.18. Roztwór buforu octanu amonu, około 0,25 mol/l.

Rozpuścić 19,3 g octanu amonu, o którym mowa w ust. 3.3, i 30 ml kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.5, w wodzie, o której mowa w ust. 3.14, i rozcieńczyć do objętości 1 litra.

3.19. Przygotowanie żywicy Amberlit XAD-2.

Żywicę, o której mowa w ust. 3.2, przemywać odpowiednią ilością wody aż do zaniku wszystkich jonów chlorku, co sprawdza się roztworem azotanu srebra, o którym mowa w ust. 3.20, w odrzucanej fazie wodnej. Następnie przemyć żywicę 50 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.8, odrzucić metanol i przechowywać żywicę w świeżym metanolu.

3.20. Roztwór azotanu srebra około 0,1 mol/l.

Rozpuścić 0,17 g azotanu srebra, o którym mowa w ust. 3.9, w 10 ml wody.

3.21. Faza ruchoma do HPLC.

Zmieszać 500 ml acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.1, z 300 ml roztworu buforu octanu amonu, o którym mowa w ust. 3.18, i 1200 ml wody, o której mowa w ust. 3.14. Przy użyciu kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.5, dostosować do pH 4,3. Przelfiltrować przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.8, a następnie odgazować roztwór; do tej czynności proponuje się zastosować łaźnię ultradźwiękową przez 10 minut. Roztwór ten jest stabilny przez miesiąc, jeżeli jest przechowywany bez dostępu światła, w zamkniętym naczyniu.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Łaźnia ultradźwiękowa.

4.2. Rotacyjna wyparka warstewkowa.

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 o wymiarach 300 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne.

4.5. Kolumna szklana o wymiarach 300 mm x 10 mm z kranem i filtrem ze spiekanej szkła.

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 formie wolnej zasady jest niestabilny w roztworach zasadowych i octanu etylowego. Nie powinien pozostawać w octanie etylu dłużej niż 30 minut.

5.1. Wskazówki ogólne.

5.1.1. Ślepą próbę paszy przeanalizować w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona ani halofuginonu, ani innych substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości halofuginonu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 3 mg/kg, dodać 300 ml podstawowego roztworu wzorcowego halofuginonu, o którym mowa w ust. 3.6.1, do 10 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji, o którym mowa w ust. 5.2.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności halofuginonu.

5.2. Ekstrakcja.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 g, 10 g przygotowanej próbki i umieścić w probówce wirówkowej o pojemności 200 ml. Dodać 0,5 g askorbinianu sodu, o którym mowa w ust. 3.10, 0,5 g EDTA, o którym mowa w ust. 3.13, 20 ml wody i zmieszać. Probówkę umieścić na 5 minut w łaźni wodnej o temperaturze 80 °C. Po schłodzeniu do temperatury pokojowej dodać 20 ml roztworu węgla sodu, o którym mowa w ust. 3.15, i zmieszać. Niezwłocznie dodać 100 ml octanu etylowego, o którym mowa w ust. 3.4, i ręcznie energicznie wstrząsać przez 15 sekund. Następnie umieścić probówkę w łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.1, na trzy minuty i odkorkować. Wirować przez 2 minuty i zdekantować fazę octanu etylowego przez filtr, o którym mowa w ust. 4.6, do rozdzielacza o pojemności 500 ml. Powtórzyć ekstrakcję tej próbki drugą porcją 100 ml octanu etylowego. Przemywać połączone ekstrakty przez minutę 50 ml roztworu chlorku sodu nasyconego węglanem sodu, o którym mowa w ust. 3.16, i odrzucić warstwę wodną.

Warstwę organiczną ekstrahować przez minutę 50 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.17. Dolną kwasową warstwę spuścić do rozdzielacza o pojemności 250 ml. Przez 1,5 minuty powtarzać ekstrakcję warstwy organicznej przy użyciu następnej ilości 50 ml kwasu chlorowodorowego i połączyć z ekstraktem uzyskanym z pierwszego procesu. Przemyć połączone ekstrakty kwasu, wirując z 10 ml octanu etylowego, o którym mowa w ust. 3.4, przez około 10 sekund.

Warstwę wodną przenieść ilościowo do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml i odrzucić warstwę organiczną. Znajdujący się jeszcze w roztworze kwasu octan etylowy odparować na rotacyjnej wyparce warstewkowej, o której mowa w ust. 4.2. Temperatura wody w łaźni nie powinna przekraczać 40 °C. W warunkach próżni około 25 milibarów cały pozostały octan etylu zostanie usunięty w czasie 5 minut w temperaturze 38 °C.

5.3. Oczyszczanie.

5.3.1. Przygotowanie kolumny z Amberlitem.

Dla każdej próbki ekstraktu przygotować kolumnę XAD-2. Przygotowany Amberlit o masie 10 g, o którym mowa w ust. 3.19, umieścić w szklanej kolumnie, o której mowa w ust. 4.5, z metanolem, o którym mowa w ust. 3.8. Wprowadzić mały zwitek waty szklanej w górną część podłoża żywicy. Wydrenować metanol z kolumny, a następnie przemyć żywicę 100 ml wody, zatrzymując proces w momencie, gdy ciecz dotrze do górnej części powierzchni żywicy. Pozostawić kolumnę do ustabilizowania się na 10 minut przed użyciem. Nie dopuścić do osuszenia kolumny.

5.3.2. Oczyszczanie próbki.

Ekstrakt uzyskany w sposób określony w ust. 5.2 przenieść ilościowo na górną powierzchnię kolumny z Amberlitem przygotowanej w sposób określony w ust. 5.3.1 i eluować, odrzucając eluat. Szybkość elucji nie powinna przekraczać

20 ml/min. Przemycić kolumnę okrągłodenną 20 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.17. Użyć tego kwasu do przemycenia kolumny z żywicą. Usunąć wszystkie pozostałości roztworu kwasu strumieniem powietrza. Wylać popłuczyny. Dodać 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.8, na kolumnę i pozostawić od 5 do 10 ml w celu wymycia, zebrać eluat do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml. Pozostawić pozostały metanol na 10 minut w celu ustabilizowania z żywicą, a następnie kontynuować elucję, której szybkość nie powinna przekraczać 20 ml/min, zbierając eluat do tej samej kolby okrągłodennej. Odparować metanol na rotacyjnej wyparce, o której mowa w ust. 4.2, przy czym temperatura wody w łaźni nie powinna być wyższa niż 40 °C. Za pomocą fazy ruchomej, o której mowa w ust. 3.21, przenieść ilościowo pozostałość do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Uzupełnić do pełnej objętości kolby fazą ruchomą i zmieszać. Podzielna część jest filtrowana przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.7. Roztwór zastosować do oznaczania HPLC, o której mowa w ust. 5.4.

5.4. Oznaczanie HPLC.

5.4.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa w ust. 4.4.1	300 mm x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma do HPLC, o której mowa w ust. 3.21:	Zmieszać 500 ml acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.1, z 300 ml buforowego octanu amonu, o którym mowa w ust. 3.18, i 1200 ml wody. Przy użyciu kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.5, dostosować pH do 4,3. Filtrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.8, a następnie odgazować roztwór; do tej czynności proponuje się zastosować łaźnię ultradźwiękową przez 10 minut.
Szybkość przepływu:	od 1,5 do 2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	243 nm
Dozowana objętość	od 40 do 100 µl

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

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna.

Zadawać kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 3.6.2, i określić wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki.

Zadawać kilka razy ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.3.2, stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików halofuginonu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików halofuginonu roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.4.2.

Zawartość halofuginonu w mg/kg w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = c \times 10/m$$

gdzie:

c – stężenie w µg/ml halofuginonu w roztworze próbki odczytane z wykresu kalibracyjnego,

m – masa w g odważki próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzanie tożsamości.

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.6.2, zawierającego 6 µg/ml halofuginonu.

7.1.1. Kochromatografia.

Ekstrakt próbki jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.6.2. Ilość dodanego halofuginonu powinna być podobna do tej w ekstrakcie próbki. Powinna zwiększyć się tylko wysokość pików halofuginonu, po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa.

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

1) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji; w przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm;

2) w zakresie pomiędzy 225 a 300 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % lub względnej absorpcji; kryterium uważa się za

spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorbancji wzorcowego analitu;

3) w zakresie od 225 do 300 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie powinny różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorbancji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

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

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.

W przypadku fortyfikowanej ślepej próby odzysk nie powinien być mniejszy niż 80 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy ośmiu laboratoriów przeprowadzono analizę⁵⁾ trzech próbek. W tabeli 23 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 23. Wyniki badań porównawczych

	Próbka A (ślepa) przy odbiorze	Próbka B (mączka)		Próbka C (granulki)	
		przy odbiorze	po dwóch miesiącach	przy odbiorze	po dwóch miesiącach
Średnia [mg/kg]	n.w.	2,80	2,42	2,89	2,45
s_R [mg/kg]	-	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R [%]	-	16	18	14	17
rec. [%]	-	86	74	88	75

n.w. – nie wykryto; s_R – odchylenie standardowe powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności; rec. – odzysk

7.3. OZNACZANIE ROBENIDYNY

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

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości robenidyny w paszach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 5 mg/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbkę poddaje się ekstrakcji zakwaszonym metanolem. Ekstrakt osusza się, a podzielną część oczyszcza na kolumnie z tlenkiem glinu. Robenidynę z kolumny wymywa się metanolem, zatęcza i uzupełnia do odpowiedniej objętości fazą ruchomą. Robenidynę oznacza się metodą chromatografii cieczowej (HPLC) z odwróconymi fazami 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 pełnej objętości kolby metanolem, o którym mowa w ust. 3.1, i mieszać. Roztwór przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

3.3. Acetonitryl 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 potasu, $c = 0,25$ mol/l:

3,40 g dwuwodorofosforanu potasu rozpuścić w wodzie w kolbie miarowej o pojemności 1 litra, uzupełnić do pełnej objętości kolby i mieszać.

3.7. Wodorofosforan dwusodu, $c = 0,025$ mol/l:

3,55 g bezwodnego lub 4,45 g dwuhydratu, lub 8,95 g dekahydratu wodorofosforanu dwusodu rozpuścić w wodzie do HPLC w kolbie miarowej o pojemności 1 litra, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą do HPLC i mieszać.

3.8. Faza ruchoma do HPLC.

Zmieszać razem: 650 ml acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.3, 250 ml wody do HPLC, 50 ml roztworu dwuwodorofosforanu potasu, o którym mowa w ust. 3.6, 50 ml roztworu wodorofosforanu dwusodu, o którym mowa w ust. 3.7. Filtrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.6, i odgazować roztwór; proponuje się zastosować ultradźwięki przez 10 minut.

3.9. Substancja wzorcowa.

Czysta robenidyna: chlorowodorek 1,3-bis[(4-chlorobenzylideno)amino]chlorowodoru guanidyny, E 750.

⁵⁾ *The Analyst*, nr 108 z 1983 r., str. 1252–1256.

3.9.1. Roztwór wzorcowy podstawowy robenidyny: 300 µg/ml:

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 30 mg substancji wzorcowej robenidyny, o której mowa w ust. 3.9. Rozpuścić w zakwaszonym metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby tym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.2. Roztwór wzorcowy pośredni robenidyny: 12 µg/ml.

10 ml podstawowego roztworu wzorcowego robenidyny, o którym mowa w ust. 3.9.1, przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.8, i zmieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową i przechowywać w ciemnym miejscu.

3.9.3. Roztwory kalibracyjne.

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść kolejno 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 i 25,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego robenidyny, o którym mowa w ust. 3.9.2. Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.8, i zmieszać. Roztworom tym odpowiada kolejno 1,2, 2,4, 3,6, 4,8, 6,0 µg/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, średnicy wewnętrznej od 10 do 15 mm i długości 250 mm.

4.2. Wstrząsarka laboratoryjna.

4.3. Rotacyjna wyparka warstwowa.

4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem UV lub diodowym pracującym w zakresie 250 do 400 nm.

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 300 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne.

4.5. Filtr szklany (Whatman GF/A lub podobny).

4.6. Filtry membranowe, 0,22 µm.

4.7. Filtry membranowe, 0,45 µm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Z uwagi na fakt, że robenidyna jest wrażliwa na światło, zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane bez dostępu światła, z zastosowaniem szkła oranżowego.

5.1. Wskazówki ogólne.

5.1.1. Ślepa próba paszy powinna być przebadana w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona ani robenidyny, ani innych substancji interferujących.

5.1.2. Przeprowadzić badanie odzysku, analizując ślepa próbę paszy, o której mowa w ust. 5.1.1, fortyfikowanej przez dodanie znanej ilości robenidyny, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby fortyfikować na poziomie 60 mg/kg, przenieść 3,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego robenidyny, o którym mowa w ust. 3.9.1, do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Odparować roztwór w strumieniu azotu do około 0,5 ml. Dodać 15 g ślepej próby paszy, starannie zmieszać i pozostawić na 10 minut przed przejściem do etapu ekstrakcji o którym mowa w ust. 5.2.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności robenidyny.

5.2. Ekstrakcja.

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, 15 g wcześniej przygotowanej próbki. Odważkę umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml i dodać 100,0 ml zakwaszonego metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, zakorkować i wstrząsać przez godzinę na wytrząsarce, o której mowa w ust. 4.2. Roztwór ten filtrować przez filtr szklany, o którym mowa w ust. 4.5, a filtrat zebrać do kolby stożkowej o pojemności 150 ml. Dodać 7,5 g sita molekularnego, o którym mowa w ust. 3.4, zamknąć i wstrząsać przez 5 minut. Natychmiast filtrować przez filtr szklany. Roztwór poddać oczyszczaniu w sposób określony w ust. 5.3.

5.3. Oczyszczanie.

5.3.1. Przygotowanie kolumny z tlenkiem glinu.

Umieścić w dolnym końcu szklanej kolumny chromatograficznej, o której mowa w ust. 4.1, zwitek waty szklanej i wbić go, używając szklanego pręcika. Odważyć 11,0 g tlenku glinu, o którym mowa w ust. 3.5, i przenieść go do kolumny. Zwrócić uwagę, aby w czasie wykonywania tej czynności zminimalizować narażenie na działanie powietrza atmosferycznego. Delikatnie postukać napełnioną kolumnę od dolnej strony w celu osadzenia tlenku glinu.

5.3.2. Oczyszczanie próbki.

Używając pipety, przenieść do kolumny 5 ml ekstraktu próbki otrzymanego w sposób określony w ust. 5.2. Zakończenie pipety przyłożyć blisko do ścianki kolumny i pozwolić, aby roztwór został wchłonięty przez tlenek glinu. Wymyć robenidynę z kolumny przy użyciu 100 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.1, przy szybkości przepływu od 2 do 3 ml na minutę, a eluat zebrać do kolby okrągłodennej o pojemności 250 ml. Na rotacyjnej wyparce, o której mowa w ust. 4.3, odparować roztwór metanolu do sucha, przy pomniejszonym ciśnieniu w temperaturze 40 °C. Pozostałość ponownie rozpuścić w od 3 do 4 ml fazy ruchomej, o której mowa w ust. 3.8, i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 10 ml. Kolbę przemyć kilkakrotnie 1 do 2 ml porcjami fazy ruchomej, a popłuczyny wlać do kolby miarowej. Uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Podzielna część jest filtrowana przez filtr, o którym mowa w ust. 4.7. Roztwór zastosować do oznaczania HPLC, o której mowa w ust. 5.4.

5.4. Oznaczanie HPLC.

5.4.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa w ust. 4.4.1:

300 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne

Faza ruchoma do HPLC, o której mowa w ust. 3.8:

Zmieszać: 650 ml acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.3, 250 ml wody czystej do HPLC, 50 ml roztworu dwuwodorofosforanu potasu, o którym mowa w ust. 3.6, 50 ml roztworu wodorofosforanu dwusodu, o którym mowa w ust. 3.7. Filtrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.6, i odgazować roztwór; proponuje się zastosować ultradźwięki przez 10 minut.

Szybkość przepływu:

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 którym mowa w ust. 3.9.3, zawierający 3,6 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości pików i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna.

Zadocować kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 3.9.3, i określić wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki.

Zadocować kilka razy ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.3.2, stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików dla pików robenidyny.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików robenidyny roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w µg/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.4.2.

Zawartość robenidyny (w mg/kg) w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{c \times 200}{m}$$

gdzie:

c – stężenie w µg/ml robenidyny w roztworze próbki odczytane z wykresu,

m – masa w g badanej próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzanie tożsamości.

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.9.3, zawierającego 6 µg/ml robenidyny.

7.1.1. Kochromatografia.

Ekstrakt próbki jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.9.3. Ilość dodanej robenidyny powinna być porównywalna do ilości robenidyny w ekstrakcie próbki. Powinna zwiększyć się tylko wysokość pików robenidyny, po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach ± 10 % pierwotnej szerokości.

7.1.2. Detekcja diodowa.

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

- 1) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji; w przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach 2 nm;
- 2) w zakresie pomiędzy 250 a 400 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorcowego analitu;
- 3) w zakresie od 250 do 400 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie powinny różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

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

W przypadku fortyfikowanej ślepej próby paszy odzysk powinien być nie mniejszy niż 85 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy 12 laboratoriów przeprowadzono analizę czterech próbek paszy dla drobiu i królików w postaci mączki lub granulatu. Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. W tabeli 24 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 24. Wyniki badań porównawczych

	Pasza dla drobiu		Pasza dla królików	
	mączka	granulat	mączka	granulat
Średnia [mg/kg]	27,00	27,99	43,6	40,1
s_r [mg/kg]	1,46	1,26	1,44	1,66
CV _r [%]	5,4	4,5	3,3	4,1
s_R [mg/kg]	4,36	3,36	4,61	3,91
CV _R [%]	16,1	12,0	10,6	9,7
Odzysk [%]	90,0	93,3	87,2	80,2

s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

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 STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości amprolium w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 1 mg/kg, granica oznaczalności wynosi 25 mg/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest ekstrahowana mieszaniną metanolu i wody. Po rozcieńczeniu fazą ruchomą i filtrowaniu przez filtr membranowy zawartość amprolium jest oznaczana metodą kationowowymienną wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC przy wykorzystaniu detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Metanol.

3.2. Acetonitryl do HPLC.

3.3. Woda do HPLC.

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

Rozpuścić 13,80 g monohydratu dwuwodorofosforanu sodu w wodzie, o której mowa w ust. 3.3, w kolbie miarowej o pojemności 1 litra, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i zmieszać.

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

Rozpuścić 224,74 g monohydratu nadchloranu sodu w wodzie, o której mowa w ust. 3.3, w kolbie miarowej o pojemności 1 litra, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i zmieszać.

3.6. Faza ruchoma do HPLC, przy uwzględnieniu ust. 9.1.

Mieszanina, w stosunku 450 + 450 + 100 (V + V + V): acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.2, roztworu dwuwodorofosforanu sodu, o którym mowa w ust. 3.4, oraz roztworu nadchloranu sodu, o którym mowa w ust. 3.5. Przed użyciem przefiltrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.3, i odgazować roztwór; do tej czynności proponuje się zastosować łaźnię ultradźwiękową co najmniej przez 15 minut.

3.7. Substancja wzorcowa:

Czyste amprolium, chlorowodorek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidyno-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny, E 750, przy uwzględnieniu ust. 9.2.

3.7.1. Roztwór wzorcowy podstawowy amprolium, 500 µg/ml.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg amprolium, o którym mowa w ust. 3.7, do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w 80 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.1, i umieścić kolbę na 10 minut w łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.4. Następnie doprowadzić roztwór do temperatury pokojowej, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i zmieszać. Roztwór przechowywany w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do miesiąca.

3.7.2. Pośredni wzorcowy roztwór amprolium, 50 µg/ml.

Przenieść pipetą 5 ml roztworu wzorcowego podstawowego, o którym mowa w ust. 3.7.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby roztworem do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 3.8, i zmieszać. Roztwór przechowywany w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do miesiąca.

3.7.3. Roztwory kalibracyjne.

Przenieść 0,5, 1,0, i 2,0 ml pośredniego wzorcowego roztworu, o którym mowa w ust. 3.7.2, do partii kolb miarowych o pojemności 50 ml. Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.6, i zmieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 0,5, 1,0 i 2,0 µg/ml amprolium. Roztwory sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

3.8. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny.

Mieszanina metanolu, o którym mowa w ust. 3.1, i wody w stosunku 2 + 1 (V + V).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Zestaw do HPLC z dozownikiem umożliwiającym dozowanie 100 µl cieczy.

4.1.1. Kolumna do chromatografii cieczerwowej o wymiarach 125 mm x 4 mm, z Nucleosil 10 SA, wypełnienie 10 µm lub równoważne.

4.1.2. Detektor UV z regulacją długości fal lub detektor diodowy.

4.2. Filtr membranowy, PTFE, 0,45 µm.

4.3. Filtr 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. Ślepa próba paszy.

W celu zbadania odzysku, o którym mowa w ust. 5.1.2, przeprowadzić analizę ślepej próby paszy, aby sprawdzić, że nie zawiera ona ani amprolium, ani substancji interferujących.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności amprolium i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku.

