

31978L0633

29.7.1978

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

L 206/43

OSMÁ SMĚRNICE KOMISE**ze dne 15. června 1978,****kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv****(78/633/EHS)**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970 o zavedení metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv ⁽¹⁾, naposledy pozměněnou aktem o přistoupení, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že směrnice stanoví, aby byla oficiální kontrola krmiv prováděna s použitím metod odběru vzorků a analytických metod Společenství pro účely kontroly souladu požadavků stanovených právními nebo správními předpisy týkajícím se jakosti a složení krmiv;

vzhledem k tomu, že směrnice komise 71/250/EHS ze dne 15. června 1971 ⁽²⁾, 71/393/EHS ze dne 18. listopadu 1971 ⁽³⁾, 72/199/EHS ze dne 27. dubna 1972 ⁽⁴⁾, 73/46/EHS ze dne 5. prosince 1972 ⁽⁵⁾, 74/203/EHS ze dne 25. března 1974 ⁽⁶⁾, 75/84/EHS ze dne 20. prosince 1974 ⁽⁷⁾ a 76/372/EHS ze dne 1. března 1976 ⁽⁸⁾ již ustanovily určitý počet analytických metod Společenství; že pokrok v práci od té doby činí vhodným přijmout osmou sérii metod;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

Článek 1

1. Členské státy stanoví, aby byly analýzy pro oficiální kontrolu krmiv, co se týče jejich obsahu zinkbacitracinu, flavofosfolipolu, železa, mědi, manganu a zinku, prováděny v souladu s metodami popsány v příloze této směrnice.

2. Obecná ustanovení stanovená v části 1 „Úvod“ přílohy první směrnice 71/250/EHS, se s výjimkou části týkající se přípravy vzorku, jež má být analyzován, vztahují i na metody popsané v příloze této směrnice.

Článek 2

Členské státy uvedou 1. ledna 1979 v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 15. června 1978.

Za Komisi

Finn GUNDELACH

místopředseda

⁽¹⁾ Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ Úř. věst. L 155, 12.7.1971, s. 13.

⁽³⁾ Úř. věst. L 279, 20.12.1971, s. 7.

⁽⁴⁾ Úř. věst. L 123, 29.5.1972, s. 6.

⁽⁵⁾ Úř. věst. L 83, 30.3.1973, s. 21.

⁽⁶⁾ Úř. věst. L 108, 22.4.1974, s. 7.

⁽⁷⁾ Úř. věst. L 32, 5.2.1975, s. 26.

⁽⁸⁾ Úř. věst. L 102, 15.4.1976, s. 8.

PŘÍLOHA

1. STANOVENÍ ZINKBACITRACINU DIFÚZÍ NA AGARU

1. ÚČEL A ROZSAH

Tato metoda je určena pro stanovení zinkbacitracinu v krmivech, koncentrátech a premixech. Dolní mez stanovení je 5 mg/kg (5 ppm) (*). Metoda není použitelná v přítomnosti ovlivňujících látek, zvláště velkých množství mědi nebo kyseliny askorbové.

2. PRINCIP

Vzorek je extrahován při pH 2 směsí methanol/voda/kyselina chlorovodíková. Extrakt je upraven na pH 6,5, koncentrován (pokud je to nutné) a zředěn. Jeho antibiotická aktivita se stanoví měřením difúze zinkbacitracinu na agaru naočkovaném mikroorganizmem *Micrococcus luteus* (Syn. *M. flavus*). Difúze se projevuje formací inhibičních zón mikroorganismu. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu antibiotické koncentrace nad rozsah použitých antibiotických koncentrací.

3. MIKROORGANISMUS: *MICROCOCCUS LUTEUS* ATCC 10240

3.1. Udržování zásobní kultury

Naočkejte *Micrococcus luteus* do zkumavky se šikmým agarem (4.1). Inkubujte 24 hodin při 30 až 37 °C, skladujte v chladničce při 4 °C a znovu přeočkejte každé dva týdny na šikmý agar.

3.2. Příprava bakteriální suspenze ^(b)

Smyjte bakterie ze zkumavky se šikmým agarem (3.1) za použití 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Tuto suspenzi použijte k naočkování 250 ml kultivačního média (4.1) v Rouxově baňce a inkubujte 18 až 20 hodin při 30 až 37 °C. Smyjte mikroorganismus do 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a promíchejte. Zředte suspenzi na jednu desetinu roztokem chloridu sodného (4.3). Světelná transmise suspenze musí být okolo 75 %, měřeno při 650 nm v 1 cm kyvetě proti roztoku chloridu sodného (4.3).

4. KULTIVAČNÍ MÉDIA A CHEMIKÁLIE

4.1. Kultivační půda ^(b)

Pepton z masa	6,0 g
Trypton	4,0 g
Extrakt z kvasnic	3,0 g
Extrakt z masa	1,5 g
Glukosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 až 6,6 (po sterilizaci)	

4.2. Zkušební půda ^(b)

Trypton	10,0 g
Extrakt z kvasnic	3,0 g
Extrakt z masa	1,5 g
Glukosa	1,0 g
Agar	20,0 g
Tween 80	1 ml
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaci)	

4.3. Roztok chloridu sodného 0,8 % (váhově-objemových): rozpustíte 8 g chloridu sodného p.a. ve vodě a zředíte do 1 000 ml; sterilizujete.

