



DZIENNIK USTAW RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

Warszawa, dnia 27 sierpnia 2007 r.

Nr 154

TREŚĆ:
Poz.:

ROZPORZĄDZENIA:

- 1086** — Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 czerwca 2007 r. w sprawie metodyki postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych 11261
- 1087** — Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 sierpnia 2007 r. w sprawie zwalczania i zapobiegania rozprzestrzenianiu się zachodniej kukurydzianej stonki korzeniowej . 11383

1086

ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI¹⁾

z dnia 27 czerwca 2007 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 pkt 2 ustawy z dnia 22 lipca 2006 r. o paszach (Dz. U. Nr 144, poz. 1045) zarządza się, co następuje:

§ 1. Metodyka postępowania analitycznego w zakresie określania zawartości składników pokarmowych i dodatków paszowych w materiałach paszowych, premiksach, mieszankach paszowych i paszach leczniczych jest określona w załączniku do rozporządzenia.

§ 2. Traci moc rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi 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 leczniczych (Dz. U. Nr 54, poz. 389).

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

Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi: w z. *M. Jabłoński*

¹⁾ Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rolnictwo, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 1 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 18 lipca 2006 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 131, poz. 915 oraz z 2007 r. Nr 38, poz. 244).

²⁾ Przepisy niniejszego rozporządzenia wdrażają postanowienia:

- pierwszej 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, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 1, str. 237, z późn. zm.),
- drugiej dyrektywy Komisji 71/393/EWG z dnia 18 listopada 1971 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 279 z 20.12.1971, str. 7, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 1, str. 277, z późn. zm.),
- trzeciej dyrektywy Komisji 72/199/EWG z dnia 27 kwietnia 1972 r. ustalającej wspólnotowe metody analiz do celów urzędowej kontroli pasz (Dz. Urz. WE L 123 z 29.05.1972, str. 6, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 1, str. 306, z późn. zm.),
- czwartej 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, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 2, str. 12, z późn. zm.),
- siódmej 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, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 3, str. 28, z późn. zm.),

- ósmej 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, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 3, str. 250, z późn. zm.),
- dziewiątej 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),
- dziesiątej 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 06.09.1984, str. 34; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 6, str. 111),
- jedenastej dyrektywy Komisji 93/70/EWG z dnia 28 lipca 1993 r. ustanawiającej wspólnotowe metody analiz 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),
- dwunastej 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),
- 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),
- 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 dyrektywę 71/250/EWG, 73/46/EWG i uchylającej dyrektywę 74/203/EWG (Dz. Urz. WE L 118 z 06.05.1999, str. 36, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 25, str. 235),
- 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 06.08.1999, str. 13; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 26, str. 250),
- 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),
- dyrektywy Komisji 2002/70/WE z dnia 26 lipca 2002 r. ustanawiającej wymagania dotyczące oznaczania poziomów dioksyn i dioksynopochodnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w paszach (Dz. Urz. WE L 209 z 06.08.2002, str. 15, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 36, str. 430, z późn. zm.),
- 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; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 41, str. 540).

Załącznik do rozporządzenia Ministra Rolnictwa
i Rozwoju Wsi z dnia 27 czerwca 2007 r. (poz. 1086)

**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	11266
1.1.	Przygotowanie próbek do badań	11266
1.2.	Wytyczne dotyczące odczynników i aparatury używanej w metodyce postępowania analitycznego	11266
1.3.	Stosowanie metodyki postępowania analitycznego i wyrażanie wyników	11267
ROZDZIAŁ 2	Badanie podstawowych składników pokarmowych	11267
2.1.	Oznaczanie białka ogólnego metodą Kjeldahla	11267
2.2.	Oznaczanie ogólnych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym	11269
2.2.1.	Oznaczanie aktywności pepsyny	11270
2.3.	Oznaczanie wilgotności	11271
2.4.	Oznaczanie wilgotności olejów i tłuszczów	11273
2.5.	Oznaczanie popiołu surowego	11273
2.6.	Oznaczanie popiołu nierozpuszczalnego w kwasie chlorowodorowym	11274
2.7.	Oznaczanie włókna surowego	11275
2.8.	Oznaczanie surowego oleju i tłuszczu	11276
2.9.	Oznaczanie skrobi metodą polarymetryczną	11278
2.10.	Oznaczanie cukrów	11280
2.11.	Oznaczanie laktozy	11282
ROZDZIAŁ 3	Badanie aminokwasów	11283
3.1.	Oznaczanie aminokwasów	11283
3.2.	Oznaczanie tryptofanu	11289
ROZDZIAŁ 4	Badanie składników mineralnych	11294
4.1.	Oznaczanie wapnia	11294
4.2.	Oznaczanie sodu	11295
4.3.	Oznaczanie potasu	11296

4.4.	Oznaczanie chlorków	11297
4.5.	Oznaczanie magnezu	11298
4.6.	Oznaczanie całkowitej zawartości fosforu metodą fotometryczną	11299
4.7.	Oznaczanie węglanów	11300
4.8.	Oznaczanie żelaza, miedzi, manganu i cynku	11302
ROZDZIAŁ 5	Badanie witamin	11305
5.1.	Oznaczanie witaminy A metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	11305
5.2.	Oznaczanie witaminy E metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	11310
ROZDZIAŁ 6	Badanie stymulatorów wzrostu	11314
6.1.	Oznaczanie wirginiamycyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	11314
6.2.	Oznaczanie Zn-bacytracyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	11316
6.3.	Oznaczanie flawofosfolipolu metodą dyfuzji w żelu agarowym	11319
6.4.	Oznaczanie spiramycyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	11322
6.5.	Oznaczanie awoparcyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	11325
6.6.	Oznaczanie soli sodowej monenzyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	11328
6.7.	Oznaczanie tylozyny metodą dyfuzji w żelu agarowym	11331
6.8.	Oznaczanie karbadoksu	11332
6.9.	Oznaczanie olaquindoksu	11336
ROZDZIAŁ 7	Badanie kokcydiostatyków i innych produktów leczniczych	11338
7.1.	Oznaczanie metylobenzoquatu	11338
7.2.	Oznaczanie halofuginonu	11341
7.3.	Oznaczanie robenidyny	11344
7.4.	Oznaczanie amprolium metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	11347
7.5.	Oznaczanie diklazurolu	11350
7.6.	Oznaczanie soli sodowej lasalocidu metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	11353
ROZDZIAŁ 8	Badanie substancji i materiałów niepożądanych i szkodliwych	11356
8.1.	Oznaczanie aflatoksyny B ₁ metodą jednokierunkowej chromatografii cienkowarstwowej	11356
8.2.	Oznaczanie aflatoksyny B ₁ metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej	11361
8.3.	Oznaczanie kwasu cyjanowodorowego	11368
8.4.	Szacowanie aktywności ureazy w produktach sojowych	11369
8.5.	Oznaczanie gossypolu	11369
8.6.	Wytyczne dotyczące mikroskopowej identyfikacji i oznaczania składników pochodzenia zwierzęcego	11372

8.7.	Oznaczanie lotnych związków azotowych	11375
8.8.	Oznaczanie poziomów dioksyn i dioksynopodobnych PCB	11377
ROZDZIAŁ 9	Badanie niebiałkowych związków azotowych	11382
	Oznaczanie mocznika	11382

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 do badań próbki końcowej, przesyłanej do laboratorium upoważnionego do prowadzenia badań w ramach urzędowej kontroli pasz, zgodnie z przepisami rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2006 r. w sprawie szczegółowych warunków i sposobu pobierania próbek do badań oraz postępowania z próbkami pobranymi w ramach urzędowej kontroli pasz (Dz. U. z 2007 r. Nr 2, poz. 14).

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

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 powinny być wykonywane możliwie szybko, przy ograniczonym dostępie powietrza i światła do próbki do badań. Nie powinny być stosowane młynki i rozdrabniacze, które podczas pracy powodują nagrzewanie próbki do badań. W przypadku pasz szczególnie wrażliwych na ciepło zaleca się ręczne rozdrabnianie. Ponadto zastosowany sprzęt nie powinien stanowić źródła zanieczyszczenia pasz mikroelementami.

Jeżeli przygotowanie próbki do badań nie może być przeprowadzone bez znacznych zmian poziomu wilgotności próbki końcowej, poziom jej wilgotności oznacza się przed i po przygotowaniu próbki do badań, zgodnie z metodą oznaczania wilgotności, o której mowa w rozdziale 2, w części 2.3.

3. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Próbka końcowa jest dokładnie mieszana mechanicznie albo ręcznie, a następnie dzielona na 2 równe części, a jeżeli jest to wymagane, stosuje się metodę dzielenia na ćwiartki. Jedną z uzyskanych części próbki końcowej umieścić w odpowiednim, czystym i suchym pojemniku, wyposażonym w hermetyczny korek, a pozostałą lub reprezentatywną część próbki końcowej o masie co najmniej 100 g przygotować w sposób opisany poniżej.

3.1. Pasze, które mogą być zmielone

Jeżeli w metodyce postępowania analitycznego nie ustalono inaczej, po zmieleniu, jeżeli to konieczne, całą próbkę przesiał przez sito o otworach w kształcie kwadratów, o bokach 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 – powtórnie zamieszać.

3.2. Pasze, które mogą być zmielone po wysuszeniu

Jeżeli 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 taki sposób, aby odważone ilości wymagane do metodyki postępowania analitycznego były jednorodne i reprezentatywne dla próbki końcowej.

4. PRZECHOWYWANIE PRÓBEK DO BADAŃ

Próbki przechowuje się w temperaturze, która nie spowoduje zmiany ich składu. Przeznaczone do badania witamin lub substancji próbki, 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 w metodyce postępowania analitycznego nie ustalono inaczej, wszystkie stosowane odczynniki powinny mieć stopień czystości do analizy. W przypadku oznaczania mikroelementów czystość odczynników sprawdza się przez wykonywanie ślepej próby. Zależnie od uzyskanych wyników, może być konieczne dalsze oczyszczanie odczynników.

1.2.2. Jeżeli w metodyce postępowania analitycznego nie podano konkretnego rozpuszczalnika lub rozcieńczalnika, w przypadku czynności wymagających przygotowania roztworów, rozcieńczania, splukiwania 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 zalecone specjalne sposoby oczyszczania wody.

1.2.3. Oprócz aparatury i sprzętu wymienionego w metodyce postępowania analitycznego stosować aparaturę i sprzęt, powszechnie stosowany w laboratorium, ponieważ w metodyce postępowania analitycznego wymieniono tylko tę aparaturę 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 paszy. Jeżeli mogą być zastosowane inne metody oznaczania tej samej substancji, metoda, z użyciem której wykonywano oznaczenie, powinna być wymieniona w sprawozdaniu z badań.

1.3.2. Wynik podany w sprawozdaniu z badań powinien stanowić średnią wartość co najmniej z 2 oznaczeń wykonanych z oddzielnych części tej samej próbki 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 próbki końcowej przed przygotowaniem.

1.3.3. W przypadku substancji niepożądanych, o których mowa w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 stycznia 2007 r. w sprawie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszach (Dz. U. Nr 20, poz. 119), 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.

Stosowana metoda analizy pozwala na ustalenie wartości niepewności pomiaru i stopnia odzysku. Wynik analizy przedstawia się 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, przy zastosowaniu współczynnika rozszerzenia $k=2$, który daje wynik w przedziale ufności 95%.

ROZDZIAŁ 2

BADANIE PODSTAWOWYCH SKŁADNIKÓW POKARMOWYCH

2.1. OZNACZANIE BIAŁKA OGÓLNEGO METODĄ KJELDAHLA

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości białka ogólnego 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 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu. Amoniak destyluje się i zbiera w znanej ilości roztworu kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany mianowanym roztworem wodorotlenku sodu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Siarczan potasu.

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

3.3. Granulowany cynk.

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

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

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

3.7. Czerwień metylowa, wskaźnik:

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

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

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

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

3.11. Granulowany pumeks, przemyty kwasem chlorowodorowym i wyprażony.

3.12. Acetanilid (temperatura 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 na ściankach kolby. Zapobiegać miejscowemu przegrzewaniu się materiału i przylepianiu organicznych cząstek 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

Miareczkować 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 ślepa próbę, składającą się z mineralizacji, destylacji i miareczkowania, stosując 1 g sacharozy, o której mowa w ust. 3.13, zamiast próbki.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość białka ogólnego obliczyć według następującego wzoru:

$$(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25$$

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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

0,2% wartości bezwzględnej, dla zawartości białka ogólnego niższej niż 20%,

1% najwyższego wyniku, dla zawartości białka ogólnego od 20 do 40%,

0,4% wartości bezwzględnej, dla zawartości białka ogólnego wyższej niż 40%.

7.2. Dokładność

Przeprowadzić analizę, składającą się z mineralizacji, destylacji i miareczkowania, stosując od 1,5 do 2 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 powoli spływała po ściankach.

8.2. Jeżeli roztwór przechodzi w postać stałą, ponownie przeprowadzić oznaczanie, 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 być, w miarę potrzeby, zmniejszona do 10 lub 15 ml i uzupełniona wodą do objętości 25 ml.

2.2. OZNACZANIE OGÓLNYCH BIAŁEK ROZPUSTWIONYCH PEPSYNĄ I KWASEM CHLOROWODOROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania frakcji ogólnych 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 ogólnego.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

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

3.2. Kwas chlorowodorowy 0,075 N.

3.3. Pepsyna o aktywności 2 jednostek na mg (U/mg). Aktywność pepsyny została zdefiniowana 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 1 l (U/l).

3.5. Emulsja zapobiegająca spienieniu, proponuje się zastosować silikon.

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

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Łaźnia wodna lub inkubator, nastawione na 40°C $\pm$ 1°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°C i zawartość wstrząsnąć, aby uniknąć zbrylenia. Sprawdzić, czy pH zawiesiny jest niższe niż 1,7. Kolbę umieścić w łaźni wodnej lub w inkubatorze, o których 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°C. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą 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 $\rho_{20} = 1,84$ g/ml, kilka granul wyprażonego pumeksu przemyczonego kwasem chlorowodorowym. Zamieszać je i doprowadzić do wrzenia. Jeżeli pojawi się piana, dodać kilka kropel emulsji zapobiegającej spienieniu. Kontynuować wrzenie aż do niemal całkowitego odparowania wody. Zmniejszyć intensywność grzania i ostrożnie usunąć resztki wody.

Kiedy roztwór stanie się klarowny i bezbarwny lub jasno zielony, w przypadku użycia katalizatora miedziowego, kontynuować ogrzewanie jeszcze przez godzinę, a następnie pozostawić do schłodzenia.

5.3. Destylacja i miareczkowanie

Postępować według metody oznaczania białka ogólnego 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 próbki analitycznej.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

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

Pomnożyć ilość uzyskaną dla azotu przez współczynnik 6,25. Wyniki przedstawić jako udział procentowy w próbce.

7. SPRAWDZENIE METODY

7.1. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

0,4 wartości bezwzględnej, dla zawartości ogólnych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym do 20%,
2% wartości względnej, dla zawartości ogólnych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym od 20 do 40%,
0,8 wartości bezwzględnej, dla zawartości ogólnych białek rozpuszczonych pepsyną i kwasem chlorowodorowym wyższej niż 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 przez ekstrakcję z użyciem eteru naftowego, gdzie temperatura wrzenia wynosi od 40 do 60°C.

2.2.1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI PEPSYNY

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

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

2. OBJAŚNIENIA

Jednostka pepsyny to taka ilość tego enzymu, która uwalnia w czasie minuty, w warunkach, w jakich jest przeprowadzana ta metoda, taką ilość grup hydroksyarylowych, które po zabarwieniu odczynnikiem Folin-Ciocalteu mają gęstość optyczną odpowiadającą 1 μmol tyrozyny zabarwionej z użyciem tego samego odczynnika.

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:

W kolbie okrągłodennej ze szlifem o pojemności 2 l umieścić 100 g dwuhydratu wolframianu(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. Dodać 50 ml kwasu fosforowego ($d = 1,71$) 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 schłodzenia, 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 i 1 ml bromu. Aby usunąć nadmiar bromu, roztwór gotować przez 15 minut.

Pozostawić do schłodzenia, następnie przelać roztwór do kolby miarowej o pojemności 1 l. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, zamieszać i filtrować. Roztwór nie może mieć zielonkawego zabarwienia. Przed użyciem 1 objętość odczynnika rozcieńczyć 2 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, rozcieńczyć 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 l 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 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 a tyrozyny.

5. APARATURA I SPRZĘT

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

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 do pełnej objętości kolby rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 4.3. Sprawdzone pehametrem 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 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 $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ i trzymać przez 10 minut, licząc od dodania roztworu pepsyny. Temperaturę i czas dokładnie kontrolować.

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

Następnie dodać 10 ml roztworu kwasu trichlorooctowego, o którym mowa w ust. 4.4, uprzednio podgrzanego do temperatury 25°C, wymieszać i przefiltrować przez suchy filtr.

6.3. Wywołanie barwy i pomiar gęstości optycznej

Odpipetować 5 ml filtratu do kolby Erlenmeyera o pojemności 50 ml, dodać 10 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 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 ml roztworu kwasu trichlorooctowego, o którym mowa w ust. 4.4, uprzednio ogrzanego do temperatury 25°C, wymieszać i dodać 1 ml roztworu pepsyny otrzymanego w sposób określony w ust. 6.1. Zamieszać szklaną bagietką i wstawić probówkę do łaźni wodnej, o której mowa w ust. 5.1, o temperaturze 25°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, 2, 3, 4 i 5 ml podzielnej ilości roztworu wzorcowego tyrozyny, o którym mowa w ust. 4.8, co odpowiada kolejno 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1 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 ml roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.5, i – ciągle wstrząsając – po 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. Wykreślić krzywą kalibracyjną w układzie zależności gęstości optycznej od ilości tyrozyny.

7. OBLICZANIE WYNIKÓW

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

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

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

gdzie:

a – ilość tyrozyny odczytana z krzywej kalibracyjnej w µmol,

P – ilość pepsyny odważona 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. 2 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, związków mineralnych, mieszanin składających się głównie ze związków mineralnych, tłuszczów i olejów pochodzenia zwierzęcego i roślinnego oraz nasion i owoców roślin oleistych określonych w rozporządzeniu Rady (WE) nr 136/66/EWG z dnia 22 września 1966 r. w sprawie ustanowienia wspólnej organizacji rynku olejów i tłuszczów (Dz. Urz. WE 172 z 30.09.1966, str. 3025, z późn. zm., Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t.1, str. 77, z późn. zm.).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest suszona w warunkach dostosowanych do właściwości pasz. Obniżenie masy jest określane przez ważenie. Jeżeli pasze stałe zawierają duże ilości wilgotności, konieczne jest przeprowadzenie wstępnego suszenia.

3. APARATURA I SPRZĘT

3.1. Rozdrabniacz wykonany z materiałów niepochłaniających wilgotności, łatwy do czyszczenia, pozwalający na szybkie rozdrobnienie materiału bez nadmiernego ogrzewania, w sposób ograniczający do minimum kontakt z powietrzem, spełniający wymagania określone w ust. 4.1.1 i ust. 4.1.2, przy czym rozdrabniaczem może być młotek, chłodzony wodą mikrorozdrabniacz, składany stożkowy młynek albo rozdrabniacz wolnoobrotowy lub wyposażony w koło zębate.

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

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

3.4. Suszarka elektryczna z termostatem ($\pm 1^\circ\text{C}$), dobrze wentylowana i pozwalająca na szybką regulację temperatury.²⁾

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 o 0,15% od wyników uzyskanych po 4 godzinach suszenia.

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 2 powtórzeniach.

4.1. Przygotowanie

4.1.1. Pasze inne niż określone w ust. 4.1.2 i ust. 4.1.3 pobrać w ilości co najmniej 50 g. Jeżeli to konieczne, rozdrobnić lub podzielić w taki sposób, aby zapobiec jakimkolwiek zmianom 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 wyższej niż 10% na sicie o oczkach o średnicy 1 mm.

4.1.3. Pasze 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. Pasze inne niż określone w ust. 4.2.2 i ust. 4.2.3

Zważyć, z dokładnością do 0,5 mg, naczynko z przykrywką, o którym mowa w ust. 3.3. Do naczynka odważyć, 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 ponownie osiągnie 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 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 2 ważeniami nie powinna przekraczać 0,1% wilgotności.

4.2.2. Zboża, mąki, kasze i mączki

Zważyć, z dokładnością do 0,5 mg, naczynko z przykrywką, o którym mowa w ust. 3.3. Do naczynka odważyć, 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 od czasu, gdy suszarka ponownie osiągnie temperaturę 130°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 i zważyć z dokładnością do 1 mg.

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

Zważyć, z dokładnością do 0,5 mg, naczynko z przykrywką, o którym mowa w ust. 3.3. Do naczynka odważyć, 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 w celu wysuszenia na 4 godziny pod działaniem tego ciśnienia i tej temperatury, 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 ponownie osiągnie temperaturę od 80 do 85°C. Ostrożnie zrównać ciśnienie w suszarce z ciśnieniem atmosferycznym. Otworzyć suszarkę, szybko 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 i zważyć z dokładnością do 1 mg. Suszyć ponownie w suszarce próżniowej przez 30 minut o temperaturze od 80 do 85°C i zważyć powtórnie. Różnica pomiędzy 2 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, z dokładnością do 10 mg, nierozdrobnionej próbki – przy czym pasze sprasowane lub zbrylone mogą wymagać wstępnego rozdrobnienia – 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 o temperaturze od 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, z dokładnością do 10 mg, 50 g nierozdrobnionego ziarna do odpowiedniego naczynia, w tym na płytkę aluminiową o wymiarach 20 x 12 cm z obwódką o wysokości 0,5 cm. Suszyć w suszarce od 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

Wilgotność jako udział procentowy w próbce 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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 0,2% wilgotności.

7. OBJAŚNIENIA

Jeżeli rozdrabnianie próbki jest konieczne i wpływa na poziom wilgotności w produkcie, 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 w temperaturze 103°C do uzyskania stałej masy. 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 ze wzmocnionym zbiornikiem i ekspansyjną rurką w górnym końcu, z podziałką od 80 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 2 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, przed wzrostem jej masy.

5. OBLICZANIE WYNIKÓW

Wilgotność, jako udział procentowy w próbce, obliczyć według następującego wzoru:

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

gdzie:

M₀ – masa w g badanej próbki,

M₁ – masa w g naczynia z zawartością przed ogrzewaniem,

M₂ – masa w g naczynia z zawartością po ogrzewaniu.

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

6. SPRAWDZENIE METODY**6.1. Powtarzalność.**

Różnica wilgotności pomiędzy wynikami 2 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. 20 % roztwór azotanu amonu, (m/V).