Badanie odzysku przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości amprolium, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Aby fortyfikować na poziomie 100 mg/kg, dodać 10,0 ml roztworu wzorcowego podstawowego, o którym mowa w ust. 3.7.1, do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do objętości około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut, mieszając kilkakrotnie przed przejściem do etapu ekstrakcji, o którym mowa w ust. 5.2.

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy podobnej do badanej próbki, o której mowa w ust. 5.1.1, badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest fortyfikowana przez dodanie znanej ilości amprolium, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od masy próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. Ekstrakcja.

5.2.1. Premiksy o zawartości 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 i dodać 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, o którym mowa w ust. 3.8. Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez godzinę na wstrząsarce lub mieszadle magnetycznym, o których mowa w ust. 4.5. Rozcieńczyć podzielną część ekstraktu fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.6, do zawartości amprolium od 0,5 do 2 µg/ml i zmieszać przy uwzględnieniu ust. 9.3. Przetłoczyć od 5 do 10 ml tego rozcieńczonego roztworu przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.2. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.3.

5.2.2. Premiksy o zawartości od 1 % 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 rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, o którym mowa w ust. 3.8. Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.4, na 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez godzinę na wstrząsarce lub mieszadle magnetycznym, o których mowa w ust. 4.5. Rozcieńczyć podzielną część ekstraktu fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.6, do zawartości amprolium od 0,5 do 2 µg/ml i zmieszać. Przetłoczyć od 5 do 10 ml tego rozcieńczonego roztworu przez filtr, o którym mowa w ust. 4.2. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.3.

5.3. Oznaczanie HPLC.

5.3.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczerwowej, o której mowa w ust. 4.1.1: 125 mm x 4 mm, wymienny kation Nucleosil 10 SA, wypełnienie 10 µm lub równoważne

Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.6: Mieszanina: w stosunku 450 + 450 + 100 (V + V + V): acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.2, roztworu dwuwodorofosforanu sodu, o którym mowa w ust. 3.4, i roztworu nadchloranu sodu, o którym mowa w ust. 3.5

Szybkość przepływu: 0,7 – 1 ml/min

Długość fali przy detekcji: 264 nm

Dozowana objętość: 100 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny, o którym mowa w ust. 3.7.3, zawierający 1,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości pików i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna.

Zadawać kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 3.7.3, i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików kalibracyjnych roztworów na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki.

Zadocować kilka razy ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.2, stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików dla pików amprolium.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików amprolium roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w $\mu\text{g/ml}$, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.3.2.

Zawartość amprolium w mg/kg próbki obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{V \times \delta \times f}{m}$$

gdzie:

V – objętość w ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, o którym mowa w ust. 3.8; zgodnie z ust. 5.2 proponuje się zastosować 200 ml,

δ – stężenie w $\mu\text{g/ml}$ amprolium w ekstrakcie próbki, o którym mowa w ust. 5.2,

f – współczynnik rozcieńczania zgodny z ust. 5.2,

m – masa w g próbki.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości.

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki, o którym mowa w ust. 5.2, i roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.7.3, zawierającego 2,0 $\mu\text{g/ml}$ amprolium.

7.1.1. Kochromatografia.

Ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.2, fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.7.3. Ilość dodanego amprolium powinna odpowiadać ilości amprolium znajdującego się w ekstrakcie próbki.

Powinno zwiększyć się tylko wysokość pików amprolium, po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach $\pm 10\%$ pierwotnej szerokości pików amprolium niefortyfikowanego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa.

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

- 1) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji; w przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach $\pm 2\text{ nm}$;
- 2) w zakresie pomiędzy 210 a 320 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorcowego analitu;
- 3) w zakresie od 210 do 320 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie powinny różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

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

7.2. Powtarzalność.

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

- 1) 15 % względem wyższej wartości dla zawartości amprolium od 25 do 500 mg/kg ,
- 2) 0,75 mg/kg dla zawartości amprolium powyżej 500 do 1000 mg/kg ,
- 3) 7,5 % względem wyższej wartości dla zawartości amprolium powyżej 1000 mg/kg .

7.3. Odzysk.

W przypadku fortyfikacji (ślepej) próby paszy odzysk powinien wynosić co najmniej 90 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy kilku laboratoriów przeprowadzono analizę trzech pasz dla drobiu (próbki 1–3), paszy mineralnej (próbka 4) i premiksu (próbka 5). W tabeli 25 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 25. Wyniki badań porównawczych

	Próbka 1 (ślepa)	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Średnia [mg/kg]	-	45,5	188	5 129	25 140
s_r [mg/kg]	-	2,26	3,57	178	550
CV_r [%]	-	4,95	1,90	3,46	2,20
s_R [mg/kg]	-	2,95	11,8	266	760
CV_R [%]	-	6,47	6,27	5,19	3,00
Zawartość nominalna [mg/kg]	-	50	200	5 000	25 000

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych oznaczeń; s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

9. OBJAŚNIENIA

9.1. Jeżeli próbka zawiera tiaminę, pik tiaminy na chromatogramie ukazuje się na krótko przed pikiem amprolium. W tej metodzie amprolium i tiamina powinny być rozdzielone. Jeżeli amprolium i tiamina nie zostaną rozdzielone w kolumnie, o której mowa w ust. 4.1.1, użytej w tej metodzie, zastąpić do 50 % acetonitrylu fazy ruchomej, o której mowa w ust. 3.6, metanolem.

9.2. Widmo roztworu amprolium: ($c = 0,02$ mol/l) w kwasie chlorowodorowym ($c = 0,1$ mol/l) wykazuje maksima przy 246 nm i 262 nm. Absorbancja powinna wynieść 0,84 przy 246 nm i 0,80 przy 262 nm.

9.3. Ekstrakt zawsze rozcieńczyć 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-dioksa-1,2,4-triazyno-2-yl)fenylo]acetonitryl)

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości diklazurilu w paszach i premiksach. Granica wykrywalności wynosi 0,1 mg/kg, granica oznaczalności 0,5 mg/kg.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Po dodaniu wzorca wewnętrznego próbka jest ekstrahowana zakwaszonym metanolem. W przypadku pasz podzielna część ekstraktu zostaje oczyszczona na wypełnieniu ekstrakcyjnym fazy stałej. Diklazuril jest eluowany z wypełnienia mieszaniną zakwaszonego metanolu i wody. Po odparowaniu pozostałość jest rozpuszczana w DMF/woda. W przypadku premiksów ekstrakt jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana w DMF/woda. Zawartość diklazurilu jest oznaczana w układzie podwójnego gradientu faz odwróconych wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Woda do HPLC.

3.2. Octan amonu.

3.3. Kwaśny siarczan tetrabutylamonowy (TBHS).

3.4. Acetonitryl do HPLC.

3.5. Metanol do HPLC.

3.6. N,N-dwumetyloformamid (DMF).

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

3.8. Substancja wzorcowa: diklazuril II-24 (+)-4-chlorofenylo[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2-yl)fenylo]acetonitryl o gwarantowanej czystości, E 771.

3.8.1. Roztwór wzorcowy podstawowy diklazurilu, 500 $\mu\text{g/ml}$.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej diklazurilu, o której mowa w ust. 3.8, do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF, o którym mowa w ust. 3.6, uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym DMF i mieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4 °C roztwór jest stabilny przez miesiąc.

3.8.2. Roztwór wzorcowy diklazurilu, 50 $\mu\text{g/ml}$.

Przenieść 5,00 ml roztworu wzorcowego podstawowego, o którym mowa w ust. 3.8.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF, o którym mowa w ust. 3.6, i mieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4 °C roztwór jest stabilny przez miesiąc.

3.9. Substancja wzorcowa wewnętrzna: 2,6-dwuchloro- α -(4-chlorofenylo)-4-(4,5dihydro-3,5-dioksa-1,2,4-triazyno-2(3H)-yl) α -metylobenzeno-acetonitryl.

3.9.1. Roztwór wewnętrznego wzorca podstawowego, 500 $\mu\text{g/ml}$.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 25 mg substancji wzorcowej wewnętrznej, o której mowa w ust. 3.9, do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić w DMF, o którym mowa w ust. 3.6, uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym DMF i mieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4 °C roztwór jest stabilny przez miesiąc.

3.9.2. Roztwór wzorca wewnętrznego, 50 $\mu\text{g/ml}$.

Przenieść 5,00 ml roztworu wewnętrznego wzorca podstawowego, o którym mowa w ust. 3.9.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby DMF, o którym mowa w ust. 3.6, i mieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4 °C roztwór zachowuje stabilność przez miesiąc.

3.9.3. Roztwór wzorca wewnętrznego dla premiksów, p/1000 mg/ml (p = nominalna zawartość diklazurilu w premiksie w mg/kg).

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, p/10 mg substancji wzorca wewnętrznego do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w DMF, o którym mowa w ust. 3.6, w łaźni ultradźwiękowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym DMF i mieszać. Kolbę owinąć folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. Roztwór przechowywany w temperaturze 4 °C zachowuje stabilność do miesiąca.

3.10. Roztwór kalibracyjny, 2 $\mu\text{g/ml}$.

Odmierzyć pipetą 2,00 ml roztworu wzorcowego diklazurilu, o którym mowa w ust. 3.8.2, i 2,00 ml roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.9.2, do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Dodać 16 ml DMF, o którym mowa w ust. 3.6, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i mieszać. Roztwór ten sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.11. C_{18} , wypełnienie ekstrakcyjne fazy stałej; proponuje się zastosować Bond Elut, rozmiar: 1 cc, masa sorbentu: 100 mg.

3.12. Rozpuszczalnik ekstrakcyjny: zakwaszony metanol.

Odmierzyć pipetą 5,0 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, do 1 litra metanolu, o którym mowa w ust. 3.5, i zmieszać.

3.13. Faza ruchoma do HPLC.

3.13.1. Eluent A: octan amonu – roztwór kwaśnego siarczanu tetrabutylamonu:

Rozpuścić 5 g octanu amonu, o którym mowa w ust. 3.2, i 3,4 g TBHS, o którym mowa w ust. 3.3, w litrze wody, o której mowa w ust. 3.1, i zmieszać.

3.13.2. Eluent B: acetonitryl, o którym mowa w ust. 3.4.

3.13.3. Eluent C: metanol, o którym mowa w ust. 3.5.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wstrząsarka mechaniczna.

4.2. Sprzęt do HPLC przy potrójnym gradiencie.

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 z regulacją długości fali lub detektor diodowy.

4.3. Rotacyjna wyparka próżniowa.

4.4. Filtr membranowy 0,45 μm .

4.5. Rozdzielnik próżni do jednoczesnej próżniowej izolacji.

4.6. Łaźnia ultradźwiękowa.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Wskazówki ogólne.

5.1.1. Ślepa próba paszy.

Przeprowadzić analizę ślepej próby paszy w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona ani diklazurilu, ani substancji interferujących.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności diklazurilu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku.

Badanie odzysku przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy, fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości diklazurilu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 1 mg/kg, dodać 0,1 ml roztworu wzorcowego podstawowego, o którym mowa w ust. 3.8.1, do 50 g ślepej próby paszy, zmieszać i pozostawić na 10 minut, kilkakrotnie mieszając, przed przejściem do etapu ekstrakcji, o którym mowa w ust. 5.2.

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy podobnej do badanej próbki, o której mowa w ust. 5.1.1, badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest fortyfikowana przez dodanie znanej ilości diklazurilu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej w próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od masy próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

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 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.9.2, 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, o którym mowa w ust. 3.12, i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce, o której mowa w ust. 4.1, przez noc. Pozostawić na 10 minut do odstania. Przebrać 20 ml podzielnej części supernatantu do odpowiedniego szklanego naczynia i rozcieńczyć 20 ml wody. Przenieść ten roztwór na wypełnienie ekstrakcyjne, o którym mowa w ust. 3.11, i przepuścić przez to wypełnienie, stosując rozdzielnik próżni, o którym mowa w ust. 4.5. Przepłukać wypełnienie 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, o którym mowa w ust. 3.12, i wody, 65 + 35 (V + V). Odrzucić zebrane frakcje i eluować związki, stosując 25 ml mieszaniny rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, o którym mowa w ust. 3.12, i wody, 80 + 20 (V + V). Odparować tę frakcję do osuszenia przy zastosowaniu rotacyjnej wyparki próżniowej, o której mowa w ust. 4.3, w temperaturze 60 °C. Rozpuścić suchą pozostałość w 1,0 ml DMF, o którym mowa w ust. 3.6, dodać 1,5 ml wody, o której mowa w ust. 3.1, i zmieszać. Przetłoczyć przez filtr, o którym mowa w ust. 4.4. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 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 1,0 ml roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.9.3, 200 ml rozpuszczalnika ekstrakcyjnego, o którym mowa w ust. 3.12, i zamknąć kolbę korkiem. Wstrząsać mieszaninę na wstrząsarce, o której mowa w ust. 4.1, przez noc. Pozostawić na 10 minut do odstania. Przenieść podzielną część 10000/p ml (p = nominalna zawartość diklazurilu w premiksie w mg/kg) supernatantu do kolby okrągłodennej o odpowiedniej pojemności. Odparować do osuszenia, pod obniżonym ciśnieniem, w temperaturze 60 °C, przy użyciu rotacyjnej wyparki próżniowej, o której mowa w ust. 4.3. Ponownie rozpuścić suchą pozostałość w 10,0 ml DMF, o którym mowa w ust. 3.6, dodać 15,0 ml wody, o której mowa w ust. 3.1, i zmieszać. Przystąpić do analizy HPLC, o której mowa w ust. 5.3.

5.3. Oznaczanie HPLC.

5.3.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa w ust. 4.2.1:	100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS wypełnienie 3 µm lub równoważne
Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.13:	Eluent A, o którym mowa w ust. 3.13.1: wodny roztwór octanu amonu i kwaśnego siarczanu tetrabutylamoniowego, Eluent B, o którym mowa w ust. 3.13.2: acetonitryl, Eluent C, o którym mowa w ust. 3.13.3: metanol
Elucja:	– gradient liniowy – warunki początkowe: A + B + C = 60 + 20 + 20 (V + V + V) – po 10 minutach frakcjonowanie przez 30 minut do: A + B + C = 45 + 20 + 35 (V + V + V) Płukać eluentem B przez 10 minut.
Szybkość przepływu:	1,5 – 2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	280 nm
Dozowana objętość:	20 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny, o którym mowa w ust. 3.10, zawierający 2,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości pików i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.3.2. Roztwór kalibracyjny.

Zadozować kilka razy 20 µl roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.10, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików diklazarilu i wewnętrzne wzorcowe pików.

5.3.3. Roztwór próbek.

Zadozować kilka razy 20 µl roztworu próbki, o którym mowa w ust. 5.2.1 lub ust. 5.2.2, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików diklazarilu i wewnętrzne wzorcowe pików.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

6.1. Pasze.

Zawartość diklazarilu w próbce w mg/kg obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{\delta_{d,c} \times 10 \text{ V}}{m}$$

gdzie:

$h_{d,s}$ – wysokość (powierzchnia) pików diklazarilu w roztworze próbki, o którym mowa w ust. 5.2.1,

$h_{i,s}$ – wysokość (powierzchnia) pików wzorca wewnętrznego w roztworze próbki, o którym mowa w ust. 5.2.1,

$h_{d,c}$ – wysokość (powierzchnia) pików diklazarilu w roztworze kalibracyjnym, o którym mowa w ust. 3.10,

$h_{i,c}$ – wysokość (powierzchnia) pików wzorca wewnętrznego w roztworze kalibracyjnym, o którym mowa w ust. 3.10,

$\delta_{d,c}$ – stężenie w µg/ml diklazarilu w roztworze kalibracyjnym, o którym mowa w ust. 3.10,

m – masa w g próbki,

V – objętość ekstraktu próbki zgodna z ust. 5.2.1; proponuje się zastosować 2,5 ml.

6.2. Premiksy.

Zawartość diklazarilu w próbce w mg/kg obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{\delta_{d,c} \times 0,02 \text{ V} \times p}{m}$$

gdzie:

$h_{d,c}$ – wysokość (powierzchnia) pików diklazarilu w roztworze kalibracyjnym, o którym mowa w ust. 3.10,

$h_{i,c}$ – wysokość (powierzchnia) pików wzorca wewnętrznego w roztworze kalibracyjnym, o którym mowa w ust. 3.10,

$h_{d,s}$ – wysokość (powierzchnia) pików diklazarilu w roztworze próbki, o którym mowa w ust. 5.2.2,

$h_{i,s}$ – wysokość (powierzchnia) pików wzorca wewnętrznego w roztworze próbki, o którym mowa w ust. 5.2.2,

$\delta_{d,c}$ – stężenie diklazarilu w roztworze kalibracyjnym, o którym mowa w ust. 3.10,

m – masa w g próbki,

V – objętość ekstraktu próbki zgodna z ust. 5.2.2; proponuje się zastosować 25 ml,

p – nominalna zawartość w mg/kg diklazarilu w premiksie.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Sprawdzenie tożsamości.

Tożsamość analitu może być potwierdzona przez kochromatografię lub zastosowanie detektora diodowego, przy użyciu którego porównuje się widma ekstraktu próbki, o którym mowa w ust. 5.2.1 lub w ust. 5.2.2, i roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.10.

7.1.1. Kochromatografia.

Ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.2.1 lub w ust. 5.2.2, fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.10. Ilość dodanego diklazurolu powinna odpowiadać ilości diklazurolu znajdującej się w ekstrakcie próbki.

Powinno zwiększyć się tylko wysokość pików diklazurolu i pików wzorca wewnętrznego, po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i stopnia rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie jego wysokości powinna mieścić się w granicach $\pm 10\%$ pierwotnej szerokości pików diklazurolu lub pików wzorca wewnętrznego niefortyfikowanego ekstraktu próbki.

7.1.2. Detekcja diodowa.

Wyniki sprawdza się według następujących kryteriów:

1) długość fali odpowiadająca maksymalnej absorpcji próbki i widm wzorcowych zapisana w punkcie wierzchołka pików zarejestrowanego na chromatogramie powinna być taka sama, po uwzględnieniu marginesu określonego zdolnością rozdzielczą systemu detekcji; w przypadku detekcji diodowej zdolność rozdzielcza mieści się zazwyczaj w granicach ± 2 nm; 2) w zakresie pomiędzy 230 a 320 nm próbki i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka pików na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % względnej absorpcji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % absorpcji wzorcowego analitu;

3) w zakresie od 230 do 320 nm widma wartości rosnących, szczytowych i malejących ekstraktu próbki nie powinny różnić się od siebie dla tych części widma w zakresie od 10 do 100 % absorpcji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między dwoma widmami nie jest większa niż 15 % widma wartości szczytowej.

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

7.2. Powtarzalność.

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

- 1) 30 % względem wyższej wartości dla zawartości diklazurolu od 0,5 do 2,5 mg/kg,
- 2) 0,75 mg/kg dla zawartości diklazurolu powyżej 2,5 do 5 mg/kg,
- 3) 15 % względem wyższej wartości dla zawartości diklazurolu powyżej 5 mg/kg.

7.3. Odzysk.

W przypadku fortyfikacji ślepej próby lub próby paszy odzysk powinien wynosić co najmniej 80 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy jedenastu laboratoriów przeprowadzono analizę pięciu próbek. Były to próbki z dwóch premiksów; jeden był wymieszany z głównym składnikiem organicznym (O 100), a drugi z głównym składnikiem nieorganicznym (A 100). Zawartość teoretyczna diklazurolu wynosiła 100 mg/kg. Trzy mieszanki pasz dla drobiu zostały sporządzone przez trzech różnych producentów (NL) (L1/Z1/K1). Teoretyczna zawartość diklazurolu wynosiła 1 mg/kg. Analizę każdej próbki przeprowadzono raz lub dwukrotnie⁶⁾. W tabeli 26 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 26. Wyniki badań porównawczych

	Próbka 1 A 100	Próbka 2 O 100	Próbka 3 L 1	Próbka Z 1	Próbka 5 K 1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Średnia [mg/kg]	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
s_r [mg/kg]	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV _r [%]	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
s_R [mg/kg]	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV _R [%]	7,53	7,38	18,61	0,67	13,65
Zawartość nominalna [mg/kg]	100	100	1	1	1

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych wartości; s_r – odchylenie standardowe powtarzalności; CV_r – współczynnik zmienności powtarzalności; s_R – odchylenie standardowe odtwarzalności; CV_R – współczynnik zmienności odtwarzalności

9. OBJAŚNIENIA

Uprzednio wykazać, że relacja diklazurolu jest liniowa w zakresie mierzonych stężeń.

7.6. OZNACZANIE SOLI SODOWEJ LASALOCIDU METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

(sól sodowa polieterowego monokarboksyłowego kwasu wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*)

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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.

⁶⁾ Bardziej szczegółowe informacje dotyczące tej analizy można znaleźć w *Dzienniku AOAC International*, tom 77, nr 6, 1994, str. 1359–1361.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Sól sodowa lasalocidu jest ekstrahowana z próbki zakwaszonym metanolem i oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (HPLC) przy wykorzystaniu detektora spektrofluorometrycznego.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Dwuwodorofosforan potasu (KH_2PO_4).