4.4. Směs čistého methanolu/vody/kyseliny chlorovodíkové p.a. (d: 1,18 až 1,19): 80/17,5/2,5 (objemově).

(*) 1 mg krmného zinkbacitracinu je ekvivalentní 42 mezinárodním jednotkám (i.u.).

(b) Jiné metody mohou být použity za předpokladu, že bylo stanoveno, že dávají podobné bakteriální suspenze.

(c) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky.

4.5. Fosfátový pufr, pH 6,5

Hydrogen fosforečnan draselný K_2HPO_4 p.a. (22,15 g).

Dihydrogen fosforečnan draselný K_2HPO_4 p.a. (27,85 g).

Voda do 1 000 ml.

4.6. Kyselina chlorovodíková p.a. (d: 1,18 až 1,19).

4.7. Kyselina chlorovodíková p.a. (0,1 N).

4.8. N roztok hydroxidu sodného p.a.

4.9. Roztok bromokresolové červeně 0,04 % (váhově-objemových): rozpustíte 0,1 g bromokresolové červeně v 18,5 ml 0,01 N roztoku hydroxidu sodného. Doplňte vodou do objemu 250 ml a promíchejte.

4.10. Standardní látky: zinkbacitracin o známé aktivitě (v i.u.).

5. STANDARDNÍ ROZTOKY

Odvažte množství standardního zinkbacitracinu (4.10) odpovídající 1 050 i.u. (podle uvedené aktivity). Přidejte 5 ml 0,1 N kyseliny chlorovodíkové (4.7) a nechte ustát 15 minut. Přidejte 30 ml vody, upravte pH na 4,5 fosfátovým pufrům pH 6,5 (4.5) (okolo 4 ml), doplňte vodou do objemu 50 ml a dobře promíchejte (1 ml = 21 i.u.).

Z tohoto roztoku připravte postupným ředěním fosfátovým pufrům pH 6,5 (4.5) následující roztoky:

S8	0,42	i.u./ml
S4	0,21	i.u./ml
S2	0,105	i.u./ml
S1	0,0525	i.u./ml

6. PŘÍPRAVA EXTRAKTU

6.1. Extrakce

6.1.1. Koncentráty, premixy a minerální krmiva

Odvažte množství vzorku 2,0 až 5,0 g, přidejte 30 ml směsi (4.4) a krátce protřepejte. Zkontrolujte, že je pH okolo 2. Třepejte 10 minut, přidejte 30 ml fosfátového pufru pH 6,5 (4.5) a třepejte 15 minut. Zředte fosfátovým pufrům (4.5), abyste obdrželi očekávaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= U_8).

6.1.2. Bílkovinné koncentráty

Odvažte množství vzorku 10,0 g, přidejte 50 ml směsi (4.4) a krátce protřepejte. Zkontrolujte, že je pH okolo 2. Třepejte 10 minut, přidejte 50 ml fosfátového pufru pH 6,5 (4.5) a třepejte 15 minut. Zředte fosfátovým pufrům (4.5), abyste obdrželi očekávaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= U_8).

6.1.3. Ostatní krmiva

Odvažte množství 10,0 g vzorku (20,0 g pro očekávaný obsah zinkbacitracinu 5 mg/kg), přidejte 25 ml směsi (4.4) a homogenizujte asi 10 minut. Přidejte 25 ml fosfátového pufru pH 6,5 (4.5), třepejte 15 minut a odstředte. Odeberte 20 ml roztoku supernatantu a upravte pH na 6,5 s použitím 1 N roztoku hydroxidu sodného (4.8) s roztokem bromokresolové červeně (4.9) jako indikátorem. Odpařte na přibližně 4 ml na rotačním odpařovači při teplotě nepřesahující 35 °C. Zředte zbytek vodou, abyste obdrželi očekávaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= U_8).

6.2. Zkušební roztoky

Z roztoku U_8 připravte roztok U_4 (očekávaný obsah: 0,21 i.u./ml), U_2 (očekávaný obsah: 0,105 i.u./ml) a U_1 (očekávaný obsah: 0,0525 i.u./ml) s použitím postupného ředění (1 + 1) fosfátovým pufrům (4.5).

7. ZKUŠEBNÍ POSTUP

7.1. Očkování zkušebního média

Očkujte zkušební médium (4.2) bakteriální suspenzí (3.2) při asi 50 °C. Předběžnými pokusy na miskách se zkušebním médiem (4.2) stanovte množství požadované bakteriální suspenze, které poskytne největší a nejjasnější inhibiční zóny s různými koncentracemi zinkbacitracinu.

7.2. Příprava misek

Difúze na agaru je prováděna v miskách za použití čtyřech koncentrací standardního roztoku (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) a čtyřech koncentrací zkušební roztoku (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Tyto čtyři koncentrace extraktu a standardu musí být nezbytně umístěny do každé plotny. Pro tento účel vyberte plotny, které jsou dostatečně velké, aby umožnily udělat v agaru nejméně 8 otvorů o průměru 10 až 13 mm a nejméně 30 mm mezi jejich středy. Pokus může být prováděn na plotnách sestávajících z plochých skleněných desek vybavených dokonale rovným hliníkovým nebo plastovým kroužkem, umístěným na vrchu, 200 mm v průměru a 20 mm výšky.