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Płyta grzewcza.

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem.

4.3. Tygle 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 pęczniących, i umieścić w wyprażonym i wytarowanym tyglu do spalań. Tygiel postawić na płycie grzewczej i ogrzewać stopniowo aż do zwęglenia. Następnie wstawić go do pieca o temperaturze ustawionej na $550^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$. Utrzymywać w tej temperaturze aż do uzyskania popiołu o barwie białej, jasnoszarej lub jasnoczerwonej, świadczącej o niewystępowaniu cząsteczek węglowych. Umieścić tygiel w desykatorze, pozostawić do schłodzenia 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.

7. OBJAŚNIENIA

7.1. Substancje, które trudno się spopielają, należy wstępnie spopielać co najmniej przez 3 godziny, schłodzić, 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 2 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 wyższej niż 1%, co sprawdza się, stosując wcześniej metodę A.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

2.2. Metoda B: próbka jest traktowana kwasem chlorowodorowym. Roztwór się filtruje, 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 kwasu trichlorooctowego w m/V.

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

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Płyta grzewcza.

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem.

4.3. Tygle 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

5.1. Metoda A

Spopielić próbkę metodą określoną w części 2.5 („Oznaczanie popiołu surowego”). Popiół uzyskany w wyniku zastosowanej analizy może być także wykorzystany do badania.

Popiół przenieść do zlewki o pojemności od 250 do 400 ml z użyciem 75 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.1. Powoli doprowadzić do wrzenia i gotować ostrożnie przez 15 minut. Przechłodzić 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 niż 550°C i nie wyższej niż 700°C . Ostudzić w eksykatorze i zważyć.

5.2. Metoda B

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki 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 co najmniej 30 minut, 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 spalań, wysuszyć i spopielać w temperaturze nie niższej niż 550°C i nie wyższej niż 700°C. Popiół umieścić w zlewce o pojemności od 250 do 400 ml z użyciem 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 niż 550°C i nie wyższej niż 700°C. Ostudzić w eksykatorze 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 spopiela w temperaturze od 475 do 500 °C. Ubytek masy po spopieleniu odpowiada zawartości włókna surowego w badanej próbce.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas siarkowy, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.

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, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

3.7. Roztwór wodorotlenku potasu, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

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 odprowadzenia cieczy i próżni, ewentualnie ze sprężonym powietrzem. Codziennie przed użyciem podgrzewa się urządzenie, przemywając je wrzącą wodą przez 5 minut.

4.2. Szklany tygiel filtracyjny ze spiekem 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 rurki odprowadzającej z kranem, służącej do ujścia cieczy i próżni.

4.7. Pierścienie łączące, służące do połączenia urządzenia grzewczego, o którym mowa w ust. 4.1, z tygłem filtracyjnym, o którym mowa w ust. 4.2, z cylindrem, o którym mowa w ust. 4.3, oraz do dołączenia 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- 8.3, 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 dołączyć cylinder, o którym mowa w ust. 4.3, do 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 przemywać pozostałość 3-krotnie 30 ml porcjami wrzącej wody, upewniając się, że pozostałość przefiltrowano do sucha po każdym przemyciu.

Zamknąć ujęcie 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 przemycania 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 przemycać pozostałość w tyglu 3 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 o temperaturze 130°C. Po każdym suszeniu schłodzić w eksykatorze 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 eksykatorze.

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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

0,3% wartości bezwzględnej, dla zawartości włókna surowego niższej niż 10%,

3% względem wyższego wyniku, dla zawartości włókna surowego równej lub wyższej niż 10%.

8. OBJAŚNIENIA

8.1. Pasze zawierające więcej niż 10% tłuszczu surowego przed oznaczaniem 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 urządzenia do zimnej ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.6, zastosować próżnię i przemyc pozostałość 3-krotnie 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 z kwasem.

Po gotowaniu z kwasem, a następnie przemyciu podłączyć tygiel wraz z jego zawartością do urządzenia do zimnej ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.6, i przemyc 3-krotnie 30 ml porcjami acetonu, a następnie 3-krotnie 30 ml porcjami eteru naftowego. Przefiltrować do sucha w warunkach próżni i postępować w sposób określony w ust. 5, rozpoczynając postępowanie z wodorotlenkiem potasu.

8.3. Jeżeli pasze zawierają więcej niż 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. Przemyc próbkę 3-krotnie 30 ml porcjami kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.6. Po dodaniu każdej porcji kwasu pozostawić próbkę na około minutę przed filtrowaniem. Przemyc 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 2 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 być wyższa niż 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 (WE) nr 136/66/EWG z dnia 22 września 1966 r. w sprawie ustanowienia wspólnej organizacji rynku olejów i tłuszczów.

Zastosowanie 2 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 wszystkich materiałów, z których oleje i tłuszcze nie mogą być w całości wyekstrahowane bez uprzedniej hydrolizy, a zwłaszcza do glutenu, drożdży, białka ziemniaczanego i produktów poddanych przetwarzaniu, w szczególności poprzez ekstruzję, płatkowanie lub ogrzewanie.

1.3. Interpretacja wyników

We wszystkich przypadkach, w których wynik otrzymany przy zastosowaniu postępowania B jest wyższy od wyniku otrzymanego przy zastosowaniu postępowania A, wynik otrzymany przy zastosowaniu postępowania B należy traktować 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 oznaczaniu 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 niższa niż 1, a pozostałość po odparowaniu niższa niż 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-supercel.

4. APARATURA I SPRZĘT

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

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

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

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Postępowanie A

Przy postępowaniu A uwzględnić ust. 8.1.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki, przenieść do gilzy ekstrakcyjnej, o której mowa w ust. 4.2, i przykryć beztłuszczowym 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. Schłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczów, przy czym ubytek masy pomiędzy 2 kolejnymi ważeniami nie powinien przekraczać 1 mg.

5.2. Postępowanie B

Przy uwzględnieniu ust. 8.2, odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2,5 g próbki, 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.

Schłodzić 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, beztłuszczowy podwójny filtr papierowy. Przemywać 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 $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Umieścić podwójny filtr papierowy zawierający suchą pozostałość w gilzie ekstrakcyjnej, o której mowa w ust. 4.2, i przykryć beztłuszczowym 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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

0,2% w wartości bezwzględnej, dla zawartości oleju i tłuszczu niższej niż 5%,

4 % względem najwyższego wyniku, dla zawartości oleju i tłuszczu od 5 do 10%,

0,4% w wartości bezwzględnej, dla zawartości oleju i tłuszczu wyższej niż 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, z dokładnością do 1 mg, 20 g próbki i zmieszać z co najmniej 10 g bezwodnego siarczanu sodu, o którym mowa w ust. 3.2. Ekstrahować eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.1, w sposób określony 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. Schłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez

³⁾ Jeżeli tłuszcz lub olej powinien być poddany dalszym badaniom jakościowym, pumeks należy zastąpić kuleczkami szklanymi.

30 minut w celu zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczu, przy czym straty masy pomiędzy 2 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 dodawać 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. Schłodzić w eksykatorze i zważyć. Suszyć ponownie przez 30 minut w celu zapewnienia stałej masy olejów i tłuszczów, przy czym straty masy pomiędzy 2 kolejnymi ważeniami nie mogą przekraczać 1 mg.

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

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

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 siarczaniem sodu, z zastosowaniem 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 wyższa niż 15%, zaleca się wstępną ekstrakcję przed hydrolizą, z zastosowaniem postępowania A, i powtórna ekstrakcję, z zastosowaniem postępowania B. Postępowanie to zależy od rodzaju paszy i 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 dyrektywą Komisji 86/174/EWG z dnia 9 kwietnia 1986 r. określającą metodę obliczania wartości energetycznej mieszanek paszowych dla drobiu (Dz. Urz. WE L 130 z 16.05.1986, str. 53; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 7, str. 29) oraz dyrektywą Rady 96/25/WE z dnia 29 kwietnia 1996 r. w sprawie obrotu materiałami paszowymi, zmieniającą dyrektywy 70/524/EWG, 74/63/EWG, 82/471/EWG i 93/74/EWG oraz uchylającą dyrektywę 77/101/EWG (Dz. Urz. WE L 125 z 23.05.1996, str. 35, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 19, str. 96, z późn. zm.).

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Metoda składa się z 2 oznaczeń. W 1 oznaczeniu próbka jest traktowana na gorąco rozcieńczonym kwasem chlorowodorowym. Po sklarowaniu i przefiltrowaniu mierzy się polarymetrycznie skręcalność optyczną roztworu.

W 2 oznaczeniu próbka jest ekstrahowana 40% etanolem. Po zakwaszeniu filtratu kwasem chlorowodorowym, sklarowaniu i przefiltrowaniu mierzy się skręcalność optyczną, tak jak w 1 oznaczeniu.

Różnica pomiędzy 2 pomiarami, pomnożona przez znany współczynnik, daje zawartość skrobi w próbce.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas chlorowodorowy, 25% (w/w) $d = 1,126$ 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, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g lodowatego kwasu octowego. Uzupełnić do objętości 100 ml wodą.

3.4. Roztwór Carreza II:

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

3.5. Etanol, 40% (V/V), $d = 0,948$ 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, wstrząsnąć 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 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 do pełnej objętości kolby wodą, zmieszać i przefiltrować. W przypadku gdy filtrat nie jest idealnie klarowny, powtórzyć oznaczanie z użyciem 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 6-krotnie kolbę tak, aby próbka została dobrze zmieszana z etanolem. Uzupełnić do pełnej objętości kolby etanolem, o którym mowa w ust. 3.5, 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 kolbę tę zanurzyć we wrzącej łaźni wodnej. Po 15 minutach wyjąć kolbę Erlenmeyera z łaźni, przenieść zawartość do kolby miarowej o pojemności 100 ml, spłukując kolbę Erlenmeyera niewielką ilością zimnej wody, i schłodzić do temperatury 20°C. Sklarować z użyciem roztworów Carreza I, o którym mowa w ust. 3.3, i Carreza II, o którym mowa w ust. 3.4, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, 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 z użyciem 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° : inne typy skrobi i jej mieszaniny w mieszkach paszowych.

6.2. Pomiary z użyciem 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 z użyciem rurki o długości 200 mm:

16,29 – dla sacharymetrów francuskich,

26 – dla sacharymetrów niemieckich,

20 – dla sacharymetrów połączonych,

$[\alpha]^{20}_D$ – określona skręcalność optyczna czystej skrobi, z uwzględnieniem ust. 6.1.

6.3. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

0,4% w wartości bezwzględnej, dla zawartości skrobi niższej niż 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, rozłożyć je przy użyciu odpowiedniej ilości rozcieńczonego kwasu siarkowego przed określeniem całkowitej skręcalności optycznej.

7.2. W przypadku produktów o wysokiej zawartości laktozy, takich jak serwatka w proszku lub mleko odtłuszczone w proszku, postępować w następujący sposób.

Po dodaniu 80 ml etanolu, o którym mowa w ust. 3.5, przymocować chłodnicę zwrotną do kolby Erlenmeyera i kolbę tę zanurzyć w łaźni wodnej o temperaturze 50°C na 30 minut. Pozostawić do schłodzenia 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 (pulp, 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 łuskane, 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, z zastosowaniem współczynnika 0,95. Metodę stosuje się 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 Carreza 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 100 ml wodą.

3.3. Roztwór Carreza II:

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

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

3.5. Kwas chlorowodorowy 4 N.

3.6. Kwas chlorowodorowy 0,1 N.

3.7. Roztwór wodorotlenku sodu 0,1 N.

3.8. Odczynnik Luff-Schoorla:

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 l wodą. Zostawić na noc do osadzenia i przefiltrować. Sprawdzić normalność otrzymanego odczynnika (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2N). 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 l 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, z dokładnością do 1 mg, 2,5 g próbki 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 z użyciem 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 100 ml wodą i homogenizować. 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 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 tiosiarczanu(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 którym 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 2 miareczkowań, wyrażonych w mg tiosiarczanu(VI) sodu 0,1 N.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w 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	mg	różnica	mg	różnica	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4	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	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4	9
10	25	2,6	37	3,8	39,5	4	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33	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	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	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4	72,2	4,3	18
19	50	3	71,7	4	76,5	4,4	19
20	53	3	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90	4,6	22
23	62,2		88		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 l. 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, z użyciem 4-krotnie 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 do pełnej objętości kolby zimną wodą, 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 2 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 2 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 w próbce.

Przykład.

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

W 1 przypadku 17 ml 0,1 N roztworu tiosiarczanu(VI) sodu odpowiada 44,2 mg zużytej glukozy, w 2 przypadku 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 jest poddawany 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 7 dni 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. Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml wodą.

3.3. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g heksacyjanożelazianu(II) potasu $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml 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 siarczanu miedzi, o którym mowa w ust. 3.4.1, i uzupełnić kolbę do objętości 1 l 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 siarczanu miedzi:

Rozpuścić 25 g siarczanu 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 tiosiarczanu sodu 0,1 N.

3.9. Roztwór skrobi:

Do 1 l 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, z dokładnością do 1 mg, 1 g próbki 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. Uzupełnić kolbę do objętości 100 ml 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 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 mieszaninie 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 2 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 z użyciem analizatora aminokwasów. Metoda ma zastosowanie do następujących aminokwasów: cystyny (cysteiny), metioniny, lizyny, treoniny, alaniny, argininy, kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego, glicyny, histydy, 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 z zastosowaniem reakcji z ninhydryną, 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. Pozostałe aminokwasy wymienione w ust. 1 mogą być oznaczane w próbce utlenionej albo niepoddanej utlenianiu.

Utlenianie jest przeprowadzane w temperaturze 0°C z użyciem mieszaniny kwasu nadmanganowego i fenolu. Nadmiar odczynnika utleniającego jest rozkładany z użyciem dwusiarczku sodu. Utleniona albo 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, przez 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 $1,18 \text{ g/ml}$.

3.8. Cytrynian trisodu, dwuhydrat.

3.9. 2,2' Tiodwuetanol (tiodwuglikol).

3.10. Chlorek sodu.

3.11. Ninhydrina.

3.12. Eter naftowy o temperaturze wrzenia $40 - 60^\circ\text{C}$.

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 7 dni przed użyciem.

3.16.2. Kwas cysteinowy.

3.16.3. Sulfon metioniny.

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

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

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

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

3.19. Roztwór 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, $c = 6 \text{ mol HCl/l}$, 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 l wodą.

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

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

3.23. Mieszanina utleniająca (kwas nadmrówkowy – fenol):

Zmieszać w małej zlewce 0,5 ml nadtlenu 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 nadmrówkowego, następnie schłodzić w lodowej łaźni wodnej przez 15 minut przed dodaniem tej mieszaniny do próbki.

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

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

Rozpuścić 19,61 g cytrynianu trisodu, o którym mowa w ust. 3.8, 5 ml tiodwuglikolu, 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 l wodą.

3.25. Bufor wymywający, 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 niższej niż 5°C :

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

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

Rozpuścić 0,2115 g kwasu cysteinowego, o którym mowa w ust. 3.16.2, i 0,2265 g 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 l i uzupełnić do pełnej objętości kolby buforem cytrynianowym. Przechowywać w temperaturze niższej niż 5°C nie dłużej niż przez 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, $c = 20 \mu\text{mol/ml}$.

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 niższej niż 5°C nie dłużej niż przez 6 miesięcy.

3.27.4. Kalibracyjny roztwór wzorca aminokwasów do użycia z hydrolizatami, $c = 5 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny i $c = 10 \text{ nmol}/50 \mu\text{l}$ 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 ml podstawowego roztworu wzorcowego aminokwasów, o którym mowa w ust. 3.27.1, 4 ml podstawowego roztworu wzorcowego kwasu cysteinowego i sulfonu metioniny, o których mowa w ust. 3.27.2, i jeżeli jest stosowany, 0,5 ml podstawowego wzorcowego roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.27.3. Dostosować pH do 2,2 z użyciem roztworu 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 niższej niż 5°C nie dłużej niż przez 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 niższej niż 5°C nie dłużej niż przez 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 $\pm 2^{\circ}\text{C}$.

4.4. Pehametr z pomiarem do 3 miejsc po przecinku.

4.5. Filtr membranowy (0,2 μm).

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, przystawką do ninhydryny, post-kolumnową 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 $c = 0,8 \text{ mol/l}$ i 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 do objętości około 5 ml, które wykonuje się po hydrolizie i przed ustaleniem pH. Odparowywanie powinno być prowadzone w warunkach próżni w temperaturze nie wyższej niż 40°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 rozdrobnieniem wysuszyć albo suchym powietrzem o temperaturze nieprzekraczającej 50°C , albo przez zamrożenie. Próbki o wysokiej zawartości tłuszczu przed rozdrobnieniem poddaje się ekstrakcji eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.12.

5.2. Oznaczanie 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 ml mieszaniny ekstrakcyjnej, o której mowa w ust. 3.21. Wstrząsać mieszaninę przez 60 minut, używając mieszadła magnetycznego lub mechanicznej wytrząsarki, o których mowa w ust. 4.8. Odstawić do sedymentacji osadu i pobrać pipetą 10 ml supernatantu roztworu do zlewki o objętości 100 ml.

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

Jeżeli jest stosowany wzorzec wewnętrzny, dodać 1 ml podstawowego wzorcowego 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 niższej niż 5°C .

5.3. Oznaczanie całkowitej zawartości aminokwasów

5.3.1. Utlenianie

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 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 oziębć do temperatury 0°C , dodać 5 ml mieszaniny utleniającej, o której mowa w ust. 3.23, i zamieszać, używając szklanej bagietki z wygiętym końcem. Uszczelnić kolbę lub butelkę wraz z bagietką, stosując hermetyczny film, umieścić wraz z lodową łaźnią wodną w lodówce o temperaturze 0°C

i pozostawić na 16 godzin. Po 16 godzinach wyjąć z lodówki i rozłożyć nadmiar odczynnika utleniającego przez dodanie 0,84 g dwusiarczynu 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 do 1 g próbki, otrzymanej w sposób określony w ust. 5.1, do kolby okrągłodennej o pojemności 100 lub 250 ml, o której mowa w ust. 4.1, lub do butelki o pojemności 100 ml z nakrętką, 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°C. W czasie 1 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 podstawowego wzorcowego roztworu 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 ml podstawowego roztworu 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 w warunkach próżni i w temperaturze 40°C objętość do 5 – 10 ml. Jeżeli objętość roztworu zostanie przypadkowo zredukowana poniżej 5 ml, hydrolizat wyrzucić i powtórzyć analizę.

Dostosować pH do 2,2 z użyciem 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 pozostałych 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 poprzez mieszanie, ostrożnie dodając 17 ml roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.17, zwracając uwagę, aby temperatura roztworu nie była wyższa niż 40°C.

Dostosować pH do 2,2 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 z użyciem 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 ml podstawowego wzorcowego 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, przechowywuje się je w temperaturze niższej niż 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 ninhydrynowego i od systemu analitycznego. Wzorzec lub próbka są wymywane buforem cytrynianowym, o którym mowa w ust. 3.24, tak aby powierzchnia piku wzorca odpowiadała od 30 do 200% powierzchni piku badanej próbki aminokwasu.

Analiza chromatograficzna aminokwasów będzie różnić się nieznacznie w zależności od typu stosowanego analizatora i żywicy. 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 wpływało 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 µmol/ml,

W – masa próbki w g przeliczona na masę oryginalnej próbki w przypadku odtłuszczania 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, stosując MW 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Metionina jest oznaczana jako sulfon metioniny w hydrolizatach utlenionej próbki, ale jest obliczana jak metionina, stosując 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 którym 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. z użyciem 4 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_r)

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 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 n = 17	3 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 przez 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 jest wykorzystywany wysoko sprawny 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 nie wyróżnia form D i L.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

W celu oznaczenia całkowitego tryptofanu próbka jest hydrolizowana w środowisku zasadowym z użyciem nasyconego roztworu wodorotlenku baru i ogrzewana do 110°C przez 20 godzin. Po hydrolizie jest dodawany wzorzec wewnętrzny.

W celu oznaczenia wolnego tryptofanu próbka jest ekstrahowana w warunkach lekko kwaśnych w obecności wzorca wewnętrznego.

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

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

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

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

3.4. Wodorotlenek baru, oktahydrat

Nie wystawiać $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 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 g wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.5, w wodzie i uzupełnić do objętości 1 l 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 l 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 l 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 l 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 l wodą.

3.15. Stężony roztwór tryptofanu, o którym mowa w ust. 3.2, c = 2,50 $\mu\text{mol/ml}$:

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 pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.13. Przechowywać w temperaturze -18°C nie dłużej niż przez 4 tygodnie.

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

W kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2728 g α -metylo-tryptofanu, o którym mowa w ust. 3.3, w kwasie chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.13, i uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.13. Przechowywać w temperaturze -18°C nie dłużej niż przez 4 tygodnie.

3.17. Kalibracyjny roztwór wzorcowy tryptofanu i wzorca wewnętrznego:

Odmierzyć 2 ml stężonego roztworu tryptofanu, o którym mowa w ust. 3.15, i 2 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 g kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.18, 900 ml wody, o której mowa w ust. 3.1, i 50 ml roztworu, o którym mowa w ust. 3.21. Dostosować pH do 5, stosując etanoloaminę, o której mowa w ust. 3.20. Uzupełnić do objętości 1 l wodą.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Wyposażenie HPLC z detektorem spektrofлуorometrycznym.

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

4.3. Pehametr.

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

4.5. Filtr membranowy, 0,45 μm .

4.6. Autoklaw, 110 (± 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) 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. Próbkę o dużej zawartości wilgotności przed rozdrobnieniem wysuszyć albo na powietrzu w temperaturze nieprzekraczającej 50°C , albo przez wymrażanie. Próbkę o wysokiej zawartości tłuszczu przed rozdrobniением 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 do 5 g próbki przygotowanej w sposób określony w ust. 5.1 do kolby stożkowej. Dodać 100 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.13, i 5 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego, o którym mowa w ust. 3.16. Wstrząsać lub mieszać przez 60 minut z użyciem wstrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego, o których mowa w ust. 4.7. Pozostawić do oddzielenia się osadu i przenieść pipetą 10 ml supernatantu roztworu do zlewki. Dodać 5 ml kwasu ortofosforowego, o którym mowa w ust. 3.14. Dostosować pH do 3 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 3.10. Dodać taką ilość metanolu, o którym mowa w ust. 3.8, aby uzyskać stężenie 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.

Przefiltrować 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 jest niemożliwe dokonanie analizy ekstraktów tego samego dnia, ekstrakty przechowywać w temperaturze 5°C nie dłużej niż przez 3 dni.