3.2. Kwas ortofosforowy, $w = 85\%$.

3.3. Roztwór kwasu ortofosforowego, $\sigma = 20\%$.

Rozcieńczyć 23,5 ml kwasu ortofosforowego, o którym mowa w ust. 3.2, wodą do objętości 100 ml.

3.4. 6-metylo-2-heptyloamina (1,5-dwumetyloheksyloamina), $w = 99\%$.

3.5. Metanol do HPLC.

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

3.7. Roztwór buforu fosforanowego, $c = 0,01$ mol/l.

Rozpuścić 1,36 g KH_2PO_4 , o którym mowa w ust. 3.1, w 500 ml wody, o której mowa w ust. 3.11, dodać 3,5 ml kwasu ortofosforowego, o którym mowa w ust. 3.2, i 10,0 ml 6-metylo-2-heptyloaminy, o której mowa w ust. 3.4. Dostosować pH do 4,0 przy użyciu roztworu kwasu ortofosforowego, o którym mowa w ust. 3.3, i rozcieńczyć wodą, o której mowa w ust. 3.11, do objętości 1 litra.

3.8. Zakwaszony metanol.

Przenieść 5,0 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.6, do kolby miarowej o pojemności 1 litra, uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem, o którym mowa w ust. 3.5, i mieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.9. Faza ruchoma HPLC: mieszanina, w stosunku 5 + 95 (V + V): buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 3.7, i metanolu, o którym mowa w ust. 3.5.

Zmieszać 5 ml roztworu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 3.7, z 95 ml metanolu, o którym mowa w ust. 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 monokarboksylogo kwasu wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1. Podstawowy roztwór wzorcowy soli sodowej lasalocidu, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Zważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg soli sodowej lasalocidu, o której mowa w ust. 3.10, do kolby miarowej o pojemności 100 ml, rozpuścić w zakwaszonym metanolem, o którym mowa w ust. 3.8, uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem i mieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.2. Roztwór wzorcowy pośredni soli sodowej lasalocidu, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Odpipetować 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego soli sodowej lasalocidu, o którym mowa w ust. 3.10.1, do kolby miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby zakwaszonym metanolem, o którym mowa w ust. 3.8, i mieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.3. Roztwory kalibracyjne.

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml roztworu wzorcowego pośredniego, o którym mowa w ust. 3.10.2. Uzupełnić do pełnej objętości kolb zakwaszonym metanolem, o którym mowa w ust. 3.8, i mieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 μg soli sodowej lasalocidu w 1 ml. Roztwory przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.11. Woda 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 chromatografii cieczowej: 125 mm x 4 mm, faza odwrócona C_{18} , wypełnienie 5 μm lub równoważne.

4.3.2. Spektrofluorymetr o zmiennej fali, z możliwością ustawienia czułości – wzbudzenia, emisji.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Objąśnienia.

5.1.1. Ślepa próba.

W celu przeprowadzenia badania odzysku, o którym mowa w ust. 5.1.2, 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 podobna do próbki paszy badanej i nie powinna zawierać ani lasalocidu sodu, ani interferujących substancji.

5.1.2. Badanie odzysku.

Badanie odzysku przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości soli sodowej lasalocidu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w próbce. Aby fortyfikować na poziomie 100 mg/kg, dodać 10,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.10.1, do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i odparować roztwór do objętości około 0,5 ml. Dodać 50 g ślepej próby paszy, mieszać i pozostawić na 10 minut, kilkakrotnie mieszając, przed przejściem do etapu ekstrakcji, o którym mowa w ust. 5.2.

Jeżeli nie można przeprowadzić badania ślepej próby paszy, o której mowa w ust. 5.1.1, która jest podobna do badanej próbki, badanie odzysku można przeprowadzić, stosując metodę dodawania wzorca. W tym przypadku przeznaczona do analizy próbka jest fortyfikowana przez dodanie znanej ilości soli sodowej lasalocidu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Próbkę tę poddaje się analizie wraz z niefortyfikowaną próbką, a odzysk może być obliczony przez odjęcie od masy próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. Ekstrakcja.

5.2.1. Pasze.

Zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 5 g do 10 g próbki do wyposażonej w korek kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać przy użyciu pipety 100 ml zakwaszonego metanolu, o którym mowa w ust. 3.8. Zamknąć luźno korkiem i zamieszać w celu rozproszenia. Umieścić kolbę w łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.1, w temperaturze około 40 °C na

20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Pozostawić kolbę na mniej więcej godzinę, dopóki suspensja nie opadnie, następnie przefiltrować podzielną część przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.2, do odpowiedniego naczynia. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.3.

5.2.2. Premiksy.

Zważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 2 g nierozdrobnionego premiksu do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 100,0 ml zakwaszonego metanolu, o którym mowa w ust. 3.8, i zamieszać w celu rozproszenia. Umieścić kolbę z zawartością w łaźni ultradźwiękowej, o której mowa w ust. 4.1, w temperaturze około 40 °C na 20 minut, następnie wyjąć i schłodzić do temperatury pokojowej. Rozcieńczyć do pełnej objętości kolby zakwaszonym metanolem, o którym mowa w ust. 3.8, i dokładnie zmieszać. Pozostawić kolbę na mniej więcej godzinę, dopóki suspensja nie opadnie, następnie przefiltrować podzielną część przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.2. Rozcieńczyć odpowiednią objętość klarownego filtratu przy użyciu zakwaszonego metanolu, o którym mowa w ust. 3.8, w celu otrzymania finalnego testowego roztworu zawierającego około 4 µg/ml soli sodowej lasalocidu. Przystąpić do oznaczania HPLC, o którym mowa w ust. 5.3.

5.3. Oznaczanie HPLC.

5.3.1. Parametry.

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, o której mowa w ust. 4.3.1:	125 mm x 4 mm, faza odwrócona C ₁₈ , wypełnienie 5 µm lub równoważne
Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.9:	Mieszanka, w stosunku 5 + 95 (V + V): buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 3.7, i metanolu, o którym mowa w ust. 3.5
Szybkość przepływu:	1,2 ml/min
Długość fali przy detekcji:	wzbudzenie: 310 nm, emisja: 419 nm
Dozowana objętość:	20 µl

Sprawdzić stabilność systemu chromatograficznego, dozując kilkakrotnie roztwór kalibracyjny, o którym mowa w ust. 3.10.3, zawierający 4,0 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) pików i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.3.2. Krzywa kalibracyjna.

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

5.3.3. Roztwór próbki.

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.2.1 lub w ust. 5.2.2, stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) pików dla pików soli sodowej lasalocidu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) pików otrzymanej po zadozowaniu roztworu próbki, o którym mowa w ust. 5.3.3, określić stężenie soli sodowej lasalocidu w µg/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego.

6.1. Pasze.

Zawartość soli sodowej lasalocidu w mg/kg w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\beta \times V_1}{m}$$

gdzie:

β – stężenie w µg/ml soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki, o której mowa w ust. 5.2.1,
 V_1 – objętość w ml ekstraktu próbki, o której mowa w ust. 5.2.1; proponuje się zastosować 100 ml,
 m – masa w g próbki.

6.2. Premiksy.

Zawartość soli sodowej lasalocidu w mg/kg w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{\beta \times V_2 \times f}{m}$$

gdzie:

β – stężenie w µg/ml soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki, o której mowa w ust. 5.2.2,
 V_2 – objętość w ml ekstraktu próbki, o której mowa w ust. 5.2.2; proponuje się zastosować 250 ml,
 f – współczynnik rozcieńczenia zgodny z ust. 5.2.2,
 m – masa w g próbki.

7. SPRAWDZENIE WYNIKÓW

7.1. Sprawdzenie tożsamości.

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

7.1.1 Kochromatografia.

Ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.2.1 lub ust. 5.2.2, jest fortyfikowany przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.10.3. Ilość dodanej soli sodowej lasalocidu powinna odpowiadać ilości soli sodowej lasalocidu w ekstrakcie próbki.

Tylko wysokość pików soli sodowej lasalocidu powinna się uwidocznić w stopniu zależnym od ilości dodanej soli sodowej lasalocidu i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość pików w połowie wysokości powinna mieścić się w zakresie $\pm 10\%$ oryginalnej szerokości pików niefortyfikowanego ekstraktu.

7.2. Powtarzalność.

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

- 1) 15 % względem wyższej wartości dla zawartości soli sodowej lasalocidu od 30 do 100 mg/kg,
- 2) 15 mg/kg dla zawartości soli sodowej lasalocidu powyżej 100 do 200 mg/kg,
- 3) 7,5 % względem wyższej wartości dla zawartości soli sodowej lasalocidu powyżej 200 mg/kg.

7.3. Odzysk.

W przypadku fortyfikowanej ślepej próby paszy lub próby paszy odzysk nie powinien być niższy od 80 %. W przypadku fortyfikowanych próbek premiksów odzysk nie powinien być niższy od 90 %.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy dwunastu laboratoriów⁷⁾ przeprowadzono analizę 2 premiksów (próbki 1 i 2) oraz 5 pasz (próbki 3–7). Analizę każdej próbki przeprowadzono dwukrotnie. W tabeli 27 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 27. Wyniki badań porównawczych

	Próbka 1 premiksu dla kurcząt	Próbka 2 premiksu dla indyków	Próbka 3 śruty dla indyków	Próbka 4 granulki dla kurcząt	Próbka 5 pasza dla indyków	Próbka 6 pasza dla drobiu A	Próbka 7 pasza dla drobiu B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Średnia [mg/kg]	5 050	16 200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,6
s_r [mg/kg]	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
CV_r [%]	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
s_R [mg/kg]	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
CV_R [%]	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
Zawartość nominalna [mg/kg]	5 000*	16 000*	80*	105*	120*	50*	35*

L – liczba laboratoriów; n – liczba poszczególnych wyników; s_r – standardowe odchylenie powtarzalności; s_R – standardowe odchylenie odtwarzalności wyników; CV_r – odchylenie standardowe zmienne powtarzalności; CV_R – odchylenie standardowe zmienne odtwarzalności; * zawartość zadeklarowana przez producenta; + pasza przygotowana w laboratorium

ROZDZIAŁ 8**BADANIE SUBSTANCJI I MATERIAŁÓW NIEPOŻĄDANYCH I SZKODLIWYCH****8.1. OZNACZANIE AFLATOKSYNY B₁ METODĄ JEDNOKIERUNKOWEJ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ****1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY**

Metoda służy do oznaczania zawartości aflatoksyny B₁ w materiałach paszowych i paszach. Metody nie można stosować w obecności pulpy cytrusowej. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 0,01 mg/kg (10 ppb).

Jeżeli występują substancje interferujące, konieczne jest powtórzenie oznaczania metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest poddawana ekstrakcji chloroformem. Ekstrakt jest filtrowany, a jego podzielna część poddawana jest oczyszczaniu przy użyciu kolumny chromatograficznej na żelu krzemionkowym. Eluat jest odparowywany, a pozostałość rozpuszczana ponownie w ściśle określonej objętości chloroformu lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu. Podzielna część tego roztworu jest poddawana chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Jakość aflatoksyny B₁ jest oznaczana poprzez naświetlanie chromatogramu promieniami UV, albo wizualnie, albo fluorodensytometrycznie, przez porównanie ze znaną ilością wzorcowej aflatoksyny B₁. Tożsamość aflatoksyny B₁ wyekstrahowanej z paszy powinna być potwierdzona poprzez wskazanie metody.

⁷⁾ The Analyst, nr 120 z 1995 r., str. 2175–2180.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

Wszystkie odczynniki powinny mieć „czystość do analizy”, jeżeli nie zaznaczono inaczej.

- 3.1. Aceton.
- 3.2. Chloroform, stabilizowany 96 % etanolem w ilości od 0,5 do 1,0 % (V/V).
- 3.3. N-heksan.
- 3.4. Metanol.
- 3.5. Eter dwuetylowy bezwodny, wolny od nadftlenków.
- 3.6. Mieszanina benzenu i acetonitrylu: 98/2 (V/V).
- 3.7. Mieszanina chloroformu, o którym mowa w ust. 3.2, i metanolu, o którym mowa w ust. 3.4: 97/3 (V/V).
- 3.8. Żel krzemionkowy do chromatografii kolumnowej, wielkość cząsteczki od 0,05 do 0,20 mm.
- 3.9. Wata bawełniana odtłuszczona chloroformem lub wata szklana.
- 3.10. Siarczan sodu bezwodny, granulowany.
- 3.11. Obojętny gaz; proponuje się zastosować azot.
- 3.12. Kwas chlorowodorowy 1 N.
- 3.13. Kwas siarkowy 50 % (V/V).
- 3.14. Kieselguhr (hyflorupelsel), przemywany kwasem.
- 3.15. Żel krzemionkowy G-HR lub podobny, do TLC.
- 3.16. Roztwór wzorcowy zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B₁ w 1 ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.2, lub mieszanina benzenu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.6, przygotowane i sprawdzone w sposób określony w ust. 7.
- 3.17. Roztwór wzorcowy do testów jakościowych zawierający około 0,1 µg aflatoksyny B₁ i B₂ w ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.2, lub mieszanina benzenu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.6. Stężenia aflatoksyn są przykładowe. Stężenia te powinny być tak dobrane, aby otrzymać taką samą intensywność fluorescencji dla obu aflatoksyn.
- 3.18. Rozpuszczalniki rozwijające:
 - 3.18.1. Chloroform, o którym mowa w ust. 3.2 / aceton, o którym mowa w ust. 3.1: 9/1 (V/V), zbiornik nienasycony.
 - 3.18.2. Eter dwuetylowy, o którym mowa w ust. 3.5 / metanol, o którym mowa w ust. 3.4 / woda: 96/3/1 (V/V/V), zbiornik nienasycony.
 - 3.18.3. Eter dwuetylowy, o którym mowa w ust. 3.5 / metanol, o którym mowa w ust. 3.4 / woda: 94/4,5/1,5 (V/V/V), zbiornik nasycony.
 - 3.18.4. Chloroform, o którym mowa w ust. 3.2 / metanol, o którym mowa w ust. 3.4: 94/6 (V/V), zbiornik nasycony.
 - 3.18.5. Chloroform, o którym mowa w ust. 3.2 / metanol, o którym mowa w ust. 3.4: 97/3 (V/V), zbiornik nasycony.

4. APARATURA I SPRZĘT

- 4.1. Rozdrabniacz.
- 4.2. Wstrząsarka lub mieszadło magnetyczne.
- 4.3. Karbowany filtr papierowy Schleicher i Schull Nr 588 lub podobny, średnica 24 cm.
- 4.4. Kolumna szklana do chromatografii o średnicy wewnętrznej 22 mm, długości 300 mm, z kurkiem PTFE i zbiornikiem o pojemności 250 ml.
- 4.5. Rotacyjna wyparka próżniowa 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. Suspensja przygotowana w następujący sposób zapewnia pokrycie 5 takich płytek:

Umieścić 30 g żelu krzemionkowego, o którym mowa w ust. 3.15, w kolbie stożkowej, dodać 60 ml wody, zamknąć korkiem i wstrząsać przez minutę, nanieść suspensję na płytki, tak aby uzyskać jednolitą warstwę grubości 0,25 mm, pozostawić na powietrzu do wysuszenia, a następnie przechowywać w eksykatorze zawierającym żel krzemionkowy. Przed użyciem aktywować płytki przez przetrzymywanie ich przez godzinę w suszarce o temperaturze 110 °C.

Mogą być stosowane gotowe do użycia płytki, jeżeli dają wyniki podobne do tych uzyskanych na płytkach przygotowanych w wyżej opisany sposób.
- 4.9. Lampa UV o długości fali 360 nm. Intensywność promieniowania powinna umożliwić, z odległości 10 cm, rozróżnienie plamki zawierającej 1 ng aflatoksyny B₁ nałożonej na płytkę TLC.
- 4.10. Probówki miarowe o pojemności 10 ml, z polietylenowymi korkami.
- 4.11. Spektrofotometr UV.
- 4.12. Fluorodensytmetr (do wyboru).

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

- 5.1. Przygotowanie próbki.

Rozdrobnić próbkę tak, aby przechodziła przez oczka sita o średnicy 1 mm, zgodnie z zaleceniami ISO R 565.

Jeżeli próbki zawierają więcej niż 5 % tłuszczów, odtłuszczyć je eterem naftowym o temperaturze wrzenia od 40 do 60 °C, a uzyskane wyniki przedstawić w odniesieniu do masy nieodtłuszczonej próbki.
- 5.2. Ekstrakcja.

Umieścić 50 g rozdrobnionej, homogennej próbki w kolbie stożkowej, o której mowa w ust. 4.6. Dodać 25 g Kieselguhr, o którym mowa w ust. 3.14, 25 ml wody i 250 ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.2. Zamknąć kolbę, wstrząsać lub mieszać przez 30 minut przy użyciu wstrząsarki lub mieszadła magnetycznego, o których mowa w ust. 4.2, i przefiltrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.3. Odrzucić pierwsze 10 ml filtratu, a następnie zebrać 50 ml.
- 5.3. Oczyszczanie na kolumnie.

Umieścić w dolnym końcu szklanej kolumny chromatograficznej, o której mowa w ust. 4.4, zwitek waty bawełnianej lub szklanej, o której mowa w ust. 3.9, napędzić dwie trzecie rurki chloroformem, o którym mowa w ust. 3.2, i dodać 5 g siarczanu sodu, o którym mowa w ust. 3.10.

Sprawdzić, czy górna powierzchnia siarczanu sodu jest płaska, następnie dodać małymi porcjami 10 g żelu krzemionkowego, o którym mowa w ust. 3.8. Lekko mieszać po każdym dodaniu w celu usunięcia pęcherzyków powietrza. Pozostawić na 15 minut, a następnie ostrożnie dodać 15 g siarczanu sodu, o którym mowa w ust. 3.10. Pozwolić, aby poziom cieczy obniżył się do chwili, aż znajdzie się tuż nad warstwą siarczanu sodu.

Zmieszać 50 ml ekstraktu zebranego w sposób określony w ust. 5.2 z 100 ml n-heksanu, o którym mowa w ust. 3.3, i przenieść ilościowo tę mieszaninę na kolumnę. Pozwolić, aby poziom cieczy obniżył się, aż znajdzie się nad warstwą siarczanu sodu. Popłuczyny odrzucić. Następnie dodać 100 ml eteru dwuetylowego, o którym mowa w ust. 3.5, i znowu pozwolić, aby poziom cieczy obniżył się, aż znajdzie się nad warstwą siarczanu sodu. W czasie tych czynności uważać, aby szybkość przepływu wynosiła od 8 do 12 ml na minutę i aby wypełnienie kolumny nie pozostawało suche. Odrzucić wyciek. Następnie wymyć kolumnę przy użyciu 150 ml mieszaniny chloroformu i metanolu, o której mowa w ust. 3.7, i zebrać cały eluat.

Odparować końcowy eluat prawie do sucha w rotacyjnej wyparce próżniowej, o której mowa w ust. 4.5, w temperaturze nie wyższej niż 50 °C w strumieniu obojętnego gazu, o którym mowa w ust. 3.11. Przenieść ilościowo pozostałość, przy użyciu chloroformu, o którym mowa w ust. 3.2, lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.6, do probówki, o której mowa w ust. 4.10. Zatężyć roztwór w strumieniu obojętnego gazu, o którym mowa w ust. 3.11, a następnie uzupełnić do objętości 2 ml chloroformem, o którym mowa w ust. 3.2, lub mieszaniną benzenu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.6.

5.4. Chromatografia cienkowarstwowa.

Nanieść na płytkę TLC, o której mowa w ust. 4.8, w odległości 2 cm od dolnej krawędzi w odstępach co 2 cm, wskazane poniżej objętości roztworu wzorcowego i ekstraktu:

- 1) 10, 15, 20, 30 i 40 µl roztworu wzorcowego aflatoksyny B₁, o którym mowa w ust. 3.16;
- 2) 10 µl ekstraktu otrzymanego w sposób określony w ust. 5.3 i, nałożonego w tym samym punkcie, 20 µl roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.16;
- 3) 10 i 20 µl ekstraktu otrzymanego w sposób określony w ust. 5.3.

Rozwinąć chromatogram w ciemności, stosując jeden z rozpuszczalników rozwijających, o których mowa w ust. 3.18. Wybór rozpuszczalnika powinien być dokonany wcześniej poprzez nałożenie 25 µl roztworu wzorcowego do testów jakościowych, o którym mowa w ust. 3.17, na płytkę i sprawdzenie, że aflatoksyna B₁ i B₂ po wywołaniu są całkowicie rozdzielone.

Pozwolić, aby rozpuszczalniki odparowały w ciemności, a następnie naświetlić płytkę światłem UV, umieszczając ją w odległości 10 cm od źródła światła, o którym mowa w ust. 4.9. Plamki aflatoksyny B₁ charakteryzują się niebieską fluorescencją.