Rozlijte na misky množství média (4.2), naočkovaného jako v bodě 7.1, aby vytvořilo vrstvu asi 2 mm silnou (50 ml na misku o průměru 200 mm). Nechejte ustát v rovnovážné pozici, vytvořte díry a umístěte do nich přesně odměřené objemy zkušebních a standardních roztoků (mezi 0,10 a 0,15 ml na díru, podle průměru).

Každou koncentraci použijte nejméně čtyřikrát tak, že každému stanovení podléhá vyhodnocení 32 inhibičních zón.

7.3. Inkubace

Inkubujte plotny 16 až 18 hodin při 28 až 30 °C.

8. VYHODNOCENÍ

Změřte průměr inhibičních zón s přesností na 0,1 mm. Zaznamenejte střední měření pro každou koncentraci na semilogaritmickém grafickém papíře, znázorňujíc logaritmus koncentrací ve vztahu k průměrům inhibičních zón. Narýsujte nejvhodnější křivky standardního roztoku a extraktu, například jako je to uvedeno níže.

Stanovte „nejvhodnější“ bod pro nejnižší úroveň standardu (SL) s použitím rovnice:

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

Stanovte „nejvhodnější“ bod pro nejvyšší úroveň standardu (SH) s použitím rovnice:

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

Podobně vypočítejte „nejvhodnější“ body pro nejnižší úroveň extraktu (UL) a nejvyšší úroveň extraktu (UH) nahrazením U_1 , U_2 , U_4 a U_8 za S_1 , S_2 , S_4 a S_8 v nahore uvedených rovnicích.

Zaznamenejte vypočítané hodnoty SL a SH na stejný grafický papír a spojte je, abyste obdrželi „nejvhodnější“ křivku pro roztok standardu. Podobně zaznamenejte UL a UH a spojte je, abyste obdrželi „nejvhodnější“ křivku pro extrakt.

V nepřítomnosti jakýchkoli ovlivnění by měly být křivky paralelní. Pro praktické účely mohou být křivky považovány za paralelní, pokud se hodnoty (SH-SL) a (UH-UL) neliší o více než 10 % od jejich střední hodnoty.

Pokud jsou křivky shledány jako neparalelní, může být pominuto buď U_1 a S_1 nebo U_8 a S_8 a SL, SH, UL a UH vypočteny za použití alternativních rovnic, které poskytují alternativní „nejvhodnější“ křivky:

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

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

a podobně pro UL a UH. Alternativní nejvhodnější křivky musí být kontrolovány na paralelnost jako předtím. Skutečnost, že byl výsledek počítán ze tří úrovní, musí být uvedena v závěrečné zprávě.

Když jsou křivky považovány za paralelní, vypočítejte logaritmus relativní aktivity (log. A) pomocí jedné z následujících rovnic.

Pro čtyři úrovně

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

Pro tři úrovně

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

nebo

$$d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Skutečná aktivita = předpokládaná aktivita x relativní aktivita.

Když jsou křivky považovány za neparalelní, opakujte stanovení. Pokud není paralelnost stále docílena, vypočítejte logaritmus relativní aktivity ($\log A$) pomocí rovnice c). Nicméně, obdrženy výsledek musí být považován za přibližný a toto musí být uvedeno v závěrečné zprávě.

9. OPAKOVATELNOST

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u stejného vzorku stejným analytikem nesmí překročit:

20 % rel. z vyšší hodnoty pro obsahy zinkbacitracinu od 5 a do 25 mg/kg;

5 mg/kg v absolutní hodnotě pro obsahy větší než 25 a do 50 mg/kg;

10 % rel. z vyšší hodnoty pro obsahy nad 50 mg/kg.

2. STANOVENÍ FLAVOFOSFOLIPOLU DIFÚZÍ NA AGARU

1. ÚČEL A ROZSAH

Tato metoda je určena pro stanovení flavofosfolipolu v krmivech, koncentrátech a premixech. Dolní mez stanovení je 1 mg/kg (1 ppm).

2. PRINCIP

Vzorek je extrahován zředěným methanolem za varu pod zpětným chladičem. Po odstředění je extrakt přečištěn (kde je to nutné) na ionexu a zředěn. Jeho antibiotická aktivita se stanoví měřením difúze flavofosfolipolu na agaru naočkovaném mikroorganizmem *Staphylococcus aureus*. Difúze se projevuje formací inhibičních zón mikroorganismu. Průměr těchto zón je přímo úměrný logaritmu antibiotické koncentrace v rozsahu použitých antibiotických koncentrací.

3. MIKROORGANISMUS: STAPHYLOCOCCUS AUREUS ATCC 6538 P

3.1. Udržování zásobní kultury

Naočkujte *Staphylococcus aureus* do zkumavky se šikmým agarem (4.1). Inkubujte 24 hodin při 37 °C, skladujte v chladničce při 4 °C a znovu přeočkujte každý měsíc na šikmý agar.

3.2. Příprava bakteriální suspenze ^(*)

Oddělte dvě zkumavky obsahující zásobní kulturu (3.1) a týdně ji přeočkovávejte. Inkubujte 24 hodin při 37 °C a skladujte v chladničce při asi 4 °C.

