

32000L0045

L 174/32

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

13.7.2000

SMĚRNICE KOMISE 2000/45/ES**ze dne 6. července 2000,****kteřou se stanoví analytické metody Společenství pro stanovení vitamínu A, vitamínu E a tryptofanu v krmivech****(Text s významem pro EHP)**

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 70/373/EHS ze dne 20. července 1970, kterou se zavádí metody odběru vzorků a analýzy Společenství pro úřední kontrolu krmiv ⁽¹⁾, naposledy pozměněnou aktem o přistoupení Rakouska, Finska a Švédska ⁽²⁾, a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že:

- (1) Směrnice 70/373/EHS stanoví, že úřední kontroly krmiv za účelem zjištění, zda jsou splněny požadavky právních a správních předpisů na jakost a složení krmiv, musí být prováděny za použití metod Společenství pro odběr vzorků a analýzy.
- (2) Směrnice Rady 70/524/EHS ze dne 23. listopadu 1970 o doplňkových látkách v krmivech ⁽³⁾, naposledy pozměněná nařízením Komise (ES) č. 2439/1999 ze dne 17. listopadu 1999 ⁽⁴⁾, stanoví, že obsah vitamínu A a vitamínu E musí být uváděn na etiketách, pokud jsou tyto látky přidány do premixů a krmiv.
- (3) Směrnice Rady 79/373/EHS ze dne 2. dubna 1979 o uvádění krmných směsí na trh ⁽⁵⁾, naposledy pozměněná směrnicí Komise 2000/16/ES ⁽⁶⁾, a směrnice Rady 93/74/EHS ze dne 13. září 1993 o krmivech určených ke zvláštním účelům výživy ⁽⁷⁾, naposledy pozměněná směrnicí 96/25/ES ⁽⁸⁾, stanoví, že aminokyseliny musí být uváděny na etiketách krmiv.
- (4) Musí být stanoveny analytické metody pro kontrolu těchto látek.
- (5) Opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy zajistí, aby se úřední kontroly obsahu vitamínu A, vitamínu E a tryptofanu v krmivech a premixech prováděly metodami stanovenými v příloze.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 31. srpna 2000. Neprodleně o nich uvědomí Komisi.

Budou tyto předpisy používat od 1. září 2000.

Tato opatření přijatá členskými státy musí obsahovat odkaz na tuto směrnici nebo musí být takový odkaz učiněn při jejich úředním vyhlášení. Způsob odkazu si stanoví členské státy.

Článek 3

Tato směrnice vstupuje v platnost dvacátým dnem po vyhlášení v *Úředním věstníku Evropských společenství*.

Článek 4

Tato směrnice je určena členskými státy.

V Bruselu dne 6. července 2000.

Za Komisi

David BYRNE

člen Komise

⁽¹⁾ Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.

⁽²⁾ Úř. věst. C 241, 29.8.1994, s. 1.

⁽³⁾ Úř. věst. L 270, 14.12.1970, s. 1.

⁽⁴⁾ Úř. věst. L 297, 18.11.1999, s. 8.

⁽⁵⁾ Úř. věst. L 86, 6.4.1979, s. 30.

⁽⁶⁾ Úř. věst. L 105, 3.5.2000, s. 36.

⁽⁷⁾ Úř. věst. L 237, 22.9.1993, s. 23.

⁽⁸⁾ Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s. 35.

PŘÍLOHA

ČÁST A

STANOVENÍ VITAMÍNU A

1. Účel a oblast použití

Tato metoda je určena pro stanovení vitamínu A (retinolu) v krmivech a premixech. Vitamín A zahrnuje *all-trans*-retinyl alkohol a jeho *cis* izomery, které se stanoví touto metodou. Obsah vitamínu A je vyjádřen v mezinárodních jednotkách (IU) na kg. Jedna IU odpovídá aktivitě 0,300 µg *all-trans*-vitamín A alkoholu nebo 0,344 µg *all-trans*-vitamín A acetátu nebo 0,550 µg *all-trans*-vitamín A palmitátu.

Mez stanovitelnosti je 2 000 IU vitamínu A/kg.

2. Princip

Vzorek je hydrolyzován etanolvým roztokem hydroxidu draselného a vitamín A je extrahován do petroleteru. Rozpouštědlo je odstraněno odpařením a zbytek se rozpustí v metanolu a, pokud je to nutné, zředí na požadovanou koncentraci. Obsah vitamínu A se stanoví reverzní fází vysoce účinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) za použití UV nebo fluorescenční detekce. Chromatografické parametry jsou vybírány tak, aby nedošlo k oddělení *all-trans*-vitamín A alkoholu a jeho *cis* izomerů.

3. Činidla

3.1 Etanol, $\sigma = 96 \%$

3.2 Petroléter, rozsah varu 40 až 60 °C

3.3 Metanol

3.4 Roztok hydroxidu draselného, $\beta = 50 \text{ g/100 ml}$

3.5 Roztok askorbanu sodného, $\beta = 10 \text{ g/100 ml}$ (viz 7.7 poznámky)

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

3.6.1 Roztok sulfidu sodného, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ v glycerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pro $x = 9$) (viz 7.8 poznámky)

3.7 Roztok fenoltaleinu, $\beta = 2 \text{ g/100 ml}$ v etanolu (3.1)

3.8 2-propanol

3.9 Mobilní fáze pro HPLC: směs metanolu (3.3) a vody, např. 980 + 20 (objemově + objemově). Extrakční poměr bude stanoven charakteristikami použité kolony.

3.10 Dusík, prostý kyslíku

3.11 *All-trans*-vitamín A acetát, extra čistý, ověřené aktivity, např. $2,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$

3.11.1 Zásobní roztok *all-trans*-vitamín A acetátu: Odvažte s přesností na 0,1 mg 50 mg acetátu vitamínu A (3.11) do 100 ml odměrné baňky. Rozpusťte ve 2-propanolu (3.8) a doplňte po značku stejným rozpouštědlem. Nominální koncentrace tohoto roztoku je 1 400 IU vitamínu A na ml. Přesný obsah musí být stanoven podle 5.6.3.1.

3.12 *All-trans*-vitamín A palmitát, extra čistý, ověřené aktivity, např. $1,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$.

3.12.1 Zásobní roztok *all-trans*-vitamín A palmitátu: Odvažte s přesností na 0,1 mg 80 mg palmitátu vitamínu A (3.12) do 100 ml odměrné baňky. Rozpusťte ve 2-propanolu (3.8) a doplňte po značku stejným rozpouštědlem. Nominální koncentrace tohoto roztoku je 1 400 IU vitamínu A na ml. Přesný obsah musí být stanoven podle 5.6.3.2.