5.3. Oznaczanie całkowitego tryptofanu (hydrolizat)

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 do 1 g 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 z użyciem 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. Splukać ściany naczynia z użyciem 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 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (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 z użyciem kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.11, mieszając, i dostosować pH do 3 z użyciem kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.12. Dodać ilość metanolu konieczną do uzyskania stężenia od 10 do 30% metanolu w końcowej objętości. Przenieść do kolby miarowej o odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do objętości, koniecznej dla chromatografii, proponuje się zastosować 100 ml Duran, Scott. Dodanie metanolu nie powinno powodować wytrącania.

Przefiltrować 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 jest niemożliwe 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 cieczowej, 125 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 3 µm lub równoważne
o której mowa w ust. 4.2:

Temperatura kolumny: temperatura pokojowa

Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.22: mieszanina 3 g kwasu octowego, o którym mowa w ust. 3.18, 900 ml wody, o której mowa w ust. 3.1, i 50 ml roztworu, o którym mowa w ust. 3.21; dostosować pH do 5 z użyciem etanoloaminy, o której mowa w ust. 3.20. Uzupełnić do objętości 1 l wodą, o której mowa w ust. 3.1

Prędkość przepływu: 1 ml/min

Całkowity czas analizy chromatograficznej: około 34 minuty

Długość fali przy detekcji: wzbudzenie: 280 nm, emisja: 356 nm

Dozowana objętość: 20 µl

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 µmol/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 ml), o której mowa w ust. 5.2, lub do hydrolizatu (= 2 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 wzorcowego, 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, jeżeli była podsuszana lub odtłuszczana,

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

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10% względem najwyższego wyniku.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

We Wspólnocie Europejskiej przeprowadzono badania porównawcze, w których 3 próbki były analizowane przez 12 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy. Na każdej próbce powtórzono analizy 5-krotnie. 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_r [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
CV_r [%]	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	2,2

L – liczba laboratoriów; n – liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochra, próba wartości oddalonych Dixon); 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 przeprowadzonym we Wspólnocie Europejskiej 2 próbki były analizowane przez 13 laboratoriów w celu sprawdzenia metody ekstrakcji wolnego tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizę 5-krotnie. Jej wyniki są przedstawione w tabeli 8.

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

	Próbka 4 Mieszanek pszenicy i soi	Próbka 5 Mieszanek 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 Cochra, próba wartości oddalonych Dixon); 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 przeprowadzonym we Wspólnocie Europejskiej 4 próbki były analizowane przez 7 laboratoriów w celu sprawdzenia metody hydrolizy tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizę 5-krotnie. Jej wyniki są przedstawione w tabeli 9.

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

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
	Mieszanka paszowa dla świń (CRM 117)	Niskotłuszczowa mączka rybna (CRM 118)	Mączka sojowa (CRM 119)	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 Cochra, 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. OBJAŚNIENIA

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 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 ₂ PO 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
Prędkość 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

Fakt, że wodorotlenek baru z czasem jest coraz trudniejszy do rozpuszczenia, wpływa na nieklarowność roztworu do oznaczania HPLC, która może być przyczyną zaniżania 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 spopielaany, popiół jest traktowany kwasem chlorowodorowym, a wapń wytrącany jako szczawian wapnia. Osad jest rozpuszczany w kwasie siarkowym i miareczkowany kwasem szczawiowym, który powstaje wraz z roztworem nadmanganianu 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 nadmanganianu potasu 0,1 N.

4. APARATURA I SPRZĘT

- 4.1. Elektryczny piec muflowy z termostatem i możliwością cyrkulacji powietrza.
- 4.2. Tygle do spaleń platynowe, kwarcowe lub porcelanowe.
- 4.3. Szklane tygle ze spiekami o porowatości G_4 .

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki, 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. Stosując pipetę, przenieść do zlewki o pojemności 250 ml podzielną część roztworu zawierającą od 10 do 40 mg wapnia zgodnie z przewidywaną jego 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 100 ml wodą. Doprowadzić do wrzenia, dodać od 8 do 10 kropli roztworu zieleni bromokrezolowej, o którym mowa w ust. 3.8, i 30 ml ciepłego 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.

Zobojętniać bardzo wolno amoniakiem, o którym mowa w ust. 3.4, ciągle mieszając, do dostosowania pH od 4,4 do 4,6, co sygnalizowane jest 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 szklany tygiel, o którym mowa w ust. 4.3.

Przemywać wodą zlewkę i tygiel do całkowitego usunięcia nadmiaru szczawianu amonowego. Nieobecność chlorków w wodzie używanej do przemywania 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. Spłukać tygiel gorącą wodą i uzupełnić filtrat do około 100 ml. Podgrzać do temperatury od 70 do 80°C i miareczkować, kroplami, roztworem nadmanganianu 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 nadmanganianu potasu odpowiada 2,004 mg wapnia.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

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 o temperaturze 550°C i po wyjęciu z pieca zważyć. Jeżeli W jest masą otrzymanego siarczanu wapnia, to zawartość wapnia podzielnej części pobranej 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 5-krotnej 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 spopielaana, 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 $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$.

3.4. Chlorek sodu, bezwodny.

3.5. Czynniki obciążające:

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 l 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 l wodą i homogenizować. Przechowywać w plastikowej butelce. 1 ml tego roztworu zawiera 1 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, z dokładnością do 10 mg, 10 g próbki, 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 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 mg sodu, dodać 10 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	—	5
powyżej 1 do 5	1 : 10	10
powyżej 5 do 10	1 : 10	5
powyżej 10 do 20	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. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą 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 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 do pełnej objętości kolby wodą 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 więcej niż 4% sodu wskazane jest spopielaanie substancji przez 2 godziny w tyglu z pokrywką. Po schłodzeniu dodać wody, utworzyć z popiołu zawiesinę, stosując drucik platynowy, wysuszyć i ponownie spopielać przez 2 godziny w tyglu z pokrywką.

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

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

3.4. Chlorek potasu, bezwodny.

3.5. Czynniki obciążające:

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 l 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 l wodą i homogenizować. Przechowywać w plastikowej butelce. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg potasu.

4. APARATURA I SPRZĘT

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

4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem.

4.3. Fotometr płomieniowy.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Analiza próbek.

Odważyć, z dokładnością do 10 mg, 10 g próbki, umieścić w tygłku, 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 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 do pełnej objętości kolby wodą, wstrząsnąć i przefiltrować. W kolbie miarowej o pojemności 100 ml umieścić podzielną część filtratu zawierającą nie więcej niż 1 mg potasu, dodać 10 ml czynnika obciążającego, o którym mowa w ust. 3.5, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą 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	—	5
powyżej 1 do 5	1 : 10	10
powyżej 5 do 10	1 : 10	5
powyżej 10 do 20	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 potasu, o którym mowa w ust. 3.6, i umieścić w kolbie miarowej o pojemności 250 ml. Uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą 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 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 do pełnej objętości kolby wodą 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 chlorku 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 siarczynu (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 100 ml 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 100 ml wodą.

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

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. 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 ust. 5.1.1, ust. 5.1.2 lub ust. 5.1.3.

W tym samym czasie przeprowadzić ślełą 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. Odważyć 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, z dokładnością do 1 mg, około 5 g próbki 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, mączka lniana, mączka lniana, produkty bogate w mączkę lnianą i inne produkty bogate w śluz lub substancje koloidalne, w tym dekstryna skrobiowa.

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

Z użyciem 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 z zastosowaniem biurety wypełnionej do znaku 0. Stosując biuretę, 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 tiocyjanianu 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 niższej niż 5%.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Próbka jest spopielała 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. Druk 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), $(76,08 \text{ g SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ lub } 60,38 \text{ g Sr(NO}_3)_2)$.

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 do pełnej objętości wodą. 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 muflowy 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, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki 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 krzemionki, 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 umieścić na godzinę w suszarce o 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 z użyciem ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia i uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą. 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 piecu muflowym w temperaturze 550°C aż do uzyskania popiołu wolnego od cząstek 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 o 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 z użyciem ciepłej wody. Pozostawić do schłodzenia i uzupełnić do pełnej objętości kolby 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, z dokładnością do 1 mg, 5 g próbki i umieścić w tyglu, spopielać w piecu muflowym w temperaturze 550°C aż do uzyskania popiołu wolnego od cząstek 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 o 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 z użyciem ciepłej wody, doprowadzić do wrzenia, pozostawić do schłodzenia i uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą. 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 magnezu, 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 l wodą. Zmierzyć absorpcję roztworu badanego i roztworów odniesienia przy 285,2 nm.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zawartość magnezu w próbce obliczyć przez porównanie z roztworami odniesienia. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 całkowitej zawartości 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 odczynnikiem molibdenowanadowym. Gęstość optyczna utworzonego żółtego roztworu jest mierzona 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 l. 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 l 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 l 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 l wodą.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Tygle kwarcowe lub porcelanowe.

4.2. Piec mufłowy 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 i pojemności od 25 do 30 ml z korkiem o średnicy do 14,5 mm

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, z dokładnością do 1 mg, co najmniej 1 g próbki. Umieścić próbkę w kolbie Kjeldahla, dodać 20 ml kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.5, wstrząsnąć do całkowitego nasycenia kwasem i nie dopuścić 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 do pełnej objętości kolby wodą, homogenizować i przefiltrować.

5.1.2. Próbkę zawierającą substancje organiczne, wolne od dwuwodorofosforanu magnezu i wapnia.

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, około 2,5 g próbki i umieścić w tyglu. Zmieszać dokładnie próbkę z 1 g węglanu wapnia, o którym mowa w ust. 3.1. Spopielać w piecu w temperaturze $550 \pm 5^\circ\text{C}$ 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 paskowej 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 paskowej przez 5 minut, nie doprowadzając do zupełnego odparowania cieczy. Przenieść ciecz do kolby miarowej o pojemności 500 ml, spłukując kilkakrotnie zlewkę gorącą wodą. Pozostawić do schłodzenia, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, 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 µg/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 fosforu, o którym mowa w ust. 3.7, przygotować roztwory zawierające odpowiednio 5, 10, 20, 30 i 40 µg fosforu w 1 ml. Pobrać 10 ml każdego z tych roztworów i dodać 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 odpowiadającym jej ilości fosforu.

W zakresie stężeń od 0 do 40 µg/ml krzywa jest liniowa.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Określić zawartość fosforu w badanej próbce z zastosowaniem krzywej kalibracyjnej.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 3% wartości względnej dla zawartości fosforu niższej niż 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 węglan wapnia, w większości pasz.

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

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

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

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

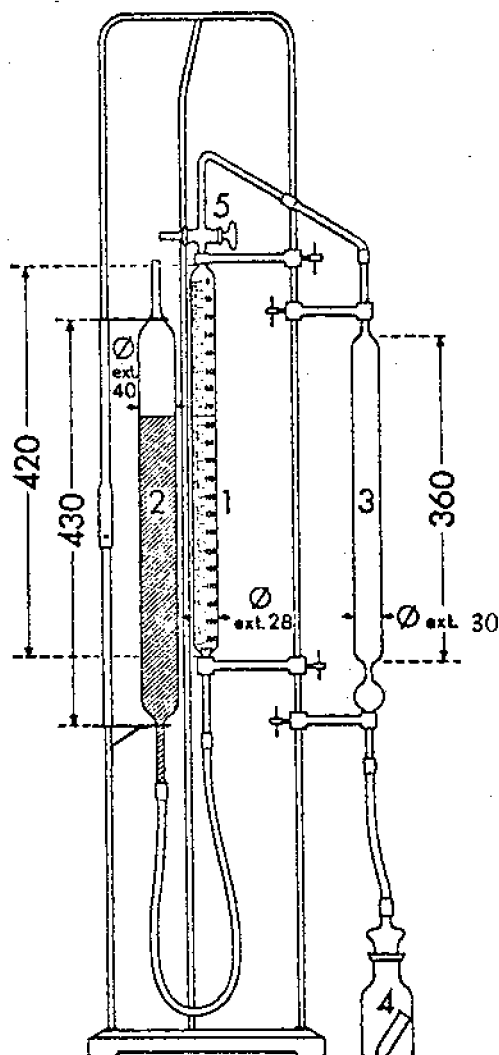
3.1. Kwas chlorowodorowy, d = 1,10.

3.2. Węglan wapnia.

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

4. APARATURA I SPRZĘT

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



Rysunek 1. Aparat Scheiblera-Dietricha do oznaczania CO_2 . Wymiary podane w mm

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

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

- 1) 0,5 g w przypadku produktów zawierających od 50 do 100% węglanów, wyrażanych jako węglan wapnia;
- 2) 1 g w przypadku produktów zawierającego od 40 do 50% węglanów, wyrażanych 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 wyznaczony jest 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 doprowadzony został do znaku 0.

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. Potrzasać kolbą, oznaczoną cyfrą 4 na rysunku 1, dopóki nie ustanie wydzielanie dwutlenku węgla.

Przywrócić ciśnienie, doprowadzając ciecz w rurce oznaczonej cyfrą 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 masa próbki 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, z użyciem 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 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 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 niższej niż 1 mg Fe/l i pozostałości po odparowaniu niższej niż 10 mg (jako siarczanu)/l.

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 nadtlenku wodoru, o którym mowa w ust. 3.6, i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.7.1. Roboczy roztwór wzorcowy żelaza (100 µg Fe/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego żelaza, 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 nadtlenku wodoru, o którym mowa w ust. 3.6, i uzupełnić do objętości 1 l wodą.

3.8.1. Roboczy roztwór wzorcowy miedzi (10 µg Cu/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego miedzi, 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 l wodą.

3.9.1. Roboczy roztwór wzorcowy manganu (10 µg Mn/ml) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego manganu, 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 l wodą.

3.10.1. Roboczy roztwór wzorcowy cynku ($10 \mu\text{g Zn/ml}$) przygotowany przez rozcieńczenie roztworu wzorcowego cynku, 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 l wodą.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Piec muflowy z regulacją temperatury i rejestratorem.

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

4.3. Tygły 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. Przemyć 2-krotnie wrzącą wodą filtr zawierający nierozpuszczalną pozostałość i umieścić w platynowym tygłku, o którym mowa w ust. 4.3. Spopielać w piecu muflowym w temperaturze niższej niż 550°C do całkowitego zaniku cząstek węgla. Pozostawić do schłodzenia, dodać kilka kropli wody, a następnie od 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 jest nadal widoczna 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, z dokładnością do 0,2 mg, od 5 do 10 g próbki i umieścić w kwarcowym lub platynowym tygłku, 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 suszarni o temperaturze 105°C i wstawić tygiel do zimnego pieca muflowego, o którym mowa w ust. 4.1. Zamknąć piec, tak aby spopielenie przebiegało bez dostępu powietrza lub tlenu, i stopniowo podwyższać temperaturę do $450 - 475^\circ\text{C}$ w czasie około 90 minut. Utrzymywać tę temperaturę od 4 do 16 godzin, najlepiej przez noc, aby usunąć związki węglowe, następnie otworzyć piec i pozostawić do schłodzenia; temperatura według wskazań pirometru nie powinna być wyższa niż 475°C .

Przemyć tygiel z użyciem 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 kroplami kwas chlorowodorowy, o którym mowa w ust. 3.1, 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. Spłukać zlewkę i filtr z użyciem 5 ml gorącego kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.2, i 2-krotnie wrzącą wodą. Uzupełnić kolbę miarową 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 od 450 do 475°C . Spopielenie, które wymaga od 3 do 5 godzin, uważa się za zakończone, gdy popiół ma 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 próbki 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 oznaczanie

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 żelaza, 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 do objętości 100 ml wodą							

Tabela 13. Miedź

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
ml roboczego roztworu wzorcowego miedzi, 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 do objętości 100 ml wodą							

Tabela 14. Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1
ml roboczego roztworu wzorcowego manganu, 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 do objętości 100 ml wodą							

Tabela 15. Cynk

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml roboczego roztworu wzorcowego cynku, 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 do objętości 100 ml wodą							

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 do pełnej objętości kolby kwasem chlorowodorowym, o którym mowa w ust. 3.3.

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 z użyciem 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 4-krotnie.

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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

5 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości mikroelementu nie wyższej niż 50 mg/kg,

10% wyższego wyniku, dla zawartości mikroelementu wyższej niż 50 do 100 mg/kg,

10 mg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości mikroelementu wyższej niż 100 do 200 mg/kg,
5% wyższego wyniku, dla zawartości mikroelementu wyższej niż 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 $\text{Ca} + \text{Mg} / \text{P} > 2$, 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 (retinolu) 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 wysokosprawnej chromatografii cieczonej z fazą odwróconą (RP-HPLC) z wykorzystaniem 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, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$, z uwzględnieniem 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 $x = 9$), z uwzględnieniem 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 do pełnej objętości tej kolby tym samym rozpuszczalnikiem. 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.

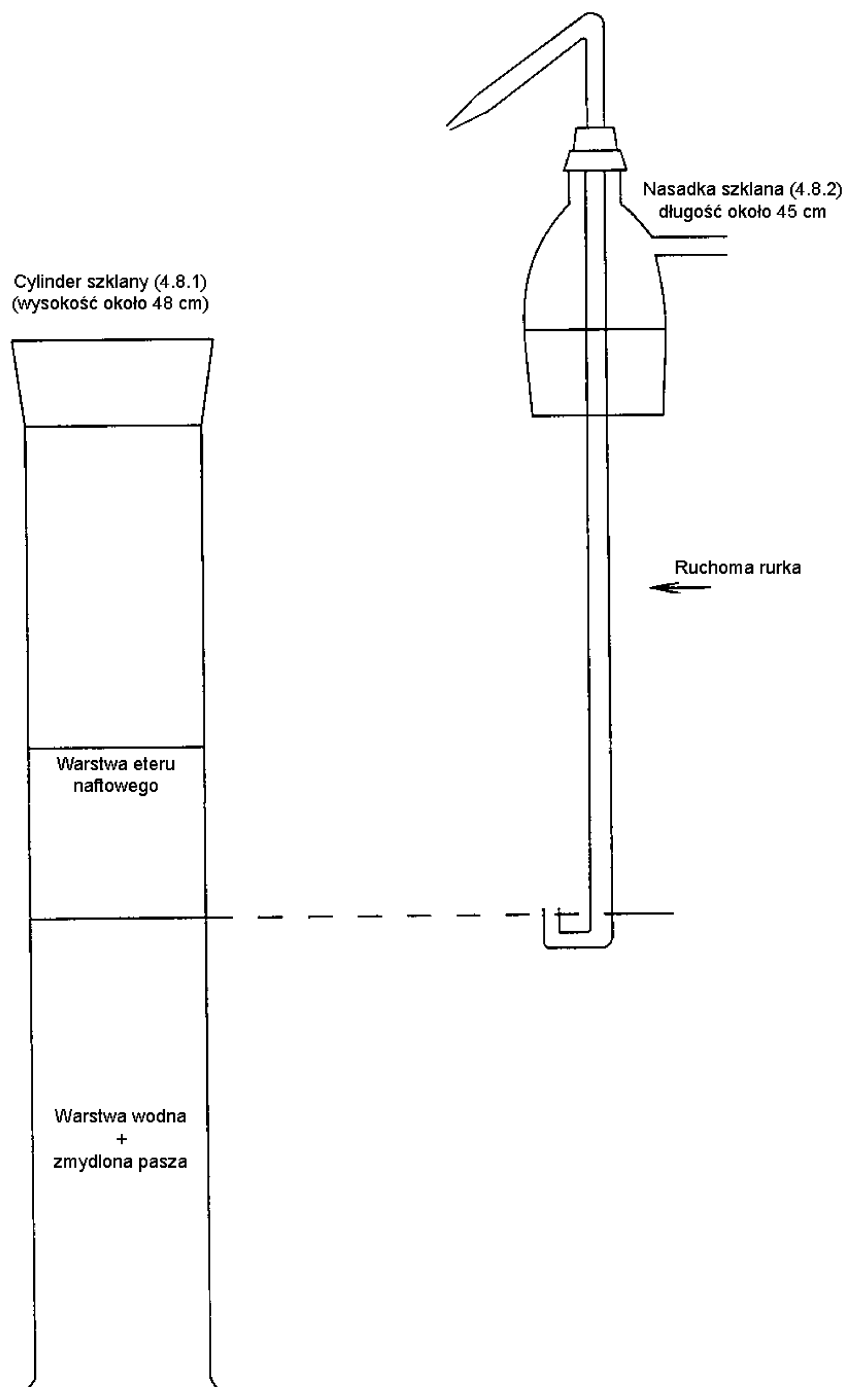
4.2.1. Kolba płaskodenna lub stożkowa o pojemności 500 ml, ze szlifem.

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 płaszcza 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 cieczowej, 250 x 4 mm, C₁₈, 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 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. Szklany cylinder o pojemności 1 l, ze szlifem i korkiem.
 - 4.8.2. Nasadkę szklaną 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.



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

Ponieważ witamina A jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie, zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane bez dostępu światła, i dlatego należy zastosować szkło oranżowe lub szkło zabezpieczone folią aluminiową, oraz bez dostępu tlenu, i dlatego należy płukać 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 próbki

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

5.2. Zmydlanie

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. Złożyć chłodnicę, o której mowa w ust. 4.3, na kolbę i umieścić kolbę w łaźni wodnej z miesadłem 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 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 osadu na 2 minuty.

5.3.1. Ekstrakcja z użyciem rozdzielacza stożkowego, o którym mowa w ust. 4.2.3

Po rozdzieleniu warstw, z uwzględnieniem ust. 7.3, przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza, o którym mowa w ust. 4.2.3. Powtórzyć ekstrakcję 2-krotnie, używając 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, i 2-krotnie używając 50 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2.

Przemyć 2-krotnie połączone ekstrakty w rozdzielaczu stożkowym 100 ml porcjami wody, ostrożnie mieszając, aby zapobiec powstawaniu zawiesiny, a następnie, wielokrotnie wstrząsając, powtórzyć przemycanie kolejnymi 100 ml porcjami wody, aż woda pozostanie bezbarwna po dodaniu roztworu fenoloftaleiny, o którym mowa w ust. 3.7. Wystarczy zwykle 4-krotne 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 z użyciem aparatu do ekstrakcji, o którym mowa w ust. 4.8

Jeżeli warstwy zostaną rozdzielone, z uwzględnieniem 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 rozdzielania 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 2-krotnie porcje 50 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, a następnie dodać warstwę eteru naftowego do rozdzielacza.

Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego w sposób określony w ust. 5.3.1 i dalej postępować w sposób tam określony.