24 hodin před zkouškou naočkujte touto kulturou dvě až čtyři zkumavky obsahující šikmé kultivační médium (4.1). Inkubujte 16 až 18 hodin při 37 °C. Vytvořte suspenzi kultury v roztoku chloridu sodného (4.3). Světelná transmittance suspenze musí být okolo 40 %, měřeno při 578 nm v 1 cm kyvetě proti roztoku chloridu sodného (4.3).

(*) Jiné metody mohou být použity za předpokladu, že bylo stanoven, že dávají podobné bakteriální suspenze.

4. KULTIVAČNÍ MÉDIA A CHEMIKÁLIE

4.1. Kultivační médium ^(a)

Pepton z masa	6,0 g
Trypton	4,0 g
Extrakt z kvasnic	3,0 g
Extrakt z masa	1,5 g
Glukosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaci)	

4.2. Zkušební médium

4.2.1. Základní vrstva ^(b)

Pepton z masa	6,0 g
Extrakt z kvasnic	3,0 g
Extrakt z masa	1,5 g
Agar	10,0 g
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaci)	

4.2.2. Očkovací vrstva

Jako v bodě 4.1, s přidavkem 2,0 g silikonové protipěnicí emulze ^(c).

4.3. Roztok chloridu sodného 0,4 % (hmotnostně-objemových): rozpustěte 4 g chloridu sodného p.a. ve vodě a zředěte do 1000 ml; sterilizujte.

4.4. Methanol, čistý.

4.5. Methanol 50 % (objemových): zředěte 500 ml methanolu (4.4) 500 ml vody.

4.6. Methanol 80 % (objemových): zředěte 800 ml methanolu (4.4) 200 ml vody.

4.7. Tris (hydroxymetyl) aminometan p.a.

4.8. Methanolvý roztok chloridu draselného 1,5 % (váhově-objemových): rozpustěte 1,5 g chloridu draselného p.a. ve 20 ml vody, doplňte methanolem (4.4) do objemu 100 ml.

4.9. Kationtový měnič: Dowex 50 Wx8, 20 až 50 mesh, Na forma (kat. Serva č. 41600) nebo ekvivalent.

4.10. Aniontový měnič: Dowex 1x2, 50 až 100 mesh, Cl forma (kat. Serva č. 41010) nebo ekvivalent. Před použitím udržujte 12 až 14 hodin v 80 % methanolu (4.6).

4.11. Skelná vlna.

4.12. pH indikátorový papírek (pH 6,06 až 8,1).

4.13. Kyselina askorbová.

4.14. Standardní látka: flavofosfolipol o známé aktivitě.

5. PŘÍSTROJE

5.1. Skleněné trubice pro chromatografii, vnitřní průměr: 9 mm, délka 150 až 200 mm, vybavené zavíracím kohoutem ve zúžené části dolního konce a skleněným zábrusem (ke spojení s dávkovací nálevkou (5.2)) v horní části.

5.2. Dávkovací nálevka 250 ml, vybavená zavíracím kohoutem a skleněným zábrusem.

5.3. 250 ml kónická baňka se skleněným zábrusem.

5.4. Zpětný chladič se skleněným zábrusem.

6. STANDARDNÍ ROZTOKY

Rozpusťte přesně odvážené množství standardní látky (4.14) v 50 % methanolu (4.5) a zředěte, abyste obdrželi zásobní roztok obsahující 100 µg flavofosfolipolu na mililitr. Pokud je tento roztok skladován v zazátkované baňce při 4 °C, je stabilní až dva měsíce.

^(a) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky, např. oxoid antibiotické médium 1 (CM 327) s přidavkem oxoid agaru č. 3 (L 13).

^(b) Může být použito jakékoli komerční kultivační médium podobného složení a dávající stejné výsledky, např. oxoid antibiotické médium 2 (CM 335) s přidavkem oxoid agaru č. 3 (L 13).

^(c) Např. SE 2 od Wacker Chemie GmbH, Mnichov.

Z tohoto zásobního roztoku připravte postupným ředěním 50 % methanolem (4.5) následující roztoky:

S8	0,2	µg/ml
S4	0,1	µg/ml
S2	0,05	µg/ml
S1	0,025	µg/ml

7. PŘÍPRAVA EXTRAKTU

7.1. Extrakce

7.1.1. Koncentráty, premixy a minerální krmiva

Odvažte množství vzorku 2,0 až 5,0 g, přidejte asi 150 mg kyseliny askorbové (4.13). Homogenizujte se 150 ml 50 % methanolu (4.5) v kónické baňce (5.3) a upravte pH na 8,1 až 8,2 asi 400 mg tris (hydroxymetyl) aminometanem (4.7). Zkontrolujte pH indikačním papírkem (4.12). Nechejte ustát 15 minut, potom znovu upravte pH na 8,1 až 8,2 tris (hydroxymetyl) aminometanem (4.7) a vařte 10 minut pod zpětným chladičem (5.4) při stálém míchání. Nechejte vychladnout, odstředte směs a dekantujte extrakt.

7.1.2. Ostatní krmiva

Odvažte množství 5,0 až 30,0 g vzorku obsahujícího nejméně 30 µg flavofosfolipolu. Homogenizujte se 150 ml 50 % methanolu (4.5) v kónické baňce (5.3) a upravte pH na 8,1 až 8,2 asi 400 mg tris (hydroxymetyl) aminometanem (4.7). Zkontrolujte pH indikačním papírkem (4.12). Nechejte ustát 15 minut, potom znovu upravte pH na 8,1 až 8,2 tris (hydroxymetyl) aminometanem (4.7) a vařte 10 minut pod zpětným chladičem (5.4) při stálém míchání. Nechejte vychladnout, odstředte směs a dekantujte extrakt.