5.5. Oznaczanie ilościowe.

Oznaczyć zawartość wizualnie lub przy użyciu fluorodensytometru, w sposób opisany 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, jeżeli to konieczne. Fluorescencja otrzymana przez nałożenie ekstraktu na roztwór wzorcowy powinna być bardziej intensywna niż fluorescencja 10 µl ekstraktu i nie powinna być bardziej widoczna niż jedna plamka. Jeżeli intensywność fluorescencji 10 µl ekstraktu jest większa niż 40 µl roztworu wzorcowego, rozcieńczyć ekstrakt 10 lub 100 razy chloroformem, o którym mowa w ust. 3.2, lub mieszaniną benzenu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.6, przed ponownym poddaniem go chromatografii cienkowarstwowej.

5.5.2. Pomiar fluorodensytometryczny.

Zmierzyć intensywność fluorescencji plamek aflatoksyny B₁ w fluorodensytometrze, o którym mowa w ust. 4.12, o czułości – wzbudzenie: 365 nm, emisja: 443 nm. Oznaczyć ilość aflatoksyny B₁ w plamkach ekstraktu przez porównanie ich intensywności fluorescencji z intensywnością fluorescencji plamki wzorcowej aflatoksyny B₁.

5.6. Potwierdzenie tożsamości aflatoksyny B₁.

Potwierdzić tożsamość aflatoksyny B₁ w ekstrakcie w sposób opisany poniżej.

5.6.1. Traktowanie kwasem siarkowym.

Rozpylić kwas siarkowy, o którym mowa w ust. 3.13, na chromatogram otrzymany w sposób określony w ust. 5.4. Pod wpływem naświetlania promieniami UV fluorescencja plamek aflatoksyny B₁ powinna zmienić barwę z niebieskiej na żółtą.

5.6.2. Dwukierunkowa chromatografia powodująca tworzenie aflatoksyny B₁ – hemiacetalu (aflatoksyny B_{2a}).

Czynności opisane poniżej przeprowadza się w sposób określony na rys. 3.

5.6.2.1. Nanoszenie roztworów.

Wyciąć dwie proste linie na płytce, o której mowa w ust. 4.8, równoległe do dwóch przyległych boków, w odległości 6 cm od każdego z nich, aby ograniczyć migrację czoła rozpuszczalnika. Nałożyć następujące roztwory na płytkę, stosując kapilarne pipety lub mikrostrzykawki:

- 1) w punkcie A: oczyszczony ekstrakt próbki otrzymany w sposób określony w ust. 5.3, zawierający około 2,5 nm aflatoksyny B₁;
- 2) w punkcie B i C: 25 µl roztworu wzorcowego, o którym mowa w ust. 3.16.

5.6.2.2. Rozwinięcie.

Rozwijać chromatogram w kierunku I w ciemności, wykorzystując rozpuszczalnik rozwijający, o którym mowa w ust. 3.18.1, (1 cm warstwa w nienasyconym zbiorniku) do chwili, gdy czoło rozpuszczalnika osiągnie ograniczającą linię.

Wyjąć płytkę ze zbiornika i pozostawić w celu wyschnięcia w ciemności, w temperaturze pokojowej, przez 5 minut. Następnie rozpylić kwas chlorowodorowy, o którym mowa w ust. 3.12, wzdłuż pasa o wysokości 2,5 cm pokrywającego punkty A i B (zakresowane pole na rys. 3), aż do ściemnienia, zabezpieczając pozostałą część płytki szklaną szybką. 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, o którym mowa w ust. 3.18.1, (1 cm warstwa w nienasyconym zbiorniku) do chwili, gdy czoło rozpuszczalnika osiągnie ograniczającą linię. Wyjąć płytkę ze zbiornika i wysuszyć w temperaturze otoczenia.

5.6.2.3. Interpretacja chromatogramu.

Zbadać chromatogram pod lampą UV, o której mowa w ust. 4.9, i sprawdzić, czy pojawiły się:

- 1) niebieska fluorescencja plamki aflatoksyny B₁ pochodząca z roztworu wzorcowego nałożonego w punkcie C (migracja w kierunku I);
- 2) niebieska fluorescencja plamki nieprzereagowanej (z kwasem chlorowodorowym) aflatoksyny B₁ i intensywniejszej, niebieskiej fluorescencji plamki aflatoksyny B₁ – hemiacetalu, pochodzących z roztworu wzorcowego nałożonego w punkcie B (migracja w kierunku II);
- 3) plamki porównywalne z tymi opisanymi w pkt 2, pochodzące z ekstraktu próbki nałożonego w punkcie A; położenie tych plamek zostało określone najpierw przez odległość migracji aflatoksyny B₁ z punktu A w kierunku I (takiej samej, jaką przebył wzorec nałożony w punkcie C), a następnie przez odległość migracji z tego punktu w kierunku II aflatoksyny B₁ – hemiacetalu (takiej samej, jaką przebył wzorec nałożony w punkcie B); intensywności fluorescencji plamek hemiacetalu pochodzących z ekstraktu i wzorca nałożonego w punkcie B powinny pasować do siebie.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

6.1. Na podstawie pomiarów wizualnych.

Zawartość w µg/kg aflatoksyny B₁ w próbce (ppb) 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, o którym mowa w ust. 3.16, i ekstraktu o podobnej intensywności fluorescencji,

S – stężenie w µg/ml aflatoksyny B₁, w roztworze wzorcowym, o którym mowa w ust. 3.16,

V – końcowa objętość w µl ekstraktu, uwzględniająca konieczne rozcieńczenia,

W – masa w g próbki, odpowiadająca objętości ekstraktu poddanego oczyszczeniu na kolumnie.

6.2. Na podstawie pomiarów fluorodensytometrycznych.

Zawartość w µg/kg aflatoksyny B₁ w próbce 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 pobranej objętości Y), obliczona na podstawie pomiarów,

V – końcowa objętość w µl ekstraktu, uwzględniająca konieczne rozcieńczenia,

W – masa w g próbki, odpowiadająca objętości ekstraktu poddanego oczyszczeniu na kolumnie.

7. PRZYGOTOWANIE I SPRAWDZANIE ROZTWORU WZORCOWEGO, O KTÓRYM MOWA W UST. 3.16

7.1. Oznaczanie stężenia aflatoksyny B₁.

Przygotować roztwór wzorcowy aflatoksyny B₁ w chloroformie, o którym mowa w ust. 3.2, lub w mieszaninie benzenu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.6, o stężeniu od 8 do 10 µg/ml. Określić spektrum absorpcji w zakresie od 330 do 370 nm przy użyciu spektrofotometru, o którym mowa w ust. 4.11.

Zmierzyć gęstość optyczną (A) przy 363 nm w przypadku roztworu chloroformu lub przy 348 nm w przypadku roztworu w mieszaninie benzenu i acetonitrylu.

Stężenie w µg/ml aflatoksyny B₁ roztworu obliczyć według następujących wzorów:

$$\frac{312 \times A \times 1000}{20600} \quad \text{dla roztworu chloroformu}$$

$$\frac{312 \times A \times 1000}{19800} \quad \text{dla roztworu w mieszaninie benzenu i acetonitrylu}$$

Odpowiednio rozcieńczyć, chroniąc przed światłem dziennym, w celu otrzymania roboczego roztworu wzorcowego o stężeniu 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, o której mowa w ust. 4.8, 5 µl roztworu wzorcowego zawierającego aflatoksynę B₁, o którym mowa w ust. 7.1, w ilości od 8 do 10 µg/ml. Rozwinąć chromatogram w sposób określony w ust. 5.4. W świetle UV chromatogram powinien wykazywać tylko jedną plamkę, a w strefie pierwotnego naniesienia roztworu wzorcowego nie powinny być widoczne ślady fluorescencji.

8. SPRAWDZENIE METODY

8.1. Powtarzalność.

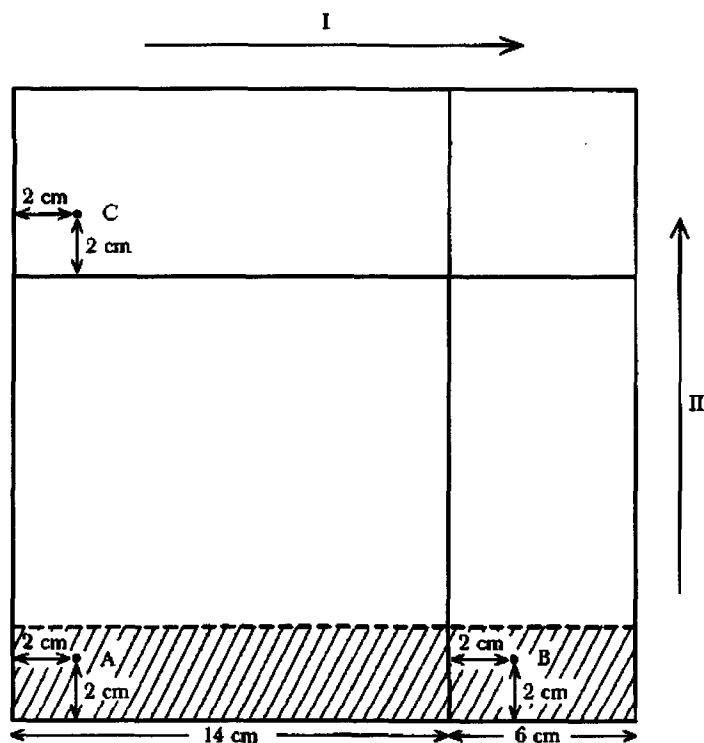
Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

- 1) 25 % najwyższej wartości dla zawartości aflatoksyny B₁ od 10 do 20 µg/kg;
- 2) 5 µg wartości bezwzględnej dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 20 do 50 µg/kg;
- 3) 10 % najwyższej wartości dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 50 µg/kg.

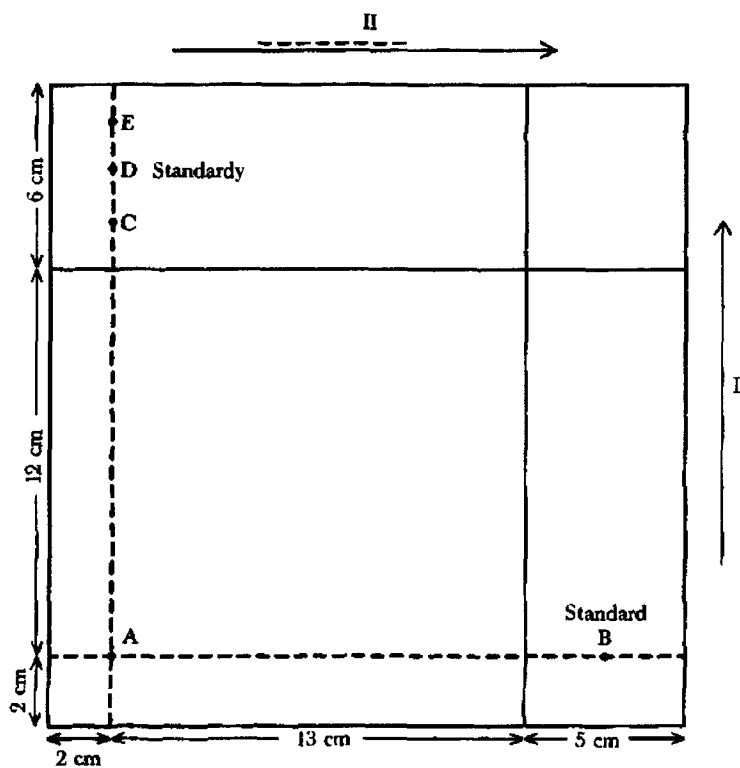
9. ODTWARZALNOŚĆ

Odtwarzalność wyników metody będąca zmiennością pomiędzy wynikami badania tej samej próbki uzyskanymi przez 2 lub więcej laboratoriów powinna wynosić:

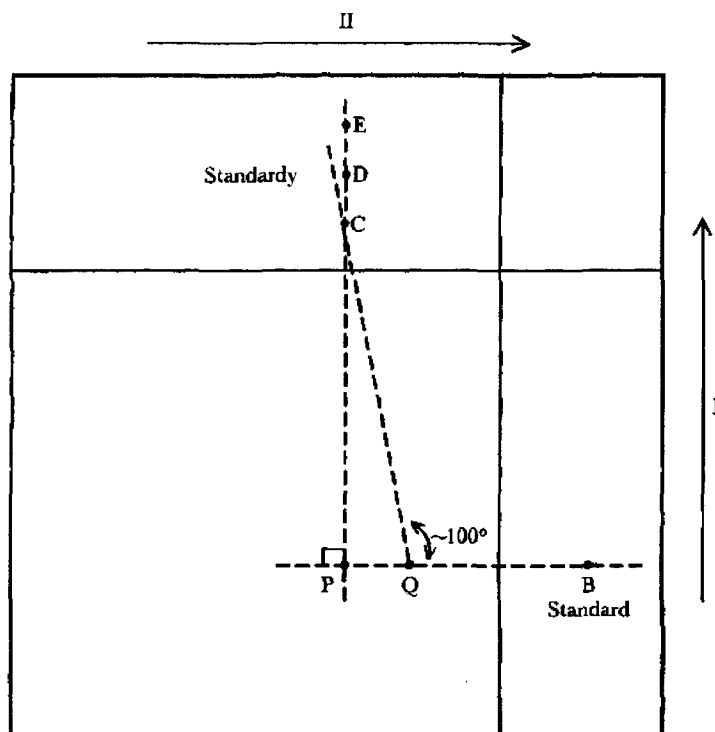
- 1) $\pm 50\%$ średniej wartości dla zawartości aflatoksyny B₁ od 10 do 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,
- 2) $\pm 10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ wartości bezwzględnej dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 20 do 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,
- 3) $\pm 20\%$ średniej wartości dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.



rysunek 3.



rysunek 4.



rysunek 5.

8.2. OZNACZANIE AFLATOKSYNY B₁ METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości aflatoksyny B₁ w paszach, łącznie z paszami zawierającymi pulpe cytrusową. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 0,001 mg/kg (1 ppb).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest ekstrahowana chloroformem. Ekstrakt jest filtrowany, a jego podzielna część jest oczyszczana na Florisilu i C₁₈. Końcowy rozdział i oznaczenie jest prowadzone przy zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) przy zastosowaniu odwróconej fazy kolumnowej C₁₈, po której następuje derywatywizacja pokolumnowa przy użyciu jodu wody jodowej i detekcja fluorescencyjna.

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 właściwości elektrostatyczne powodujące rozprzestrzenianie się ich w środowisku pracy.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Chloroform stabilizowany wagowo od 0,5 do 1,0 % alkoholem etylowym. Uwzględnić ust. 10.2.

3.2. Metanol do HPLC, do przygotowania roztworu, o którym mowa w ust. 3.6.

3.3. Aceton.

3.4. Acetonitryl do HPLC.

3.5. Rozpuszczalniki eluujące: przygotować na dzień przed użyciem lub usunąć powietrze z rozpuszczalników, stosując ultradźwięki.

3.5.1. Mieszanina acetonu, o którym mowa w ust. 3.3, i wody, 98 + 2 (V + V).

3.5.2. Mieszanina wody i metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, 80 + 20 (V + V).

3.5.3. Mieszanina wody i acetonu, o którym mowa w ust. 3.3, 85 + 15 (V + V).

3.6. Faza ruchoma do HPLC.

Mieszanina, w stosunku 130 + 70 + 40 (V + V + V): wody, metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, i acetonitrylu, o którym mowa w ust. 3.4.

Skład fazy ruchomej rozpuszczalnika 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 filtrować przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.15. W celu przeciwdziałania fotodegradacji chronić nasycony roztwór przed światłem.

3.8. Kwas przemyty Celitem 545 lub podobny.

3.9. Wypełnienie Florisil (Waters SEP-PAK) lub podobne.

3.10. Wypełnienie C₁₈ (Waters SEP-PAK) lub podobne.

3.11. Obojętny gaz; proponuje się zastosować azot.

3.12. Roztwór wzorcowy aflatoksyny B₁ w chloroformie, stężenie 10 µg/ml.

Sprawdzić stężenie roztworu w następujący sposób: oznaczyć spektrum absorpcji roztworu pomiędzy 330 i 370 nm przy użyciu spektrofotometru, o którym mowa w ust. 4.23, zmierzyć absorbancję (A) w maksimum przy 363 nm. Stężenie aflatoksyny B₁ w µg/ml roztworu obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{312 \times A \times 1000}{22300} = 13,991 \times A$$

3.12.1. Wzorcowy roztwór podstawowy aflatoksyny B₁ w chloroformie.

Przenieść ilościowo 2,5 ml roztworu wzorcowego aflatoksyny B₁, o którym mowa w ust. 3.12, do kolby miarowej o pojemności 50 ml i uzupełnić do pełnej objętości tej kolby chloroformem, o którym mowa w ust. 3.1. Przechowywać ten roztwór w chłodnym miejscu w temperaturze 4 °C w ciemności, szczelnie zamknięty i owinięty w folię.

3.13. Aflatoksyna B₁, roztwory kalibracyjne do HPLC.

Do przygotowania tych roztworów stosować naczynia szklane myte kwasem, przy uwzględnieniu ust. 4.

3.13.1. Roztwór kalibracyjny 4 ng/ml.

Kolbę miarową zawierającą wzorcowy roztwór podstawowy, o którym mowa w ust. 3.12.1, owiniętą w aluminiową folię pozostawić przez kilka godzin do osiągnięcia temperatury pokojowej. Przenieść 400 µl roztworu wzorcowego podstawowego zawierającego 200 ng aflatoksyny B₁ do kolby miarowej o pojemności 50 ml i odparować roztwór do sucha w strumieniu obojętnego gazu, o którym mowa w ust. 3.11. Rozpuścić pozostałość w około 20 ml mieszaniny wody i acetonu, o której mowa w ust. 3.5.3, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną wody i acetonu, dobrze zmieszać.

3.13.2. Roztwór kalibracyjny 3 ng/ml.

Przenieść ilościowo 7,5 ml roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.13.1, do kolby miarowej o pojemności 10 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną wody i acetonu, o której mowa w ust. 3.5.3, i dobrze zmieszać.

3.13.3. Roztwór kalibracyjny 2 ng/ml.

Przenieść ilościowo 25 ml roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.13.1, do kolby miarowej o pojemności 50 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną wody i acetonu, o której mowa w ust. 3.5.3, i dobrze zmieszać.

Ten roztwór jest także wzorcem odniesienia, stosowanym do wielokrotnych wstrzyknięć podczas HPLC, o której mowa w ust. 5.5.

3.13.4. Roztwór kalibracyjny 1 ng/ml.

Przenieść ilościowo 2,5 ml roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.13.1, do kolby miarowej o pojemności 10 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną wody i acetonu, o której mowa w ust. 3.5.3, i dobrze zmieszać.

3.14. Ampułki zawierające mieszaninę aflatoksyn B₁, B₂, G₁ i G₂ o stężeniach odpowiednio 1,0, 0,5, 1,0 i 0,5 µg/ml, w ml chloroformu.

3.14.1. Roztwór testowy do chromatografii.

Przenieść zawartość ampułki, o której mowa w ust. 3.14, do próbówki zamykanej szklanym korkiem lub do naczynka z nakrętką. Następnie przenieść 40 µl tego roztworu do próbówki, o której mowa w ust. 4.22, opłukanej kwasem, o którym mowa w ust. 3.8. Odparować chloroform w strumieniu obojętnego gazu, o którym mowa w ust. 3.11, i powtórnie rozpuścić w 10 ml mieszaniny wody i acetonu, o której mowa w ust. 3.5.3.

3.15. Odczynniki do testu potwierdzającego, o którym mowa w ust. 6.

3.15.1. Chlorek sodu, roztwór nasycony.

3.15.2. Siarczan sodu bezwodny, granulowany.

4. APARATURA I SPRZĘT

Stosowanie naczyń szklanych, które nie były myte kwasem, do sporządzania wodnych roztworów aflatoksyn może być przyczyną zaniżonych wyników. Szczególną uwagę zwrócić na nowy sprzęt szklany oraz sprzęt używany, taki jak naczynka do automatycznego podajnika próbek, pipety Pasteura. Sprzęt laboratoryjny, który ma kontakt z wodnymi roztworami aflatoksyn, powinien być moczony w rozcieńczonym kwasie (proponuje się zastosować kwas siarkowy o stężeniu 2 mol/l) przez kilka godzin, następnie dokładnie płukany wodą destylowaną w celu usunięcia pozostałości kwasu (proponuje się płukać trzy razy, a następnie sprawdzić pH papierkiem). W praktyce, stosowanie tych zaleceń jest niezbędne w przypadku używania kolb okrągłodennych, o których mowa w ust. 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 oczkach o średnicy 1 mm, zgodnie z ISO R 565.

4.3. Wstrząsarka mechaniczna.

4.4. Rotacyjna wyparka próżniowa wyposażona w kolbę okrągłodenną o pojemności od 150 do 250 ml.

4.5. Wysokosprawny chromatograf cieczerwowy, dozownik z pętlą umożliwiającą zadozowanie 250 ml, zgodnie z instrukcją użytkownika dotyczącą częściowego lub całkowitego napełniania pętli.

4.6. Analityczna kolumna do HPLC: wypełnienie C₁₈, 3 µm lub 5 µm.

4.7. Bezpulsacyjna pompa dostarczająca odczynnik jodowy do derywatywacji 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 o wymiarach: 3000 x 0,5 mm do 5000 x 0,5 mm, odpowiednich do połączenia z kolumnami HPLC 5 µm lub 3 µm.