5.4. Przygotowanie roztworu próbki do HPLC

Pobrać pipetą podzielną część roztworu eteru naftowego, otrzymanego w sposób określony w ust. 5.3.1 lub 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 z użyciem detektora UV (325 nm) lub detektora fluorescencyjnego o czułości - wzbudzenie: 325 nm, emisja: 475 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. 3.9. Obliczyć średnią wysokość (powierzchnię) piku kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) pików 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 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

Prędkość 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 prawie do sucha 100 ml tego ekstraktu na rotacyjnej wyparce próżniowej, z uwzględnieniem ust. 5.4, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu, o którym mowa w ust. 3.10, i ponownie rozpuścić pozostałość w 10 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. Roboczy roztwór wzorcowy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

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

Zadozować kilka razy 20 µl każdego z roztworów kalibracyjnych i określić średnie wysokości (powierzchnie) pików. Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) pików, 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 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 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 ml tego rozcieńczonego roztworu octanowej 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 a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

1%

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

1 cm

5.6.3.2. Roztwór podstawowy palmitynianowej witaminy A

Pobrać pipetą 2 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 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 a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

1%

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

1 cm

5.6.3.3. Robocze roztwory wzorcowe witaminy A

Pobrać pipetą 3 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 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 a 400 nm. Maksimum wygaśnięcia powinno znajdować się pomiędzy 325 a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

1%

(E — dla alkoholowej witaminy A = 1821 przy 325 nm w 2-propanolu)

1 cm

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:

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

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 podzielnej 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 jest wskazane połączenie ekstraktów eteru naftowego 2 zmydlanych 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 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 od 45 do 60 minut.

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu zwykłej kolumny jest możliwe 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 2 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]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
S_r [IU/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r [%]	3	3,5	4,1	8,1	3,8
S_R [IU/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R [%]	8	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 roztworem 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 wysokosprawnej 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 do 60°C.

3.3. Metanol.

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

3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $\beta = 10$ g/100 ml, z uwzględnieniem 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, $c = 0,5$ mol/l w glicerolu, $\beta = 120$ g/l (dla $x = 9$) z uwzględnieniem ust. 7.8.

3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $\beta = 2$ g/100 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 pełnej objętości kolby 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 pełnej objętości kolby 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 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 płaszcza 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 cieczowej, 250 x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 5 lub 10 μ m 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 l, ze szlifem i korkiem.

4.8.2. Nasadkę szklaną 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

Ponieważ witamina E jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie, zaleca się, aby wszystkie czynności były przeprowadzane bez dostępu światła, i dlatego należy zastosować szkło oranżowe lub szkło zabezpieczone folią aluminiową, oraz bez dostępu tlenu, i dlatego należy płukać 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 wydzielalo się ciepło. Aby zapobiec stratom witaminy E, rozdrabnianie powinno być przeprowadzone tuż przed ważeniem i zmydleniem.

5.2. Zmydlenie

W zależności od zawartości witaminy E odważyć, 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. 3.6.1. 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 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 2-krotnie, używając 100 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2, i używając 2-krotnie 50 ml eteru naftowego, o którym mowa w ust. 3.2.

Przemyć 2-krotnie 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 fenolofaleiny, o którym mowa w ust. 3.7. Wystarczy zwykle 4-krotne 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 pełnej objętości kolby 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 2-krotnie porcję 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 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 roztworu, otrzymanego w sposób określony w ust. 5.4 i wymywać fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.8. Obliczyć średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku kolejnych dozowań tego samego roztworu próbki i średnie wysokości (powierzchnie) pików kilku dozowań kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 5.6.2.

Warunki HPLC

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

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

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

Prędkość 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 (octanu 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 pełnej objętości kolby 500 ml eterem naftowym, o którym mowa w ust. 3.2. Odparować prawie do sucha 25 ml tego ekstraktu na rotacyjnej wyparce próżniowej, przy uwzględnieniu ust. 5.4, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu, o którym mowa w ust. 3.9, i ponownie rozpuścić pozostałość w 25 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, 2, 4 i 10 ml roboczego roztworu wzorcowego do kolb miarowych o pojemności 20 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem, o którym mowa w ust. 3.3, i zmieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,5, 5, 10 i 25 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) pików.

Wykorzystując średnie wysokości (powierzchnie) pików, 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 ml roztworu podstawowego octanu DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.10.1, w 25 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:

1%

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

1 cm

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 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 pełnej objętości kolby metanolem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 40 μg DL- α -tokoferolu na 1 ml, co odpowiada 44 μg octanu DL- α -tokoferolu na 1 ml. Wzorcowy roztwór roboczy przygotowuje się bezpośrednio przed użyciem.

5.6.2.2. Przygotowanie kalibracyjnych roztworów i krzywej kalibracyjnej

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

Zadozować 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 ml roztworu podstawowego DL- α -tokoferolu, o którym mowa w ust. 3.11.1, w 25 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 i 320 nm.

Maksimum absorpcji powinno wystąpić przy 292 nm.

1%

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

1 cm

Przy tym rozcieńczeniu wartość 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 ust. 5.6.2.2.

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

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

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 podzielonej 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 jest wskazane połączenie ekstraktów eteru naftowego z 2 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 rozdzielania 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 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 ust. 3.11.1, i roztwór przechowywać w lodówce nie dłużej niż przez 4 tygodnie.

7.5. Zamiast BHT może być użyty hydrochinon.

7.6. Przy zastosowaniu zwykłej kolumny jest możliwe 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 2 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 (VDLUF). 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	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	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6	6	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 dodatkiem Tween 80. Ekstrakt dekantuje się lub odwirowuje i rozcieńcza. Aktywność antybiotyczna 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 14 dni.

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 suspensję szczepić 250 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux i inkubować od 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 7 dni 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 i ich analiza

Pepton mięsa	6 g
Trypton	4 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1 g
Agar	10 do 20 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_2HPO_4 – 2 g
Dwuwodorofosforan potasu KH_2PO_4 – 8 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, metanolemowy 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 $\mu\text{g/ml}$

S_1 0,125 $\mu\text{g/ml}$.

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 $\mu\text{g/ml}$ ($= U_8$).

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

Odważyć próbkę o masie nie większej niż 10 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 $\mu\text{g/ml}$ ($= U_8$).

6.2. Roztwory do oznaczania

Z roztworu U_8 przygotować roztwór U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,5 $\mu\text{g/ml}$, U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,25 $\mu\text{g/ml}$, U_1 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,125 $\mu\text{g/ml}$ metodą kolejnych rozcieńczeń (1 + 1) z użyciem 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. 4.1, 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 bakteryjnej zawiesiny, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń wirginiamycyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy 4 stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i 4 stężeniach analizowanych roztworów (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Te 4 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, 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 4-krotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Płytki inkubować od 16 do 18 godzin w temperaturze 30°C $\pm$ 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 przez 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.

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

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

Wynik wyrazić w mg wirginiamycyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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-BACYTRACYN 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 zaszczipionym *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 14 dni.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego skosu agarowego, o którym mowa w ust. 3.1, z użyciem 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 od 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 7 dni 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 g
Trypton	4 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1 g
Agar	10 do 20 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 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1 g
Agar	10 do 20 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, 0,1 M.

4.8. Roztwór wodorotlenku sodu (1 M).

4.9. Roztwór siarczku sodu, w przybliżeniu 0,5 M.

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

Rozpuścić 0,1 g purpury bromokrezolowej w 18,5 ml 0,01M roztworu wodorotlenku sodu. Uzupełnić do objętości 2,5 l 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 z użyciem 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 do 5 g próbki, dodać 29 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 g, dodać 49 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

z użyciem 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, a jeżeli oczekiwana zawartość Zn-bacytracyny wynosi 5 mg/kg, odważyć 20 g próbki. Dodać mieszaninę składającą się z 24 ml mieszaniny, o której mowa w ust. 4.4, i 1 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, wstrząsając przez 15 minut i odwirować. Pobrać 20 ml supernatantu roztworu i dostosować pH do 6,5 z użyciem roztworu wodorotlenku sodu, o którym mowa w ust. 4.8, sprawdzając przy użyciu pehametru lub 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 roztwory: 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 przeszczepu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.2, określić wymaganą ilość bakteryjnej zawiesiny, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń Zn-bacytracyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy 4 stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i 4 stężeniach badanych roztworów (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). 4 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 4-krotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Płytki inkubować 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 przez 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”:

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

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

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

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

Wynik wyrazić w mg Zn-bacytracyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 2 próbki zawierające kulturę macierzystą, o której mowa w ust. 3.1, i przeszczepiać je raz na 7 dni. 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 do 2 lub 4 próbek zawierających skosy podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1. Inkubować od 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 g
Trypton	4 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1 g
Agar	15 g
Woda	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki, w tym oxoid 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 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Agar	10 g
Woda	1 l
pH	6,5 (po sterylizacji).

Mogą być zastosowane inne dostępne podłoża o podobnym składzie, dające takie same wyniki, w tym oxoid 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 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, z użyciem wody o objętości 500 ml.

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

Rozcieńczyć 800 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, z użyciem 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 do 5 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, z użyciem 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 mieszaninę i zdekantować ekstrakt.

7.1.2. Pozostałe pasze

Odważyć od 5 do 30 g próbki zawierającej co najmniej 30 µg flawofosfolipolu. Homogenizować ze 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, z użyciem 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 z użyciem 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 mieszaninę 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 ze 150 ml metanolu, o którym mowa w ust. 4.4, i roztwór przechowywać 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 eluentu 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, z użyciem 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, roztwór U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,05 µg/ml, i roztwór 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 warstwę do posiewu, o której mowa w ust. 4.2.2, zawiesiną 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 bakteryjnej zawiesiny, 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 4 stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i 4 stężeniach analizowanych podłoży (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Te 4 stężenia ekstraktu i wzorca powinny być umieszczone na każdej płycie. 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 mm. 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 4-krotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

8.3. Inkubacja

Płytki inkubować od 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 przez 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”:

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

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

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, według których oceniano równoległość.

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

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 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 ten fakt w końcowym sprawozdaniu.

10. SPRAWDZENIE METODY

10.1. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 SPIRAMYCYN 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 PRZEWODZENIA 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 14 dni.

3.2. Przygotowanie zawiesiny bakteryjnej

Zebrać kulturę macierzystą ze świeżo przygotowanego skosu agarowego, o którym mowa w ust. 3.1, z użyciem 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 od 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 7 dni 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 g
Trypton	4 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1 g
Agar	10 do 20 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 g
Ekstrakt drożdżowy	4 g
Ekstrakt mięsny	3 g
Agar	10 do 20 g
Woda	1 l
pH	8 (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:

Wodorofosforan dwupotasu K_2HPO_4	16,7 g
Dwuwodorofosforan potasu KH_2PO_4	0,5 g
Wodorowęglan sodu $NaHCO_3$	20 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 g próbki w przypadku pasz i od 1 do 20 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 z użyciem 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 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, roztwór U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 0,25 IU/ ml, i roztwór 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 bakteryjnej zawiesiny, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń spiramycyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy 4 stężeniach wzorcowych roztworów (S_8, S_4, S_2, S_1) i 4 stężeniach analizowanych roztworów (U_8, U_4, U_2, U_1). Te 4 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, zaszczerpiętego 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 4-krotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Płytki inkubować od 16 do 18 godzin w temperaturze $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

8. OBLICZANIE WYNIKÓW

Zmierzyć średnicę stref zahamowania z dokładnością do 0,1 mm. Nanieść średnią wartość pomiarów dla każdego stężenia na papier o skali półlogarytmicznej, pokazując zależność logarytmu 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 przez 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 oceniono równoległość:

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.

$$U_8 = S_8 \times A$$

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

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

Wynik wyrazić w mg spiramycyny na kg paszy.

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 AWOPARCYN Y METODĄ DYFUZJI W ŻELU AGAROWYM

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości awoparcyny w paszach i premiksach. Dolna granica oznaczalności metody wynosi 2 mg/kg (2 ppm). Obecność antybiotyków politerowych może interferować przy oznaczaniu.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Metoda polega na ekstrakcji awoparcyny przy użyciu mieszaniny acetonu, wody i kwasu chlorowodorowego. Aktywność antybiotyku ekstraktu jest oznaczana przez pomiar dyfuzji awoparcyny 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.

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 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 g
Trypton	4 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1 g
Agar	15 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 którym 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 µg/ml
S_4	2 µg/ml
S_2	1 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 µg/ml
S_4	1 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 znajduje się od 10 do 100 mg awoparcyny. Próbkę umieścić 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 z zastosowaniem 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 pełnej objętości mieszaniną, o której mowa w ust. 4.6, i zmieszać. Przechowywać 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 oczekiwane stężenie awoparcyny 4 µg/ml (= U_8).

Z tego roztworu przygotować: roztwór U_4 , którego oczekiwana zawartość wynosi 2 µg/ml, roztwór U_2 , którego oczekiwana zawartość wynosi 1 µg/ml, i roztwór 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 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_x	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, zawiesiną bakteryjną, o której mowa w ust. 3.2, w temperaturze od 50 do 60°C. Uwzględniając wstępne próby przeszczepu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.1, określić wymaganą ilość bakteryjnej zawiesiny, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń awoparcyny.

7.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy 4 stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i 4 stężeniach analizowanych roztworów (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Te 4 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

plytkach 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, zaszczerpiętego 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 4-krotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Płytki inkubować 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 przez 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. 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, powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężenia ekstraktów lub, jeżeli nie jest to możliwe, wzorcowych roztworów. Jeżeli względna aktywność nadal nie mieści się w wymaganym przedziale, to uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować ten fakt w końcowym sprawozdaniu z badań.

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

9. SPRAWDZENIE METODY

9.1. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 agaru w ośrodku 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. Czułość 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 suspensję 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 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Glukoza	1 g
Agar	10 – 20 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	1 g
Ekstrakt drożdżowy	2,5 g
Wodorofosforan dwupotasowy K_2HPO_4	0,69 g
Dwuwodorofosforan potasowy KH_2PO_4	0,45 g
Agar	10 – 20 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, granulit (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 14 dni.

Z roztworu podstawowego przygotować, metodą kolejnych rozcieńczeń metanolem, o którym mowa w ust. 4.6, następujące roztwory:

S_8 8 µg/ml

S_4 4 µg/ml

S_2 2 µg/ml

S_1 1 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. Przemyć 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 co najmniej przez 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 hodowli 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 przeszczepu na płytki z analizowanym podłożem, o którym mowa w ust. 4.2, określić wymaganą ilość bakteryjnej zawiesiny, przy której występują największe i wyraźne strefy zahamowania dla różnych stężeń wirginiamycyny.

8.2. Przygotowanie płytek

Dyfuzja w agarze jest prowadzona na płytkach przy 4 stężeniach wzorcowych roztworów (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) i 4 stężeniach analizowanych roztworów (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Te 4 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. 8.1, 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 4-krotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

8.3. Inkubacja

Płytki inkubować 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 przez 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, powtórzyć oznaczenie, wprowadzając odpowiednią korektę stężeń ekstraktu lub, jeżeli nie jest to możliwe, wzorcowych roztworów. Jeżeli względna aktywność nadal nie mieści się w wymaganym przedziale, to uzyskane wyniki należy traktować jako przybliżone i odnotować ten fakt w końcowym sprawozdaniu z badań.

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

10. SPRAWDZENIE METODY**10.1. Powtarzalność**

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 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. 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 suspensję szczepić 250 ml podłoża do hodowli mikroorganizmów, o którym mowa w ust. 4.1, umieszczonego w kolbie Roux, dostosowanej do pH 7. Inkubować 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 7 dni.

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:

Glukoza	1 g
Pepton trypsynowy	10 g
Ekstrakt mięsny	1,5 g
Ekstrakt drożdżowy	3 g
Agar - w zależności od jakości	10 do 20 g
Woda destylowana	do 1 000 ml

Bezpośrednio przed użyciem – pH podłoża dostosować do 7, co jest konieczne do utrzymania szczepu macierzystego i suspensji bakteryjnej, a w przypadku oznaczania – pH dostosować do 8.

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	5,5g
Wodorofosforan dwupotasu K_2HPO_4	13,6g
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

Substancję wzorcową, o której mowa w ust. 4.8, suszyć 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 1ml.

Z otrzymanego roztworu podstawowego przygotować roztwór wzorcowy roboczy S_8 zawierający 2 µg tylozyny w 1ml, 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:

S_4 1 µg/ml

S_2 0,5 µg/ml

S_1 0,25 µg/ml

6. EKSTRAKcja

W przypadku koncentratu przygotować próbkę o wadze 10 g, a 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 mieszaniny, o której mowa w ust. 4.7, aby otrzymać stężenie tylozyny wynoszące około 2 µg w 1ml (=U₈). Następnie przygotować stężenia U₄, U₂ i U₁, metodą kolejnych rozcieńczeń (1+1) z użyciem 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

Dyfuzyja w agarze jest prowadzona na płytkach przy 4 stężeniach wzorcowych roztworów (S₈, S₄, S₂, S₁) i 4 stężeniach ekstraktu (U₈, U₄, U₂, U₁). Te 4 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 4-krotnie, tak aby każde oznaczenie odpowiadało pomiarowi 32 stref zahamowania.

7.3. Inkubacja

Płytki inkubować 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:

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

Aktywność rzeczywista = aktywność przypuszczalna x aktywność względna

9. SPRAWDZENIE METODY

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 10% w wartości względnej.

6.8. OZNACZANIE KARBADOKSU

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości karbadoksu (metylo 3-(2-chinoksalinylo-metyleno) pikrynian N¹,N⁴-dwutlenek) 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, $c = 0,01 \text{ mol/l}$, $\text{pH} = 6$.

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 6 kwasem octowym, o którym mowa w ust. 3.6. Przenieść do kolby miarowej o pojemności 1 l, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, o której mowa w ust. 3.8, 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, w szczególności przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut.

3.11. Substancja wzorcowa:

Czysty karbadoks: metylo 3-(2-chinoksalinylometryleno)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 do miesiąca.

3.11.2. Roztwory kalibracyjne.

Przenieść 2, 5, 10 i 20 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, 5, 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu. Roztwory kalibracyjne sporządza się bezpośrednio przed użyciem.

Do oznaczenia karbadoksu w paszach zawierających mniej niż 10 mg/kg – sporządza się roztwory kalibracyjne o stężeniu niższym niż 2 $\mu\text{g/ml}$.

3.12. Mieszanina wody i mieszanina 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 spiekem szklanym oraz zaworem odpływowym.

Dopuszcza się użycie szklanej kolumny z kurkiem lub ze ściętym końcem i 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 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

Ponieważ karbadoks jest wrażliwy na światło, 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 karbadoksu i 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 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 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 z zastosowaniem 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% karbadoksu

Odważyć, z dokładnością do 0,01 g, około 1 g niezmielonej próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 200 ml. Dodać 15 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 z użyciem 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 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 karbadoksu wyższej niż 2%

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 0,2 g niezmielonej próbki i przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać 45 ml wody, zmieszać i równoważyć przez 5 minut. Dodać 105 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 z zastosowaniem 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 rozcieńczania 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 tlenku glinu

Odważyć 4 g tlenku 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 eluentu. 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:	300 x 4 mm, C ₁₈ , wypełnienie 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.10:	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
Prędkość 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 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z wzorcowych roztworów, o których mowa w ust. 3.11.2, i określić wysokości (powierzchnie) piku 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.

5.4.3. Roztwór próbki

Zadozować 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) piku 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:

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

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:

$$w = \frac{\delta \times V_2 \times f}{m} [\text{mg/kg}]$$

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 ekstraktu w ml, 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 $\mu\text{g/ml}$ karbadoksu.

7.1.1. Kochromatografia

Ekstrakty próbki fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.11.2. Ilość 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 ± 2 nm;

2) w zakresie pomiędzy 225 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 2 widmami nie jest wyższa 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 2 widmami nie jest wyższa niż 15% widma wartości szczytowej.

Jeżeli jedno z tych kryteriów nie jest spełnione, obecność analitu nie jest potwierdzona.

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 8 laboratoriów przeprowadzono analizę 6 próbek pasz, 4 premiksów i 3 preparatów. Analizę każdej próbki przeprowadzono 2-krotnie⁴⁾. 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	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S_x (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV _x (%)	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	50	50	50	50	50

⁴⁾ Bardziej szczegółowe informacje dotyczące tej analizy można znaleźć w *Dzienniku AOAC International*, Tom 71, 1988, s. 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	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV _r (%)	4,2	3	3	5	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	4,3	6,3	5,7	6,5	7,4
Zawartość nominalna (mg/kg)	10	10	10	10	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

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości olaquindoksu (2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksalino-N¹,N⁴-dioksyd) 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 wody, o której mowa w ust. 3.3, i metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, w stosunku 900 + 100 (V + V).

3.5. Substancja wzorcowa: czysty olaquindoks (2-[N-2'-(hydroksyetyl)karbamoil]-3-metylochinoksalino-N¹,N⁴-dioksyd, E 851).

3.5.1. Roztwór wzorcowy podstawowy olaquindoksu, 250 µg/ml.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg olaquindoksu, 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 do pełnej objętości kolby wodą 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 roztworu wzorcowego podstawowego, 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, 2, 5, 10, 15 i 20 ml roztworu wzorcowego pośredniego, 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, 2,5, 5, 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 x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne.

4.4. Filtr membranowy, 0,45 µm.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Ponieważ olaquindoks jest wrażliwy na światło, 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 roztworu wzorcowego podstawowego, 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 15 minut. Wyjąć kolbę z łaźni i wstrząsać nią przez 30 minut z użyciem wstrząsarki mechanicznej, o której mowa w ust. 4.2, następnie przefiltrować przez pofałdowany 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 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
Prędkość 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 roztworów kalibracyjnych, 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 roztworów kalibracyjnych 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 piku 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 2 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 2 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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać 15% najwyższego wyniku, dla zawartości olaquindoksu od 10 do 200 mg/kg.

7.3. Odzysk

Odzysk olaquindoksu dodanego do ślepej próby paszy nie może być niższy niż 90%.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy 13 laboratoriów, przeprowadzono analizę 4 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	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
Nominalna zawartość (mg/kg)	–	15	50	100
Odzysk (%)	–	97,3	96	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 odtwarzalności.

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 otrzymania 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

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości metylobenzoquatu (7-benzylloksy-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon) 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) z użyciem detektora UV.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Dwuchlorometan.

3.2. Metanol do HPLC.

3.3. Faza ruchoma HPLC:

Mieszanina metanolu, o którym mowa w ust. 3.2, i wody do HPLC, w stosunku 75 + 25 (v+v).

Przefiltrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.5, i odgazować roztwór, w szczególności przy zastosowaniu ultradźwięków przez 10 minut.