7.2. Přechištění (tento krok může být pominut u koncentrátů, premixů a minerálních krmiv)

Rozmíchejte 110 ml extraktu s 11 g kationtového měniče (4.9), vařte jednu minutu pod zpětným chladičem (5.4) při stálém míchání. Oddělte kationtový měnič odstředěním nebo filtrací. Promíchejte 100 ml extraktu se 150 ml methanolu (4.4) a skladujte roztok 12 až 15 hodin při 4 °C. Odfiltrujte vločkovitou hmotu dokud je roztok chladný.

Vložte zátku ze skelné vlny (4.11) do spodního konce skleněné trubice (5.1), vlijte do trubice 5 ml aniontového měniče (4.10) a promyjte kolonu 100 ml 80 % methanolu (4.6). S použitím nálevky (5.2), přeneste do kolony nejméně 100 ml filtrátu, u kterého se očekává, že obsahuje 16 µg flavofosfolipolu (200 ml na 30 g vzorku krmiva při 1 ppm). Kde je to nutné, zředte filtrát před aplikací do kolony 80 % methanolem (4.6), abyste obdrželi očekávaný obsah flavofosfolipolu 16 µg/100 ml. Průtok upravte na asi 2 ml/minutu. Odstraňte efluentvýtok. Jímejte 50 ml 80 % methanolu (4.6) a odstraňte výtok.

Eluujte flavofosfolipol methanolem roztokem chloridu draselného (4.8) při průtoku asi 2 ml/minutu. Seberte 50 ml eluátu do odměrné baňky, přidejte 30 ml vody a promíchejte. Tento roztok by měl mít obsah flavofosfolipolu 0,2 µg/ml (= U_8).

7.3. Zkušební roztoky

Kde je to nutné (tj. když bylo pominuto předchištění), zředte extrakt získaný v bodě 7.1.1 50 % methanolem (4.5), abyste obdrželi očekávaný obsah flavofosfolipolu 0,2 µg/ml (= U_8).

Z roztoku U_8 připravte roztok U_4 (očekávaný obsah: 0,1 µg/ml), U_2 (očekávaný obsah: 0,05 µg/ml) a U_1 (očekávaný obsah: 0,025 µg/ml) s použitím postupného ředění (1 + 1) 50 % methanolem (4.5).

8. ZKUŠEBNÍ POSTUP

8.1. Očkování zkušebního média

Očkujte zkušební médium (4.2.2) bakteriální suspenzí (3.2) při asi 50 °C. Předběžnými pokusy na miskách se zkušebním médiem (4.2.2) stanovte množství požadované bakteriální suspenze, které poskytne největší a nejjasnější inhibiční zóny s různými koncentracemi flavofosfolipolu (asi 30 ml/litr).

8.2. Příprava misek

Difúze na agaru je prováděna v miskách za použití čtyřech koncentrací standardního roztoku (S_8 , S_4 , S_2 , S_1) a čtyřech koncentrací zkušebního roztoku (U_8 , U_4 , U_2 , U_1). Tyto čtyři koncentrace extraktu a standardu musí být nezbytně umístěny do každé plotny. Pro tento účel vyberte plotny, které jsou dostatečně velké, aby umožnily udělat v agaru nejméně 8 otvorů o průměru 10 až 13 mm a nejméně 30 mm mezi jejich středy. Pokus může být prováděn na miskách sestávajících z plochých skleněných ploten vybavených dokonale rovným hliníkovým nebo plastovým rámem 200 mm v průměru a 20 mm výšky.

Rozlijte na plotny množství média (4.2.1), aby vytvořilo vrstvu asi 1,5 mm silnou (45 ml na misku o průměru 200 mm). Nechejte ustát ve vodorovné pozici a potom přelijte množstvím média (4.2.2) naočkovaného jako v bodě 8.1, aby vytvořilo vrstvu 1 mm silnou (30 ml na misku o průměru 200 mm). Nechejte znovu ustát v rovnovážné pozici, vytvořte otvory a umístěte do nich přesně odměřené objemy zkušebních a standardních roztoků (mezi 0,10 a 0,15 ml na díru, podle průměru).

Každou koncentraci použijte nejméně čtyřikrát tak, že každému stanovení podléhá vyhodnocení 32 inhibičních zón.

8.3. Inkubace

Inkubujte plotny 16 až 18 hodin při 28 až 30 °C.

9. VYHODNOCENÍ

Změřte průměr inhibičních zón s přesností na 0,1 mm. Zaznamenejte střední hodnotu pro každou koncentraci na semilogaritmickém grafickém papíře, znázorňujíc logaritmus koncentrací ve vztahu k průměrům inhibičních zón. Narýsujte nejvhodnější křivky standardního roztoku a extraktu, například jako je to uvedeno níže.

Stanovte „nejvhodnější“ bod pro nejnižší úroveň standardu (SL) s použitím rovnice:

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

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

Podobně vypočtete „nejvhodnější“ body pro nejnižší úroveň extraktu (UL) a nejvyšší úroveň extraktu (UH) nahrazením U_1 , U_2 , U_4 a U_8 za S_1 , S_2 , S_4 a S_8 ve výše uvedených rovnicích.