4.10. Łaźnia wodna z termostatem umożliwiającym utrzymanie temperatury 60 °C ± 0,1 °C.

4.11. Detektor fluorescencyjny o czułości – wzbudzenie: 365 nm, emisja: 435 nm, a 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, zwłaszcza przy użyciu restryktora, spirali

teflonowej lub ze stali nierdzewnej podłączonej u wylotu detektora w celu usunięcia pęcherzyków powietrza z naczynka przepływowego.

4.12. Rejestrator.

4.13. Integrator elektroniczny (opcjonalnie).

4.14. Karbowany filtr bibułowy o średnicy porów 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 lub o podobnych parametrach.

4.15. Filtr membranowy o średnicy porów 0,45 μm , Milipore HAWP04700 lub o podobnych parametrach.

4.16. Kolba stożkowa ze szklanym korkiem o pojemności 500 ml.

4.17. Kolumna szklana o średnicy wewnętrznej około 1 cm, o długości około 30 cm, wyposażona w końcówkę Luera.

4.18. Kurek zamykający Luera odporny na chloroform; proponuje się zastosować Bio-rad 7328017, Analytichem A1 6078, J.T.Baker 4514 lub o podobnych parametrach.

4.19. Strzykawka odporna na działanie substancji chemicznych, wyposażona w 10 ml nasadkę Luera.

4.20. Strzykawka do HPLC, odpowiednia do zadozowania 250 μl , przy uwzględnieniu ust. 4.5.

4.21. Mikrostrzykawka 100 μl do przygotowania roztworów kalibracyjnych, która powinna być sprawdzona przed użyciem w celu ustalenia, 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, o którym mowa w ust. 6.

4.24.1. Rozdzielacz o pojemności 100 ml, wyposażony w teflonowy kurek, umyty kwasem.

4.24.2. Blok grzewczy zapewniający temperaturę od 40 do 50 $^{\circ}\text{C}$.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbki.

Rozdrobnić próbkę tak, aby przechodziła przez sito, o którym mowa w ust. 4.2.

5.2. Badana część próbki.

Odważyć 50 g przygotowanej próbki do kolby stożkowej, o której mowa w ust. 4.16.

5.3. Ekstrakcja.

Do odważki, o której mowa w ust. 5.2, dodać 25 g Celitu, o którym mowa w ust. 3.8, 250 ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.1, i 25 ml wody. Zamknąć kolbę i wstrząsać przez 30 minut na wstrząsarce mechanicznej, o której mowa w ust. 4.3.

Filtrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.14. Zebrać 50 ml filtratu. Jeżeli konieczne, pobrać podzielną część filtratu i rozcieńczyć do 50 ml chloroformem, tak aby stężenie aflatoksyny B₁ nie było wyższe niż 4 ng/ml.

5.4. Oczyszczanie powinno być prowadzone bez istotnych przerw.

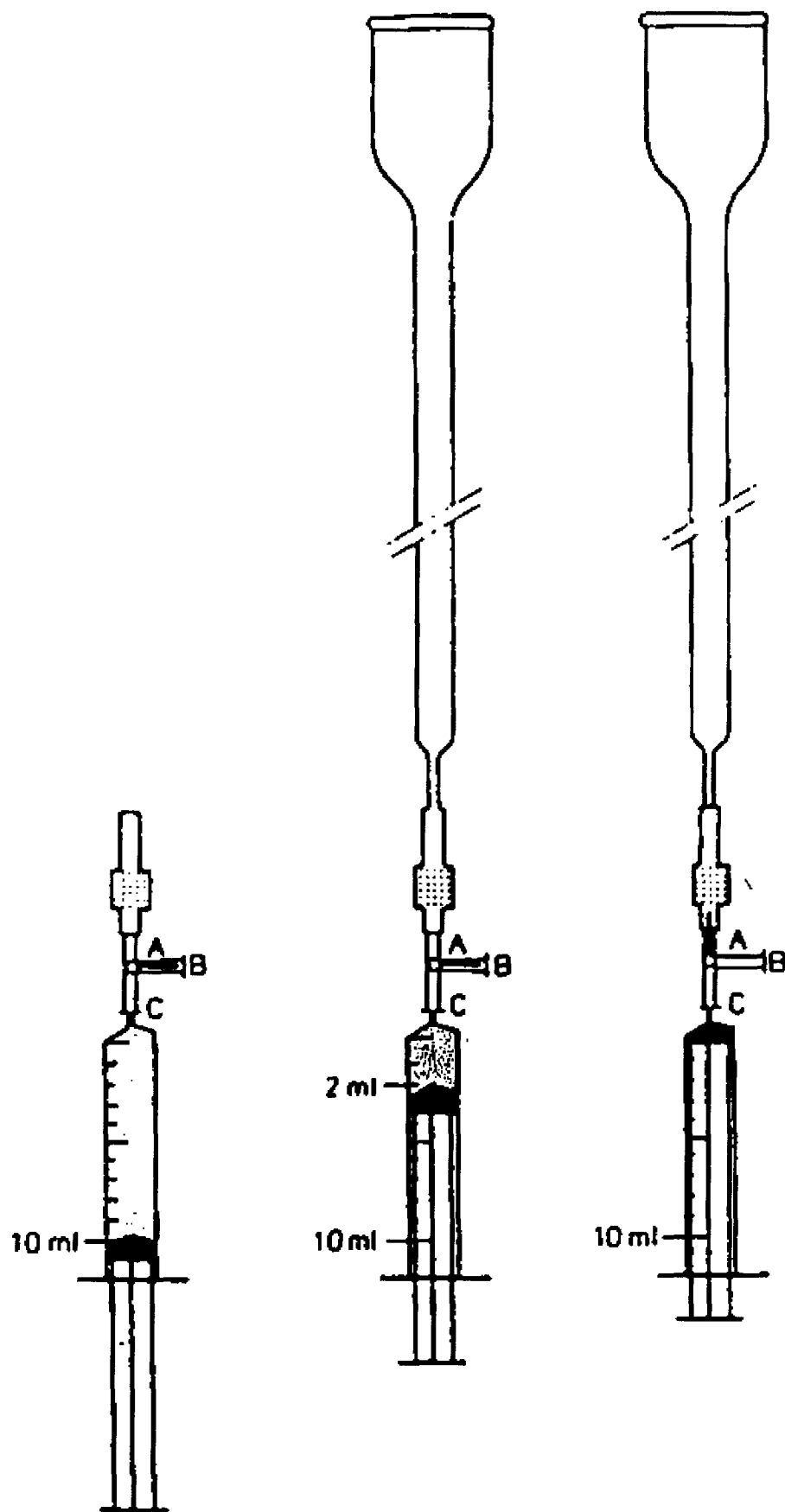
W czasie wykonywania analizy chronić pomieszczenia laboratoryjne przed dostępem światła dziennego. Można to uzyskać poprzez założenie na okna folii pochłaniającej promieniowanie UV z równoczesnym ograniczeniem dostępu światła słonecznego oraz poprzez założenie zaston lub żaluzji w połączeniu ze sztucznym światłem, dopuszcza się stosowanie światła jarzeniowego.

Roztwory zawierające aflatoksynę powinny być chronione przed dostępem światła poprzez przechowywanie ich w ciemności albo poprzez stosowanie aluminiowych folii.

5.4.1. Oczyszczanie Florisil SEP-PAK.

5.4.1.1. Przygotowanie zestawu wypełnionej kolumny.

Podłączyć kurek zamykający, o którym mowa w ust. 4.18, do krótszej końcówki mikrokolumny z wypełnieniem Florisil, o którym mowa w ust. 3.9 (rys. 6). Przemyc wypełnienie i usunąć środek pomocniczy, stosując 10 ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.1, i szybko przepuszczając 8 ml przez kurek zamykający, przy użyciu strzykawki, o której mowa w ust. 4.19. Podłączyć dłuższą końcówkę mikrokolumny z wypełnieniem do kolumny szklanej, o której mowa w ust. 4.17, i przepuścić pozostałe 2 ml chloroformu przez wypełnienie do kolumny. Zamknąć kurek zamykający. Odłączyć strzykawkę.



rysunek 6. Zestaw kolumnowy z mikrokolumną

5.4.1.2. Oczyszczanie.

Wprowadzić filtrat otrzymany w sposób określony w ust. 5.3 do wypełnionej kolumny i osuszonej grawitacyjnie. Spłukać kolumnę przy użyciu 5 ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.1, i 20 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2. Odrzucić eluaty. W czasie tych czynności nie wolno dopuścić, aby wypełnienie mikrokolumny pozostawało suche.

Wymyć aflatoksynę B₁ przy użyciu 40 ml mieszaniny acetonu i wody, o której mowa w ust. 3.5.1, i zebrać całość eluatu do kolby okrągłodennej rotacyjnej wyparki, o której mowa w ust. 4.4. Zatężyć eluat na rotacyjnej wyparce, o której mowa w ust. 4.4, w temperaturze od 40 do 50 °C, aż do całkowitego oddestylowania acetonu. Po zastosowaniu tego procesu *w kolbie pozostaje około 0,5 ml cieczy. Badania wykazały, że dalsze odparowywanie nie jest szkodliwe, a w 0,5 ml pozostałości nie występują istotne ilości acetonu. Pozostałości acetonu mogą powodować straty aflatoksyny B₁ na wypełnieniu C₁₈.*

Dodać 1 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, poruszać kolbę ruchem okrężnym w celu rozpuszczenia aflatoksyny B₁ na ścianach kolby, dodać 4 ml wody i zmieszać. Odłączyć i odrzucić wypełnienie. Spłukać wodą kolumnę szklaną i przystąpić do etapu oczyszczania wypełnienia C₁₈.

5.4.2. Oczyszczanie SEP-PAK C₁₈.

5.4.2.1. Przygotowanie zestawu wypełnionej kolumny.

Podłączyć kurek zamykający, o którym mowa w ust. 4.18, do krótszej końcówki mikrokolumny z wypełnieniem C₁₈, o którym mowa w ust. 3.10 (rys. 6). Sprawdzić wypełnienie i usunąć środek pomocniczy, stosując 10 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, szybko przepuszczając przez kurek zamykający przy użyciu strzykawki, o której mowa w ust. 4.19. Pęcherzyki powietrza w wypełnieniu są widoczne jako jasne punkty na szarym tle. Pobrać 10 ml wody i przepuścić 8 ml przez wypełnienie, nie dopuszczając do wprowadzenia powietrza do wypełnienia przy przejściu od metanolu do wody. Podłączyć dłuższą końcówkę wypełnienia do kolumny szklanej, o której mowa w ust. 4.17, i przepuścić pozostałe 2 ml wody przez wypełnienie w kolumnie. Zamknąć kurek zamykający. Odłączyć strzykawkę.

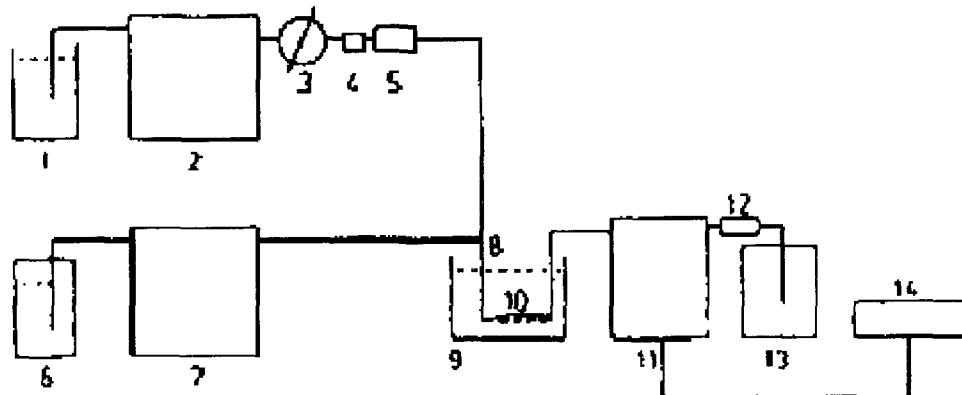
5.4.2.2. Oczyszczanie.

Przenieść ilościowo ekstrakt uzyskany w sposób określony w ust. 5.4.1.2 do kolumny szklanej, o której mowa w ust. 4.17, spłukując kolbę dwukrotnie przy użyciu 5 ml mieszaniny wody i metanolu, o której mowa w ust. 3.5.2, i osuszyć grawitacyjnie. Podczas tych czynności zwrócić uwagę, aby wypełnienie kolumny nie pozostawało suche. Jeżeli w pobliżu wypełnienia utworzą się pęcherzyki powietrza, przerwać przepływ i uderzyć w górny koniec kolumny w celu usunięcia powietrza, a następnie kontynuować analizę. Eluować przy użyciu 25 ml mieszaniny wody i metanolu. Odrzucić eluat. Eluować aflatoksynę B₁ przy użyciu 50 ml mieszaniny wody i acetonu, o której mowa w ust. 3.5.3, i zebrać całość eluatu do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Uzupelnąć wodą do pełnej objętości kolby i zmieszać. Uzyskany roztwór jest stosowany do chromatografii, o której mowa w ust. 5.5.

Filtracja końcowego ekstraktu przed chromatografią HPLC zwykle nie jest konieczna. Jeżeli jednak okaże się to niezbędne, nie stosować filtrów celulozowych ze względu na możliwe straty aflatoksyny B₁. Można stosować filtry teflonowe.

5.5. Wysokosprawna chromatografia cieczowa.

Sposób połączenia zestawu jest podany na rys. 7. Pozwolić na ustabilizowanie się warunków pracy aparatu.

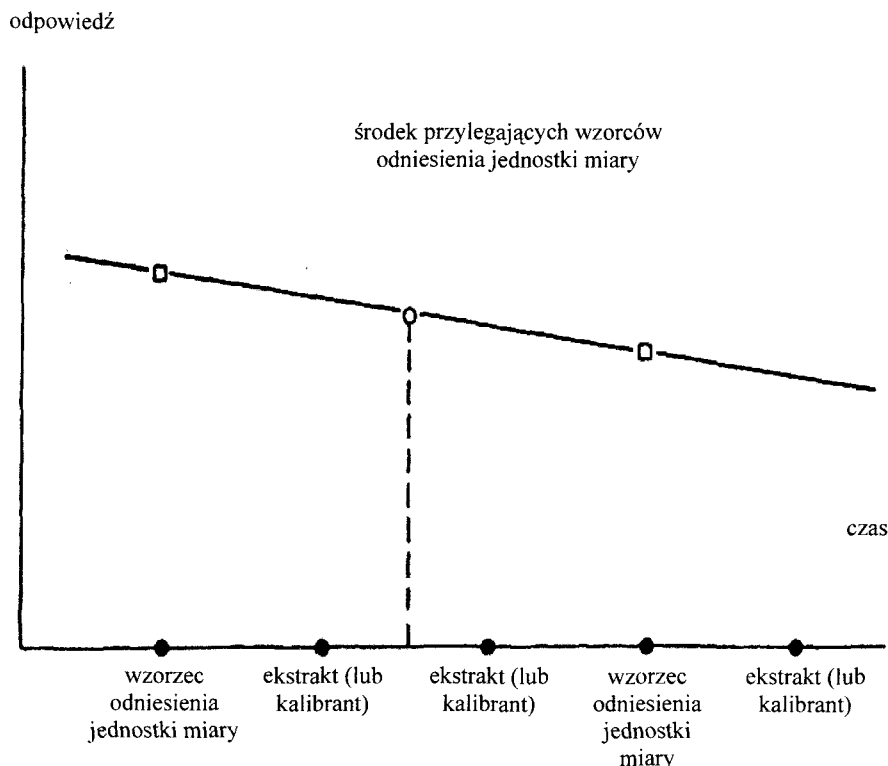


rysunek 7. Przepływowy diagram systemu LC z derywatyzacją pokolumnową

1. Faza ruchoma
2. Pompa
3. Zawór dozownika
4. Przedkolumna
5. Kolumna analityczna do 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

Szybkości przepływu fazy ruchomej i odczynnika przedkolumnowego są tylko wskaźnikowe. Parametry te powinny być ustalone w zależności od charakterystyki kolumny HPLC.

Przy oznaczaniu aflatoksyny B_1 sygnał detektora zależy od temperatury, dlatego kompensacja powinna być wykonana dla dryfu (rys. 8). Dozując określone ilości wzorca odniesienia aflatoksyny B_1 , o którym mowa w ust. 3.13.3, w regularnych odstępach, zwłaszcza co trzecie wstrzyknięcie, wartości piku aflatoksyny B_1 pomiędzy tymi wzorcami odniesienia mogą być skorygowane poprzez uśrednienie odpowiedzi, pod warunkiem że różnice pomiędzy kolejnymi odpowiedziami wzorców odniesienia są bardzo małe (< 10%). Dlatego dozowania powinny być prowadzone bez przerw. Jeżeli przerwa jest nieunikniona, ostatnie dozowanie przed przerwą i pierwsze dozowanie po przerwie powinny być uznawane jako wzorzec odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3. Z uwagi na prostoliniowość krzywej kalibracyjnej i przechodzenie jej przez punkt wyjściowy, zawartości aflatoksyny B_1 w ekstraktach próbki są określone bezpośrednio przez odniesienie do przyległych wzorców.



rysunek 8. Kompensacja dryfu przy oznaczaniu aflatoksyny B_1 poprzez dozowanie wzorca odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3, w regularnych odstępach

5.5.1. Ustawianie pompy HPLC.

Ustawić pompę HPLC, o której mowa w ust. 4.5, na przepływ 0,5 lub 0,3 ml/min odpowiednio dla 5 μm lub 3 μm kolumny HPLC, o której mowa w ust. 4.6, stosując fazę ruchomą, o której mowa w ust. 3.6.

5.5.2. Ustawianie pompy pokolumnowej.

Ustawić pompę, o której mowa w ust. 4.7, na przepływ nasyconego, wodnego roztworu jodu, o którym mowa w ust. 3.7, od 0,2 do 0,4 ml/min. Uwzględnić ogólną regułę: przepływy około 0,4 lub 0,2 ml/min są zalecane w powiązaniu z odpowiednimi przepływami 0,5 i 0,3 ml/min fazy ruchomej, o której mowa w ust. 3.6.

5.5.3. Detektor fluorescencyjny.

Ustawić detektor fluorescencyjny, o którym mowa w ust. 4.11, o czułości — wzbudzenie: 365 nm, emisja: 435 nm, a w aparatach wyposażonych w filtry powyżej 400 nm. Ustawić wzmacnienie detektora na takim poziomie, aby wychylenie pisaka wynosiło 80 % skali dla 1 ng aflatoksyny B_1 .

5.5.4. Dozownik.

W przypadku wszystkich roztworów dozować 250 μl ilości, zgodnie z instrukcją obsługi dozownika.

5.5.5. Sprawdzenie chromatograficznego rozdzielania.

Zadozować roztwór testowy do chromatografii, o którym mowa w ust. 3.14.1. Doliny powinny stanowić mniej niż 5 % sumy wysokości piku przyległych pików.

5.5.6. Sprawdzanie stabilności układu.

Przed każdą serią analiz dozować kolejno wzorzec odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3, aż do uzyskania stałych powierzchni piku, przy czym piki aflatoksyny B_1 nie mogą się różnić więcej niż 6%. Przeprowadzić niezwłocznie sprawdzian liniowości, o którym mowa w ust. 5.5.7.

5.5.7. Sprawdzenie liniowości.

Dozować roztwory kalibracyjne aflatoksyny B₁, o których mowa w ust. 3.13.1 – 3.13.4. Za każdym razem dozować wzorzec odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3, w celu korekty dryfu w odpowiedzi, przy czym *odpowiedzi pików dla tego referencyjnego wzorca nie powinny się różnić więcej niż o 10 % w czasie 90 minut*. Skorygować dryf zgodnie z wzorem opisanym w ust. 7. Wykres kalibracyjny powinien być liniowy i przechodzić przez punkt wyjściowy w granicach podwójnego wzorcowego błędu 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 dalszym oznaczaniem.

5.5.8. Dozowanie próbek ekstraktów.

Dozować oczyszczone próbki ekstraktów, o których mowa w ust. 5.4.2.2. Po zadozowaniu każdych dwóch próbek ekstraktu powtarzać dozowanie wzorca odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3, w szczególności zgodnie z poniższą sekwencją: wzorzec odniesienia, ekstrakt, ekstrakt, wzorzec odniesienia, ekstrakt, ekstrakt, wzorzec odniesienia.

6. TEST POTWIERDZAJĄCY

6.1. Dalszy etap postępowania z ekstraktem, o którym mowa w ust. 5.4.2.2.

Dodać 5 ml roztworu chlorku sodu, o którym mowa w ust. 3.15.1, do końcowego ekstraktu otrzymanego w sposób określony w ust. 5.4.2.2. Ekstrahować trzykrotnie, stosując każdorazowo po 2 ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.1, w czasie minuty, w rozdzielniku, o którym mowa w ust. 4.24.1. Nanosić chloroformowe ekstrakty na około 1 g warstwę siarczanu sodu, o którym mowa w ust. 3.15.2, i zbierać w próbówce o pojemności 10 ml. Do ekstrakcji zastosować mały rozdzielnik o średnicy 4 cm, przy czym około 1 g siarczanu sodu nałożyć na zwitek waty.