3.13 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (viz 7.5 poznámky)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Rotační vakuová odparka

4.2 Nádobí z opakního skla

- 4.2.1 Baňky s plochým dnem nebo Erlenmeyerovy baňky, 500 ml, se zábrusovými hrdly
- 4.2.2 Odměrné baňky se zábrusovými zátkami, úzkohrdlé, 10, 25, 100 a 500 ml
- 4.2.3 Dělicí nálevky, kuželovité, 1 000 ml, se zábrusovými zátkami
- 4.2.4 Hruškovité baňky, 250 ml, se zábrusovými hrdly
- 4.3 Allihnův kondenzátor, délka izolační vrstvy 300 mm, se zábrusovým hrdlem, s adaptérem pro přívodní trubici plynu.
- 4.4 Skládaný filtrační papír pro oddělení fáze, průměr 185 mm (např. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5 HPLC vybava se vstřikovacím systémem
- 4.5.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm x 4 mm, C_{18} , velikost částic náplně 5 nebo 10 μm nebo obdobné (výkonnostní parametry: pouze jednotlivý pík pro všechny izomery retinolu za podmínek HPLC)
- 4.5.2 UV nebo fluorescenční detektor s proměnlivým nastavením vlnové délky
- 4.6 Spektrofotometr s 10 mm křemennými kyvetami
- 4.7 Vodní lázeň s magnetickým míchadlem
- 4.8 Extrakční přístroj (viz obrázek 1) sestávající ze:
 - 4.8.1 Skleněný odměrný válec o objemu 1 l vybavený zábrusovým hrdlem a zátkou
 - 4.8.2 Zábrusová vložka vybavená bočním ramenem a nastavitelnou trubicí procházející středem. Nastavitelná trubice musí mít spodní konec ve tvaru písmene U a trysku na opačném konci tak, aby mohla být horní vrstva kapaliny ve válci převedena do dělicí nálevky.

5. Postup

Poznámka: Vitamin A je citlivý vůči (UV) světlu a oxidaci. Všechny operace musí být prováděny v nepřítomnosti světla (za použití nádobí z opakního skla, nebo nádobí chráněného hliníkovou fólií) a kyslíku (vypláchněte dusíkem). Vzduch nad kapalinou musí být během extrakce nahrazen dusíkem (vyhněte se přetlaku občasným povolením zátky).

5.1 Příprava vzorku

Rozmělněte vzorek tak, aby prošel sítím s otvory 1 mm, přičemž dbejte, aby nedošlo k zahřátí. Rozmělnění musí být provedeno bezprostředně před vážením a saponifikací, jinak může dojít ke ztrátám vitamínu A.

5.2 Saponifikace

V závislosti na obsahu vitamínu A, odvažte s přesností na 0,01 g, 2 g až 25 g vzorku do 500 ml baňky s plochým dnem nebo Erlenmeyerovy baňky (4.2.1). Přidejte postupně za stálého kroužení 130 ml etanolu (3.1), přibližně 100 mg BHT (3.13), 2 ml roztoku askorbanu sodného (3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (3.6). Připojte kondenzátor (4.3) k baňce a ponořte baňku do vodní lázně s magnetickým míchadlem (4.7). Zahřejte k varu a nechejte odtékat pět minut. Potom přidejte 25 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4) přes kondenzátor (4.3) a nechejte odtékat dalších 25 minut za stálého míchání pod pomalým proudem dusíku. Potom vypláchněte kondenzátor přibližně 20 ml vody a obsah baňky ochlaďte na pokojovou teplotu.

5.3 Extrakce

Převedte dekantací saponifikovaný roztok kvantitativně vypláchnutím celkovým objemem 250 ml vody do 1 000 ml dělicí nálevky (4.2.3) nebo do extrakčního přístroje (4.8). Vypláchněte saponifikační baňku postupně 25 ml etanolu (3.1) a 100 ml petroleteru (3.2) a převedte výplachy do dělicí nálevky nebo do extrakčního přístroje. Podíl vody a etanolu v kombinovaných roztocích musí být okolo 2:1. Třeptejte silně dvě minuty a nechejte ustát dvě minuty.

5.3.1 Extrakce s použitím dělicí nálevky (4.2.3)

Když se vrstvy oddělily (viz poznámky 7.3), převedte vrstvu petroleteru do další dělicí nálevky (4.2.3). Opakujte tuto extrakci dvakrát 100 ml petroleteru (3.2) a dvakrát 50 ml petroleteru (3.2).

Promyjte kombinované extrakty v dělicí nálevce dvakrát 100 ml dávkami vody za současného kroužení (aby se zabránilo tvorbě emulzí) a potom opakovaným třepáním s dalšími 100 ml dávkami vody, dokud voda nezůstává bezbarvá za přidavku roztoku fenoltaleinu (3.7) (čtyřnásobné promývání je obvykle dostačující). Přefiltrujte extrakt přes suchý skládaný filtr pro dělení fází (4.4), aby se odstranila všechna suspendovaná voda do 500 ml odměrné baňky (4.2.2). Vypláchněte dělicí nálevku a filtr 50 ml petroleteru (3.2), doplňte po značku petroleterem (3.2) a dobře promíchejte.

5.3.2 Extrakce za použití extrakčního přístroje (4.8)

Když se vrstvy oddělily (viz poznámky 7.3), nahraďte zátku skleněného válce (4.8.1) za zábrusovou vložku (4.8.2) a nasměrujte dolní konec ve tvaru písmene U nastavitelné trubice tak, aby byl právě nad hladinou rozhraní. Za pomoci tlaku z rozvodu dusíku do postranního ramene, převedte vrchní vrstvu petroleteru do 1 000 ml dělicí nálevky (4.2.3). Přidejte 100 ml petroleteru (3.2) do skleněného válce, zazátkujte a dobře protřepejte. Nechejte vrstvy oddělit se a převedte vrchní vrstvu do dělicí nálevky jako předtím. Opakujte postup extrakce dalšími 100 ml petroleteru (3.2), potom dvakrát 50 ml dávkami petroleteru (3.2) a přidejte vrstvy petroleteru do dělicí nálevky.

Promyjte kombinované extrakty petroleteru tak, jak je to popsáno v 5.3.1, a pokračujte jak je tam popsáno.

5.4 Příprava roztoku vzorku pro HPLC

Odpipetujte alikvotní část roztoku petroleteru (z 5.3.1 nebo 5.3.2) do 250 ml baňky ve tvaru hrušky (4.2.4). Odpařte rozpouštědlo téměř do sucha na rotační vakuové odparce (4.1) za sníženého tlaku při teplotě vodní lázně nepřekračující 40 °C. Obnovte atmosférický tlak připuštěním dusíku (3.10) a odpojte baňku od rotační vakuové odparky. Odstraňte zbývající rozpouštědlo proudem dusíku (3.10) a ihned rozpusťte zbytek ve známém objemu (10–100 ml) metanolu (3.3) (koncentrace vitamínu A by měla být v rozsahu 5 IU/ml až 30 IU/ml).

5.5 Stanovení pomocí HPLC

Vitamín A je oddělen na reverzní fázové koloně C₁₈ (4.5.1) a koncentrace je měřena pomocí UV detektoru (325 nm) nebo fluorescenčního detektoru (excitace: 325 nm, emise: 475 nm) (4.5.2).

Vstříkněte alikvotní část (např. 20 µl) metanolového roztoku získaného v 5.4 a vymývejte mobilní fází (3.9). Vypočítejte střední výšku píku (plochu) několika vstříků roztoku stejného vzorku a střední výšky (plochy) několika vstříků kalibračních roztoků (5.6.2).

Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou předkládány jako doporučení; ostatní podmínky smějí být použity za předpokladu, že poskytují shodné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.5.1): 250 mm x 4 mm, C₁₈, velikost částic náplně 5 nebo 10 µm nebo ekvivalent

Mobilní fáze (3.9): Směs metanolu (3.3) a vody, např. 980 + 20 (objemově + objemově)

Úroveň toku: 1 – 2 ml/min.

Detektor (4.5.2): UV detektor (325 nm) nebo fluorescenční detektor (excitace: 325 nm/emise: 475 nm)

5.6 Kalibrace

5.6.1 Příprava standardních pracovních roztoků

Odpipetujte 20 ml zásobního roztoku vitamínu A acetátu (3.11.1) nebo 20 ml zásobního roztoku vitamínu A palmitátu (3.12.1) do 500 ml baňky s plochým dnem nebo Erlenmeyerovy baňky (4.2.1) a hydrolyzujte, jak je to popsáno v 5.2, ale bez přidavku BHT. Následně extrahujte petroleterem (3.2) podle 5.3 a doplňte do 500 ml petroleterem (3.2). Odpařte 100 ml tohoto extraktu na rotační vakuové odparce (viz 5.4) téměř do sucha, odstraňte zbývající rozpouštědlo proudem dusíku (3.10) a znovu rozpusťte zbytek v 10,0 ml metanolu (3.3). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 560 IU vitamínu A/1 ml. Přesný obsah se stanoví podle 5.6.3.3. Standardní pracovní roztok musí být čerstvě připraven před použitím.

Pipetujte 2,0 ml tohoto standardního pracovního roztoku do 20 ml odměrné baňky, doplňte po značku metanolem (3.3) a promíchejte. Nominální koncentrace tohoto zředěného standardního pracovního roztoku je 56 IU vitamínu A na ml.

5.6.2 Příprava kalibračních roztoků a kalibrační graf

Převeďte 1,0, 2,0, 5,0 a 10,0 ml zředěného standardního pracovního roztoku do sérií 20 ml odměrných baněk, doplňte po značku metanolem (3.3) a promíchejte. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,8, 5,6, 14,0 a 28,0 IU vitamínu A na ml.

Vstříknete několikrát 20 μ l každého kalibračního roztoku a stanovte střední výšky píků (plochy). Za použití středních výšek píků (ploch) narysujte kalibrační graf odpovídající výsledkům UV kontroly (5.6.3.3).

5.6.3 UV standardizace standardních roztoků

5.6.3.1 Zásobní roztok vitamín A acetátu

Pipetujte 2,0 ml zásobního roztoku vitamín A acetátu (3.11.1) do 50 ml odměrné baňky (4.2.2) a doplňte po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 56 IU vitamínu A na ml. Pipetujte 3,0 ml tohoto zředěného roztoku vitamín A acetátu do 25 ml odměrné baňky a doplňte po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 6,72 IU vitamínu A na ml. Změřte UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (3.8) ve spektrofotometru (4.6) mezi 300 nm a 400 nm. Extinkční maximum musí být mezi 325 nm a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_{\text{pro vitamín A acetát}} = 1\,530 \text{ při } 326 \text{ nm ve 2-propanolu}$$

5.6.3.2 Zásobní roztok vitamín A palmitátu

Pipetujte 2,0 ml zásobního roztoku vitamín A palmitátu (3.12.1) do 50 ml odměrné baňky (4.2.2) a doplňte po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 56 IU vitamínu A na ml. Pipetujte 3,0 ml tohoto zředěného roztoku vitamín A palmitátu do 25 ml odměrné baňky a doplňte po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 6,72 IU vitamínu A na ml. Změřte UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (3.8) ve spektrofotometru (4.6) mezi 300 nm a 400 nm. Extinkční maximum musí být mezi 325 nm a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_{\text{pro vitamín A acetát}} = 957 \text{ při } 326 \text{ nm ve 2-propanolu}$$

5.6.3.3 Standardní pracovní roztoky vitamínu A

Pipetujte 3,0 ml nezředěného standardního pracovního roztoku vitamínu A, připraveného podle 5.6.1 do 50 ml odměrné baňky (4.2.2) a doplňte po značku 2-propanolem (3.8). Pipetujte 5,0 ml tohoto roztoku do 25 ml odměrné baňky a doplňte po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 6,72 IU vitamínu A na ml. Změřte UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (3.8) ve spektrofotometru (4.6) mezi 300 nm a 400 nm. Extinkční maximum musí být mezi 325 nm a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

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

$$(E_{1\text{ cm}}^{1\%})_{\text{pro vitamín A alkohol}} = 1\,821 \text{ při } 325 \text{ nm ve 2-propanolu}$$

6. Výpočet výsledků

Ze střední výšky (plochy) píku pro roztok vzorku vitamínu A stanovte koncentraci roztoku vzorku v IU/ml ve vztahu ke kalibračnímu grafu (5.6.2).

Obsah vitamínu A w v IU/kg ve vzorku je dán následující rovnicí:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1\,000}{V_1 \cdot m} \text{ (IU/kg)}$$

ve které:

β = koncentrace vitamínu A v roztoku vzorku (5.4) v IU/ml

V_1 = objem roztoku vzorku (5.4) v ml

V_2 = objem alikvot odebraných v 5.4 v ml

m = hmota zkušební dávky v g

7. Poznámky

- 7.1 U vzorků s nízkou koncentrací vitamínu A může být užitečné spojit extrakty petroléru dvou saponifikačních vsázek (hmotnostní hodnota: 25 g) do jednoho roztoku vzorku pro stanovení pomocí HPLC.
- 7.2 Množství tuku ve vzorku odebraném pro analýzu by nemělo překročit 2g.
- 7.3 Pokud se neobjeví fázové dělení, přidejte přibližně 10 ml etanolu (3.1), k rozrušení emulze.
- 7.4 U rybího tuku a ostatních čistých tuků by měla být doba saponifikace prodloužena na 45–60 minut.
- 7.5 Namísto BHT může být použit hydrochinon.
- 7.6 Oddělení izomerů retinolu je možné s použitím normální fázové kolony.
- 7.7 Namísto askorbanu sodného může být použito přibližně 150 mg kyseliny askorbové.
- 7.8 Namísto roztoku sulfidu sodného může být použito přibližně 50 mg EDTA.

8. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku nesmí překročit 15 % z vyššího výsledku.