Zaznamenejte vypočítané hodnoty SL a SH na stejný grafický papír a spojte je, abyste obdrželi „nejvhodnější“ křivku pro roztok standardu. Podobně zaznamenejte UL a UH a spojte je, abyste obdrželi „nejvhodnější“ křivku pro extrakt.

V nepřítomnosti jakýchkoli ovlivnění by měly být křivky paralelní. Pro praktické účely mohou být křivky považovány za paralelní, pokud se hodnoty (SH-SL) a (UH-UL) neliší o více než 10 % od jejich střední hodnoty.

Pokud jsou křivky shledány jako neparalelní, může být pominuto buď U_1 a S_1 nebo U_8 a S_8 a SL, SH, UL a UH vypočteny za použití alternativních rovnic, které poskytují alternativní „nejvhodnější“ křivky:

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

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

a podobně pro UL a UH. Alternativní nejvhodnější křivky musí být kontrolovány na paralelnost jako předtím. Skutečnost, že byl výsledek počítán ze tří úrovní, musí být uvedena v závěrečné zprávě.

Když jsou křivky považovány za paralelní, vypočtete logaritmus relativní aktivity (log. A) pomocí jedné z následujících rovnic.

Pro čtyři úrovně

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

Pro tři úrovně

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

nebo

$$d') \log A = \frac{(U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401}{U_8 + S_8 - U_2 - S_2}$$

Skutečná aktivita = předpokládaná aktivita x relativní aktivita.

Když jsou křivky považovány za neparalelní, opakujte stanovení. Pokud není paralelnost stále docílena, vypočítejte logaritmus relativní aktivity (log. A) prostřednictvím rovnice c). Nicméně, obdrženy výsledek musí být považován za přibližný a toto musí být uvedeno v závěrečném hlášení.

10. OPAKOVATELNOST

Rozdíl mezi výsledky dvou stanovení provedených u stejného vzorku stejným analytikem nesmí překročit:

0,5 mg/kg v absolutní hodnotě pro obsahy flavofosfolipolu od 1 do 2 mg/kg;

25 % rel. z vyšší hodnoty pro obsahy větší než 2 do 10 mg/kg;

20 % rel. z vyšší hodnoty pro obsahy větší než 10 do 25 mg/kg;

5 mg/kg v absolutní hodnotě pro obsahy větší než 25 do 50 mg/kg;

10 % rel. z vyšší hodnoty pro obsahy nad 50 mg/kg.

3. STANOVENÍ STOPOVÝCH PRVKŮ ŽELEZA, MĚDI, MANGANU A ZINKU

1. ÚČEL A ROZSAH

Tato metoda umožňuje stanovit stopové prvky železo, měď, mangan a zinek v krmivech. Dolní meze stanovení jsou:

železo (Fe): 20 mg/kg

měď (Cu): 10 mg/kg

mangan (Mn): 20 mg/kg

zinek (Zn): 20 mg/kg

2. PRINCIP

Vzorek je převeden do roztoku kyselinou chlorovodíkovou po destrukci organické hmoty, pokud je obsažena. Prvky železo, měď, mangan a zinek jsou stanoveny po příslušném zředění atomovou absorpční spektrofotometrií.

3. CHEMIKÁLIE

Úvodní poznámky

Pro přípravu chemikálií a analytických roztoků používejte vodu, u které bylo stanoveno, že je bez kationtů, získanou buď dvounásobnou destilací vody v borosilikátovém nebo křemíkatém destilačním přístroji nebo dvounásobným působením ionexu.

Chemikálie musí být nejméně analytické kvality (p.a.). Nepřítomnost prvků, které mají být stanoveny, musí být kontrolována slepým pokusem. Pokud je to nutné, musí být chemikálie dále přečištěny.

Namísto standardních roztoků popsaných níže, mohou být použity komerční standardní roztoky za předpokladu, že jsou garantovány a před použitím byly překontrolovány.