3.4. Roztwór kwasu metanosulfonowego, s=2%.

Rozcieńczyć 20 ml kwasu metanosulfonowego metanolem, o którym mowa w ust. 3.2, do objętości 1 l.

3.5. Roztwór kwasu chlorowodorowego, s=10%

Rozcieńczyć 100 ml kwasu chlorowodorowego ($\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$) wodą do objętości 1 l.

3.6. Żywica kationowowymienna 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 ogrzewa na płycie grzewczej do wrzenia, ciągle mieszając. Pozostawić do schłodzenia i zdekantować kwasem. Przefiltrować w warunkach próżni na filtrze z bibuły. Żywicę przemyć 2-krotnie 500 ml porcjami wody, a następnie 250 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2. Żywicę przemyć ponownie 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-benzyloksi-6-butylo-3-metoksykarbonylo-4-chinolon)

3.7.1. Roztwór wzorcowy podstawowy metylobenzoquatu, 500 µg/ml.

Odważyć, z dokładnością do 0,1 mg, 50 mg substancji wzorcowej, o której mowa w ust. 3.7, rozpuścić w roztworze kwasu metanosulfonowego, o którym mowa w ust. 3.4, w kolbie miarowej o pojemności 100 ml, uzupełnić do pełnej objętości kolby kwasem 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 do pełnej objętości kolby metanolem, o którym mowa w ust. 3.2, i zmieszać.

3.7.3. Roztwory wzorcowe do kalibracji.

Do kolb miarowych o pojemności 25 ml przenieść kolejno 1, 2, 3, 4 i 5 ml roztworu wzorcowego pośredniego metylobenzoquatu, o którym mowa w ust. 3.7.2. Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.3, i zmieszać. Roztwory te mają odpowiednio stężenia 2, 4, 6, 8 i 10 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 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 metylobenzoquatu 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 roztworu wzorcowego 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, z dokładnością do 0,01 g, około 20 g przygotowanej próby i umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml. Dodać 100 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 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 2 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 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 kationowowymiennnej

Dolny koniec kolumny, o której mowa w ust. 4.3, zatkać zwitkiem waty szklanej. Przygotować zawiesinę 5 g żywicy kationowowymiennnej, o której mowa w ust. 3.6, i 50 ml roztworu kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.5. Wlać ją do kolumny i pozostawić do ustabilizowania się. Zlać nadmiar kwasu znad powierzchni żywicy i przemyć 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 2 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, tak aby prędkość zbierania ekstraktu nie była wyższa 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 eluent w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml.

5.5. Rozdział w układzie ciecz – ciecz

Eluent otrzymany w sposób określony w ust. 5.4.2, przenieść do rozdzielacza o pojemności 1 l. Przemycić 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 2 porcjami 70 ml dwuchlorometanu i ekstrakty 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. Przemycić 2 razy kolbę okrągłodenną następnymi 2 porcjami od 1 do 2 ml metanolu, a następnie przenieść do kolby miarowej. Uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem 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 x 4 mm, C ₁₈ , 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
Prędkość 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) piku i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.6.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z kalibracyjnych roztworów, o których mowa w ust. 3.7.3, i określić wysokości (powierzchnie) piku 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

Zadozować kilka razy ekstrakt próbki, o którym mowa w ust. 5.5, stosując taką samą objętość jak przy roztworach kalibracyjnych, i wyznaczyć średnią wysokość (powierzchnię) piku 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 piku metylobenzoquatu, po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość piku 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 piku 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 od 220 do 350 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku na chromatogramie nie powinny się różnić dla tych części widma w zakresie od 10 do 100% względnej absorbancji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 widmami nie jest większa niż 15% absorbancji 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 2 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 2 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 10 laboratoriów przeprowadzono analizę 5 próbek. Analizę każdej próbki przeprowadzono 2-krotnie.

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
CV _R (%)	-	8,90	11,10	10,10	11,50
Odzysk (%)	-	92	93	92	89

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

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości halofuginonu (dl-trans-7-bromo-6-chloro-3-[3-(3-hydroksy-2-piperydylo)acetonylo]-chinazolin-4-(3H)-1 bromowoderek) 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 z wykorzystaniem 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)acetonylo]-chinazolin-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 zachowuje stabilność do 3 tygodni, 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, 2, 3, 4, i 6 ml roztworu wzorcowego podstawowego halofuginonu, o którym mowa w ust. 3.6.1. Uzupełnić do pełnej objętości kolb fazą ruchomą, o której mowa w ust. 3.21, i zmieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1, 2, 3, 4 i 6 µg/ml halofuginonu. Roztwory te przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.7. Kwas chlorowodorowy (ρ₂₀ = około 1,16 g/ml).

3.8. Metanol.

3.9. Azotan srebra.

3.10. Askorbinian sodu.

3.11. Węglan sodu.

3.12. Chlorek sodu.

3.13. EDTA (etylenodwuaminocteroowy kwas, sól dwusodowa).

3.14. Woda do HPLC.

3.15. Roztwór węglanu sodu, $V = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$.

3.16. Roztwór chlorku sodu nasyconego węglanem sodu, $V = 5 \text{ g}/100 \text{ ml}$.

Rozpuścić 50 g węglanu sodu, o którym mowa w ust. 3.11, w wodzie, rozcieńczyć do objętości 1 l 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 l.

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 l.

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 pH do 4,3. Przechowywać przez filtr membranowy, o którym mowa w ust. 4.8, a następnie odgazować roztwór, w szczególności przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut. Roztwór zachowuje stabilność do miesiąca, jeżeli jest przechowywany w zamkniętym naczyniu, bez dostępu światła.

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 x 4 mm, C_{18} , wypełnienie 10 μm lub równoważne.

4.5. Kolumna szklana o wymiarach 300 x 10 mm z kranem i filtrem ze spiekane 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 odcianie etylu dłużej niż przez 30 minut.

5.1. Wskazówki ogólne.

5.1.1. Ślepą próbę paszy przeanalizować w celu sprawdzenia, czy nie zawiera ona halofuginonu i 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 węglanu 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 3 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 kolejnej ilości 50 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.17, 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 octanu etylowego odparować na rotacyjnej wyparce warstewkowej, o której mowa w ust. 4.2. Temperatura wody w łaźni nie powinna przekraczać 40°C. Pozostały octan etylu zostanie usunięty w próżni o ciśnieniu około 25 mbar i temperaturze 38°C, w czasie 5 minut.

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 szklanej waty w górną część podłoża żywicy. Wydrenować metanol z kolumny, a następnie przemyć żywicę 100 ml wody, zatrzymując proces, gdy ciecz dosięgnie górnej części powierzchni żywicy. Pozostawić kolumnę do ustabilizowania 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 eluent. Prędkość elucji nie powinna przekraczać 20 ml/min. Przemyć kolbę okrągłodenną 20 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.17. Użyć tego kwasu do przemycia kolumny z żywicą. Usunąć 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 eluent w kolbę okrągłodenną o pojemności 250 ml. Pozostawić pozostały metanol na 10 minut w celu ustabilizowania z żywicą, a następnie kontynuować elucję, której prędkość nie powinna przekraczać 20 ml/min, zbierając eluent 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 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 300 x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne w ust. 4.4.1:

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, w szczególności przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej przez 10 minut

Prędkość 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 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku i czasów retencji.

Dopuszczalne jest zastosowanie innych parametrów gwarantujących uzyskanie równoważnych wyników.

5.4.2. Krzywa kalibracyjna

Zadozować kilka razy każdy z roztworów kalibracyjnych, o których mowa w ust. 3.6.2, i określić wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) pików roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.4.3. Roztwór próbki

Zadozować 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.

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 piku halofuginonu, po uwzględnieniu zarówno dodanej ilości, jak i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość piku 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 piku 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 od 225 do 300 nm próbka i widma wzorcowe zapisane w punkcie wierzchołka piku 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 2 widmami nie jest większa niż 15% absorpcji 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% absorpcji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów, rozbieżność między 2 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 2 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 8 laboratoriów przeprowadzono analizę⁵⁾ 3 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 2 miesiącach	przy odbiorze	po 2 miesiącach
Średnia (mg/kg)	n.w.	2,80	2,42	2,89	2,45
S_R	-	0,45	0,43	0,40	0,42
CV_R (%)	-	16	18	14	17
odzysk (%)	-	86	74	88	75

n.w. – nie wykryto; S_R – odchylenie standardowe powtarzalności; CV_R – współczynnik zmienności.

7.3. OZNACZANIE ROBENIDYNY

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości robenidyny (chlorowodorek 1,3-bis[(4-chlorobenzylideno)amino]guanidyny) 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, zatęża 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 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 1 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 (KH_2PO_4), $c = 0,25$ mol/l:

3,40 g KH_2PO_4 rozpuścić w wodzie w kolbie miarowej o pojemności 1 l, uzupełnić do pełnej objętości kolby i mieszać.

3.7. Roztwór wodorofosforanu 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 l, 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 KH_2PO_4 , 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, w szczególności przy zastosowaniu ultradźwięków przez 10 minut.

⁵⁾The Analyst 108 z 1983 r., str. 1252-1256.

3.9. Substancja wzorcowa.

Czysta robenidyna: chlorowodorek 1,3-bis[(4-chlorobenzylideno)amino]chlorowodoru guanidyny, E 750.

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 roztworu wzorcowego podstawowego 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, 10, 15, 20 i 25 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 µg/ml robenidyny. Roztwory przygotować bezpośrednio przed użyciem.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Kolumna szklana.

Przygotować kolumnę ze szkła oranżowego o średnicy wewnętrznej od 10 do 15 mm i długości 250 mm, wyposażoną w kran i zbiorniczek o pojemności około 150 ml.

4.2. Wstrząsarka laboratoryjna.

4.3. Rotacyjna wyparka warstwowa.

4.4. Wyposażenie do HPLC z detektorem UV lub diodowym pracującym w zakresie od 250 do 400 nm.

4.4.1. Kolumna do chromatografii cieczowej o wymiarach 300 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

Ponieważ 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 robenidyny i innych substancji interferujących.

5.1.2. Przeprowadzić badanie odzysku, analizując ślepą 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 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. Odważyć umieścić w kolbie stożkowej o pojemności 250 ml i dodać 100 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 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 szklanej waty i wbić ją, używając szklanego pręcika. Odważyć 11 g tlenku glinu, o którym mowa w ust. 3.5, i przenieść go do kolumny. Czynność tę wykonywać tak, aby ograniczyć do minimum działanie powietrza atmosferycznego. Delikatnie postukać w napełnioną kolumnę od strony dna 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 prędkości przepływu od 2 do 3 ml na minutę, a eluent 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 od 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 którym mowa w ust. 5.4.

5.4. Oznaczanie HPLC

5.4.1. Parametry

Podane niżej parametry oznaczania są przykładowe.

Kolumna do chromatografii cieczowej, 300 x 4 mm, C₁₈, wypełnienie 10 µm lub równoważne
o której mowa w ust. 4.4.1:

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 KH₂PO₄, 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, w szczególności przy zastosowaniu ultradźwięków przez 10 minut

Prędkość 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

Zadawać 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

Zadawać 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, z użyciem którego porównuje się widma ekstraktu próbki i roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.9.3, zawierającego 6 µg/ml.

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 od 250 do 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 absorbancji; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 widmami nie jest większa niż 15% absorbancji 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% absorbancji względnej; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 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 2 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 nie powinien być mniejszy niż 85%.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy 12 laboratoriów przeprowadzono analizę 4 próbek paszy dla drobiu i królików, w postaci mączki lub granulatu. Analizę każdej próbki przeprowadzono 2-krotnie. 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	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	10,6	9,7
Odzysk (%)	90	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 CHROMATOGRAPHII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości amprolium (chlorowoderek chlorku 1-[(4-amino-2-propylopirymidyno-5-yl)metyl]-2-metylo-pirydyny) 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 kationowo wymienną wysokosprawną chromatografią cieczową 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, 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 l, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą 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 l, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą 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, w szczególności przy zastosowaniu łaźni ultradźwiękowej co najmniej przez 15 minut.

3.7. Substancja wzorcowa:

Czyste amprolium, chlorowoderek 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 do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Roztwór przechowywany w temperaturze 4°C zachowuje stabilność nie dłużej niż miesiąc.

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 nie dłużej niż miesiąc.

3.7.3. Roztwory kalibracyjne.

Przenieść 0,5, 1 i 2 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 odpowiadają odpowiednio 0,5, 1 i 2 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 cieczowej o wymiarach 125 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 amprolium i 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 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 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, od 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, 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, uwzględniając ust. 9.3. Przefiltrować od 5 do 10 ml 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. Przefiltrować od 5 do 10 ml 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 cieczowej, o której mowa w ust. 4.1.1:	125 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
---	---

Prędkość 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 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 roztworów kalibracyjnych na osi rzędnych i odpowiadające im stężenia w µg/ml na osi odciętych.

5.3.3. Roztwór próbki

Zadawać 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 µg/ml, odnosząc się do wykresu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 5.3.2.

Zawartość amprolium w mg/kg próbki obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{V \times \delta \times f}{m} \text{ [mg/kg]}$$

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 µg/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 kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.7.3, zawierającego 2 µg/ml.

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.

Powinna 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 ± 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 ±2 nm;
2) w zakresie od 210 do 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 2 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 2 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 2 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 3 pasz dla drobiu (próbki 1-3), paszy mineralnej (próbka 4) i premixu (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
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 piku amprolium może się znacznie przesunąć, z uwagi na zmiany siły jonowej.

7.5. OZNACZANIE DIKLAZURILU

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości diklazurilu ((+)-4-chlorofenylo[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksol-1,2,4-triazyno-2-yl)fenylo]acetonitryl) 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, ρ₂₀ = 1,19 g/ml.

3.8. Substancja wzorcowa: diklazuril II-24 (+)-4-chlorofenylo[2,6-dwuchloro-4-(2,3,4,5-tetrahydro-3,5-dioksol-1,2,4-triazyno-2-yl)fenylo]acetonitryl o gwarantowanej czystości, E 771.

3.8.1. Roztwór wzorcowy podstawowy diklazurilu, 500 µg/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 zmieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność do miesiąca.

3.8.2. Roztwór wzorcowy diklazurilu, 50 µg/ml.

Przenieść 5 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 zmieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność do miesiąca.

3.9. Substancja wzorcowa wewnętrzna: 2,6-dwuchloro-α-(4-chlorofenylo)-4-(4,5dihydro-3,5-dioksol-1,2,4-triazyno-2(3H)-yl)α-metylobenzeno-acetonitryl.

3.9.1. Roztwór wewnętrznego wzorca podstawowego, 500 µg/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 zmieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność nie dłużej niż miesiąc.

3.9.2. Roztwór wzorca wewnętrznego, 50 µg/ml.

Przenieść 5 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 zmieszać. Kolbę owinać folią aluminiową lub użyć kolby ze szkła oranżowego i przechowywać w lodówce. W temperaturze do 4°C roztwór zachowuje stabilność nie dłużej niż 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 zmieszać. Kolbę owinać 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 µg/ml.

Odmierzyć pipetą 2 ml roztworu wzorcowego diklaurilu, o którym mowa w ust. 3.8.2, i 2 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 do pełnej objętości kolby wodą i zmieszać. Roztwór sporządzać bezpośrednio przed użyciem.

3.11. C₁₈, 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 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.7, do 1 l 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 1 l 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 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 diklaurilu i substancji interferujących.

Ślepa próba paszy powinna być podobna do badanej próbki, a jej analiza nie powinna potwierdzać obecności diklaurilu i substancji interferujących.

5.1.2. Badanie odzysku

Badanie odzysku przeprowadzić, analizując ślepą próbę paszy, fortyfikowaną przez dodanie znanej ilości diklaurilu, 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 diklaurilu, o wadze zbliżonej do tej, która znajduje się w analizowanej próbce. Probkę 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 50 g próbki. Przenieść do kolby stożkowej o pojemności 500 ml, dodać 1 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 ml DMF, o którym mowa w ust. 3.6, dodać 1,5 ml wody, o której mowa w ust. 3.1, i zmieszać. Przefiltrować 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 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 diklaurilu 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 ml DMF, o którym mowa w ust. 3.6, dodać 15 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 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 tetrabutylamonowego
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)
Flukać eluentem B przez 10 minut

Prędkość 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 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 diklazurilu i wewnętrzne wzorcowe pików.

5.3.3. Roztwór próbki

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 diklazurilu i wewnętrzne wzorcowe pików.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

6.1. Pasze

Zawartość diklazurilu w próbce w (mg/kg) obliczyć według następującego wzoru:

$$w = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{\delta_{d,c} \times 10V}{m} \quad [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

$h_{d,s}$ – wysokość (powierzchnia) pików diklazurilu 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 diklazurilu 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 diklazurilu 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 diklazurilu w próbce w mg/kg obliczyć według następującego wzoru:

$$W = \frac{h_{d,s} \times h_{i,c}}{h_{i,s} \times h_{d,c}} \times \frac{\delta_{d,c} \times 0,02 V \times p}{m} \quad [\text{mg/kg}]$$

gdzie:

$h_{d,c}$ – wysokość (powierzchnia) pików diklazurilu 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 diklazurilu 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 diklazurilu 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 diklazurilu 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 ust. 5.2.2, fortyfikuje się przez dodanie odpowiedniej ilości roztworu kalibracyjnego, o którym mowa w ust. 3.10. Ilość dodanego diklazurilu powinna odpowiadać ilości diklazurilu znajdującej się w ekstrakcie próbki.

Powinna zwiększyć się tylko wysokość pików diklazurilu 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 ± 10% pierwotnej szerokości pików diklazurilu 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 od 230 do 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 2 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; kryterium uważa się za spełnione, jeżeli występują te same maksymalne wartości i w ramach żadnego z obserwowanych punktów rozbieżność między 2 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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

- 1) 30% względem wyższej wartości, dla zawartości diklaurilu od 0,5 do 2,5 mg/kg;
- 2) 0,75 mg/kg, dla zawartości diklaurilu powyżej 2,5 do 5 mg/kg;
- 3) 15% względem wyższej wartości, dla zawartości diklaurilu 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 11 laboratoriów przeprowadzono analizę 5 próbek. Były to próbki z 2 premiksów; jeden był wymieszany z głównym składnikiem organicznym (O 100), a drugi z głównym składnikiem nieorganicznym (A 100). Zawartość teoretyczna diklaurilu wynosiła 100 mg/kg, 3 mieszanki pasz dla drobiu zostały sporządzone przez 3 różnych producentów (NL) (L1/Z1/K1). Teoretyczna zawartość diklaurilu wynosiła 1 mg/kg. Analizę każdej próbki przeprowadzono raz lub 2-krotnie.⁶⁾ 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	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

Upřednio wykazać, że relacja diklaurilu jest liniowa w zakresie mierzonych stężeń.

7.6. OZNACZANIE SOLI SODOWEJ LASALOCIDU METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAPHII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości soli sodowej lasalocidu (sól sodowa polietarowego monokarboksylowego kwasu wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*) w paszach i premiksach. Granica wykrywalności metody wynosi 5 mg/kg, granica oznaczalności wynosi 30 mg/kg.

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 spektrofлуorometrycznego.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Dwuwodorofosforan potasu (KH₂PO₄).

3.2. Kwas ortofosforowy, w = 85 %.

3.3. Roztwór kwasu ortofosforowego, σ = 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 %.

⁶⁾ Bardziej szczegółowe informacje dotyczące tej analizy można znaleźć w *Dzienniku AOAC International*, Tom 77, nr 6, 1994, s. 1359 - 1361.

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 ml 6-metylo-2-heptyloaminy, o której mowa w ust. 3.4. Dostosować pH do 4 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 l.

3.8. Zakwaszony metanol.

Przenieść 5 ml kwasu chlorowodorowego, o którym mowa w ust. 3.6, do kolby miarowej o pojemności 1 l, uzupełnić do pełnej objętości kolby metanolem, o którym mowa w ust. 3.5, i zmieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.9. Faza ruchoma HPLC: mieszanina, w stosunku 5 + 95 (v+v): roztworu 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 polietereowego monokarboksylowego kwasu wytwarzanego przez *Streptomyces lasaliensis*), E 763.

3.10.1. Podstawowy roztwór wzorcowy soli sodowej lasalocidu, 500 $\mu\text{g/ml}$.

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 metanolu, o którym mowa w ust. 3.8, uzupełnić do pełnej objętości kolby tym samym rozpuszczalnikiem i zmieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.2. Roztwór wzorcowy pośredni soli sodowej lasalocidu, 50 $\mu\text{g/ml}$.

Odpipetować 10 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 zmieszać. Roztwór przygotować bezpośrednio przed użyciem.

3.10.3. Roztwory kalibracyjne.

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść 1, 2, 4, 5 i 10 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 zmieszać. Roztwory te odpowiadają odpowiednio 1, 2, 4, 5 i 10 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, umożliwiającym dozowanie 20 μl .

4.3.1. Kolumna do chromatografii cieczowej: 125 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. Objasnienia

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, czy badana pasza nie zawiera lasalocidu i substancji interferujących. Pasza użyta do ślepej próby powinna być podobna do próbki paszy badanej i nie powinna zawierać lasalocidu sodu i 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 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, zmieszać i pozostawić na 10 minut, a następnie kilkakrotnie zamieszać i przejść 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 próbki fortyfikowanej masy próbki niefortyfikowanej.

5.2. Ekstrakcja

5.2.1. Pasze

Zważyć, z dokładnością do 0,01 g, od 5 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 około 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

Odważyć, z dokładnością do 0,001 g, około 2 g nierozdrobnionego premiksu do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 100 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 około 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 x 4 mm, faza odwrócona C ₁₈ , wypełnienie 5 µm lub równoważne
Faza ruchoma, o której mowa w ust. 3.9:	Mieszanina, w stosunku 5 + 95 (v+v): roztworu buforu fosforanowego, o którym mowa w ust. 3.7, i metanolu, o którym mowa w ust. 3.5
Prędkość 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 µg/ml, aż do uzyskania stałych wysokości (powierzchni) piku 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. 3.10.3, i określić średnie wysokości (powierzchnie) piku dla każdego stężenia. Wykreślić krzywą kalibracyjną, odkładając średnie wysokości (powierzchnie) piku 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 ust. 5.2.2, stosując taką samą objętość jak przy kalibracyjnych roztworach, i określić średnią wysokość (powierzchnię) piku dla pików soli sodowej lasalocidu.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Na podstawie średniej wysokości (powierzchni) piku 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:

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

gdzie:

β – stężenie w µg/ml soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki, o której mowa w ust. 5.2.1,

V₁ – 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:

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

gdzie:

β – stężenie w µg/ml soli sodowej lasalocidu w roztworze próbki, o której mowa w ust. 5.2.2,

V₂ – 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 spektrofлуorometrycznej 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 piku soli sodowej lasalocidu powinna się uwidocznić w stopniu zależnym od ilości dodanej soli sodowej lasalocidu i rozcieńczenia ekstraktu. Szerokość piku w połowie wysokości powinna mieścić się w zakresie ± 10% oryginalnej szerokości piku niefortyfikowanego ekstraktu.