9. Výsledky studijní spolupráce ⁽¹⁾

Premix	Premixové krmivo	Minerální koncentrát	Bílkovinný koncentrát	Krmivo pro selata	
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
střed [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 [IU/kg]	3,0	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 [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: počet laboratoří

n: počet jednotlivých hodnot

s_r : standardní odchylka opakovatelnosti

s_R : standardní odchylka reprodukovatelnosti

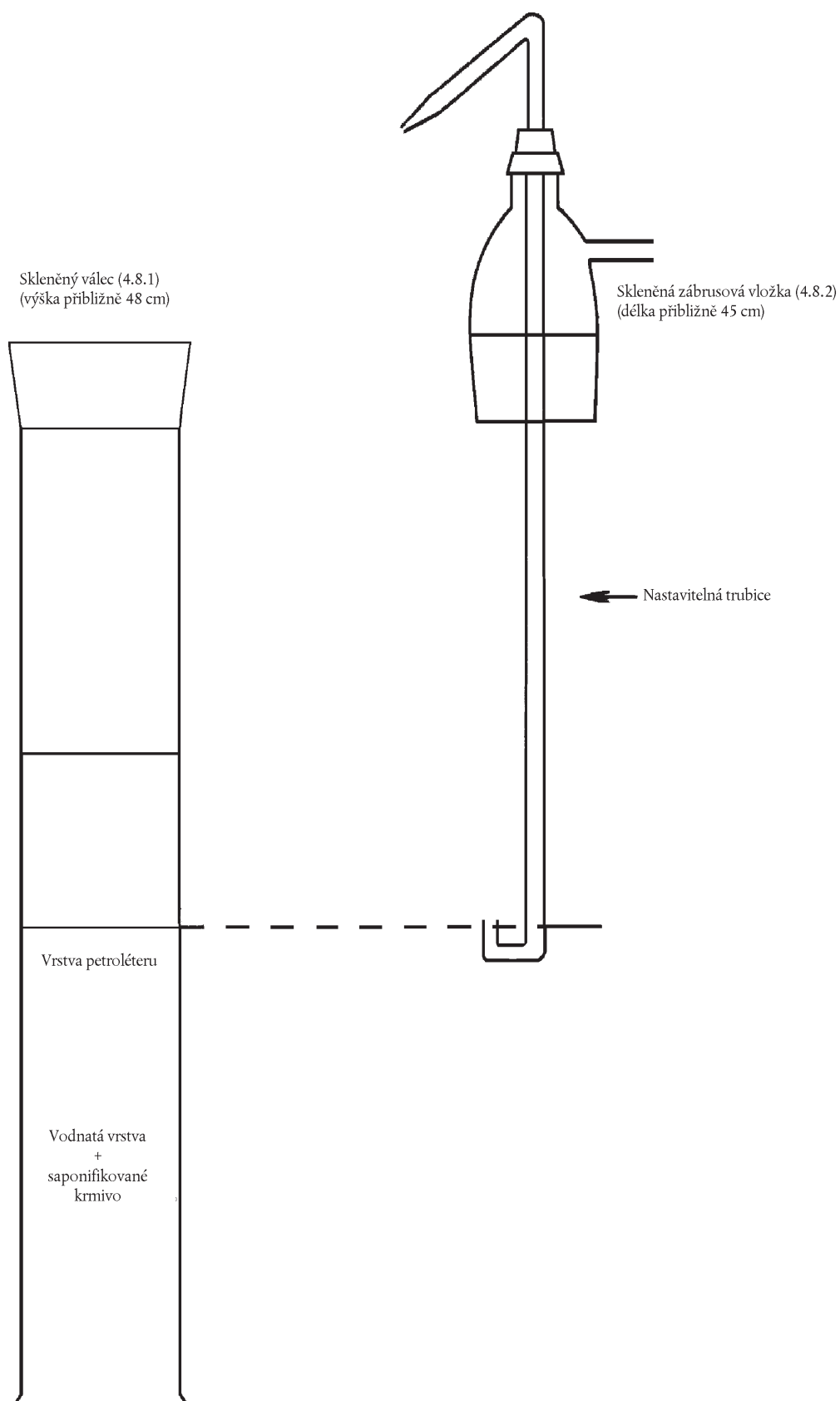
r : opakovatelnost

R : reprodukovatelnost

CV_r : koeficient variace opakovatelnosti

CV_R : koeficient variace reprodukovatelnosti

⁽¹⁾ Řízené pracovní skupinou pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Obrázek 1: Extrakční přístroj (4.8)

ČÁST B**STANOVENÍ VITAMÍNU E****1. Účel a oblast použití**

Tato metoda je určena pro stanovení vitamínu E v krmivech a premixech. Obsah vitamínu E je vyjádřen jako mg DL- α -tokoferol acetátu na kg. 1 mg DL- α -tokoferol acetátu odpovídá 0,91 mg DL- α -tokoferolu (vitamín E).

Mez stanovitelnosti je 2 mg vitamínu E/kg.

2. Princip

Vzorek je hydrolyzován etanolvým roztokem hydroxidu draselného a vitamín E je extrahován do petroléteru. Rozpouštědlo je odstraněno odpařením a zbytek se rozpustí v metanolu a, pokud je to nutné, zředí na požadovanou koncentraci. Obsah vitamínu E se stanoví reverzní fází vysoce účinné kapalinové chromatografie (RP-HPLC) za použití UV nebo fluorescenčního detekce.

3. Činidla

3.1 Etanol, $\sigma = 96 \%$

3.2 Petroléter, rozsah varu 40 až 60 °C

3.3 Metanol

3.4 Roztok hydroxidu draselného, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$

3.5 Roztok askorbanu sodného, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (viz 7.7 poznámky)

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

3.6.1 Roztok sulfidu sodného, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ v glycerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (pro $x = 9$) (viz 7.8 poznámky)

3.7 Roztok fenoltaleinu, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ v etanolu (3.1)

3.8 Mobilní fáze pro HPLC: směs metanolu (3.3) a vody, např. 980 + 20 (objemově + objemově). Extrakční poměr bude stanoven charakteristikami použité kolony.

3.9 Dusík, prostý kyslíku

3.10 DL- α -tokoferol acetát, extra čistý, ověřené aktivity

3.10.1 Zásobní roztok DL- α -tokoferol acetátu: Odvažte s přesností na 0,1 mg, 100 mg DL- α -tokoferol acetátu (3.10) do 100 ml odměrné baňky. Rozpusťte v etanolu (3.1) a doplňte po značku stejným rozpouštědlem. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL- α -tokoferol acetátu. (UV kontrola – viz 5.6.1.3; stabilizace – viz 7.4 poznámky).

3.11 DL- α -tokoferol, extra čistý, ověřené aktivity

3.11.1 Odvažte s přesností na 0,1 mg, 100 mg DL- α -tokoferolu (3.10) do 100 ml odměrné baňky. Rozpusťte v etanolu (3.1) a doplňte po značku stejným rozpouštědlem. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg DL- α -tokoferolu. (UV kontrola – viz 5.6.2.3; stabilizace – viz 7.4 poznámky).

3.12 2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT) (viz 7.5 poznámky)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Rotační vakuová odparka

4.2 Nádobí z opakního skla

4.2.1 Baňky s plochým dnem nebo Erlenmeyerovy baňky, 500 ml, se zábrusovými hrdly

- 4.2.2 Odměrné baňky se zábrusovými zátkami, úzkohrdlé, 10, 25, 100 a 500 ml
- 4.2.3 Dělicí nálevky, kuželovité, 1 000 ml, se zábrusovými zátkami
- 4.2.4 Hruškovité baňky, 250 ml, se zábrusovými hrdly
- 4.3 Allihnův kondenzátor, délka izolační vrstvy 300 mm, se zábrusovým hrdlem, s adaptérem pro přívodní trubici plynu
- 4.4 Skládaný filtrační papír pro oddělení fáze, průměr 185 mm (např. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5 HPLC vybava se vstřikovacím systémem
- 4.5.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm x 4 mm, C₁₈, velikost částic náplně 5 nebo 10 µm nebo ekvivalent
- 4.5.2 UV nebo fluorescenční detektor s proměnlivým nastavením vlnové délky
- 4.6 Spektrofotometr s 10 mm křemennými kyvetami
- 4.7 Vodní lázeň s magnetickým míchadlem
- 4.8 Extrakční přístroj (viz obrázek 1) sestávající ze:
 - 4.8.1 Skleněný odměrný válec o objemu 1 l vybavený zábrusovým hrdlem a zátkou
 - 4.8.2 Zábrusová vložka vybavená bočním ramenem a nastavitelnou trubicí procházející středem. Nastavitelná trubice musí mít spodní konec ve tvaru písmene U a trysku na opačném konci tak, aby mohla být horní vrstva kapaliny ve válci převedena do dělicí nálevky.