3.1. Kyselina chlorovodíková p.a. (d: 1,19).

3.2. Kyselina chlorovodíková p.a. (6 N).

3.3. Kyselina chlorovodíková p.a. (0,5 N).

- 3.4. Kyselina fluorovodíková 38 až 40 % (objemových) mající obsah železa menší než 1 mg Fe/litr a zbytek po odpaření menší než 10 mg (jako sulfát)/litr.
- 3.5. Kyselina sírová p.a. (d: 1,84).
- 3.6. Peroxid vodíku p.a. (přibližně 100 objemů kyslíku (30 % hmotnostně)).
- 3.7. Standardní roztok železa (1 000 µg Fe/ml) připravený následovně: rozpustíte 1 g železného drátu p.a. ve 200 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2), přidejte 16 ml peroxidu vodíku (3.6) a doplňte do jednoho litru vodou.
- 3.7.1. Pracovní standardní roztok železa (100 µg Fe/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.7) 1 + 9 vodou.
- 3.8. Standardní roztok mědi (1 000 µg Cu/ml) připravený následovně: rozpustíte 1 g mědi v práškové formě (p.a.) ve 25 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2), přidejte 5 ml peroxidu vodíku (3.6) a doplňte do jednoho litru vodou.
- 3.8.1. Pracovní standardní roztok mědi (10 µg Cu/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.8) 1 + 9 vodou a potom zředěním výsledného roztoku 1 + 9 vodou.
- 3.9. Standardní roztok manganu (1 000 µg Mn/ml) připravený následovně: rozpustíte 1 g manganu v práškové formě (p.a.) ve 25 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2), přidejte 5 ml peroxidu vodíku (3.6) a doplňte do jednoho litru vodou.
- 3.9.1. Pracovní standardní roztok manganu (10 µg Mn/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.9) 1 + 9 vodou a potom zředěním výsledného roztoku 1 + 9 vodou.
- 3.10. Standardní roztok zinku (1 000 µg Zn/ml) připravený následovně: rozpustíte 1 g zinku ve formě pásu nebo plátku (p.a.) ve 25 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2) a doplňte do jednoho litru vodou.
- 3.10.1. Pracovní standardní roztok zinku (10 µg Zn/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.10) 1 + 9 vodou a potom zředěním výsledného roztoku 1 + 9 vodou.
- 3.11. Roztok chloridu lanthanitého připravený následovně: rozpustíte 12 g kysličníku lanthanitého ve 150 ml vody, přidejte 100 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2) a doplňte do jednoho litru vodou.
4. PŘÍSTROJE
- 4.1. Muflová pec s regulací teploty a záznamníkem.
- 4.2. Skleněné nádoby musí být rezistentního borosilikátového typu a doporučuje se používat přístroje, které jsou výlučně rezervovány pro stanovení stopových prvků.
- 4.3. Platinové kelímky a (volitelně) křemenné kelímky.
- 4.4. Atomový absorpční spektrofotometr splňující požadavky metody, co se týče citlivosti a přesnosti v požadovaném rozsahu.
5. POSTUP
- 5.1. **Vzorky obsahující organickou hmotu**
- 5.1.1. *Žihání a příprava roztoku pro analýzu (*)*
- i) Vložte 5 až 10 g vzorku, odváženého s přesností na 0,2 mg, do křemenného nebo platinového kelímku (4.3) (viz poznámka b)), vysušte v sušárně při 105 °C a vložte kelímek do chladné muflové pece (4.1). Zavřete pec (viz poznámka c)) a postupně zvyšujte teplotu na 470 až 475 °C po asi 90 minut. Udržujte tuto teplotu 4 až 16 hodin (např. přes noc), aby se odstranil uhlíkatý materiál a potom otevřete pec a nechejte vychladnout (viz poznámka d)).

(*) Zelené pícniny (čerstvé nebo suché) často obsahují velká množství rostlinného křemíku, který může zadržovat stopové prvky a musí být odstraněn. U vzorků těchto krmiv musí být proto dodržen následující modifikovaný postup.

Provedte operaci 5.1.1 i) až po filtraci. Vymyjte filtrační papír obsahující nerozpustný zbytek dvakrát vroucí vodou a vložte jej do platinového kelímku (4.3). Spalte v muflové peci (4.1) při teplotě pod 550 °C, dokud všechny uhlíkatý materiál zcela nezmizel. Nechejte vychladnout, přidejte několik kapek vody a následně 10 až 15 ml kyseliny fluorovodíkové (3.4) a odpařte do sucha při asi 150 °C. Pokud zůstane nějaký křemičitý zbytek, rozpustě jej znovu v několika mililitrech kyseliny fluorovodíkové (3.4) a odpařte do sucha. Přidejte pět kapek kyseliny sírové (3.5) a zahřívajte dokud se nepřestane uvolňovat bílý kouř. Po přidání 5 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2) a asi 30 ml vody, zahřejte, přefiltrujte roztok do 250 ml odměrné baňky a doplňte po značku vodou (koncentrace HCL asi 0,5 N). Poté pokračujte stanovením od bodu 5.1.3.

Vymyjte kelímek celkem asi 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a přidejte kyselinu pomalu a opatrně do kádinky (může proběhnout prudká reakce díky tvorbě CO_2). Přidejte po kapkách kyselinu chlorovodíkovou (3.1) za míchání, dokud neustane šumění. Odpaře do sucha za příležitostného míchání skleněnou tyčinkou.

Dále přidejte ke zbytku 15 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2) a následně asi 120 ml vody. Míchejte skleněnou tyčinkou, která by měla být ponechána v kádince a zakryjte kádinku hodinovým sklem. Uvedte mírně do varu a udržujte na bodu varu dokud již není vidět nerozpuštěný popel. Přefiltrujte přes filtrační papír bez obsahu popela a jímejte do 250 ml odměrné baňky. Kádinku a filtr vymyjte 5 ml horké 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2) a dvakrát vroucí vodou. Doplňte odměrnou baňku po značku vodou (koncentrace HCl asi 0,5 N).

- ii) Pokud je zbytek na filtru zbarven černě (uhlík), dejte jej zpět do pece a žiňte znovu při 450 až 475 °C. Toto žhání, které vyžaduje pouze několik hodin (asi tři až pět hodin), je dokončeno, když je popel bílý nebo téměř bílý. Rozpusťte zbytek asi 2 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), odpaře do sucha a přidejte 5 ml 6 N kyseliny chlorovodíkové (3.2). Zahřejte, přefiltrujte roztok do odměrné baňky a doplňte po značku vodou (koncentrace HCl asi 0,5 N).