7.2. Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 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 niż 80%. W przypadku fortyfikowanych próbek premiksów odzysk nie powinien być niższy niż 90%.

8. WYNIKI BADAŃ MIĘDZYLABORATORYJNYCH

W ramach współpracy 12 laboratoriów⁷⁾ przeprowadzono analizę 2 premiksów (próbki 1 i 2) oraz 5 pasz (próbki 3-7).

Analizę każdej próbki przeprowadzono 2-krotnie. W tabeli 27 podano wyniki przeprowadzonych badań porównawczych.

Tabela 27. Wyniki badań porównawczych

	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6	Próbka 7
	premiks dla kurcząt	premiks dla indyków	śruty dla indyków	granulki dla kurcząt	pasza dla indyków	pasza dla drobiu A	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	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 podzielną część jest poddawana oczyszczaniu przy użyciu kolumny chromatograficznej na żelu krzemionkowym. Eluent jest odparowywany, a pozostałość ponownie rozpuszczana w ściśle określonej objętości chloroformu lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu. Podzielną część tego roztworu jest poddawana chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Jakość aflatoksyny B₁ jest oznaczana poprzez naświetlanie chromatogramu promieniami UV, wizualnie albo fluorodensytometrycznie, przez porównanie ze znaną ilością wzorcowej aflatoksyny B₁. Tożsamość aflatoksyny B₁ wyekstrahowanej z paszy powinna być potwierdzona poprzez wskazanie metody.

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% (V/V).

3.3. N-heksan.

3.4. Metanol.

3.5. Eter dwutylowy bezwodny, wolny od nadtlenu.

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 cząsteczek 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.

⁷⁾ The Analyst nr 120 z 1995 r., str. 2175-2180.

- 3.12. Kwas chlorowodorowy 1 N.
3.13. Kwas siarkowy 50% (V/V).
3.14. Kieselguhr (hyflosupelsel), przemysłowy 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 rozróżnienie, z odległości 10 cm, 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. Fluorodensytmeter (do wyboru).

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbek

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, odtłuścić je eterem naftowym o temperaturze wrzenia od 40 do 60°C, a uzyskane wyniki przedstawić w odniesieniu do masy nieodtłuszczonej próbek.

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 bawełnianej lub szklanej waty, o której mowa w ust. 3.9, napełnić 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, 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 prędkość 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 eluent.

Odparować końcowy eluent 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, z użyciem chloroformu, o którym mowa w ust. 3.2, lub mieszaniny benzenu i acetonitrylu, o której mowa w ust. 3.6, do próbówki, 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 jako 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 przedstawiony na rys.3.

5.6.2.1. Nanoszenie roztworów

Wyciąć 2 proste linie na płytce, o której mowa w ust. 4.8, równoległe do 2 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 wzorcowego roztworu, 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), aż 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 (zakreskowane pole na rys. 3), aż do ściemnienia, zabezpieczając pozostałą część płytki szklaną szybą. Pozostawić na 10 minut w ciemności i wysuszyć w strumieniu powietrza w temperaturze otoczenia. Następnie rozwinąć chromatogram w kierunku II w ciemności, stosując rozpuszczalnik rozwijający, o którym mowa w ust. 3.18.1 (1 cm warstwa w nienasyconym zbiorniku), aż 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 plamkami, o których mowa 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 wzorzec nałożony w punkcie C), a następnie przez odległość migracji z tego punktu w kierunku II

aflatoksyny B₁ – hemiacetalu (takiej samej, jaką przebył wzorzec 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:

$$\frac{S \times Y \times V}{W \times X}$$

$$W \times X$$

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:

$$S \times V$$

$$W \times Y$$

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:

$$\frac{312 \times A \times 1000}{20600}$$

dla roztworu chloroformu

$$20600$$

$$\frac{312 \times A \times 1000}{19800}$$

dla roztworu w mieszaninie benzenu i acetonitrylu

$$19800$$

Odpowiednio rozcieńczyć, chroniąc przed światłem słonecznym, 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 14 dni.

7.2. Badanie czystości chromatograficznej

Nanieść na płytkę, o której mowa w ust. 4.8, 5 µl roztworu wzorcowego zawierającego aflatoksynę B₁, o której 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

Powtarzalność

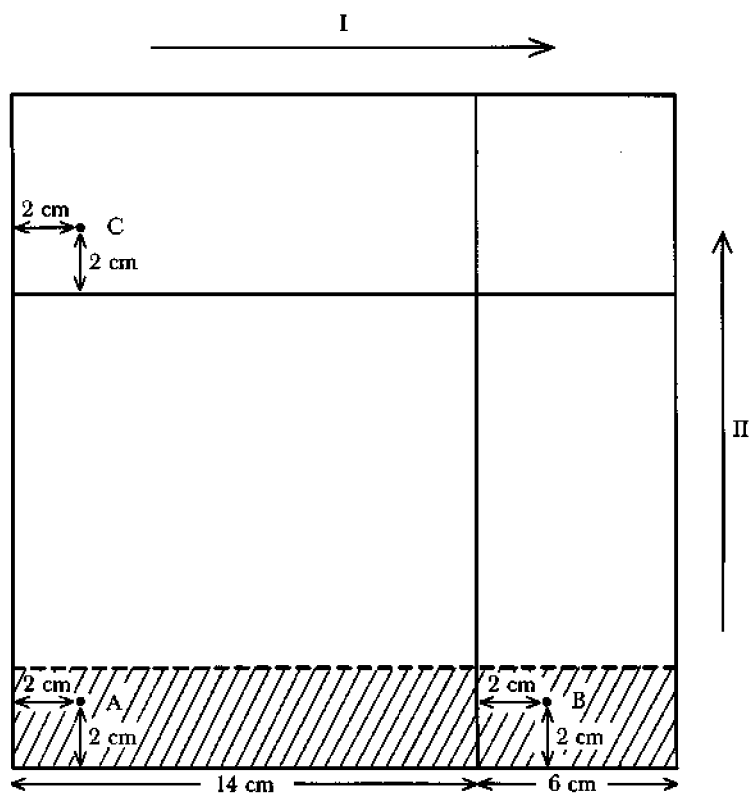
Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

- 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.

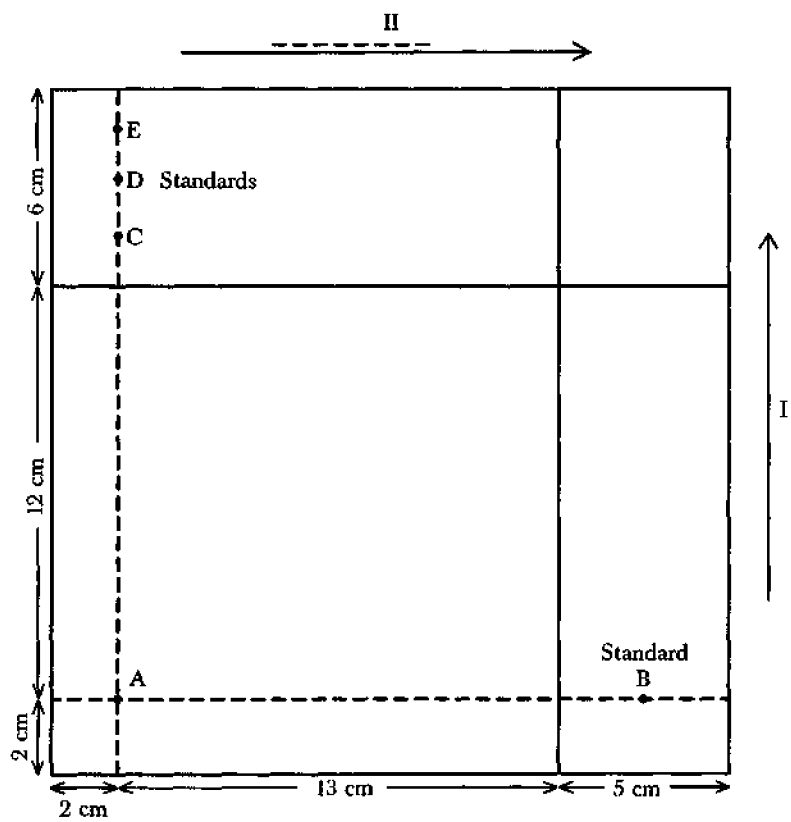
9. ODTWARZALNOŚĆ

Odtwarzalność wyników metody będąca zmiennością pomiędzy wynikami badania tej samej próbki uzyskanymi przez 2 lub więcej laboratoriów, powinna wynosić:

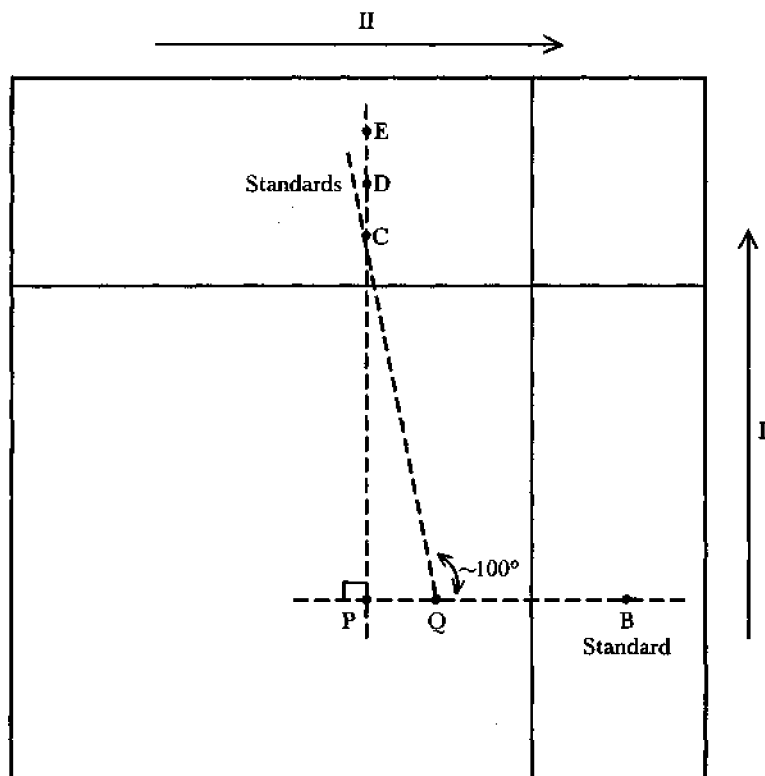
- 1) ± 50% średniej wartości, dla zawartości aflatoksyny B₁ od 10 do 20 µg/kg;
- 2) ± 10 µg/kg wartości bezwzględnej, dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 20 do 50 µg/kg;
- 3) ± 20% średniej wartości, dla zawartości aflatoksyny B₁ powyżej 50 µg/kg.



Rysunek 3.



Rysunek 4.



Rysunek 5.

8.2. OZNACZANIE AFLATOKSYNY B₁ METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ

1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości aflatoksyny B₁ w paszach, łącznie z paszami zawierającymi pulpę 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 są prowadzone z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z zastosowaniem odwróconej fazy kolumnowej C₁₈, po której następuje derywatyzacja pokolumnowa przy użyciu jodu wody jodowej i fluoroscencyjna detekcja.

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 wpływające na ich rozprzestrzenianie się w środowisku pracy.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Chloroform stabilizowany wagowo od 0,5 do 1% 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 przemity 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 z użyciem 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 kolby chloroformem, o którym mowa w ust. 3.1. Roztwór przechowywać 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 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, i 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.

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, 0,5, 1 i 0,5 µg/ml, w 1 ml chloroformu.

3.14.1. Roztwór testowy do chromatografii.

Przenieść zawartość ampułki, o której mowa w ust. 3.14, do probówki zamykanej szklanym korkiem lub do naczynka z nakrętką. Następnie przenieść 40 µl tego roztworu do probówki, 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 potwierdzającego testu, 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 destylowaną wodą w celu usunięcia pozostałości kwasu; proponuje się płukać 3 razy, a następnie sprawdzić pH papierkiem. W praktyce stosowanie tych zaleceń jest konieczne w przypadku używania kolb okrągłodennych, o których mowa w ust. 4.4, kolb miarowych, cylindrów miarowych, naczynek lub probówek stosowanych do kalibracyjnych roztworów i końcowych ekstraktów, zwłaszcza naczynek do automatycznego podajnika próbek i pipet Pasteura, jeżeli są używane do przenoszenia kalibracyjnych roztworów lub ekstraktów.

4.1. Rozdrabniacz.

4.2. Sito o oczkach o średnicy 1 mm, zgodnie z ISO R 565.

4.3. Mechaniczna wstrząsarka.

4.4. Rotacyjna wyparka próżniowa, wyposażona w kolbę okrągłodenną o pojemności od 150 do 250 ml.

4.5. Wysokosprawny chromatograf cieczowy, dozownik z pętlą umożliwiającą zadozowanie 250 ml, zgodnie z instrukcją użytkowania dotyczącą częściowego lub całkowitego napełniania pętli.

4.6. Analityczna kolumna do HPLC: wypełnienie C₁₈, 3 lub 5 µm.

4.7. Bezpulsacyjna pompa dostarczająca odczynnik jodowy do derywatyzacji pokolumnowej.

4.8. Zawór Valco o zerowej objętości martwej w kształcie litery T, ze stali nierdzewnej (1/16" - 0,75mm).

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 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. Elektroniczny integrator (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 AI 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 kalibracyjnych roztworów, 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 °C.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

5.1. Przygotowanie próbeki.

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 mechanicznej wstrząsarce, o której mowa w ust. 4.3.

Filtrować przez filtr, o którym mowa w ust. 4.14. Zebrać 50 ml filtratu. Jeżeli to 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.

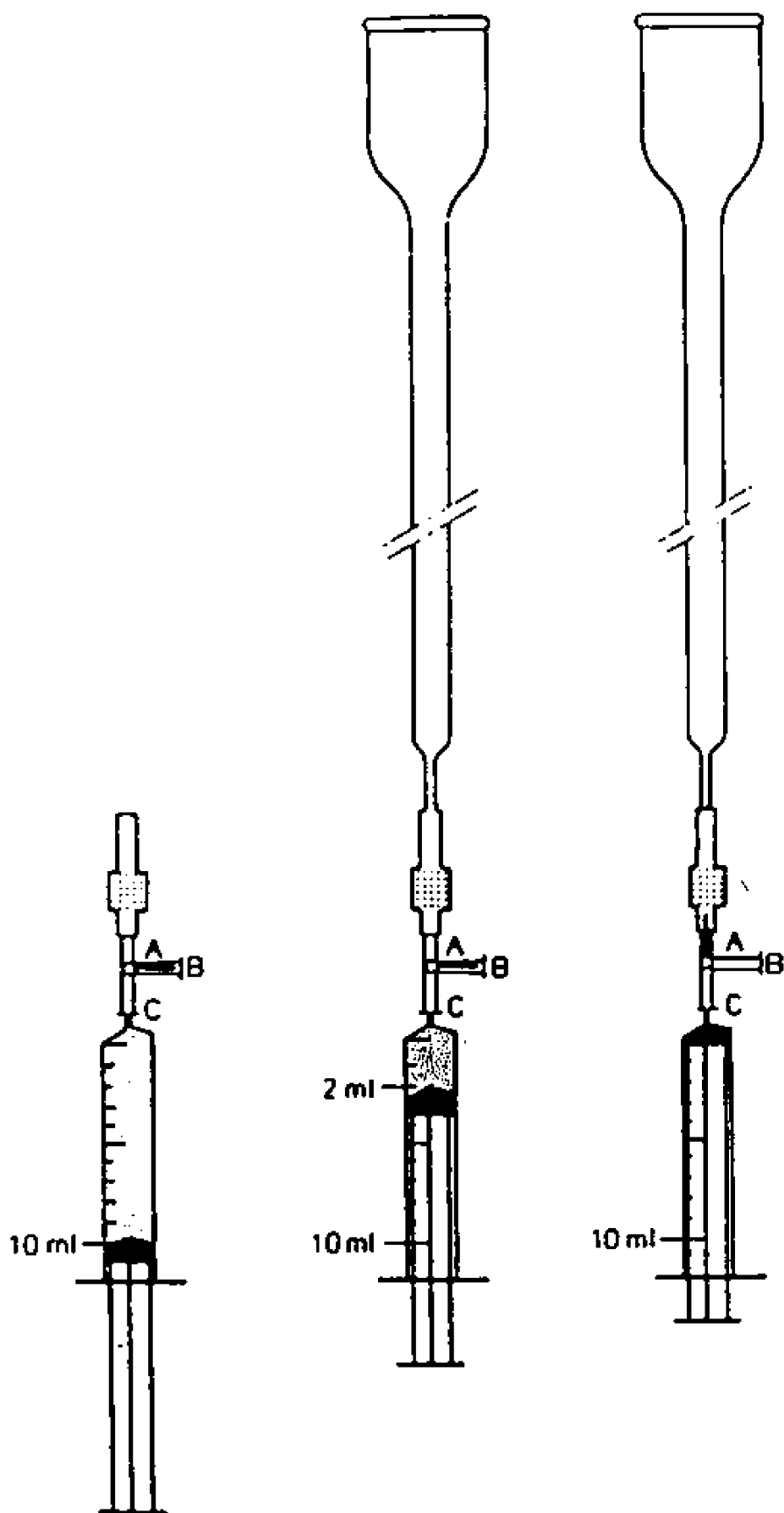
W czasie wykonywania analizy chronić pomieszczenia laboratoryjne przed światłem słonecznym. Można to uzyskać poprzez założenie na okna folii pochłaniającej promieniowanie UV z równoczesnym ograniczeniem dostępu światła słonecznego oraz poprzez założenie zasłon lub żaluzji w połączeniu ze sztucznym oświetleniem; dopuszcza się stosowanie światła jarzeniowego.

Roztwory zawierające aflatoksynę powinny być chronione przed światłem, 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). Przemyć 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 szklanej kolumny, 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 z użyciem 5 ml chloroformu, o którym mowa w ust. 3.1, i 20 ml metanolu, o którym mowa w ust. 3.2. Odrzucić elenty. W czasie tych czynności nie wolno dopuścić, aby wypełnienie mikrokolumny pozostawało suche.

Wymyć aflatoksynę B₁ z użyciem 40 ml mieszaniny acetonu i wody, o której mowa w ust. 3.5.1, i zebrać całość eluentu do kolby okrągłodennej rotacyjnej wyparki, o której mowa w ust. 4.4. Zatężyć eluent 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 kolbą ruchem okrężnym w celu rozpuszczenia aflatoksyny B₁ na ścianach kolby, dodać 4 ml wody i mieszać. 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 z użyciem 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.

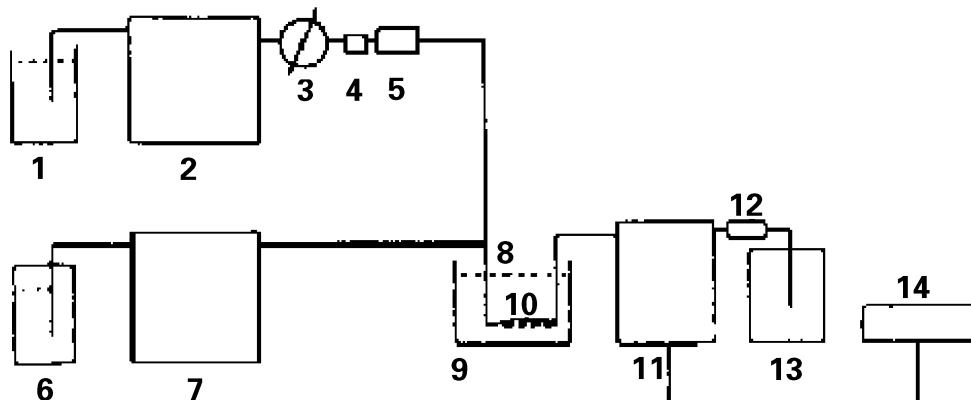
5.4.2.2. Oczyszczanie

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 2-krotnie z użyciem 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 z użyciem 25 ml mieszaniny wody i metanolu. Odrzucić eluent. Eluować aflatoksynę B₁ z użyciem 50 ml mieszaniny wody i acetonu, o której mowa w ust. 3.5.3, i zebrać całość eluentu do kolby miarowej o pojemności 50 ml. Uzupełnić wodą do pełnej objętości kolby i mieszać. 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 konieczne, 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.

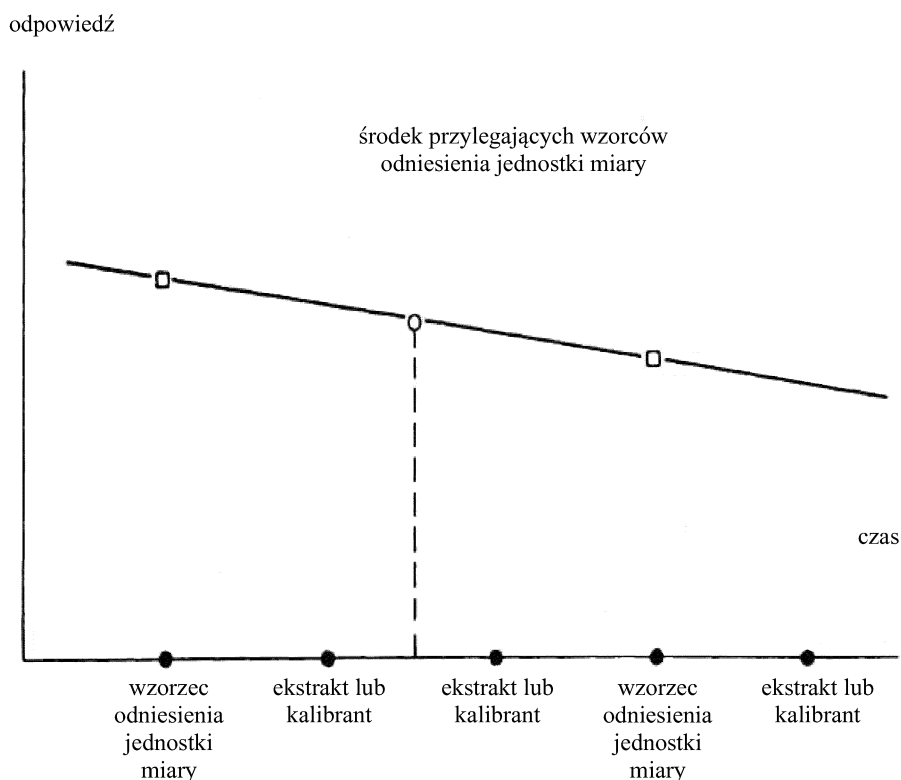


Rysunek 7. Przepływowy diagram systemu LC z derywatyzacją pokolumnową

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

Prędkości przepływu fazy ruchomej i odczynnika przedkolumnowego są tylko wskaźnikowe. Parametry te powinny być ustalone w zależności od charakterystyki kolumny HPLC.