5. Postup

Poznámka: Vitamin E je citlivý vůči (UV) světlu a oxidaci. Všechny operace musí být prováděny v nepřítomnosti světla (za použití nádobí z opakního skla, nebo nádobí chráněného hliníkovou fólií) a kyslíku (vypláchněte dusíkem). Vzduch nad kapalinou musí být během extrakce nahrazen dusíkem (vyhněte se přetlaku občasným povolením zátky).

5.1 Příprava vzorku

Rozmělněte vzorek tak, aby prošel sítím s otvory 1 mm, přičemž dbejte, aby nedošlo k zahřátí. Rozmělnění musí být provedeno bezprostředně před vážením a saponifikací, jinak může dojít ke ztrátám vitamínu E.

5.2 Saponifikace

V závislosti na hmotnosti obsahu vitamínu E odvažte s přesností na 0,01 g, 2 g až 25 g vzorku do 500 ml baňky s plochým dnem nebo Erlenmeyerovy baňky (4.2.1). Přidejte postupně za stálého kroužení 130 ml etanolu (3.1), přibližně 100 mg BHT (3.12), 2 ml roztoku askorbanu sodného (3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (3.6). Připojte kondenzátor (4.3) k baňce a ponořte baňku do vodní lázně s magnetickým míchadlem (4.7). Zahřejte k varu a nechejte odtékat pět minut. Potom přidejte 25 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4) přes kondenzátor (4.3) a nechejte odtékat dalších 25 minut za stálého míchání pod pomalým proudem dusíku. Potom vypláchněte kondenzátor přibližně 20 ml vody a obsah baňky ochlaďte na pokojovou teplotu.

5.3 Extrakce

Převedte dekantací saponifikovaný roztok kvantitativně vypláchnutím celkovým objemem 250 ml vody do 1 000 ml dělicí nálevky (4.2.3) nebo do extrakčního přístroje (4.8). Vypláchněte saponifikační baňku postupně 25 ml etanolu (3.1) a 100 ml petroléru (3.2) a převedte výplachy do dělicí nálevky nebo do extrakčního přístroje. Podíl vody a etanolu v kombinovaných roztocích by měl být okolo 2:1. Třeptejte silně dvě minuty a nechejte ustát dvě minuty.

5.3.1 Extrakce s použitím dělicí nálevky (4.2.3)

Když se vrstvy oddělily (viz poznámky 7.3), převedte vrstvu petroléru do další dělicí nálevky (4.2.3). Opakujte tuto extrakci dvakrát 100 ml petroléru (3.2) a dvakrát 50 ml petroléru (3.2).

Promyjte kombinované extrakty v dělicí nálevce dvakrát 100 ml dávkami vody za současného kroužení (aby se zabránilo tvorbě emulzí) a potom opakovaným třepáním s dalšími 100 ml dávkami vody, dokud voda nezůstává bezbarvá za přídavku roztoku fenoltaleinu (3.7) (čtyřnásobné promývání je obvyčejně dostačující). Přefiltrujte extrakt přes suchý skládaný filtr pro dělení fází (4.4), aby se odstranila všechna suspendovaná voda do 500 ml odměrné baňky (4.2.2). Vypláchněte dělicí nálevku a filtr 50 ml petroléteru (3.2), doplňte po značku petroléterem (3.2) a dobře promíchejte.

5.3.2 Extrakce za použití extrakčního přístroje (4.8)

Když se vrstvy oddělily (viz poznámky 7.3), nahraďte zátku skleněného válce (4.8.1) za zábrusovou vložku (4.8.2) a nasměrujte dolní konec ve tvaru písmene U nastavitelné trubice tak, aby byl právě nad hladinou rozhraní. Za pomoci tlaku z rozvodu dusíku do postranního ramene, převedte vrchní vrstvu petroléteru do 1 000 ml dělicí nálevky (4.2.3) Přidejte 100 ml petroléteru (3.2) do skleněného válce, zazátkujte a dobře protřepejte. Nechejte vrstvy oddělit se a převedte vrchní vrstvu do dělicí nálevky jako předtím. Opakujte postup extrakce dalšími 100 ml petroléteru (3.2), potom dvakrát 50 ml dávkami petroléteru (3.2) a přidejte vrstvy petroléteru do dělicí nálevky.

Promyjte kombinované extrakty petroléteru tak, jak je to popsáno v 5.3.1, a pokračujte jak je tam popsáno.

5.4 Příprava roztoku vzorku pro HPLC

Odpipetujte alikvotní část roztoku petroléteru (z 5.3.1 nebo 5.3.2) do 250 ml baňky ve tvaru hrušky (4.2.4). Odpařte rozpouštědlo téměř do sucha na rotační vakuové odparce (4.1) za sníženého tlaku při teplotě vodní lázně nepřekračující 40 °C. Obnovte atmosférický tlak připuštěním dusíku (3.9) a odpojte baňku od rotační vakuové odparky. Odstraňte zbývající rozpouštědlo proudem dusíku (3.9) a ihned rozpusťte zbytek ve známém objemu (10–100 ml) metanolu (3.3) (koncentrace DL- α -tokoferolu by měla být v rozsahu 5 μ g/ml až 30 μ g/ml).

5.5 Stanovení pomocí HPLC

Vitamin E je oddělen na reverzní fázové koloně C_{18} (4.5.1) a koncentrace je měřena pomocí fluorescenčního detektoru (excitace: 295 nm, emise: 330 nm) nebo UV detektoru (292 nm) (4.5.2).

Vstříkněte alikvotní část (např. 20 μ l) metanolového roztoku získaného v 5.4 a vymývejte mobilní fází (3.8). Vypočítejte střední výšky píku (plochy) několika vstříků roztoku stejného vzorku a střední výšky (plochy) několika vstříků kalibračních roztoků (5.6.2).

Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou předkládány jako doporučení; ostatní podmínky smějí být použity za předpokladu, že poskytují shodné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.5.1):	250 mm x 4 mm, C_{18} , velikost částic náplně 5 nebo 10 μ m nebo obdobné
Mobilní fáze (3.8):	Směs metanolu (3.3) a vody, např. 980 + 20 (objemově + objemově)
Úroveň toku:	1–2 ml/min.
Detektor (4.5.2):	Fluorescenční detektor (excitace: 295 nm/emise: 330 nm) nebo UV detektor (292 nm)

5.6 Kalibrace (DL- α -tokoferol acetátu nebo DL- α -tokoferolu)

5.6.1 Standard DL- α -tokoferol acetátu

5.6.1.1 Příprava standardních pracovních roztoků

Převedte pipetou 25 ml zásobního roztoku DL- α -tokoferol acetátu (3.10.1) do 500 ml baňky s plochým dnem nebo Erlenmeyerovy baňky (4.2.1) a hydrolyzujte, jak je to popsáno v 5.2. Následně extrahujte petroléterem (3.2) podle 5.3 a doplňte do 500 ml petroléterem. Odpařte 25 ml tohoto extraktu na rotační vakuové odparce (viz 5.4) téměř do sucha, odstraňte zbývající rozpouštědlo proudem dusíku (3.9) a znovu rozpusťte zbytek v 25,0 ml metanolu (3.3). Nominální koncentrace tohoto roztoku je 45,5 μ g DL- α -tokoferolu na ml, ekvivalent 50 μ g DL- α -tokoferol acetátu na ml. Standardní pracovní roztok musí být čerstvě připraven před použitím.

5.6.1.2 Příprava kalibračního roztoku a kalibrační graf

Převedte 1,0, 2,0, 4,0 a 10,0 ml standardního pracovního roztoku do sérií 20 ml odměrných baněk, doplňte po značku metanolem (3.3) a promíchejte. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,5, 5,0, 10,0 a 25,0 µg/ml DL-α-tokoferol acetátu, tj. 2,28, 4,55, 9,10 a 22,8 µg/ml DL-α-tokoferolu.

Vstříkněte několikrát 20 µl každého kalibračního roztoku a stanovte střední výšky píků (plochy). Za použití středních výšek píků (ploch) narýsujte kalibrační graf.

5.6.1.3 UV standardizace zásobního roztoku DL-α-tokoferol acetátu (3.10.1)

Rozředte 5,0 ml zásobního roztoku DL-α-tokoferol acetátu (3.10.1) na 25,0 ml etanolem a změřte UV spektrum tohoto roztoku proti etanolu (3.1) ve spektrofotometru (4.6) mezi 250 nm a 320 nm.

Absorpční maximum by mělo být při 284 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 43,6 \text{ při } 284 \text{ nm v etanolu}$$

Při tomto ředění by měla být získána extinkce 0,84 až 0,88.

5.6.2 Standard DL-α-tokoferolu

5.6.2.1 Příprava standardního pracovního roztoku

Převedte pipetou 2,0 ml zásobního roztoku DL-α-tokoferolu (3.11.1) do 50 ml odměrné baňky, rozpustě v metanolu (3.3) a doplňte po značku metanolem. Nominální koncentrace tohoto roztoku je 40 µg DL-α-tokoferolu na ml, ekvivalent 44,0 µg DL-α-tokoferol acetátu na ml. Standardní pracovní roztok musí být čerstvě připraven před použitím.

5.6.2.2 Příprava kalibračního roztoku a kalibrační graf

Převedte 1,0, 2,0, 4,0 a 10,0 ml standardního pracovního roztoku do sérií 20 ml odměrných baněk, doplňte po značku metanolem (3.3) a promíchejte. Nominální koncentrace těchto roztoků jsou 2,0, 4,0, 8,0 a 20,0 µg/ml DL-α-tokoferolu, tj. 2,20, 4,40, 8,79 a 22,0 µg/ml DL-α-tokoferol acetátu.

Vstříkněte několikrát 20 µl každého kalibračního roztoku a stanovte střední výšky píků (plochy). Za použití středních výšek píků (ploch) narýsujte kalibrační graf.

5.6.2.3 UV standardizace zásobního roztoku DL-α-tokoferolu (3.11.1)

Rozředte 2,0 ml zásobního roztoku DL-α-tokoferolu (3.11.1) na 25,0 ml etanolem a změřte UV spektrum tohoto roztoku proti etanolu (3.1) ve spektrofotometru (4.6) mezi 250 nm a 320 nm. Absorpční maximum by mělo být při 292 nm:

$$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 75,8 \text{ při } 292 \text{ nm v etanolu}$$

Při tomto ředění by měla být získána extinkce 0,6.

6. Výpočet výsledků

Ze střední výšky (plochy) píku pro roztok vzorku vitamínu E stanovte koncentraci roztoku vzorku v µg/ml (počítáno jako α-tokoferol acetát) ve vztahu ke kalibračnímu grafu (5.6.1.2 nebo 5.6.2.2).

Obsah vitamínu E w v mg/kg ve vzorku je dán následující rovnicí:

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

ve které:

β = koncentrace vitamínu E v roztoku vzorku (5.4) v $\mu\text{g/ml}$

V_1 = objem roztoku vzorku (5.4) v ml

V_2 = objem alikvot odebraných v 5.4 v ml

m = hmota zkušební dávky v g

7. Poznámky

- 7.1 U vzorků s nízkou koncentrací vitamínu E může být užitečné spojit extrakty petroléru dvou saponifikačních vsázek (hmotnostní hodnota: 25 g) do jednoho roztoku vzorku pro stanovení pomocí HPLC.
- 7.2 Množství tuku ve vzorku odebraném pro analýzu nesmí překročit 2g.
- 7.3 Pokud se neobjeví fázové dělení, přidejte přibližně 10 ml etanolu (3.1), k rozrušení emulze.
- 7.4 Po spektrofotometrickém měření roztoku DL- α -tokoferol acetátu nebo DL- α -tokoferolu podle 5.6.1.3 nebo 5.6.2.3 přidejte do roztoku (3.10.1 nebo 3.10.2) přibližně 10 mg BHT (3.12) a skladujte roztok v chladničce (maximální doba skladovatelnosti je čtyři týdny).
- 7.5 Namísto BHT může být použit hydrochinon.
- 7.6 Oddělení α -, β -, γ - a δ tokoferolů je možné s použitím normální fázové kolony.
- 7.7 Namísto askorbanu sodného může být použito přibližně 150 mg kyseliny askorbové.
- 7.8 Namísto roztoku sulfidu sodného může být použito přibližně 50 mg EDTA.

8. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku nesmí překročit 15 % z vyššího výsledku.