Poznámky:

- a) Při stanovení stopových prvků je důležité být ostražitý vůči rizikům kontaminace, zejména zinkem, mědí a železem. Z tohoto důvodu musí být vybavení používané při přípravě vzorků bez těchto kovů.

Ke snížení obecného rizika kontaminace, pracujte v bezprašné atmosféře s úzkostlivě čistým vybavením a pečlivě umývaným nádobím. Stanovení zinku je zvláště citlivé na mnoho typů kontaminace, např. z nádobí, chemikálií, prachu, atd.

- b) Váha vzorku, který má být žhán, je počítána z přibližného obsahu stopového prvku v krmivu ve vztahu k citlivosti použitého spektrofotometru. U určitých krmiv s nízkým obsahem stopových prvků může být nezbytné začít s 10 až 20 g vzorku a doplnit konečný roztok na pouze 100 ml.
- c) Žhání musí být prováděno v zavřené peci bez vhnění vzduchu nebo kyslíku.
- d) Teplota ukazovaná pyrometrem nesmí překročit 475 °C.

5.1.2. Spektrofotometrické stanovení

5.1.2.1. Příprava kalibračních roztoků

Pro každý prvek, který má být stanoven, připravte z pracovních standardních roztoků získaných dle bodů 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 a 3.10.1 řadu kalibračních roztoků, každý kalibrační roztok s koncentrací HCl okolo 0,5 N a (v případě železa, manganu a zinku) koncentrací chloridu lanthanitého ekvivalentní 0,1 % La (hmotnostně-objemových). Koncentrace vybraných stopových prvků musí ležet v rozsahu citlivosti použitého spektrofotometru. Tabulky uvedené níže ukazují příkladné složení typických řad kalibračních roztoků; v závislosti na typu a citlivosti použitého spektrofotometru může být nicméně nutno vybrat další koncentrace.

Železo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml pracovního standardního roztoku (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)	0	0,5	1	2	3	4	5
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.11) a doplnit do 100 ml vodou.

Měď

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml pracovního standardního roztoku (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml 6 N HCl (3.2)	8	8	8	8	8	8	8

Doplnit do 100 ml vodou.

Mangan

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml pracovního standardního roztoku (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn)	0	1	2	4	6	8	10
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.11) a doplnit do 100 ml vodou.

Zinek

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml pracovního standardního roztoku (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn)	0	0,5	1	2	4	6	8
+ ml 6 N HCl (3.2)	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.11) a doplnit do 100 ml vodou.

5.1.2.2. Příprava roztoku pro analýzy

U stanovení mědi může být roztok připravený z bodu 5.1.1 normálně použit přímo. Pokud je nezbytné přivést jeho koncentraci na úroveň kalibračních roztoků, může být alikvotní část pipetována do 100 ml odměrné baňky a doplněna po značku 0,5 N kyselinou chlorovodíkovou (3.3).

U stanovení železa, manganu a zinku odpipetujte alikvotní podíl roztoku připraveného podle bodu 5.1.1 do 100 ml odměrné baňky, přidejte 10 ml chloridu lanthanitého (3.11) a doplňte po značku 0,5 N kyselinou chlorovodíkovou (3.3) (viz rovněž bod 8 poznámky).

5.1.2.3. Slepý pokus

Slepý pokus musí zahrnovat všechny předepsané kroky postupu kromě toho, že je pominut materiál vzorku.

Kalibrační roztok „0“ nemůže být použit jako slepý.

5.1.2.4. Měření atomové absorpce

Změřte atomovou absorpci kalibračních roztoků a roztoku, který má být analyzován, s použitím oksylichého plamene vzduch-acetylen při následujících vlnových délkách:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Proveďte každé měření čtyřikrát.

5.2. **Minerální krmiva**

Pokud vzorek neobsahuje organickou hmotu, není nezbytné spalování. Pokračujte, jak je to popsáno v bodě 5.1.1 i) počínaje druhým odstavcem. Odpaření s kyselinou fluorovodíkovou může být pominuto.

6. **VÝPOČET VÝSLEDKŮ**

S použitím kalibrační křivky vypočítejte koncentraci stopového prvku v roztoku, který má být analyzován a vyjádřete výsledek v miligramech stopového prvku na kilogram vzorku (ppm).

7. **OPAKOVATELNOST**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku stejným analytikem nesmí překročit:

— 5 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahů příslušného stopového prvku do 50 mg/kg.

- 10 % z vyššího výsledku u obsahů příslušného stopového prvku od 50 do 100 mg/kg,
- 10 mg/kg, v absolutní hodnotě u obsahů příslušného stopového prvku od 100 do 200 mg/kg,
- 5 % z vyššího výsledku u obsahů příslušného stopového prvku přes 200 mg/kg.

8. POZNÁMKY

Přítomnost velkých množství fosfátů může ovlivňovat stanovení železa, manganu a zinku. Takové ovlivnění musí být korigováno přidáním roztoku chloridu lanthanitého (3.11). Nicméně, pokud je váhový poměr ve vzorku $\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}} \cdot 2$, může být přídatek roztoku chloridu lanthanitého (3.11) do roztoku pro analýzy a do kalibračních roztoků pominuto.