Przy oznaczaniu aflatoksyny B₁ sygnał detektora zależy od temperatury, dlatego kompensacja powinna być wykonana dla dryfu (rys. 8). Dozując określone ilości wzorca odniesienia aflatoksyny B₁, o którym mowa w ust. 3.13.3, w regularnych odstępach czasu, zwłaszcza co 3. wstrzyknięcie, wartości piku aflatoksyny B₁ 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 powinno być uznawane za wzorzec odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3. Z uwagi na prostoliniowość krzywej kalibracyjnej i przechodzenie jej przez punkt wyjściowy, zawartości aflatoksyny B₁ w ekstraktach próbki są określane bezpośrednio przez odniesienie do przyległych wzorców.



Rysunek 8. Kompensacja dryfu przy oznaczaniu aflatoksyny B₁ poprzez dozowanie wzorca odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3, w regularnych odstępach czasu

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 lub 3 μ m 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 wzmocnienie detektora na takim poziomie, aby wychylenie pisaka wynosiło 80% skali dla 1 ng aflatoksyny B₁.

5.5.4. Dozownik

W przypadku wszystkich roztworów dozować 250 μ l 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 pików przyległych.

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 B₁ nie mogą się różnić więcej niż o 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 3. razem dozować wzorzec odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3, w celu korekty dryfu w odpowiedzi, przy czym odpowiedzi piku dla tego referencyjnego wzorca nie powinny się różnić więcej niż o 10% w czasie 90 minut. Skorygować dryf zgodnie ze 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 każdego 2 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 3-krotnie, 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-gramową warstwę siarczanu sodu, o którym mowa w ust. 3.15.2, i zbierać w próbówce o pojemności 10 ml. Do ekstrakcji zastosować mały rozdzielacz o średnicy 4 cm, przy czym około 1 g siarczanu sodu nałożyć na zwitek waty.

Przemyć warstwę siarczanu sodu z użyciem kilku ml chloroformu i zebrać popłuczyny w tej samej testowej próbówce. Odparować chloroformowy ekstrakt do sucha z tej samej próbówki z użyciem 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:

$$\text{zawartość aflatoksyny B}_1 \text{ w } \mu\text{g/ kg} = \frac{m \times V_{\text{ext}}}{V_m \times M \times V_f / V_c}$$

gdzie:

m - ilość aflatoksyny B₁ w ng odpowiadająca zarejestrowanemu pikowi, obliczona w następujący sposób:

$$m = \frac{P(\text{próbka})}{P(\text{st}_1) + P(\text{st}_2)} \times 2 \text{ r}(\text{st})$$

P (próbka) - powierzchnia piku aflatoksyny B₁ dla próbki,

P (st₁) - powierzchnia piku aflatoksyny B₁ odpowiadająca poprzedniemu zadozowaniu wzorca odniesienia, o którym mowa w ust. 3.13.3,

P (st₂) - powierzchnia piku 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 której 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 x m

7.1. Obliczanie wyników można prowadzić na podstawie pomiaru wysokości piku.

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 mieszkankach paszowych. Pozwoliły one uzyskać dane o powtarzalności i odtwarzalności, które podano w tabeli 28. Termin powtarzalności (r) w tym przypadku jest stosowany jako największy przedział, w którym 2 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

⁸⁾ Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). Food Additives and Contaminants 8, str. 17-29.

definiowany podobnie, w przypadku porównywania 2 różnych laboratoriów. Zgodnie z normą ISO 3534 wartości r i R również podano w tabeli 28 w kategoriach współczynników zmienności.

Tabela 28. Wyniki badań międzylaboratoryjnych, przeprowadzonych w 15 laboratoriach.
Powtarzalność (r) i odtwarzalność (R) wyrażone jako proporcje i odpowiednie współczynniki zmienności

Poziom	r	R	$CV_r^*)$	CV_R
$\mu\text{g}/\text{kg}$			%	%
8 i 14	1,4	1,7	11	18

*) 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 z użyciem 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 pochodzącego z nasion lnu, mąki mianikowej i niektórych gatunków fasoli.

2. SPOSÓB PRZEPROWADZENIA METODY

Po utworzeniu zawiesiny próbki w wodzie, pod wpływem enzymów uwalnia się kwas cyjanowodorowy, który jest zbierany przez parę destylacyjną, a następnie umieszczany w odpowiedniej objętości zakwaszonego roztworu azotanu srebra. Cyjanek srebra wyodrębnia się w wyniku filtracji, 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 10 ml zawiesiny nie ma kwasu cyjanowodorowego, stosując w tym celu sodowy papierik pikrynowy lub wykonując ślełą próbę, w sposób określony w ostatnim akapicie 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 $0,02\text{ N}$.

3.6. Roztwór tiocyjanianu amonu o stężeniu $0,02\text{ N}$.

3.7. Nasycony roztwór siarczanu żelazowo-amonowego.

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 o pojemności 1 l, ze szklanymi korkami.

4.4. Łaźnia olejowa.

4.5. Biureta z podziałką w zakresie $1/20\text{ ml}$.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA

Odważyć, z dokładnością do 5 mg, 20 g próbki i umieścić w kolbie płaskodennej o pojemności 1 l, 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 schłodzić 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 . Destylować od 200 do 300 ml cieczy, przepuszczając duży strumień pary przez kolbę, i delikatnie podgrzewać łaźnię olejową. 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 do pełnej objętości kolby wodą, wymieszać i przefiltrować. Odrzucić 250 ml filtratu i dodać około 1 ml roztworu siarczanu żelazowo-amonowego, 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 $1/20\text{ ml}$.

Ślepą próbę przeprowadza się, jeżeli to konieczne, w ten sam sposób, używając 10 ml zawiesiny słodkich migdałów, o której mowa w ust. 3.1, pomijając analizowaną próbkę.

6. OBLICZANIE WYNIKÓW

Jeżeli ślepa próba wykaże, że 0,02 N roztwór azotanu srebra został zużyty, odjąć jego objętość od objętości zużytej przez destylat z próbki. 1 ml AgNO_3 0,02 N odpowiada 0,54 mg HCN. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. OBJAŚNIENIA

Jeżeli próbka zawiera znaczne ilości siarczków, a w szczególności w przypadku fasoli, wytrąca się czarny osad siarczku srebra, który jest filtrowany wraz z osadem cyjanku srebra. Tworzenie się tego osadu powoduje straty roztworu azotanu srebra 0,02 N, którego objętość 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 przepłukać w rozcieńczonym amoniaku 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 g mocznika w 1 l obciążającego roztworu fosforanowego, o którym mowa w ust. 3.3, przy pH od 6,9 do 7.

4. APARATURA I SPRZĘT

4.1. Aparatura do miareczkowania potencjometrycznego lub pehametr o wysokiej czułości (0,02 pH), z mieszkadłem 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, z dokładnością do 1 mg, 0,2 g rozdrobnionej próbki 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 probówki do naczynia do miareczkowania, przemywając 2-krotnie 5 ml wody. 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 probówki 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:

$$\frac{\text{mg N}}{\text{g} \times \text{min}} \text{ w temperaturze } 30^\circ\text{C} = \frac{1,4 (b - a)}{30 \times E}$$

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 próbce,

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 mieszkankach 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 l 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. Uzupełnić do pełnej objętości kolby mieszaniną propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1. Odczynnik zachowuje stabilność do 7 dni.

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 zachowuje stabilność do 7 dni.

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 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 do pełnej objętości kolby rozpuszczalnikiem A. 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 2 identyczne podzielne części filtratu zawierające od 50 do 100 µg gossypolu i umieścić w 2 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 2 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 1-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-centymetrowe szklane kuwety.

Od odpowiadającej gęstości optycznej wartości roztworu próbki odjąć wartość gęstości optycznej roztworu ślepej próby. Z użyciem 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 1-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. Uzupełnić zawartość kolby o pojemności 25 ml do pełnej jej objętości mieszaniną 1-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 2 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 1-propan-2-ol-heksanu, o której mowa w ust. 3.1, homogenizować i odstawić na godzinę.

Oznaczyć gęstość optyczną, tak jak dla wolnego gossypolu, o którym mowa w ust. 5.2. Używając 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 2 partie po 5 kolb miarowych o pojemności 25 ml. Do każdej partii kolb wprowadzić pipetą odpowiednio 2, 4, 6, 8 i 10 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 1 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 2 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 1 kolby dodać 10 ml rozpuszczalnika B, o którym mowa w ust. 3.3, a do pozostałych odpowiednio 2, 4, 6, 8 i 10 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 zmieszać.

Do każdej z 2 partii po 6 kolb miarowych o pojemności 25 ml wprowadzić po 2 ml wyżej wspomnianych roztworów. 6 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 2 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 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

- 1) 15% w wartości względnej, dla zawartości gossypolu do 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 z zastosowaniem 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 jest wykorzystywana reprezentatywna próbka, która podlega odpowiedniemu przygotowaniu. Metoda ma zastosowanie do paszy o wilgotności do 14%. Pasza o wilgotności wyższej niż 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 więcej niż 15% tłuszczu.

5.3. Sito o otworach w kształcie kwadratów, o bokach 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 z użyciem 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, z zastosowaniem sprzętu do rozdrabniania, o którym mowa w ust. 5.2, jeżeli to konieczne, aby uzyskać odpowiednie rozdrobnienie. Ze zmielonego materiału pobrać 2 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 2 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, z dokładnością do 0,01 g, co najmniej 5 g próbki, 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 2 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 chloralu, 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.
--	---

Lug, 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 2-krotnie 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 od 2 do 3 minut, a wodę z zawieszonymi cząsteczkami wylać. Osad przepłukać 2-krotnie 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 2-krotnie 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 czarnobrazową 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 których 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 opisany poniżej.

Obliczenia ilościowe mogą być przeprowadzane tylko w przypadku, gdy składniki pochodzenia zwierzęcego zawierają fragmenty kostne.

Fragmenty kostne lądowych gatunków zwierząt stałocieplnych (ssaków i ptaków) można odróżnić od różnych typów ości rybich 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 3 preparatów, jeżeli to możliwe, zawierających co najmniej 5 pól każdy. W mieszkankach 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, z użyciem mikroskopu, w badanej próbce żadnych składników pochodzących ze zwierząt lądowych albo

2) stwierdzono, z użyciem mikroskopu, w badanej próbce składniki pochodzące ze zwierząt lądowych.

8.2. W odniesieniu do występowania mączki rybnej:

1) nie stwierdzono, z użyciem mikroskopu, w badanej próbce żadnych składników pochodzących z mączki rybnej albo

2) stwierdzono, z użyciem 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, chrząstkę, kości, rogi, sierść, szczecinę, pióra, krew, skorupy jaj, ości ryb, łuski.

Jeżeli szacuje się ilość składników zwierzęcych, wymienić zastosowany współczynnik korekcyjny f.

Jeżeli są zidentyfikowane 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.

Pipetą przenieść 40 ml tłuszczu z dna próbki do probówki wirówkowej.

Wirować przez 10 minut przy 4 000 obr./min.

Jeżeli tłuszcz jest zestalony po odwirowaniu, ogrzać go jeszcze raz, zwłaszcza używając kuchenki mikrofalowej, aż do uzyskania postaci płynnej. Ponownie wirować przez 5 minut przy 4 000 obr./min.

Małą łyżką lub łopatką laboratoryjną przenieść połowę zdekantowanych zanieczyszczeń na płytkę Petriego lub na szkiełko mikroskopowe w celu dokonania mikroskopowej identyfikacji ewentualnej zawartości składników pochodzenia zwierzęcego, takich jak włókna mięsniowe, pióra, fragmenty kostne. Jako środek zanurzeniowy stosowany w badaniach mikroskopowych zaleca się olej parafinowy lub glicerynę.

Pozostałe zanieczyszczenia poddać sedymentacji 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 z użyciem roztworu węglanu potasu, zbierane w roztworze kwasu bornego i miareczkowane kwasem siarkowym.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Kwas trójchłoroctowy, 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 l rozpuścić 10 g kwasu bornego w 200 ml etanolu o stężeniu od 95 do 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.

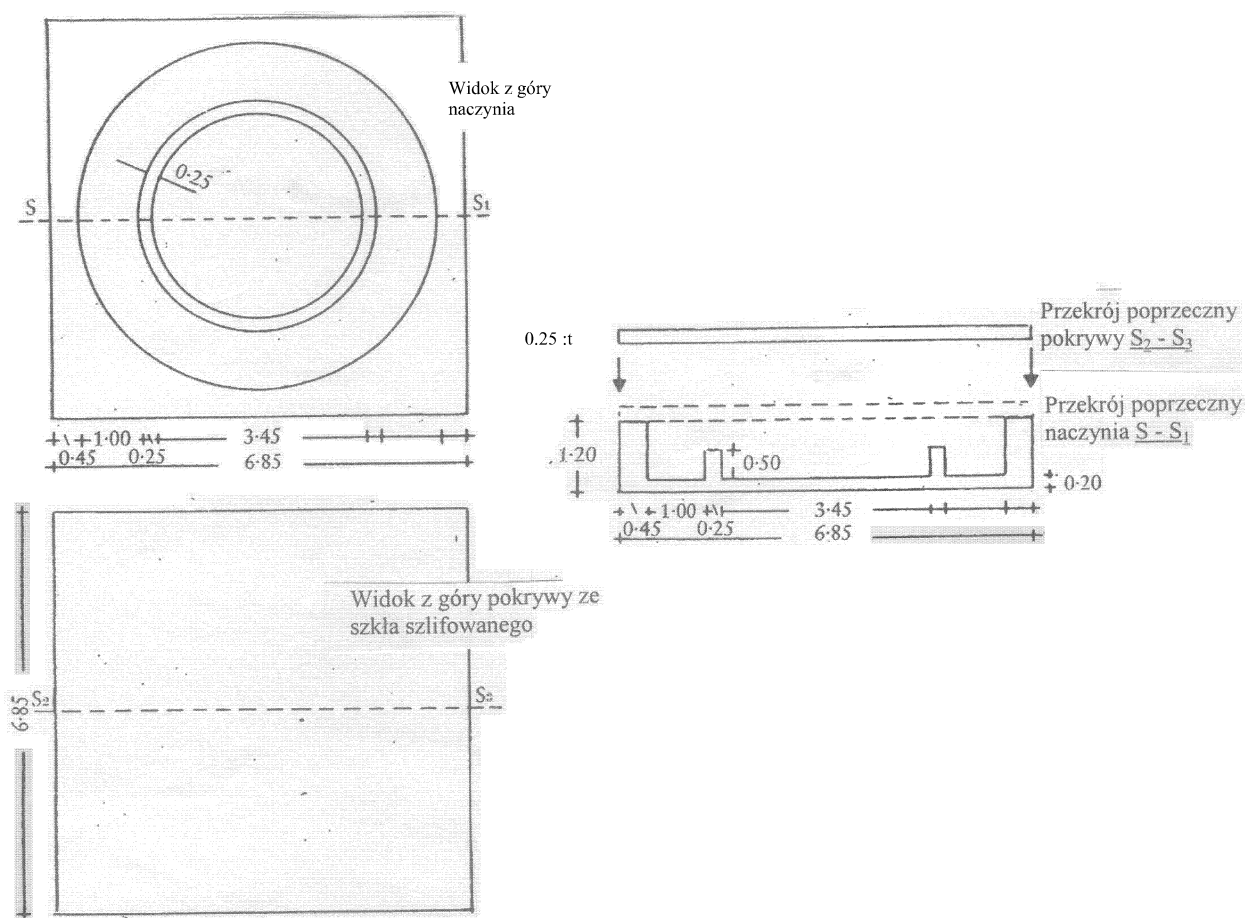
4. APARATURA I SPRZĘT

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, z dokładnością do 1 mg, 10 g próbki do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać 100 ml wody. Miksować w mikserze przez 30 minut. Dodać 50 ml roztworu kwasu tróchlorooctowego, o którym mowa w ust. 3.1, uzupełnić do pełnej objętości kolby wodą, energicznie wstrząsnąć i przefiltrować przez karbowany filtr. Dodać z użyciem 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 2 odczynników. Inkubować przez co najmniej 4 godziny w temperaturze pokojowej lub godzinę w temperaturze 40°C. Miareczkować lotne zasady zaabsorbowane w kwasie bornym, stosując roztwór kwasu siarkowego, o którym mowa w ust. 3.5, z użyciem 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

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń wykonanych dla tej samej próbki nie powinna przekraczać:

- 1) 10% wartości względnej, dla zawartości amoniaku poniżej 1%;
- 2) 0,1% wartości bezwzględnej, dla zawartości amoniaku równej lub wyższej niż 1%.

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 niższej 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 tlenku magnezu i zbierane w określonej ilości kwasu siarkowego, którego nadmiar jest miareczkowany z użyciem roztworu wodorotlenku sodu.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

- 3.1. Kwas trójchłoroctowy, 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, z dokładnością do 1 mg, 10 g próbki do kolby miarowej o pojemności 200 ml i dodać 100 ml wody. Miksować w mikserze przez 30 minut. Dodać 50 ml roztworu kwasu trójchłoroctowego, 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 tlenku 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 tlenku 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 roztworu 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. Ślepą 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

Powtarzalność

Różnica pomiędzy wynikami 2 równoległych oznaczeń, wykonanych dla tej samej próbki, nie powinna przekraczać 10% wartości względnej.

8.8. OZNACZANIE DIOKSYN I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB**1. METODY POBIERANIA PRÓBEK I INTERPRETACJA WYNIKÓW****1.1. CEL I ZAKRES**

Próbki przeznaczone do urzędowej kontroli poziomu zawartości dioksyn (PCDD/PCDF) oraz dioksynopodobnych (PCB) w paszach, z uwzględnieniem tabeli 29, pobiera się zgodnie z przepisami rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 grudnia 2006 r. w sprawie szczegółowych warunków i sposobu pobierania próbek do badań oraz postępowania z próbkami pobranymi w ramach urzędowej kontroli pasz. Stosować wymagania ilościowe w stosunku do kontroli substancji lub produktów jednolicie rozmieszczonych w paszy, o których mowa w § 4 ust. 1, 2 i 5, § 6 ust. 3 i § 8 tego rozporządzenia. Uzyskane w ten sposób próbki ogólne uważa się za reprezentatywne dla partii lub podpartii, z których pochodzą. Zgodność partii lub podpartii z dopuszczalną zawartością określoną w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 stycznia 2007 r. w sprawie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszach ustala się na podstawie zawartości stwierdzonych w próbkach laboratoryjnych.

Tabela 29. Tabela TEF - toksycznych czynników równoważności dla dioksyn, furanów i dioksynopodobnych (PCB)

Kongener	Wartość TEF	Kongener	Wartość TEF
Dibenzo-p-dioksyne (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	Mono-orto PCB	
Dibenzofurany (PCDF)		PCB 105	0,0001
2,3,7,8-TCDF	0,1	PCB 114	0,0005
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05	PCB 118	0,0001
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 123	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 157	0,0005
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 167	0,00001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1		

1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 189	0,0001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01		
OCDF	0,0001		

Użyte skróty oznaczają: T – tetra (cztero); Pe – penta (pięcio); Hx – hexa (sześć); Hp – hepta (siedmio); O – octa (ośmio); CDD – chlorodibenzo-p-dioksyna; CDF – chlorodibenzofuran; CB – chlorobifenyl.

1.2. ZGODNOŚĆ PARTII LUB PODPARTII Z WYMAGANIAMI OKREŚLONYMI W ROZPORZĄDZENIU MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI Z DNIA 23 STYCZNIA 2007 R. W SPRAWIE DOPUSZCZALNYCH ZAWARTOŚCI SUBSTANCJI NIEPOŻĄDANYCH W PASZACH

Jeżeli wynik pojedynczej analizy nie przekracza dopuszczalnej zawartości określonej w rozporządzeniu Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 23 stycznia 2007 r. w sprawie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszach, z uwzględnieniem przy tym niepewności pomiaru, badaną partię uznaje się za spełniającą wymagania określone w tym rozporządzeniu.

Jeżeli wynik analizy potwierdzony 2. analizą i obliczony jako średnia co najmniej 2 oddzielnych oznaczeń przekracza dopuszczalną zawartość określoną w tym rozporządzeniu, z uwzględnieniem przy tym niepewności pomiaru, badaną partię uznaje się za niespełniającą wymagań w zakresie dopuszczalnych zawartości substancji niepożądanych w paszy.

Niepewność pomiaru uwzględnia się z zastosowaniem jednego z następujących sposobów:

- 1) obliczając niepewność rozszerzoną z użyciem współczynnika rozszerzenia 2, która określa poziom zaufania na poziomie około 95%;
- 2) ustalając decyzyjną wartość graniczną ($CC\alpha$) 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, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 36, str. 493, z późn. zm.) – przypadek substancji z ustaloną dopuszczalną wartością graniczną, o którym mowa w pkt 3.1.2.5 załącznika do tej decyzji Komisji.

Niniejsze zasady interpretacji odnoszą się do wyniku analizy uzyskanego z próbki przeznaczonej do urzędowej kontroli.

2. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK I WYMAGANIA DOTYCZĄCE METOD ANALIZ WYKORZYSTYWANYCH W URZĘDOWEJ KONTROLI DIOKSYN (PCDD/PCDF) I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB

2.1. CEL I ZAKRES STOSOWANIA METODY

Metoda służy do oznaczania zawartości dioksyn polichlorowanych dibenzo-p-dioksyn (PCDD) i polichlorowanych dibenzofuranów (PCDF) oraz dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli (PCB) w paszach.

Monitorowanie obecności dioksyn w paszach można wykonać przy zastosowaniu metody skринingowej w celu wyselekcjonowania tych próbek, które zawierają dioksyny i dioksynopodobne PCB na poziomie od 30 do 40% niższym lub wyższym niż poziom zainteresowania. Stężenia dioksyn w tych próbkach, które zawierają znaczące ich poziomy, powinny zostać oznaczone lub potwierdzone z zastosowaniem metody potwierdzającej.