Przemyc warstwę siarczanu sodu przy użyciu kilku ml chloroformu i zebrać popłuczyny w tej samej próbówce testowej. Odparować chloroformowy ekstrakt do sucha z tej samej próbówki przy użyciu bloku grzewczego, o którym mowa w ust. 4.24.2, i ponownie rozpuścić w ml chloroformu.

6.2. Przygotowanie cienkowarstwowej chromatografii połączonej z derywatyzacją.

Postępować w sposób określony w rozdziale 8 w części 8.1, w ust. 5.6.2.

7. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość aflatoksyny B₁ w µg/kg w próbce obliczyć według następującego wzoru:

$$m \times V_{\text{ext}}$$

$$\frac{V_m \times M \times V_f / V_c}{\text{gdzie:}}$$

m – ilość aflatoksyny B₁ w ng odpowiadająca zarejestrowanemu pikowi, obliczona w następujący sposób:

$$m = \frac{P(\text{próbka})}{P(st_1) + P(st_2)} \times 2 r(\text{st})$$

P (próbka) – powierzchnia pików aflatoksyny B₁ dla próbki.

P (st₁) – powierzchnia pików aflatoksyny B₁ odpowiadająca poprzedniemu zadozowaniu wzorca odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3,

P (st₂) – powierzchnia pików aflatoksyny B₁ odpowiadająca następnemu zadozowaniu wzorca odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3,

r (st) – ilość w ng aflatoksyny B₁ zadozowana na kolumnę z wzorca odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3,

V_m – objętość w ml zadozowanego na kolumnę ekstraktu próbki,

V_{ext} – końcowa objętość w ml ekstraktu próbki, uwzględniająca wszelkie rozcieńczenia w toku postępowania określonego w ust. 5.3,

M – masa w g próbki,

V_f – objętość w ml filtratu przeniesiona na wypełnienie Florisil, o którym mowa w ust. 5.4.1.2,

V_c – objętość w ml chloroformu użyta do ekstrakcji próbki.

Jeżeli sposób postępowania jest zgodny z podanym, wzór upraszcza się do postaci:

zawartość aflatoksyny B₁ w µg/kg = 20 × m

7.1. Obliczanie wyników można prowadzić na podstawie pomiaru wysokości pików.

8. POWTARZALNOŚĆ

Powtarzalność z uwzględnieniem ust. 10.1.

9. ODTWARZALNOŚĆ

Odtwarzalność z uwzględnieniem ust. 10.1.

10. OBJAŚNIENIA

10.1. Precyzja.

Międzynarodowe badania międzylaboratoryjne⁸⁾ były prowadzone na mieszankach paszowych. Pozwoliły one uzyskać dane o powtarzalności i odtwarzalności, które zamieszczono w tabeli 28. Termin powtarzalności (r) jest tutaj stosowany jako największy przedział, w którym dwa wyniki oznaczeń aflatoksyny B₁ wykonane w tej samej próbce, w powtarzalnych warunkach w tym samym laboratorium, nie różnią się z prawdopodobieństwem 95 %. Termin odtwarzalności (R) jest definiowany podobnie w przypadku porównania dwóch różnych laboratoriów. Zgodnie z normą ISO 3534 – 1977, 2,35⁹⁾ i decyzją Rady 89/610/EEC (Dz. Urz. WE L 351 z 2.12.1989, str. 39) wartości r i R podano również w tabeli 28 w kategoriach współczynników zmienności.

⁸⁾ Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Food Additives and Contaminants 8, str. 17–29.

⁹⁾ ISO 3534-1977.

Tabela 28. Wyniki badań międzylaboratoryjnych przeprowadzonych w 15 laboratoriach
Powtarzalność (r) i odtwarzalność (R) wyrażone jako proporcje i odpowiednie współczynniki zmienności

Poziom	r	R	CV _r (^o)	CV _R
µg/kg			%	%
8 i 14	1,4	1,7	11	18

(^o) CV – współczynnik zmienności

10.2. Stabilizacja chloroformu, o którym mowa w ust. 3.1.

Charakterystyki absorpcji na Florisilu mogą się zmienić przy stosowaniu stabilizatorów innych niż etanol. Jeżeli zalecany chloroform jest niedostępny, sprawdzić wynik analizy w sposób określony w ust. 10.3.

10.3. Dokładność.

Poprawność wykonania oznaczenia przy użyciu niniejszej metody może być sprawdzona poprzez wykonywanie wielokrotnych pomiarów certyfikowanego materiału odniesienia. Jeżeli taki materiał nie jest dostępny, metodyka oznaczania powinna być zweryfikowana poprzez badanie fortyfikowanej ślepej próbki paszy. Odchylenie średniej od wartości rzeczywistej, wyrażonej w procentach tej wartości, powinno zawierać się w przedziale od -20 do +10 % w stosunku do rzeczywistej wartości.

8.3. OZNACZANIE KWASU CYJANOWODOROWEGO

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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 maniołu i niektórych gatunków fasoli.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Po utworzeniu zawiesiny próbki w wodzie pod wpływem enzymów uwalnia się kwas cyjanowodorowy, który zbierany jest przez parę destylacyjną, a następnie umieszczany w odpowiedniej objętości zakwaszonego roztworu azotanu srebra. Powstały cyjanek srebra oddziela się na filtrze, a nadmiar azotanu srebra miareczkuje się roztworem tiocyjanianu amonu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Zawiesina ze słodkich migdałów. Rozdrobnić 20 wyluskanych słodkich migdałów i wrzucić do 100 ml wody o temperaturze od 37 do 40 °C. Sprawdzić, czy w zawieszynie nie ma kwasu cyjanowodorowego w ten sposób, że 10 ml zawiesiny nanieść na sodowy papierik pikrynowy lub wykonując ślepa próbę w sposób określony w ust. 5.

3.2. Roztwór octanu sodu, 10 % (m/V), obojętny wobec fenoloftaleiny.

3.3. Emulsja przeciwpieniąca; proponuje się zastosować silikon.

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, ze skraplaczem.

4.3. Kolby płaskodenne ze szklanymi korkami, o pojemności 1 litra.

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 ze słodkich migdałów, o której mowa w ust. 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, o którym mowa w ust. 3.2, i kroplę emulsji przeciwpieniącej, o której mowa w ust. 3.3.

Połączyć kolbę z aparaturą do destylacji z parą wodną i umieścić w łaźni olejowej, którą uprzednio rozgrzewa się do temperatury nieco powyżej 100 °C. Oddestylować od 200 do 300 ml cieczy z parą wodną i łagodnie ogrzewać kolbę. Destylat zebrać w kolbie Erlenmeyera osłoniętej od światła i zawierającej 50 ml roztworu azotanu srebra, o którym mowa w ust. 3.5, i 1 ml kwasu azotowego, o którym mowa w ust. 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 wodą do pełnej objętości kolby, wymieszać i przefiltrować. Odrzucić 250 ml filtratu i dodać około 1 ml roztworu siarczynu żelaza i amonu, o którym mowa w ust. 3.7, a nadmiar azotanu srebra miareczkować roztworem tiocyjanianu amonu, o którym mowa w ust. 3.6, z biurety z podziałką w zakresie 1/20 ml.

Ślepa próbę przeprowadza się w ten sam sposób, używając 10 ml zawiesiny ze słodkich migdałów, o której mowa w ust. 3.1, pomijając analizowaną próbkę.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Jeżeli ślepa próba wykaże, że roztwór azotanu srebra został zużyty, odjąć jego objętość od objętości zużytej przez destylat z próbki. 1 ml AgNO₃ 0,02 N odpowiada 0,54 mg HCN. Wynik wyrazić w procentach wagowych.

7. OBJAŚNIENIA

Jeżeli próbka zawiera znaczne ilości siarczku, a w szczególności w przypadku fasoli, wytrąca się czarny osad siarczku srebra, który zostaje na filtrze wraz z osadem cyjanku srebra. Tworzenie się siarczku srebra powoduje straty roztworu azotanu srebra 0,02 N i wartość tę należy odjąć od objętości użytej do obliczania zawartości HCN. Czynność tę wykonać

w sposób opisany poniżej. Pozostały na filtrze osad potraktować 50 ml amoniaku, o którym mowa w ust. 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 filtrat kwasem azotowym.

8.4. SZACOWANIE AKTYWNOŚCI UREAZY W PRODUKTACH SOJOWYCH

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania aktywności ureazy w produktach sojowych oraz do wykazania, czy te produkty były poddawane obróbce cieplnej przez wystarczająco długi okres.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA 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 0,1 N.

3.2. Roztwór wodorotlenku sodu 0,1 N.

3.3. Obciążający roztwór fosforanowy 0,05 M, zawierający w 1 l 4,45 g dwuhydratu wodorofosforanu dwusodu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 3,40 g dwuwodorofosforanu potasu (KH_2PO_4).

3.4. Obciążający roztwór mocznika, świeżo przygotowany, zawierający 30,0 g mocznika w 1 l obciążającego roztworu fosforanowego, o którym mowa w ust. 3.3, przy pH od 6,9 do 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 umożliwiającym utrzymanie temperatury 30 °C.

4.3. Probówki ze szlifowanymi korkami o wymiarach 150 x 18 mm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Rozdrobnić około 10 g próbki tak, aby przesiewała się przez oczka sita o średnicy 0,2 mm. Można w tym celu użyć młynka do kawy. Odważyć 0,2 g rozdrobnionej próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić w probówce ze szlifowanym korkiem, następnie dodać 10 ml obciążającego roztworu mocznika, o którym mowa w ust. 3.4. Natychmiast zamknąć korkiem i wstrząsnąć energicznie. Probówkę umieścić w łaźni wodnej nastawionej na 30 °C i utrzymywać w niej przez 30 minut. Natychmiast dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 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, o której mowa w ust. 4.1, natychmiast miareczkować elektrometrycznie roztworem wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.2, do uzyskania pH 4,7.

Przeprowadzić test ślepej próby w następujący sposób: szybko umieścić 0,2 g próbki, odważonej z dokładnością do 1 mg, w probówce ze szlifowanym korkiem, dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1, a następnie 10 ml obciążającego roztworu mocznika, o którym mowa w ust. 3.4. Szybko schłodzić probówkę w łaźni lodowej i pozostawić na 30 minut. Przenieść zawartość próbki do naczynia do miareczkowania, używając roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.2, do uzyskania pH 4,7.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Aktywność ureazy obliczyć według następującego wzoru:

$$\frac{\text{mg N}}{\text{g x min}} \text{ w temperaturze } 30\text{ }^\circ\text{C} = \frac{1,4 (b - a)}{30 \times E}$$

gdzie:

a – objętość w ml roztworu 0,1 N wodorotlenku sodu zużytego w próbce,

b – objętość w ml roztworu 0,1 N wodorotlenku sodu zużytego w ślepej próbie,

E – masa w g próbki.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Metoda jest odpowiednia do oznaczania aktywności ureazy do 1 mg N/g/min w temperaturze 30 °C. W przypadku produktów o większej aktywności ureazy zmniejszyć masę próbki 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 STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości wolnego gossypolu, całkowitego gossypolu i chemicznie związanych substancji w nasionach bawełny, w makuchach, w mączce z nasion bawełny i w mieszaninach paszowych zawierających te substancje w ilości ponad 20 ppm.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Gossypol ekstrahuje się w obecności 3-aminopropan-1-olu lub mieszaniny propan-2-olu i heksanu w przypadku oznaczania wolnego gossypolu lub dwumetyloformamidem w przypadku oznaczenia całkowitego gossypolu. Gossypol reagując z aniliną, tworzy gossypol-dianilinę, której gęstość optyczna mierzona jest przy 440 nm.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Mieszanina 1-propan-2-ol-heksanu:

Zmieszać 60 części objętościowych propan-2-olu z 40 częściami objętościowymi n-heksanu.

3.2. Rozpuszczalnik A:

Umieścić w kolbie o pojemności 1 litra około 500 ml mieszaniny propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1, 2 ml 3-aminopropan-1-olu, 8 ml lodowatego kwasu octowego i 50 ml wody. Uzpełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1. Odczynnik jest stabilny przez 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. Schłodzić do temperatury pokojowej i uzupełnić do pełnej objętości kolby N,N-dwumetyloformamidem. Odczynnik jest stabilny przez tydzień.

3.4. Anilina:

Jeżeli gęstość optyczna ślepej próby przekracza 0,022, przedestylować anilinę nad proszkiem cynku, odrzucając pierwsze i ostatnie 10 % frakcji destylatu. Schłodzić i przechowywać w brązowej butelce zamkniętej korkiem. Odczynnik można przechowywać przez kilka miesięcy.

3.5. Roztwór A wzorcowego gossypolu:

27,9 mg octanu gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Rozpuścić i uzupełnić zawartość kolby do pełnej objętości kolby rozpuszczalnikiem A, o którym mowa w ust. 3.2. Odpipetować 50 ml tego roztworu do kolby miarowej o pojemności 250 ml i uzupełnić rozpuszczalnikiem A do pełnej objętości kolby. Stężenie gossypolu w tym roztworze wynosi 0,02 mg/ml. Przed użyciem pozostawić na godzinę w temperaturze pokojowej.

3.6. Roztwór B wzorcowego gossypolu:

27,9 mg octanu gossypolu umieścić w kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Rozpuścić i uzupełnić do pełnej objętości kolby rozpuszczalnikiem B, o którym mowa w ust. 3.3. Stężenie gossypolu w tym 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 lub tumbler: około 35 obr/min.

4.2. Spektrofotometr.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Analiza próbki.

Masa próbki pobrana do analizy zależy od przewidywanej zawartości gossypolu w próbce. Zalecana jest praca na małych ilościach próby i stosunkowo dużej ilości filtratu po to, aby otrzymać wystarczającą ilość gossypolu do precyzyjnego oznaczenia fotometrycznego. W przypadku oznaczania wolnego gossypolu w nasionach bawełny, w makuchach i mączce z nasion bawełny masa próbki do analizy nie powinna przekraczać 1 g. W przypadku mieszanek paszowych może wynosić do 5 g. W większości przypadków wystarczające jest 10 ml podzielnej części filtratu. Powinien on zawierać od 50 do 100 µg gossypolu. Jeżeli oznaczamy całkowity gossypol, ilość badanej próbki powinna wynosić od 0,5 do 5 g, wówczas 2 ml podzielnej części filtratu będzie zawierać od 40 do 200 µg gossypolu. Analizę przeprowadzać w temperaturze pokojowej, za którą uważa się temperaturę około 20 °C.

5.2. Oznaczanie wolnego gossypolu.

Umieścić próbkę w kolbie ze szlifowaną szyjką o pojemności 250 ml. Dno kolby pokryć pokruszonym szkłem. Przy użyciu pipety dodać 50 ml rozpuszczalnika A, o którym mowa w ust. 3.2, zamknąć kolbę korkiem i mieszać przez godzinę w mikserze. Filtrować przez suchy filtr, a filtrat zebrać do małej kolby ze szlifowaną szyjką. Podczas filtracji przykryć lejek szkiełkiem zegarkowym. Odmierzyć pipetą dwie identyczne podzielne części filtratu zawierające od 50 do 100 µg gossypolu i umieścić w dwóch kolbach miarowych o pojemności 25 ml (A i B). Jeżeli to konieczne, uzupełnić zawartość kolby do 10 ml rozpuszczalnikiem A, o którym mowa w ust. 3.2. Następnie uzupełnić zawartość kolby (A) do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1. Roztwór ten będzie użyty jako roztwór odniesienia względem pomiaru roztworu próbki. Odpipetować po 10 ml rozpuszczalnika A, o którym mowa w ust. 3.2, do dwóch kolb miarowych o pojemności 25 ml (C i D). Zawartość kolby C uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1. Roztwór ten będzie używany jako roztwór odniesienia względem pomiaru roztworu ślepej próby.

Dodać po 2 ml aniliny, o której mowa w ust. 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 do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1, homogenizować i odstawić na godzinę.

Oznaczyć gęstość optyczną roztworu ślepej próby (D), używając odpowiedniego roztworu (C) jako roztworu odniesienia, oraz gęstość optyczną roztworu próbki (B) przez porównanie z odpowiednim roztworem (A), jako roztworem odniesienia w spektrofotometrze przy 440 nm, stosując 1 cm szklane kuwety.

Od odpowiadającej gęstości optycznej wartości roztworu próbki odjąć wartość gęstości optycznej roztworu ślepej próby. Przy użyciu tej różnicy obliczyć zawartość wolnego gossypolu w sposób określony w ust. 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, o którym mowa w ust. 3.3. W tym samym czasie przygotować ślepą próbę, umieszczając 10 ml rozpuszczalnika B, o którym mowa w ust. 3.3, w następnej kolbie miarowej o pojemności 50 ml. Ogrzewać obie kolby przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Następnie schłodzić do temperatury pokojowej i uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1. Homogenizować i odstawić na 10 do 15 minut. Następnie filtrować, a filtrat zebrać do kolb ze szlifowaną szyjką. Odpipetować po 2 ml filtratu próbki do każdej z dwu 25 ml kolb miarowych. Uzpełnić zawartość kolby o pojemności 25 ml do pełnej jej objętości mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1. Roztwory te będą używane jako roztwory odniesienia.

Dodać po 2 ml aniliny, o której mowa w ust. 3.4, do dwu następnych kolb miarowych. Ogrzewać obie kolby przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej do wywołania reakcji barwnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do objętości 25 ml mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1, homogenizować i pozostawić na godzinę.

Oznaczyć gęstość optyczną tak jak dla wolnego gossypolu, o którym mowa w ust. 5.2. Przy użyciu tej wartości obliczyć zawartość całkowitego gossypolu w sposób określony w ust. 6.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wyniki mogą być obliczone na podstawie określonej gęstości optycznej, o której mowa w ust. 6.1, lub na podstawie odniesienia do krzywej kalibracyjnej, o której mowa w ust. 6.2.

6.1. Wyniki obliczane na podstawie określonej gęstości optycznej.

W podanych warunkach określone gęstości optyczne są następujące:

$$\text{wolny gossypol} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{całkowity gossypol} \quad E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Zawartość wolnego lub całkowitego gossypolu 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 – skorygowana gęstość optyczna określona w ust. 5.2,

p – masa w g próbki,

a – podzielna część filtratu w ml.

6.2. Wyniki obliczane na podstawie krzywej kalibracyjnej.

6.2.1. Wolny gossypol.

Przygotować dwie partie po 5 kolb miarowych o pojemności 25 ml. Do każdej partii kolb wprowadzić pipetą odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml roztworu A wzorcowego gossypolu, o którym mowa w ust. 3.5. Uzupełnić do objętości 10 ml rozpuszczalnikiem A, o którym mowa w ust. 3.2. Uzupełnić każdą partię kolbą miarową o pojemności 25 ml zawierającą jedynie 10 ml rozpuszczalnika A, o którym mowa w ust. 3.2, będącą kolbą ślepej próby.

Uzupełnić do objętości 25 ml kolby w pierwszej partii, stanowiącej partię odniesienia, włączając kolbę ślepej próby, mieszaniną 1-propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1.

Dodać po 2 ml aniliny, o której mowa w ust. 3.4, do każdej kolby drugiej partii, stanowiącej partię wzorcową, włączając kolbę ślepej próby. Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej do wywołania reakcji barwnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną 1-propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1, homogenizować i odstawić na godzinę.

Oznaczyć w sposób określony w ust. 5.2 gęstość optyczną roztworów w partii wzorcowej przez porównanie z odpowiadającymi im roztworami w partii odniesienia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, nanosząc gęstości optyczne względem ilości gossypolu w µg.

6.2.2. Całkowity gossypol.

Przygotować 6 kolb miarowych o pojemności 50 ml. Do pierwszej kolby dodać 10 ml rozpuszczalnika B, o którym mowa w ust. 3.3, a do pozostałych odpowiednio 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 i 10,0 ml roztworu B wzorcowego gossypolu, o którym mowa w ust. 3.6. Każdą kolbę uzupełnić do objętości 10 ml rozpuszczalnikiem B, o którym mowa w ust. 3.3. Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną 1-propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1, i wymieszać.

Do każdej z dwóch partii po 6 kolb miarowych o pojemności 25 ml wprowadzić po 2 ml wyżej wspomnianych roztworów. Sześć kolb pierwszej partii, stanowiących partię odniesienia, uzupełnić do objętości 25 ml mieszaniną 1-propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1.

Do każdej kolby drugiej partii, stanowiącej partię wzorcową, dodać po 2 ml aniliny, o której mowa w ust. 3.4. Ogrzewać przez 30 minut na wrzącej łaźni wodnej. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną 1-propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1, homogenizować i odstawić na godzinę.

Oznaczyć w sposób określony w ust. 5.2 gęstość optyczną roztworów w partii wzorcowej przez porównanie z odpowiadającymi im roztworami w partii odniesienia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, nanosząc gęstości optyczne względem ilości gossypolu w µg.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność.

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

- 1) 15 % w wartości względnej dla zawartości gossypolu poniżej 500 ppm,
- 2) 75 ppm w wartości bezwzględnej dla zawartości gossypolu powyżej 500 do 750 ppm,
- 3) 10 % w wartości względnej dla zawartości gossypolu powyżej 750 ppm.