9. Výsledky studijní spolupráce ⁽¹⁾

Premix	Premixové krmivo	Minerální koncentrát	Bílkovinný koncentrát	Krmivo pro selata	
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
střed [mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
CV_r [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	3,8
s_R [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	7,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: počet laboratoří

n: počet jednotlivých hodnot

s_r : standardní odchylka opakovatelnosti

s_R : standardní odchylka reprodukovatelnosti

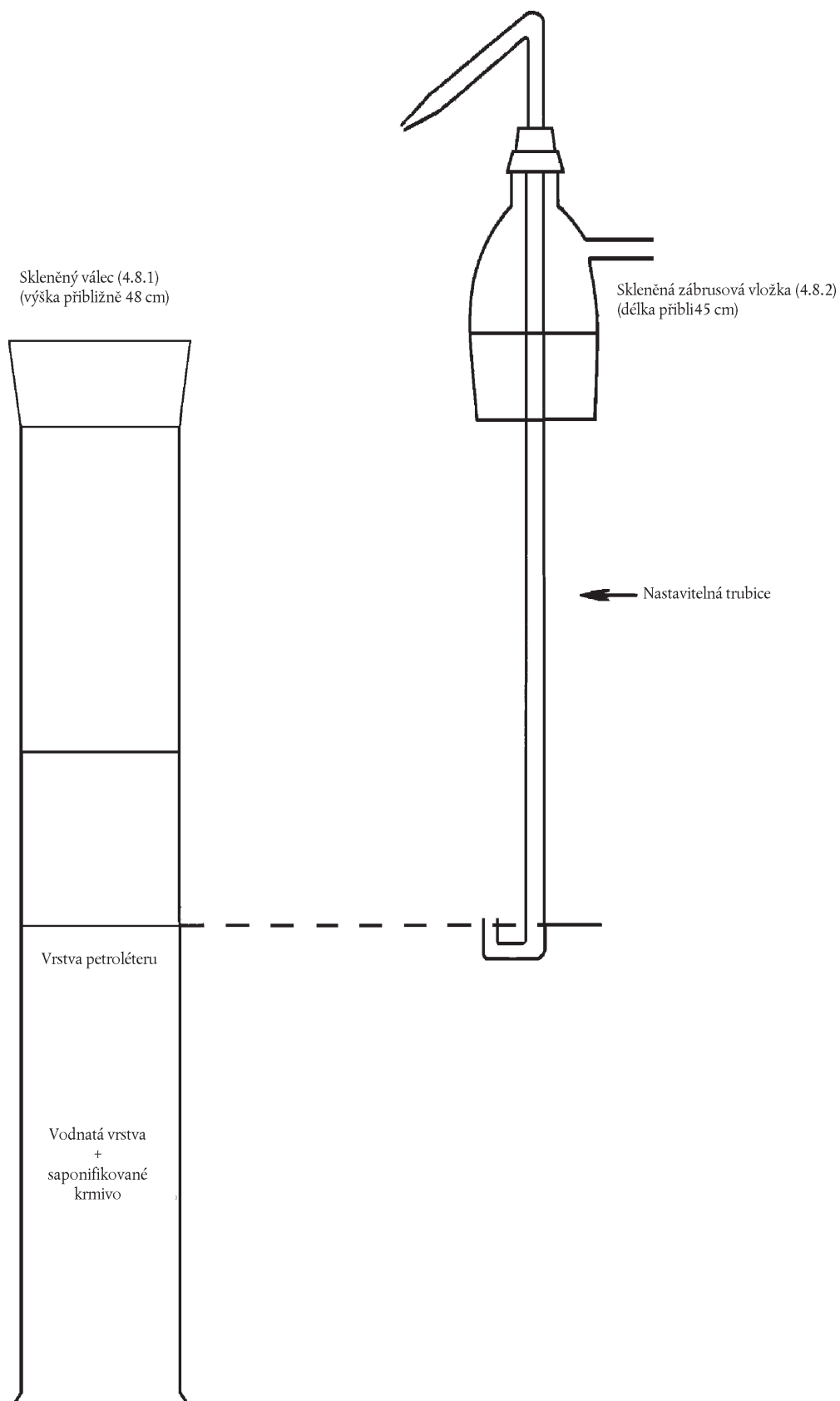
r : opakovatelnost

R : reprodukovatelnost

CV_r : koeficient variace opakovatelnosti

CV_R : koeficient variace reprodukovatelnosti

⁽¹⁾ Řízené pracovní skupinou pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Obrázek 1: Extrakční přístroj (4.8)

ČÁST C

STANOVENÍ TRYPTOFANU

1. Účel a oblast použití

Tato metoda je určena pro stanovení celkového a volného tryptofanu v krmivech. Nerozlišuje mezi D- a L-formami.

2. Princip

Pro stanovení celkového tryptofanu je vzorek hydrolyzován za alkalických podmínek nasyceným roztokem hydroxidu barnatého a zahříván při 110 °C po 20 hodin. Po hydrolyze je přidán vnitřní standard.

Pro stanovení volného tryptofanu je vzorek extrahován za mírně kyselých podmínek v přítomnosti vnitřního standardu.

Tryptofan a vnitřní standard jsou stanoveny v hydrolyzátu nebo extraktu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí.

3. Činidla

3.1 Dvojnásobně destilovaná voda, nebo voda obdobné kvality musí být používána (vodivost < 10 µS/cm)

3.2 Standardní látka: tryptofan (čistota/obsah > 99 %), sušený pod vakuem přes pentoxid fosforu

3.3 Vnitřní standardní látka: α-methyl-tryptofan (čistota/obsah > 99 %), sušený pod vakuem přes pentoxid fosforu

3.4 Octa-hydrát hydroxidu barnatého (musí být dbáno, aby nebyl $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$ nadměrně vystavován na vzduchu, aby se zabránilo tvorbě BaCO_3 , jež může rušit stanovení) (viz poznámky 9.3)

3.5 Hydroxid sodný

3.6 Kyselina orto-fosforečná, w = 85 %

3.7 Kyselina chlorovodíková, $p_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$

3.8 Metanol, HPLC stupeň

3.9 Petroléter, rozsah varu 40–60 °C

3.10 Roztok hydroxidu sodného, c = 1 mol/l:

Rozpusťte 40,0 g NaOH (3.5) ve vodě a doplňte do 1 l vodou (3.1).

3.11 Kyselina chlorovodíková, c = 6 mol/l:

Vezměte 492 ml HCL (3.7) a doplňte do 1 l vodou.

3.12 Kyselina chlorovodíková, c = 1 mol/l:

Vezměte 82 ml HCL (3.7) a doplňte do 1 l vodou.

3.13 Kyselina chlorovodíková, c = 0,1 mol/l:

Vezměte 8,2 ml HCL (3.7) a doplňte do 1 l vodou.

3.14 Kyselina orto-fosforečná, c = 0,5 mol/l:

Vezměte 34 ml kyseliny orto-fosforečné (3.6) a doplňte do 1 l vodou (3.1)

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

Rozpusťte 0,2553 g tryptofanu (3.2) v 500 ml odměrné baňce v kyselině chlorovodíkové (3.13) a doplňte po značku kyselinou chlorovodíkovou (3.13). Skladujte při -18°C po dobu maximálně čtyř týdnů.

3.16 Koncentrovaný vnitřní standardní roztok, $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:

Rozpusťte 0,2728 g α -methyl-tryptofanu (3.3) v 500 ml odměrné baňce v kyselině chlorovodíkové (3.13) a doplňte po značku kyselinou chlorovodíkovou (3.13). Skladujte při -18°C po dobu maximálně čtyř týdnů.

3.17 Kalibrační standardní roztok tryptofanu a vnitřní standard:

Vezměte 2,00 ml koncentrovaného roztoku tryptofanu (3.15), a 2,00 ml koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (α -methyl-tryptofan) (3.16). Zředte vodou (3.1) a metanolem (3.8) na přibližně stejný objem a na přibližně stejnou koncentraci metanolu (10–30 %) jako konečný hydrolyzát.

Tento roztok musí být připravován čerstvý před použitím.

Během přípravy chraňte před přímým slunečním svitem.