Metody skринingowe służą do wykrywania obecności dioksyn i dioksynopodobnych PCB na poziomie zainteresowania. Metody te mają zdolność związaną z wysoką wydajnością 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, pozwalającej na jednoznaczną identyfikację i kwantyfikację dioksyn oraz dioksynopodobnych PCB na poziomie zainteresowania.

2.2. POSTANOWIENIA OGÓLNE

Ze względu na fakt, że próbki śródowniskowe i biologiczne, włączając w to próbki pasz, zazwyczaj zawierają złożone mieszaniny różnych kongenerów dioksyn, w celu ułatwienia oceny ryzyka, wprowadzono pojęcie „współczynników równoważnej toksyczności - TEF (Toxicity Equivalency Factors)”. Współczynniki te zostały opracowane w celu wyrażenia stężeń mieszanin posiadających podstawniki chloru w pozycjach 2,3,7,8- PCDD i PCDF, a ostatnio także niektórych PCB posiadających podstawnik chloru w pozycjach non-orto i mono-orto, które posiadają podobną do dioksyn aktywność w postaci równoważników toksyczności - TEQ (Toxicity Equivalent) o 2,3,7,8-TCDD, z uwzględnieniem tabeli 29.

Stężenia poszczególnych substancji w próbce są mnożone przez ich TEF, a następnie wartości te są sumowane w celu obliczenia całkowitego stężenia związków dioksynopodobnych, wyrażonego w wartości TEQ.

Koncepcja górnej granicy (upperbound) wymaga podania granicy oznaczalności danego kongeneru do obliczenia TEQ, w przypadku stwierdzenia zawartości tego kongeneru poniżej granicy oznaczalności.

Koncepcja dolnej granicy (lowerbound) wymaga podania zerowej zawartości danego kongeneru do obliczenia TEQ, w przypadku stwierdzenia zawartości tego kongeneru poniżej granicy oznaczalności.

Koncepcja średniej granicy (mediumbound) wymaga podania zawartości równej połowie granicy oznaczalności danego kongeneru do obliczenia TEQ, w przypadku stwierdzenia zawartości tego kongeneru poniżej granicy oznaczalności.

Akceptowalną granicą oznaczalności danego kongeneru jest stężenie analitu w ekstrakcie próbki, które wywołuje instrumentalną reakcję na impuls dla 2 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 metodą EPA 1613, korekta B.

2.3. WYMAGANIA JAKOŚCIOWE, JAKIE POWINNY BYĆ SPEŁNIONE PRZY PRZYGOTOWANIU PRÓBEK DO ANALIZY

Przy przygotowaniu próbek do analizy, oprócz wymagań określonych w rozdziale 1 załącznika, przestrzega się następujących wymagań:

- 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 ślepej próby, obejmującą przeprowadzenie pełnej procedury analitycznej z wyłączeniem próbki;
- 5) masa próbki użytej do ekstrakcji powinna być dostosowana do czułości metody.

2.4. WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ LABORATORIA WYKONUJĄCE 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; kryteria akceptacji procedury analitycznej są określone w ust. 2.5;
- 2) limit kwantyfikacji metody potwierdzającej powinien wynosić około 1/5 poziomu zainteresowania, aby gwarantować, że akceptowalne współczynniki zmienności znajdują się w zakresie danego poziomu zainteresowania;
- 3) w ramach wewnątrzlaboratoryjnej kontroli jakości ślepe próby i spiking eksperymenty lub analizy próbek kontrolnych (a zwłaszcza certyfikowanych materiałów 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 oznaczają jednocześnie 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.

2.5. WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ PROCEDURY ANALITYCZNE STOSOWANE PRZY OZNACZANIU DIOKSYN I DIOKSYNOPODOBNYCH PCB

2.5.1. Wysoka czułość i niska granica wykrywalności.

Ilość PCDD i PCDF powinny być wykrywane 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 za wystarczającą uznaje się czułość rzędu nanogramów (10^{-9} g). Jednakże w przypadku oznaczania bardziej toksycznych dioksynopodobnych PCB kongenerów (w szczególności non-orto podstawionych kontenerów), powinna być uzyskana taka sama czułość, jak dla PCDD i PCDF.

2.5.2. Wysoka selektywność (specyficzność).

Konieczne jest odróżnienie PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB od wielu współekstrahujących i ewentualnie interferujących substancji występujących w stężeniach do kilku wielkości wyższych od analizowanych związków. Przy stosowaniu metody chromatografii gazowej z wykorzystaniem detektora masowego (GC/MS) konieczne jest odróżnienie kongenerów toksycznych, a w szczególności siedemnastu 2,3,7,8-substituted kongenerów PCDD i PCDF oraz PCB, od pozostałych kongenerów. Testy biologiczne powinny oznaczyć wartości TEQ selektywnie jako sumę PCDD, PCDF i dioksynopodobnych PCB.

2.5.3. 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) prawdziwość rozumiana jako różnica między średnią wartością analitu zmierzoną w materiale certyfikowanym a deklarowaną, certyfikowaną wartością, wyrażoną jako jej odsetek;
- 2) precyzja, zazwyczaj obliczana jako standardowe odchylenie obejmujące powtarzalność i odtwarzalność, wskazuje na stopień zgodności między wynikami uzyskanymi przy wielokrotnym wykorzystaniu procedury badawczej w określonych warunkach.

Metody skринingowe mogą obejmować testy biologiczne oraz metody GC/MS. Metody potwierdzające to metody wysokorozdzielczej chromatografii gazowej sprzężonej z wysokorozdzielczą spektrometrią masową (HRGC/HRMS). Przy oznaczaniu sumarycznej wartości TEQ powinny być spełnione kryteria podane w tabeli 30.

Tabela 30. Kryteria dla oznaczania sumarycznej wartości TEQ

	Metody skринingowe (przesiewowe)	Metody potwierdzające
Częstość wyników fałszywie negatywnych	< 1 %	
Prawdziwość		Od – 20 % do + 20 %
Współczynnik zmienności, CV	< 30 %	< 15 %

2.6. WYMAGANIA DLA METOD GC/MS, W METODACH SKRININGOWYCH LUB POTWIERDZAJĄCYCH

2.6.1. W celu zwalidowania procedury analitycznej wzorce wewnętrzne 2,3,7,8-chloropodstawionych PCDD/F znakowane izotopem węgla ¹³C, oraz wzorce wewnętrzne dioksynopodobnych PCB, znakowane izotopem węgla ¹³C, jeżeli dioksynopodobne PCB mają być oznaczone, dodawać na wstępnych etapach metody, w szczególności przed ekstrakcją. Dodać co najmniej 1 kongener dla każdej grupy homologicznej, od tetra- do oktachloro PCDD/F oraz co najmniej 1 kongener dla każdej grupy homologicznej dioksynopodobnych PCB, jeżeli dioksynopodobne PCB mają być oznaczone. Alternatywnie co najmniej 1 kongener na każdy wybrany jon masy spektrometrycznej, rejestrujący funkcję służącą do monitorowania PCDD/F i dioksynopodobnych PCB.

Dla metod potwierdzających pierwszeństwo zastosowania mają wszystkie siedemnaście 2,3,7,8-podstawione wzorce wewnętrznych PCDD/F znakowane izotopem węgla ¹³C oraz wszystkie dwanaście wzorce wewnętrzne dioksynopodobne PCB znakowane izotopem węgla ¹³C, jeżeli dioksynopodobne PCB mają być oznaczone.

Względne współczynniki odpowiedzi (relative response factors) należy oznaczyć dla tych kongenerów, dla których nie zastosowano analogów znakowanych izotopem węgla ¹³C poprzez odpowiedni roztwór kalibracyjny.

2.6.2. Przed procedurą ekstrakcji w przypadku pasz pochodzenia roślinnego i zwierzęcego o zawartości tłuszczu poniżej 10% należy dodać wzorce wewnętrzne. W przypadku pasz pochodzenia zwierzęcego o zawartości tłuszczu powyżej 10 % wzorce wewnętrzne mogą być dodane zarówno przed, jak i po ekstrakcji tłuszczu. Należy przeprowadzić walidację skuteczności ekstrakcji, w zależności od etapu, na którym dodaje się wzorce wewnętrzne, a także od tego, czy wyniki są wyrażane na jednostkę masy produktu czy tłuszczu.

2.6.3. Przed analizą GC/MS dodać do próbki 1 lub 2 wzorce odzysku.

2.6.4. Konieczne jest sprawdzenie odzysku. 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 dibenzofuranów, jeżeli ich udział w TEQ nie przekracza 10 % całkowitego TEQ (tylko na podstawie PCDD/F). W przypadku metod skринingowych odzysk może zawierać się w granicach od 30 do 140 %.

2.6.5. Rozdzielenie dioksyn od interferujących chlorowanych związków, takich jak dioksynopodobne PCB czy polichlorowane difenyloetery, można osiągnąć przez zastosowanie odpowiednich technik chromatograficznych; proponuje się zastosować florisil, tlenek glinu lub kolumnę węglową.

2.6.6. Poniżej 25 % nakładania się pików pomiędzy 1,2,3,4,7,8-HxCDF i 1,2,3,6,7,8-HxCDF występuje skuteczność rozdzielania izomerów przy chromatografii gazowej.

2.6.7. Oznaczanie powinno być wykonywane zgodnie z metodą EPA 1613, korekta B: tetra- poprzez oktachlorowane dioksyny i furany zastosować rozcieńczenie izotopowe HRGC/HRMS lub inne o równoważnych parametrach.

2.6.8. Dla pasz o zawartości dioksyn równej lub wyższej niż dopuszczalna ich zawartość różnica między wynikami obliczonymi zgodnie z koncepcją górnej i dolnej granicy 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 %.

2.7. SKRININGOWE METODY ANALIZY

2.7.1. WPROWADZENIE

W ramach metody skринingowej rozróżnia się podejście skринingowe i ilościowe.

2.7.1.1. Podejście skринingowe

W przypadku podejścia skринingowego 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 niższa niż wartość sygnału próbki referencyjnej, uznaje się za negatywne, natomiast próbki, dla których wartość sygnału jest wyższa niż wartość sygnału próbki referencyjnej, uznaje się za potencjalnie pozytywne.

Wymagania:

- w każdej partii badanych próbek powinna znaleźć się próbka ślepa 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 wyższa niż wartość sygnału uzyskanego w próbce ślepej,

- aby wykazać, że badanie zostało wykonane na poziomie zainteresowania w badaniach kontrolnych zbadać dodatkowe próbki referencyjne zawierające 0,5 i 2-krotny poziom zainteresowania analitu,

- w przypadku badania innych matryc wykazać, że stosowane próbki referencyjne są odpowiednie. Można tego dokonać przez włączenie próbek, dla których z użyciem metody HRGC/HRMS wykazano, że równoważnik toksyczności TEQ jest zbliżony do próbki referencyjnej lub ślepej, wzbogaconej na tym samym poziomie,

- badanie powtarzalności pozwalającej na uzyskanie informacji o odchyleniu standardowym w obrębie jednej partii próbek jest szczególnie istotne, w przypadku gdy w testach biologicznych jest niemożliwe zastosowanie wzorców wewnętrznych. Wartość współczynnika zmienności nie powinna być wyższa niż 30 %,

- w przypadku testów biologicznych zdefiniować badane związki, możliwe interferencje oraz najwyższą dopuszczalną wielkość sygnału próbki ślepej.

2.7.1.2. Podejście ilościowe

Analiza ilościowa wymaga użycia serii wzorcowych rozcieńczeń, dwu- lub trzystopniowego procesu oczyszczania, pomiarów oraz zerowych i odzyskowych kontroli. Wyniki mogą być wyrażone jako równoważnik toksyczności (TEQ), tym samym zakładając, że związki odpowiedzialne za sygnał odpowiadają regule TEQ. Można tego dokonać przez zastosowanie TCDD (lub mieszaniny wzorców dioksyn lub furanów) do sporządzenia krzywej kalibracyjnej umożliwiającej obliczenie poziomu TEQ w ekstrakcie oraz w próbce; wynik jest korygowany o wartość TEQ uzyskanej w wyniku analizy próbki ślepej (do obliczenia zanieczyszczeń z zastosowanych rozpuszczalników i użytych odczynników) oraz odzysk (obliczony z wartości TEQ oznaczonej w jakościowej próbce kontrolnej 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).

2.7.2. OGÓLNE WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ SKRININGOWE METODY ANALIZY

- do badań skринingowych można stosować metody GC/MS oraz testy biologiczne (bioassays). Przestrzegać wymagań dla metod GC/MS, określonych w ust. 2.6. Wymagania dla biologicznych testów komórkowych (cell-based bioassays) są określone w ust. 2.7.3, a dla zestawów do testów biologicznych (kit-based bioassays) w ust. 2.7.4,

- konieczne jest podanie informacji o liczbie wyników fałszywie pozytywnych i wyników fałszywie negatywnych, poniżej i powyżej maksymalnego dopuszczalnego poziomu, uzyskanych w dużych seriach próbek w porównaniu do zawartości TEQ ustalonej z zastosowaniem potwierdzającej metody analizy. Rzeczywista częstość występowania wyników fałszywie negatywnych nie powinna przekraczać 1 %. Częstość uzyskiwania wyników fałszywie pozytywnych powinna być na tyle niska, aby można było wykorzystać zalety metod skринingowych,

- wyniki pozytywne zawsze potwierdzać z zastosowaniem potwierdzającej metody analizy (HRGC/HRMS). Ponadto próbki z szerokim zakresem TEQ potwierdzać HRGC/HRMS (od 2 do 10 % próbek negatywnych). Do wyników dołącza się informację na temat korelacji pomiędzy biotestem (bioassay) a wynikami HRGC / HRMS.

2.7.3. SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ BIOLOGICZNE TESTY KOMÓRKOWE

- w czasie wykonywania testów biologicznych (bioassays) przeprowadzenie każdego testu wymaga referencyjnych stężeń TCDD lub mieszaniny dioksyn i furanów (pełna dawka- krzywa reakcji z $R^2 > 0,95$). Dla celów badań skринingowych można zastosować rozszerzoną krzywą niskiego poziomu dla analizy próbek niskopoziomowych,

- do oceny sprawności testu biologicznego (bioassays) powinny być stosowane referencyjne stężenia TCDD (około 3-krotna granica oznaczalności) nanoszone na karty kontrolne w stałych odstępach czasu. Alternatywnie można zastosować względną odpowiedź próbki referencyjnej w porównaniu do linii krzywej kalibracyjnej TCDD, ponieważ odpowiedź komórkowa może zależeć od wielu czynników,

- dla każdego rodzaju materiału referencyjnego powinny być prowadzone i sprawdzane wykresy kontroli jakości (QC chart) w celu zapewnienia, że wyniki są zgodne z deklarowanymi wytycznymi,

– przy obliczeniach 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 poddać oznaczeniu. W czasie oznaczania zaleca się przeprowadzenie co najmniej 3 lub więcej rozcieńczeń,

– procentowe odchylenie standardowe nie powinno być wyższe niż 15 % w 3-krotnym oznaczaniu dla każdego rozcieńczenia próbek i nie może być wyższe niż 30 % dla wyników uzyskanych w 3 niezależnych eksperymentach,

– granicę wykrywalności można ustalić jako 3-krotne odchylenie standardowe rozpuszczalnika zerowego lub sygnału tła. Innym podejściem jest wykorzystanie sygnału wyższego od tła, gdzie wskaźnik indukcji jest 5-krotnością rozpuszczalnika zerowego, wyznaczonego na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia.

Granice oznaczalności można ustalić jako 5-6-krotną wartość odchylenia standardowego rozpuszczalnika zerowego lub sygnału tła lub zastosować sygnał powyżej tła, gdzie wskaźnik indukcji jest 10-krotnością rozpuszczalnika zerowego, wyznaczony na podstawie krzywej kalibracji przygotowanej tego samego dnia.

2.7.4. SZCZEGÓŁOWE WYMAGANIA, JAKIE POWINNY SPEŁNIAĆ TESTY BIOLOGICZNE⁹⁾

- przestrzegać dostarczonych przez producenta instrukcji przygotowania próbek i sposobu przeprowadzenia ich analizy,
- zestawy do testów (test kits) nie mogą być wykorzystywane po upływie daty ważności,
- nie używać materiałów lub składników przeznaczonych do wykorzystania w innych zestawach (kits),
- zestawy do testów (test kits) powinny być przechowywane oraz używane do badań w temperaturze podanej w instrukcji,
- w przypadku testów immunologicznych granicę wykrywalności określa się jako sumę średniej i 3-krotnego odchylenia standardowego obliczonego na podstawie wyników 10 analiz zerowych podzieloną przez współczynnik nachylenia krzywej wzorcowej wyznaczonej według równania regresji liniowej,
- stosować wzorce referencyjne w celu kontroli, czy ich odpowiedź mieści się w akceptowanym zakresie.

2.8. PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW

Wyniki analiz zawartości dioksyn i dioksynopodobnych PCB przedstawia się w sprawozdaniu z badań, które powinno zawierać:

- 1) poziomy poszczególnych kongenerów PCDD/F i PCB; wyniki analiz powinny być przedstawione zgodnie z górną granicą, dolną granicą i średnią granicą, w celu dostarczenia w sprawozdaniu z badań jak największej ilości informacji, a tym samym umożliwiając interpretację uzyskanych wyników w zależności od określonych wymagań - jeżeli pozwala na to zastosowana procedura analityczna;
- 2) informację o zawartości lipidów w próbce oraz o zastosowanej metodzie ich ekstrakcji.

Informacje na temat odzysku wszystkich zastosowanych wzorców wewnętrznych dołącza się do sprawozdania, jeżeli wartości odzysku wykraczają poza granice określone w ust. 2.6, 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.

3. ODCZYNNIKI I ROZTWORY

3.1. Roztwór 4-dwumetyloaminobenzaldehydu:

Rozpuścić 1,6 g czystego 4-DMAB w 100 ml 96% etanolu i dodać 10 ml kwasu chlorowodorowego ($d = 1,19$). Trwałość tego odczynnika wynosi nie więcej niż 14 dni.

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 100 ml wodą.

3.3. Roztwór Carreza II:

Rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić do objętości 100 ml 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.

⁹⁾ Dotychczas nie ma informacji o dostępnych w handlu zestawach do testów biologicznych charakteryzujących się dostateczną czułością i wiarygodnością, które umożliwiłyby ich wykorzystywanie w skринingowych (przesiewowych) badaniach obecności określonych poziomów dioksyn w próbkach środków spożywczych i paszy.

5. SPOSÓB POSTĘPOWANIA**5.1. Analiza próbeki**

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, 2 g próbki 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-dwumetyloaminobezaldehydu, 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, 2, 4, 5 i 10 ml roztworu mocznika, o którym mowa w ust. 3.5, i uzupełnić do pełnej objętości kolb wodą. Odać 5 ml każdego z roztworów, dodać do każdej probówki po 5 ml roztworu 4-dwumetyloaminobezaldehydu, o którym mowa w ust. 3.1, wymieszać i zmierzyć gęstość optyczną w sposób, o którym mowa w ust. 5.1, porównując z roztworem kontrolnym zawierającym 5 ml 4-dwumetyloaminobezaldehydu 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 jest wyższa niż 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 niskiej zawartości mocznika zwiększać masę próbki tak, aby filtrat pozostał przezroczysty i bezbarwny.

7.3. Jeżeli próbka zawiera proste związki azotowe, takie jak aminokwasy, gęstość optyczną mierzyć przy długości fali 435 nm.

1087**ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ROLNICTWA I ROZWOJU WSI¹⁾**

z dnia 21 sierpnia 2007 r.

w sprawie zwalczania i zapobiegania rozprzestrzenianiu się zachodniej kukurydzianej stonki korzeniowej²⁾

Na podstawie art. 8 ust. 5 oraz art. 10 ust. 1 pkt 2 i 3 ustawy z dnia 18 grudnia 2003 r. o ochronie roślin (Dz. U. z 2004 r. Nr 11, poz. 94, z późn. zm.³⁾) zarządza się, co następuje:

§ 1. Rozporządzenie określa:

- 1) nakazy i zakazy, które wprowadza się na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej w związku ze szczegól-

nym zagrożeniem kukurydzy przez zachodnią kukurydzianą stonkę korzeniową, zwaną dalej „stonką”;

- 2) metody wykrywania i identyfikacji stonki;

- 3) sposób wyznaczania stref, w których stosuje się środki w celu zwalczania i zapobiegania rozprzestrzenianiu się stonki.

§ 2. 1. Nakazuje się do dnia 31 grudnia 2009 r. na części terytorium Rzeczypospolitej Polskiej obejmującej powiaty, w których zadomowiła się stonka, zwane dalej „strefą zasiedlenia”, z zastrzeżeniem ust. 2, stosowanie przy uprawie kukurydzy zmianowania dopuszczającego jej uprawę na danym gruncie, poczynsz od sezonu uprawowego 2007 r.:

- 1) raz na trzy kolejne sezony uprawowe albo
- 2) dwa razy na trzy kolejne sezony uprawowe, jeżeli przynajmniej podczas jednego sezonu uprawowego, w którym jest ona uprawiana:
 - a) zostaną zastosowane zabiegi z użyciem środków ochrony roślin zwalczających owady dorosłe stonki albo
 - b) zostanie ona wysiana po dniu 1 lipca.

¹⁾ Minister Rolnictwa i Rozwoju Wsi kieruje działem administracji rządowej — rolnictwo, na podstawie § 1 ust. 2 pkt 1 rozporządzenia Prezesa Rady Ministrów z dnia 18 lipca 2006 r. w sprawie szczegółowego zakresu działania Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi (Dz. U. Nr 131, poz. 915 oraz z 2007 r. Nr 38, poz. 244).

²⁾ Przepisy rozporządzenia wdrażają decyzję Komisji 2003/766/WE z dnia 24 października 2003 r. w sprawie środków nadzwyczajnych zapobiegających rozprzestrzenianiu się we Wspólnocie *Diabrotica virgifera* Le Conte (Dz. Urz. UE L 275 z 25.10.2003, str. 49, z późn. zm.; Dz. Urz. UE Polskie wydanie specjalne, rozdz. 3, t. 40, str. 442, z późn. zm.).

³⁾ Zmiany wymienionej ustawy zostały ogłoszone w Dz. U. z 2004 r. Nr 96, poz. 959, Nr 173, poz. 1808 i Nr 273, poz. 2703, z 2005 r. Nr 163, poz. 1362, z 2006 r. Nr 92, poz. 639, Nr 170, poz. 1217 i Nr 171, poz. 1225 oraz z 2007 r. Nr 80, poz. 541.