8.6. WYTYCZNE DOTYCZĄCE MIKROSKOPOWEJ IDENTYFIKACJI I OZNACZANIA SKŁADNIKÓW POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości składników pochodzenia zwierzęcego, za które uważa się produkty pozyskane podczas przetwarzania tusz lub części tusz ssaków, drobiu i ryb, w paszach przy zastosowaniu badania mikroskopowego. Dodatkowo, w celu zwiększenia wykrywalności lub aby określić pochodzenie pewnych rodzajów składników pochodzenia zwierzęcego, można przeprowadzić inne badanie, stosując metody alternatywne. W przypadku badania zawartości specyficznych składników pochodzenia zwierzęcego, takich jak badania zawartości plazmy lub kości w łoju, można ponadto zastosować postępowanie, o którym mowa w ust. 9.

2. CZUŁOŚĆ

Metodą mogą być wykrywane bardzo małe ilości, poniżej 0,1 %, składników pochodzenia zwierzęcego zależnie od rodzaju tych składników w paszach.

3. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Do badań wykorzystywana jest reprezentatywna próbka, która podlega odpowiedniemu przygotowaniu. Metoda ma zastosowanie do pasz o wilgotności do 14 %. Pasza o wilgotności powyżej 14 % powinna być przed obróbką wysuszona (zagęszczona). Pasze lub materiały paszowe, takie jak tłuszcze i oleje wymagają określonej obróbki, o której mowa w ust. 9. Składniki pochodzenia zwierzęcego są identyfikowane na podstawie typowych, mikroskopowo identyfikowalnych cech charakterystycznych, zwłaszcza włókien mięśniowych i innych cząstek tkanki mięsnej, chrząstki, kości, rogów, włosów, szczeciny, krwi, piór, skorup jaj, ości ryb, łusek. Identyfikacji poddać zarówno frakcję sitową, o której mowa w ust. 6.1, jak i zagęszczony osad, o którym mowa w ust. 6.2.

4. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

4.1. Odczynniki zanurzeniowe.

4.1.1. Hydrat chloralu (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 o lepkości od 68 do 81 do badania osadu.

4.2. Odczynniki chemiczne do płukania.

4.2.1. Alkohol, 96 %.

4.2.2. Aceton.

4.3. Odczynnik zagęszczający.

4.3.1. Czterochloroetylen o gęstości 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, którą uzyskuje się poprzez rozcieńczenie 2,5 ml 1M kwasu chlorowodorowego w 100 ml wody i dodanie 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.

4.5.1. Handlowy roztwór podchlorynu sodowego będący 9,6 % aktywnym chlorem.

5. APARATURA I SPRZĘT

5.1. Waga analityczna ważąca z dokładnością do 0,01 g, a w przypadku badania zagęszczonego osadu ważąca z dokładnością do 0,001 g.

5.2. Sprzęt do rozdrabniania, młynek lub moździerz, szczególnie w przypadku paszy zawierającej powyżej 15 % tłuszczu.

5.3. Sito o oczkach w kształcie kwadratu i szerokości 0,50 mm.

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 poddać co najmniej 50 g próbki, starannie zmielonej, przy zastosowaniu sprzętu do rozdrabniania, o którym mowa w ust. 5.2, jeżeli to konieczne, aby uzyskać odpowiednie rozdrobnienie. Ze zmielonego materiału pobrać dwie reprezentatywne próbki, każda o masie co najmniej 5 g, jedną do badania frakcji sitowej, o której mowa w ust. 6.1, a drugą do badania zagęszczonego osadu, o którym mowa w ust. 6.2. Dodatkowo, aby ułatwić identyfikację, można zastosować barwienie odczynnikami barwiącymi, o których mowa w ust. 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, o którym mowa w ust. 5.3, co najmniej 5 g próbki w celu otrzymania dwóch frakcji.

Frakcję sitową lub reprezentatywną jej część, zawierającą duże cząstki, rozsypać równomiernie na odpowiednim podłożu i przeglądać systematycznie pod mikroskopem stereoskopowym, o którym mowa w ust. 5.5, stosując różne powiększenia, poszukując składników pochodzenia zwierzęcego.

Preparaty wykonane z frakcji sitowej drobnej przeglądać systematycznie pod mikroskopem optycznym, o którym mowa w ust. 5.6, stosując różne powiększenia, 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 dnie, dodać co najmniej 50 ml czterochloroetylenu, o którym mowa w ust. 4.3.1. Mieszaninę wielokrotnie wstrząsać lub mieszać. Jeżeli jest stosowany zamknięty rozdzielacz, osad pozostawić co najmniej na 3 minuty przed oddzieleniem osadu. Powtórzyć wytrząsanie i pozostawić osad co najmniej na 3 minuty. Osad powinien oddzielić się ponownie. Jeżeli stosuje się zlewkę otwartą, osad powinien być pozostawiony co najmniej na 5 minut, zanim 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, o którym mowa w ust. 5.3, w dwóch frakcjach. Zbadać wysuszony osad na obecność składników kostnych pod mikroskopem stereoskopowym, o którym mowa w ust. 5.5, i mikroskopem optycznym, o którym mowa w ust. 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 chlorału, o którym mowa w ust. 4.1.1:

Ostrożnie ogrzewając, można zobaczyć wyraźniej struktury komórkowe, ponieważ ziarna skrobi żelują i niepożądana zawartość komórek zostaje usunięta.

Ług, o którym mowa w ust. 4.1.2:

Wodorotlenek sodu albo wodorotlenek potasu oczyszcza materiał paszowy, wspomagając wykrycie włókien mięśniowych, włosów i innych keratynowych struktur.

Olej parafinowy i gliceryna, o których mowa w ust. 4.1.3:

Składniki kostne mogą być dobrze zidentyfikowane, gdyż większość lakun wypełnia się powietrzem i są widoczne jako czarne otwory o rozmiarach od 5 do 15 µm.

Roztwór jodu w jodku potasu, o którym mowa w ust. 4.4.1:

Stosowany do wykrywania zawartości skrobi (kolor niebiesko-fioletowy) i białka (kolor żółtopomarańczowy). Roztwory można rozcieńczyć, jeżeli to konieczne.

Roztwór czerwieni alizarynowej, o której mowa w ust. 4.4.2:

Czerwonoróżowe zabarwienie kości, ości ryb i łusek. Przed wysuszeniem, o którym mowa w ust. 6.2, cały osad przenieść do szklanej probówki i przepłukać dwukrotnie około 5 ml alkoholu, o którym mowa w ust. 4.2.1. Za każdym razem stosować wytrząsarkę typu Vortex, pozostawić rozpuszczalnik przez minutę do osadzenia osadu i następnie go odlać. Przed zastosowaniem tego odczynnika osad wybielić przez dodanie co najmniej 1 ml roztworu podchlorynu sodowego, o którym mowa w ust. 4.5.1. Pozwolić na przebieg reakcji przez 10 minut. Probówkę napełnić wodą, osad powinien osadzać się przez od 2 do 3 minut, a wodę z zawieszonymi cząsteczkami wylać. Osad przepłukać dwukrotnie około 10 ml wody. Zastosować wirowanie, pozwolić na osadzenie się osadu i za każdym razem wylać wodę. Dodać od 2 do 10 lub więcej kropli w zależności od ilości pozostałego roztworu czerwieni alizarynowej. Mieszaninę wytrząsać i pozwolić na przebieg reakcji przez kilka sekund. Zabarwiony osad przepłukać dwukrotnie około 5 ml alkoholu, o którym mowa w ust. 4.2.1, a następnie raz acetonem, o którym mowa w ust. 4.2.2. Za każdym razem stosować wirowanie, doprowadzić do osadzania się rozpuszczalnika przez minutę i wylać go. Osad jest wówczas gotowy do wysuszenia.

Odczynnik cystynowy, o którym mowa w ust. 4.4.3:

Po ostrożnym ogrzewaniu składniki zawierające cystynę, zwłaszcza włosy i pióra, przybierają czarnobrązową barwę.

6.4. Badanie paszy na obecność mączki rybnej.

Zbadać pod mikroskopem optycznym co najmniej 1 preparat z frakcji sitowej drobnej i z frakcji osadu, o którym mowa w ust. 6.1 i ust. 6.2. Jeżeli na etykiecie jest informacja, że w składzie jest mączka rybna lub gdy istnieje podejrzenie występowania mączki rybnej lub została ona wykryta w badaniu wstępnym, zbadać dodatkowo co najmniej 2 preparaty z drobnej frakcji sitowej i cały osad.

7. OBLICZANIE WYNIKÓW

W przypadku przeprowadzania oceny ilościowej składników pochodzenia zwierzęcego postępować w sposób poniżej opisany.

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:

- 1) oszacowaną proporcję (% wagowy) fragmentów kości w zagęszczonym osadzie;
- 2) proporcję kości (% wagowy) w składnikach pochodzenia zwierzęcego.

Szacowania składników pochodzenia zwierzęcego w materiale próbki dokonać z wykorzystaniem co najmniej trzech preparatów, jeżeli to możliwe, zawierających co najmniej 5 pól każdy. W mieszkach 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.

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 w mg osadu,

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 w mg materiału próbki służącej do wytworzenia osadu.

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, i 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 w mg osadu,

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 w mg materiału próbki służącej do wytworzenia osadu.

8. WYRAŻANIE WYNIKÓW

Sprawozdanie powinno zawierać co najmniej informacje o występowaniu składników pochodzenia zwierzęcego ze zwierząt lądowych i z mączki rybnej. Informacje sformułować w podany niżej sposób:

8.1. W odniesieniu do występowania składników pochodzących ze zwierząt lądowych:

1) nie stwierdzono, przy użyciu mikroskopu, w badanej próbce żadnych składników pochodzących ze zwierząt lądowych albo

2) stwierdzono, przy użyciu mikroskopu, w badanej próbce składniki pochodzące ze zwierząt lądowych.

8.2. W odniesieniu do występowania mączki rybnej:

1) nie stwierdzono, przy użyciu mikroskopu, w badanej próbce żadnych składników pochodzących z mączki rybnej albo:

2) stwierdzono, przy użyciu mikroskopu, w badanej próbce składniki pochodzące z mączki rybnej.

W przypadku gdy zostanie stwierdzone występowanie składników pochodzących z ryb lub ze zwierząt lądowych, w sprawozdaniu z badań, jeżeli to konieczne, 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, w tym włókna mięśniowe, chrząstka, kości, rogi, sierść, szczecina, pióra, krew, skorupy jaj, ości ryb, łuski.

W przypadku gdy szacuje się ilość składników zwierzęcych, wymienić zastosowany współczynnik korekcyjny f.

W przypadku gdy zidentyfikowane są składniki kostne zwierząt lądowych, w sprawozdaniu umieścić dodatkową informację o następującej treści: „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 występuje w postaci stałej, ogrzewać, zwłaszcza w kuchence mikrofalowej, aż do uzyskania postaci płynnej.

Przy użyciu pipety przenieść 40 ml tłuszczu z dna próbki do próbki wirowkowej. Wirować przez 10 minut przy 4 000 obr/min.

Jeżeli tłuszcz jest zestalony po odwirowaniu, ogrzać, go jeszcze raz, zwłaszcza używając kucharki mikrofalowej, aż do uzyskania postaci płynnej. Ponownie wirować przez 5 minut przy 4 000 obr/min.

Przy użyciu małej łyżki lub łopatkę laboratoryjnej przenieść połowę zdekantowanych zanieczyszczeń na płytkę Petriego lub na szkiełko mikroskopowe w celu dokonania mikroskopowej identyfikacji ewentualnej zawartości składników pochodzenia zwierzęcego, takich jak włókna mięśniowe, pióra, fragmenty kostne. Jako środek zanurzeniowy stosowany w badaniach mikroskopowych zaleca się olej parafinowy lub glicerynę.

Pozostałe zanieczyszczenia poddać sedimentacji w sposób określony w ust. 6.2.

8.7. OZNACZANIE LOTNYCH ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH

A. METODA MIKRODYFUZYJNA

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania w paszach zawartości lotnych związków azotowych w przeliczeniu na amoniak.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest ekstrahowana wodą, a uzyskany roztwór klarowany i filtrowany. Lotne zasady azotowe są oddzielane metodą mikrodyfuzji przy użyciu roztworu węglanu potasu, zbierane w roztworze kwasu bornego i miareczkowane kwasem siarkowym.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas trójchlorooctowy, roztwór 20 % (m/V).

3.2. Wskaźnik:

Rozpuścić 33 mg zieleni bromokrezolowej i 65 mg czerwieni metylowej w 100 ml alkoholu etylowego o stężeniu od 95 do 96 % (m/V).

3.3. Kwas borowy, 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, o którym mowa w ust. 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 przefiltrować.

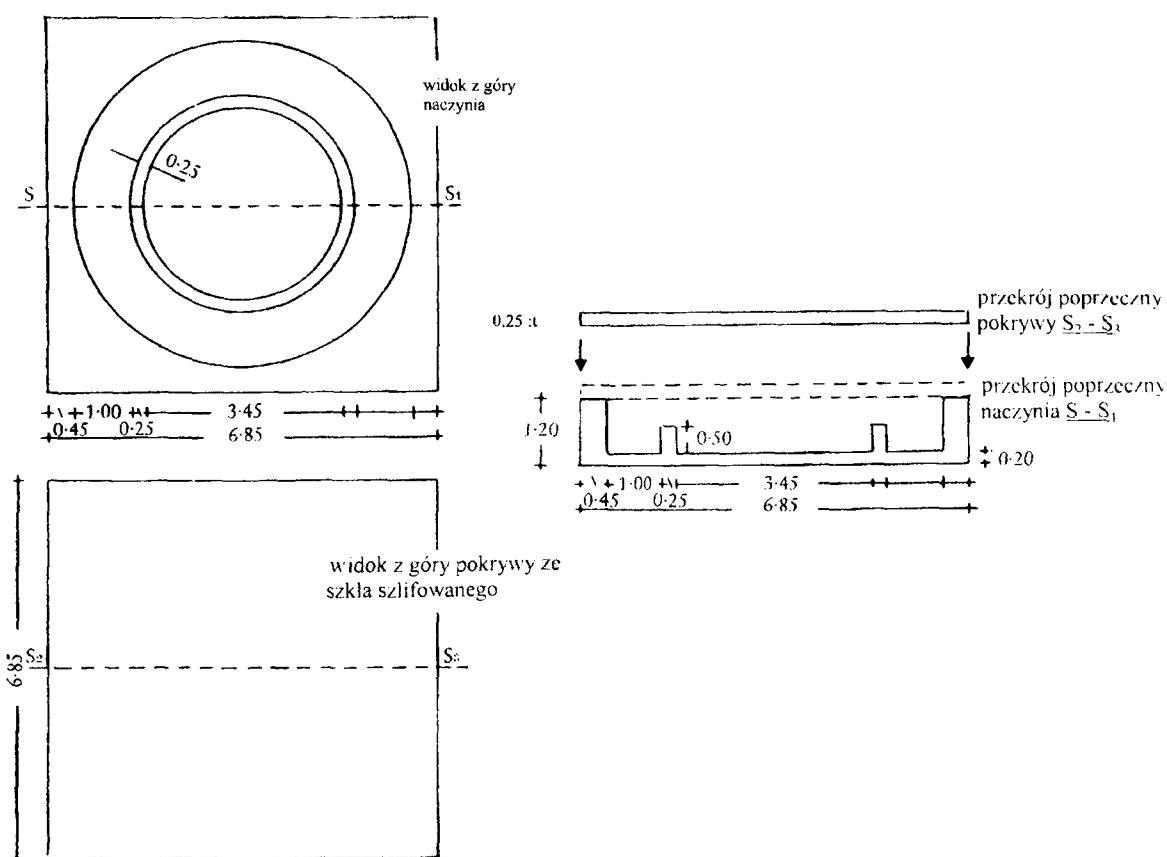
3.5. Kwas siarkowy o stężeniu 0,02 N.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Mikser lub tumbler: od 35 do 40 obr/min.

4.2. Naczynko Conwaya, szklane lub plastikowe (rys. 9).

4.3. Mikrobiureta ze skalą 1/100 ml.



rysunek 9. Naczynko Conwaya
skala 1:1

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, o którym mowa w ust. 3.1, uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby, energicznie wstrząsnąć i przefiltrować przez karbowany filtr. Dodać przy użyciu pipety 1 ml roztworu kwasu borowego, o którym mowa w ust. 3.3, do środkowej części naczynka Conwaya i 1 ml filtratu próbki na obrzeże naczynka. Przykryć częściowo nasmarowaną przykrywką. Dodać kroplami 1 ml nasyconego roztworu węgla potasu, o którym mowa w ust. 3.4, na obrzeże naczynka i szybko zamknąć pokrywę, 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 godzinę w temperaturze 40 °C. Miareczkować lotne zasady zaabsorbowane w kwasie borowym, stosując roztwór kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.5, przy użyciu mikrobiurety, o której mowa w ust. 4.3. Ślepą próbę przeprowadzić w ten sam sposób.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

1 ml H_2SO_4 o stężeniu 0,02 N odpowiada 0,34 mg amoniaku. Przedstawić wynik w procentach wagowych.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność.

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

- 1) 10 % wartości względnej dla zawartości amoniaku poniżej 1,0 %;
- 2) 0,1 % wartości bezwzględnej dla zawartości amoniaku równej lub wyższej niż 1,0 %.

8. OBJAŚNIENIA

Jeżeli zawartość amoniaku w próbce przekracza 0,6 %, rozcieńczyć filtrat.

B. METODA DESTYLACYJNA

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest ekstrahowana wodą, a uzyskany roztwór klarowany i filtrowany. Lotne zasady azotowe są oddzielane w punkcie wrzenia poprzez dodanie tlenu magnezu i zbierane w określonej ilości kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany przy użyciu roztworu wodorotlenku sodu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- 3.1. Kwas trójchlorooctowy, roztwór 20 % (m/V).
- 3.2. Tlenek magnezu.
- 3.3. Emulsja zapobiegająca spienieniu; proponuje się zastosować silikon.
- 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 lub tumbler: od 35 do 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, o którym mowa w ust. 3.1, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, energicznie wstrząsnąć i filtrować przez karbowany filtr. Pobrać taką ilość klarownego filtratu, która odpowiada spodziewanej zawartości lotnych związków azotowych, co zwykle odpowiada objętości 100 ml. Rozcieńczyć do 200 ml, dodać 2 g tlenu magnezu, o którym mowa w ust. 3.2, i kilka kropli emulsji zapobiegającej spienieniu, o której mowa w ust. 3.3. Roztwór powinien wykazywać alkaliczność wobec papierka lakmusowego, w przeciwnym razie dodać nieco tlenu magnezu, o którym mowa w ust. 3.2. Destylować około 150 ml roztworu w aparacie Kjeldahla i zebrać destylat w kolbie Erlenmeyera zawierającej od 25 do 50 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.4. W czasie destylacji chronić roztwór przed przegrzaniem. Gotować roztwór kwasu siarkowego przez 2 minuty, schłodzić i odmiareczkować nadmiar kwasu wodorotlenkiem sodu, o którym mowa w ust. 3.5, w obecności czerwieni metylowej, o której mowa w ust. 3.6. Ślełą próbę przeprowadzić 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

7.1. Powtarzalność.

Różnica pomiędzy wynikami dwóch równoległych oznaczeń, wykonanych dla tej samej próbki, nie powinna przekraczać 10 % wartości względnej.

8.8. OZNACZANIE POZIOMÓW DIOKSYN I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania w paszach zawartości dioksyn (polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD) i polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF)) oraz dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB).

2. MONITOROWANIE OBECNOŚCI DIOKSYN

Monitorowanie obecności dioksyn w paszach wykonuje się przy zastosowaniu strategii uwzględniającej zastosowanie metody skryningowej (przesiewowej) w celu wyselekcjonowania próbek zawierających dioksyny i dioksynopodobne PCB na poziomie od 30 % do 40 % niższym lub wyższym od poziomu zainteresowania. Stężenia dioksyn w tych próbkach, które zawierają znaczące ich poziomy, powinny zostać oznaczone lub potwierdzone przy zastosowaniu metody dostarczającej pełnej lub uzupełniającej informacji, pozwalającej na identyfikację i kwantyfikację dioksyn oraz dioksynopodobnych PCB na poziomie zainteresowania.

Metody skryningowe (przesiewowe) służą do wykrywania występowania dioksyn i dioksynopodobnych PCB na poziomie zainteresowania. Metody te są wydajne, pozwalają na analizę dużej liczby próbek i są stosowane do oddzielenia wielu próbek potencjalnie pozytywnych. Są tak zaprojektowane, aby ograniczały liczbę wyników fałszywie negatywnych.

Metody potwierdzające są metodami dostarczającymi pełnej lub uzupełniającej informacji, pozwalają na identyfikację i kwantyfikację dioksyn oraz dioksynopodobnych PCB na poziomie zainteresowania.

3. OBJAŚNIENIA

Ze względu na występowanie złożonych mieszanin różnych kongenerów dioksyn w próbkach środowiskowych i biologicznych (włączając w to próbki pasz), w celu ułatwienia oceny ryzyka wprowadzono pojęcie tzw. współczynników równoważnej toksyczności – TEF (Toxicity Equivalency Factors). Współczynniki te zostały opracowane w celu wyrażenia stężeń w postaci równoważników toksyczności – TEQ (Toxicity Equivalent) wobec 2,3,7,8-TCDD w przypadku mieszanin PCDD i PCDF mających podstawniki w pozycjach 2,3,7,8, a ostatnio także niektórych PCB mających podstawnik chloru w pozycjach non-orto i mono-orto, które mają podobną do dioksyn aktywność, przy uwzględnieniu tabeli 29.

W celu obliczenia całkowitego stężenia związków dioksynopodobnych, wyrażonego w wartości TEQ, stężenia poszczególnych kongenerów oznaczonych w danej próbce mnoży się przez ich TEF, a następnie sumuje.

Koncepcja „górnego granicy” (*upperbound*) wymaga, aby wkład do TEQ każdego nieoznaczonego ilościowo kongeneru stanowiła jego granica oznaczenia ilościowego.

Koncepcja „dolnej granicy” (*lowerbound*) wymaga, aby wkład do TEQ każdego nieoznaczonego ilościowo kongeneru stanowiło zero.

Koncepcja „średniej granicy” (*mediumbound*) wymaga, aby wkład do TEQ każdego nieoznaczonego ilościowo kongeneru stanowiła połowa granicy oznaczania ilościowego.

Akceptowalnym limitem kwantyfikacji poszczególnego kongeneru jest stężenie analitu w ekstrakcie próbki, które wywołuje instrumentalną reakcję na impuls dla dwóch różnych jonów, rejestrowaną przy współczynniku S/N (sygnał/szum)

w stosunku 3:1 dla sygnału mniej wrażliwego i przy spełnieniu podstawowych wymagań, takich jak czas retencji oraz stosunek izotopów, zgodnie z procedurą oznaczania, o której mowa w ust. 8.7.

Tabela 29. Tabela dioksynopodobnych (PCB)

Kongener	Wartość TEF	Kongener	Wartość TEF
Dibenzo-p-dioksyny (PCDD)		<i>„Dioksynopodobne” PCB: Non-orto PCB + Mono-orto PCB</i>	
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		
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		

T – tetra (cztery); Pe – penta (pięć); Hx – heksa (sześć); Hp – hepta (siedmio); O – octa (ośmio); CDD – chlorodibenzo-p-dioksyna; CDF – chlorodibenzofuran; CB – chlorobifenyl

4. WYMAGANIA W ZAKRESIE SPOSOBU POBIERANIA I PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO ANALIZY

Próbki przeznaczone do oznaczenia zawartości poziomów dioksyn (PCDD/PCDF) oraz dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w paszach, przy uwzględnieniu tabeli 29, pobiera się zgodnie z przepisami rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 17 czerwca 2004 r. w sprawie szczegółowych warunków i sposobu pobierania próbek środków żywienia zwierząt i pasz leczniczych do badań oraz postępowania z pobranymi próbkami w ramach kontroli urzędowej (Dz. U. Nr 158, poz. 1654). Stosować wymagania ilościowe w stosunku do kontroli substancji lub produktów jednolicie rozmieszczonych w paszy, o których mowa w § 1 pkt 1, § 4 ust. 1–2 i 5, § 6 ust. 1 i 3 oraz § 8 ust. 1–2 tego rozporządzenia. Uzyskane w ten sposób próbki ogólne uważa się za reprezentatywne dla partii lub jej wydzielonej części, z których pochodzi. Zgodność partii lub jej wydzielonej części z dopuszczalną zawartością określoną w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 28 czerwca 2004 r. w sprawie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszach (Dz. U. Nr 162, poz. 1704 oraz z 2005 r. Nr 151, poz. 1267) ustala się na podstawie zawartości stwierdzonych w próbkach laboratoryjnych.

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) wykonać analizę próbki odczynnikowej obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej z wyłączeniem próbki;
- 5) masa próbki użytej do ekstrakcji powinna być odpowiednia do wymagań czułości metody.

5. ZGODNOŚĆ PARTII LUB JEJ WYDZIELONEJ CZĘŚCI ZE SPECYFIKACJĄ

Jeżeli wynik pojedynczej analizy nie przekracza dopuszczalnej zawartości określonej w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 28 czerwca 2004 r. w sprawie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszach, uwzględniając przy tym niepewność pomiaru, badaną partię uznaje się za spełniającą wymagania określone w tym rozporządzeniu.

Jeżeli wynik analizy potwierdzony drugą analizą i obliczony jako średnia co najmniej dwóch oddzielnych pomiarów przekracza dopuszczalną zawartość określoną w tym rozporządzeniu, uwzględniając przy tym niepewność pomiaru, badaną partię uznaje się za niespełniającą wymagań względem dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszy.

Niepewność pomiaru może być uwzględniona przy zastosowaniu jednego z następujących sposobów:

- 1) obliczając niepewność rozszerzoną przy użyciu współczynnika rozszerzenia 2, który daje dokładność wyniku na poziomie 95 %;
- 2) ustalając wartość graniczną (cc α) zgodnie z decyzją Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonującą dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz. Urz. WE L 221 z 17.08.2002, str. 8) – przypadek substancji z ustaloną dopuszczalną wartością graniczną, o którym mowa w pkt 3.1.2.5. załącznika.

Niniejsze zasady interpretacji odnoszą się do wyniku analizy uzyskanego z próbki przeznaczonej do urzędowej kontroli. Nie wpływają one na prawo państw członkowskich do stosowania zasad krajowych w odniesieniu do analiz do celów obrony lub arbitrażu, o których mowa w art. 44 ust. 10 i art. 44a ustawy z dnia 23 sierpnia 2001 r. o środkach żywienia zwierząt.

6. WYMAGANIA DOTYCZĄCE LABORATORIÓW WYKONUJĄCYCH BADANIA

1) Laboratorium powinno wykazać możliwości wykonawcze metody na poziomie zainteresowania, na przykład 0,5-, 1- i 2-krotny poziom zainteresowania wraz z akceptowalną wartością współczynnika zmienności obliczonego dla wielokrotnych powtórzeń analizy. Szczegóły kryteriów akceptacji procedury analitycznej określono w ust. 7.

2) Granica oznaczalności metody potwierdzającej powinna wynosić około 1/5 poziomu zainteresowania, aby gwarantować, że akceptowalny współczynnik zmienności znajdzie się w zakresie danego poziomu zainteresowania.

3) W ramach wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości próbki odczynnikowe i wzbogacone lub próbki kontrolne, a zwłaszcza certyfikowane materiały odniesienia, jeżeli takie materiały są dostępne, powinny być regularnie analizowane.

4) Potwierdzeniem biegłości laboratorium w zakresie danych analiz są pozytywne wyniki uzyskiwane w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości. Jednakże pozytywne wyniki uzyskane w badaniach międzylaboratoryjnych, w tym w badaniach próbek gleby lub osadów dennych, nie muszą jednocześnie oznaczać podobnej kompetencji w analizie żywności lub pasz, które zawierają niższe poziomy skażeń. Dlatego obowiązkowe jest stałe uczestnictwo w międzylaboratoryjnych badaniach biegłości w zakresie oznaczania dioksyn i PCB o właściwościach dioksynopodobnych w odpowiednich próbkach środków spożywczych lub pasz.

5) Laboratoria powinny posiadać akredytację udzieloną przez Polskie Centrum Akredytacji, zgodnie z wymaganiami normy PN EN ISO/IEC 17025:2001.

7. WYMAGANIA DOTYCZĄCE PROCEDUR ANALITYCZNYCH

7.1. Wysoka czułość i niska granica wykrywalności.

Metody oznaczania PCDD i PCDF powinny umożliwiać ich wykrywanie na poziomie pikogramów TEQ (10^{-12} g) ze względu na bardzo dużą toksyczność niektórych związków. PCB występują w wyższych stężeniach niż PCDD i PCDF. Dla większości kongenerów 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.

7.2. Wysoka selektywność (specyficzność).

W przypadku analizy PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB niezbędne jest ich odróżnienie od wielu współekstrahujących i ewentualnie interferujących substancji występujących w stężeniach do kilku wielkości wyższych od analizowanych związków. Stosowane metody chromatografii gazowej z wykorzystaniem detektora masowego (GC/MS) powinny umożliwić rozróżnienie kongenerów toksycznych, a w szczególności siedemnastu 2,3,7,8-podstawionych kongenerów PCDD i PCDF oraz PCB, od pozostałych kongenerów. Testy biologiczne powinny oznaczyć selektywnie TEQ jako sumę PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB.

7.3. Wysoka dokładność (poprawność i precyzja).

Oznaczenie powinno dostarczyć wiarygodnego oszacowania 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:

1) poprawność rozumiana jako różnica między średnią wartością stężenia analitu zmierzoną w materiale certyfikowanym a deklarowaną, certyfikowaną wartością, wyrażoną jako jej odsetek;

2) precyzja wyrażana liczbowo jako wartość odchylenia standardowego w warunkach powtarzalności i odtwarzalności oraz określająca stopień zgodności między wynikami uzyskanymi przy wielokrotnym wykorzystaniu procedury badawczej.

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 30.

Tabela 30. Kryteria do oznaczania sumarycznej wartości TEQ

	Metody skринingowe (przesiewowe)	Metody potwierdzające
Częstość wyników fałszywie negatywnych	< 1 %	
Poprawność		od -20 % do +20 %
Współczynnik zmienności, cv	< 30 %	< 15 %

8. WYMAGANIA DLA METOD GC/MS W METODACH SKRININGOWYCH (PRZESIEWOWYCH) LUB POTWIERDZAJĄCYCH

8.1. 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, dodawać na wstępnych etapach metody, w szczególności przed ekstrakcją. 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 podstawowych wewnętrznych wzorców PCDD/F znakowanych izotopem węgla ^{13}C oraz wszystkie dwanaście dioksynopodobnych PCB znakowanych izotopem węgla ^{13}C , jeżeli ta grupa związków ma być oznaczana. Wykorzystując odpowiednie roztwory wzorcowe, oznaczyć również względne współczynniki odpowiedzi dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ^{13}C .

8.2. Przed procedurą ekstrakcji, w przypadku pasz pochodzenia roślinnego oraz pasz pochodzenia zwierzęcego o zawartości tłuszczu poniżej 10 %, obowiązkowe 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, poddać walidacji.

8.3. Przed analizą GC/MS dodać do próbki 1 lub 2 wzorce odzysku.

8.4. Sprawdzenie odzysku jest niezbędne. Odzysk dla poszczególnych wzorców wewnętrznych w metodach potwierdzających powinien 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) odzysk może zawierać się w granicach od 30 do 140 %.

8.5. 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.

8.6. Sprawność rozdzielania izomerów przy chromatografii gazowej powinna być wystarczająca poniżej 25 % nakładania się pików 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF.

8.7. Oznaczanie powinno być wykonywane zgodnie z metodą EPA 1613, korekta B: w celu oznaczenia tetra- do oktachlorowanych dioksyn i furanów zastosować metodę rozcieńczeń izotopowych HRGC/HRMS lub inną, o równoważnych parametrach.

8.8. Dla pasz o zawartości dioksyn równej lub wyższej niż dopuszczalna ich zawartość, różnica między wynikami obliczonymi zgodnie z koncepcją „górną i dolną granicą” oznaczalności 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 %.

9. SKRININGOWE (PRZESIEWOWE) METODY ANALIZY

W ramach metod skринingowych (przesiewowych) rozróżnia się klasyczne metody wstępne oraz analizę ilościową.

9.1. Klasyczne metody wstępne. W tych metodach porównuje się wartość sygnału uzyskanego w badanej próbce z wartością sygnału uzyskanego w próbce referencyjnej zawierającej analit na poziomie zainteresowania. Próbki, dla których 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:

9.1.1. W każdej partii 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.

9.1.2. W celu wykazania sprawności metody na poziomie zainteresowania w badaniach kontrolnych zbadać dodatkowe próbki referencyjne zawierające 50 i 200 % poziomu zainteresowania analitu.

9.1.3. W przypadku badania innych matryc 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.

9.1.4. Badanie powtarzalności pozwalającej na uzyskanie informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej partii próbek jest szczególnie istotne w przypadku, gdy w testach biologicznych niemożliwe jest zastosowanie wzorców wewnętrznych. Wartość współczynnika zmienności nie może przekraczać 30 %.

9.1.5. W przypadku testów biologicznych zdefiniować badane związki, możliwe interferencje oraz najwyższą dopuszczalną wielkość sygnału próbki odczynnikowej.

9.2. Analiza ilościowa wymaga użycia serii rozcieńczonych wzorcowych roztworów, 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, uwzględniając obecność zanieczyszczeń w rozpuszczalnikach i użytych odczynnikach, oraz odzysk obliczony na podstawie wartości TEQ oznaczonej w próbce kontroli jakościowej w zakresie limitu zainteresowania. Część obserwowanych strat odzysku jest spowodowana oddziaływaniem matrycy lub różnicami między wartościami współczynników toksyczności (TEF) wykorzystywanymi w testach biologicznych oraz oficjalnymi wartościami TEF przyjętymi przez Światową Organizację Zdrowia (WHO).

10. OGÓLNE WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ SKRININGOWE (PRZESIEWOWE) METODY ANALIZY

10.1. Do badań skринingowych (przesiewowych) można stosować metody GC/MS oraz testy biologiczne. Przestrzegać wymagań dla metod GC/MS określonych w ust. 8. Wymagania dla biologicznych testów komórkowych określono w ust. 11, a dla zestawów do testów biologicznych w ust. 12.

10.2. Niezbędne jest 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 przy zastosowaniu metod potwierdzających. Rzeczywista częstość występowania wyników fałszywie ujemnych

nie powinna przekraczać 1 %. Częstość uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich powinna być na tyle niska, aby można było wykorzystać zalety metod skringingowych.

10.3. Wyniki pozytywne zawsze potwierdzać przy zastosowaniu analizy potwierdzającej HRGC/HRMS. Oprócz tego od 2 do 10 % próbek ujemnych potwierdzać techniką HRGC/HRMS. Powinna być znana korelacja pomiędzy biotestem a metodą HRGC/HRMS.

11. SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ BIOLOGICZNE TESTY KOMÓRKOWE

11.1. W czasie wykonywania testów biologicznych w każdej serii powinno się uwzględnić zestaw referencyjnych stężeń TCDD lub mieszaniny dioksyn i furanów (pełna krzywa dawka-efekt, $R^2 > 0,95$). Dla celów badań skringingowych (przesiewowych) można zastosować rozszerzoną krzywą wzorcową dla próbek zawierających niskie poziomy analitu.

11.2. Do oceny sprawności testu biologicznego powinny służyć wyniki badania referencyjnego stężenia TCDD (około trzykrotna granica oznaczalności) nanoszone na karty kontrolne w stałych odstępach czasu. Alternatywnie można zastosować względną odpowiedź próbki referencyjnej w porównaniu do krzywej kalibracyjnej TCDD, ponieważ odpowiedź komórkowa może zależeć od wielu czynników.

11.3. Dla każdego rodzaju materiału referencyjnego powinny być prowadzone i sprawdzane karty kontrolne jakości (QC chart) w celu zapewnienia, że wyniki są zgodne z deklarowanymi wytycznymi.

11.4. Przy oznaczeniach ilościowych zwracać uwagę, aby zastosowane rozcieńczenie próbki mieściło się w zakresie liniowym krzywej kalibracji. Próbki, których sygnał przekracza liniowy zakres krzywej kalibracji, rozcieńczyć i ponownie oznaczyć. Zaleca się jednoczesne badanie co najmniej trzech rozcieńczeń.

11.5. Procentowe odchylenie standardowe nie powinno być większe niż 15 % dla trzykrotnej analizy każdego rozcieńczenia próbki oraz nie może przekraczać 30 % dla wyników uzyskanych w trzech niezależnych eksperymentach.

11.6. Granicę wykrywalności można ustalić jako 3-krotne odchylenie standardowe próbki odczynnikowej lub sygnału tła. Inną metodą jest wykorzystanie sygnału wyższego od tła (pięciokrotna wartość próbki odczynnikowej) wyznaczonego na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia.

Granicę oznaczalności można ustalić jako 5–6-krotną wartość odchylenia standardowego próbki odczynnikowej lub sygnału tła lub zastosować sygnał powyżej tła (dziesięciokrotna wartość próbki odczynnikowej) wyznaczony na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia.

12. SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ TESTY BIOLOGICZNE¹⁰⁾

12.1. Przestrzegać dostarczonych przez producenta instrukcji przygotowania próbek i ich analizy.

12.2. Zestawy do testów biologicznych nie mogą być wykorzystywane po upływie daty ważności.

12.3. Nie wolno używać materiałów lub składników przeznaczonych do wykorzystania w innych zestawach.

12.4. Zestawy do testów biologicznych powinny być przechowywane oraz używane do badań w temperaturze podanej w instrukcji.

12.5. W przypadku testów immunologicznych granicę wykrywalności określa się jako sumę średniej i trzykrotnego odchylenia standardowego obliczonego na podstawie wyników 10 analiz próbek odczynnikowych podzieloną przez współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej wyznaczonej równaniem regresji liniowej.

12.6. Stosować wzorce referencyjne w celu kontroli, czy ich odpowiedź mieści się w akceptowanym zakresie.

13. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

Wyniki analiz zawartości dioksan i dioksynopodobnych PCB powinny być przedstawione w sprawozdaniu z badań, które powinno zawierać:

- 1) jeżeli pozwala na to zastosowana procedura analityczna, poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i PCB – wyniki analiz powinny być przedstawione zgodnie z górną, dolną i średnią granicą ich wkładu do TEQ, w celu dostarczenia w sprawozdaniu z badań jak największej ilości informacji, a tym samym umożliwiając interpretację uzyskanych wyników w zależności od określonych wymagań;
- 2) informację o zawartości lipidów w próbce oraz o zastosowanej metodzie ich ekstrakcji.

Informacje na temat odzysku wszystkich zastosowanych wzorców wewnętrznych powinny być dostępne w przypadku, gdy wartości odzysku wykraczają poza granice określone w ust. 8, w razie przekroczenia dopuszczalnej zawartości lub w innych przypadkach.

ROZDZIAŁ 9

BADANIE NIEBIAŁKOWYCH ZWIĄZKÓW AZOTOWYCH

OZNACZANIE MOCZNIKA

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości mocznika w paszach.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka ze środkiem klarującym tworzy w wodzie zawiesinę. Suspensja jest filtrowana.

Zawartość mocznika w filtracie jest oznaczana po dodaniu 4-dwumetyloaminobenzaldehydu (4-DMAB) poprzez pomiar gęstości optycznej przy długości fali 420 nm.

¹⁰⁾ Dotychczas nie ma informacji o dostępnych w handlu zestawach do testów biologicznych charakteryzujących się dostateczną czułością i wiarygodnością, które umożliwiałyby ich wykorzystywanie w skringingowych (przesiewowych) badaniach obecności określonych poziomów dioksyn w próbkach środków spożywczych i paszy.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Roztwór 4-dwumetyloaminobezaldehydu:

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 do objętości 1 litra wodą.

3.3. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić do objętości 1 litra wodą.

3.4. Aktywny węgiel nieabsorbujący mocznika (sprawdzony).

3.5. Roztwór 0,1 % (m/V) mocznika.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Mikser lub 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 próbki.

Odważyć 2 g próbki, z dokładnością do 1 mg, i umieścić razem z 1 g aktywnego węgla, o którym mowa w ust. 3.4, w kolbie miarowej o pojemności 500 ml. Dodać 400 ml wody i po 5 ml roztworu Carreza I, o którym mowa w ust. 3.2, i Carreza II, o którym mowa w ust. 3.3. Mieszać przez 30 minut w mikserze, o którym mowa w ust. 4.1. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, wstrząsnąć i przefiltrować.

Do probówek, o których mowa w ust. 4.2, przenieść po 5 ml przezroczystego, bezbarwnego filtratu, dodać 5 ml roztworu 4-DMAB, o którym mowa w ust. 3.1, i zamieszać. Wstawić probówki do łaźni wodnej ustawionej na temperaturę 20 °C. Po 15 minutach zmierzyć gęstość optyczną roztworu próbki spektrofotometrem, przy długości fali 420 nm. Pomiar wykonać względem ślepej próby odczynnikowej.

5.2. Krzywa kalibracyjna.

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml nalać 1,0, 2,0, 4,0, 5,0 i 10,0 ml roztworu mocznika, o którym mowa w ust. 3.5, i uzupełnić do pełnej objętości kolb wodą. Odląć 5 ml każdego z roztworów, dodać do każdej probówki po 5 ml roztworu 4-DMAB, o którym mowa w ust. 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 kalibracyjną.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie krzywej kalibracyjnej oznaczyć zawartość mocznika w próbce. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. OBJAŚNIENIA

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 niższej zawartości mocznika zwiększać masę próbki do czasu, aż filtrat stanie się przezroczysty i bezbarwny.

7.3. Jeżeli próbka zawiera proste związki azotowe, takie jak aminokwasy, gęstość optyczną mierzyć przy długości fali 435 nm.