3.18 Kyselina octová

3.19 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol

3.20 Ethanolamin > 98 %

3.21 Roztok 1 g 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanolu (3.19) ve 100 ml metanolu (3.8).

3.22 Mobilní fáze pro HPLC: 3,00 g kyseliny octové (3.18) + 900 ml vody (3.1) + 50,0 ml roztoku (3.21) 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanolu (3.19) v metanolu (3.8) (1g/100 ml). Upravte pH na 5 s použitím ethanolaminu (3.20). Doplňte do 1 000 ml vodou (3.1).

4. **Přístroje a pomůcky**

4.1 Vybavení pro HPLC se spektrofotometrickým detektorem

4.2 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 125 mm x 4 mm, C_{18} , velikost částic náplně 3 μm nebo ekvivalent

4.3 pH metr

4.4 Polypropylenová láhev, objem 125 ml, se širokým hrdlem a šroubovacím uzávěrem

4.5 Membránový filtr, 0,45 μm

4.6 Autokláv, 110 (+ 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 (+ 0,1) baru

4.7 Mechanická třepačka nebo magnetické míchadlo

4.8 Vířivý mixer

5. **Postup**

5.1 Příprava vzorku

Vzorek je rozmělněn tak, aby prošel sítím s otvory 0,5 mm. Vzorky, které mají vysokou vlhkost, musí být před rozmělněním usušeny buď vzduchem při teplotě nepřesahující 50°C , nebo zmrazením. Vzorky s vysokým obsahem tuku musí být před mletím extrahovány petroléterem (3.9).

5.2 Stanovení volného tryptofanu (extrakt)

Odvažte s přesností na 1 mg příslušné množství (1–5 g) připraveného vzorku (5.1) do Erlenmeyerovy baňky. Přidejte 100 ml kyseliny chlorovodíkové, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (3.13) a 5,00 ml koncentrovaného vnitřního standardního roztoku (3.16). Třepejte nebo mixujte 60 minut s použitím mechanické třepačky, nebo magnetického míchadla (4.7). Nechejte usadit sediment a pipetujte 10,0 ml roztoku supernatantu do kádinky. Přidejte 5 ml kyseliny orto-fosforečné, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Upravte pH na 3,0 za použití hydroxidu sodného, $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (3.10). Přidejte přiměřeně metanolu (3.8), abyste obdrželi koncentraci mezi 10 a 30 % metanolu v konečném objemu. Převeďte do odměrné baňky o vhodném objemu a zředte vodou na objem nezbytný pro chromatografii (přibližně stejný objem jako kalibrační standardní roztok (3.17)).

Před vstříknutím do kolony HPLC přefiltrujte několik ml roztoku přes membránový filtr 0,45 µm (4.5). Provádějte chromatografii podle 5.4.

Chraňte standardní roztok a extrakty před přímým slunečním světlem. Pokud není možné analyzovat extrakty stejný den, mohou být skladovány při 5 °C po maximální dobu tří dnů.

5.3 Stanovení celkového tryptofanu (hydrolyzát)

Odvažte s přesností na 0,2 mg od 0,1 do 1 g připraveného vzorku (5.1) do polypropylénové láhve (4.4). Odvážená dávka vzorku by měla mít obsah dusíku okolo 10 mg. Přidejte 8,4 g octa-hydrátu hydroxidu barnatého (3.4) a 10 ml vody. Promíchejte na vířivém mixeru (4.8) nebo magnetickém míchadle (4.7). Ponechte teflonem potažený magnet ve směsi. Opláchněte stěny nádoby 4 ml vody. Našroubujte uzávěr a láhev volně uzavřete. Přeneste do autoklávu (4.6) s vroucí vodou a párou na 30–60 minut. Uzavřete autokláv a autoklávujte při 110 (+ 2) °C po dobu 20 hodin.

Před otevřením autoklávu snižte teplotu právě pod 100 °C. Aby nedošlo ke krystalizaci $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$, přidejte do horké směsi 30 ml vody o pokojové teplotě. Mírně protřepávejte, nebo míchejte. Přidejte 2,00 ml koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (α -methyl-tryptofan) (3.16). Zchladte nádobu ve vodní/ledové lázni po dobu 15 minut.

Potom přidejte 5 ml orto-fosforečné kyseliny, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (3.14). Udržujte nádobu ve chladicí lázni a neutralizujte kyselinou chlorovodíkovou, $c = 6 \text{ mol/l}$ (3.11) zatímco mícháte a upravte pH na 3,0 s použitím HCL, $c = 1 \text{ mol/l}$ (3.12). Přidejte přiměřeně metanolu, abyste obdrželi koncentraci mezi 10 a 30 % metanolu v konečném objemu. Převedte do odměrné baňky o vhodném objemu a zřeďte vodou na definovaný objem nezbytný pro chromatografii (například 100 ml). Přídavek metanolu by neměl způsobit sraženinu.

Před vstříknutím do kolony HPLC přefiltrujte několik ml roztoku přes membránový filtr 0,45 µm (4.5). Pokračujte v chromatografii podle odstavce 5.4.

Chraňte standardní roztok a hydrolyzáty před přímým slunečním světlem. Pokud není možné analyzovat hydrolyzáty stejný den, mohou být skladovány při 5 °C po maximální dobu tří dnů.

5.4 Stanovení pomocí HPLC

Následující podmínky pro izokratické vymývání jsou předkládány jako doporučení; ostatní podmínky smějí být použity za předpokladu, že poskytují shodné výsledky (viz také poznámky 9.1 a 9.2):

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.2):	125 mm x 4 mm, C_{18} , velikost částic náplně 3 µm nebo ekvivalent
Teplota kolony	Pokojová teplota
Mobilní fáze (3.22):	3,00 g kyseliny octové (3.18) + 900 ml vody (3.1) + 50,0 ml roztoku (3.21) 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanolu (3.19) v metanolu (3.8) (1 g/100 ml). Upravte pH na 5,00 s použitím ethanolaminu (3.20). Doplňte do 1 000 ml vodou (3.1)
Úroveň toku:	1 ml/min.
Celková doba běhu:	přibližně 34 minut
Detekční vlnová délka:	excitace: 280 nm, emise: 356 nm
Vstřikový objem:	20 µl

6. Výpočet výsledků

$$\frac{A \times B \times C \times D \times E \times \text{MW}}{F \times G \times H \times 10\,000 \times W} = \text{g tryptofanu na 100 g vzorku}$$

- A = plocha píku vnitřního standardu, roztoku kalibračního standardu (3.17)
- B = plocha píku tryptofanu, extraktu (5.2) nebo hydrolyzátu (5.3)
- C = objem roztoku koncentrovaného tryptofanu (3.15) (2 ml) přidaný do kalibračního roztoku (3.17)
- D = koncentrace koncentrovaného roztoku tryptofanu (3.15) v $\mu\text{molech/ml}$ (= 2,50) přidaného do kalibračního roztoku (3.17)
- E = objem koncentrovaného vnitřního standardního roztoku (3.16) v ml přidaného při extrakci (5.2) (= 5,00 ml) nebo do hydrolyzátu (5.3) (= 2,00 ml)
- F = plocha píku vnitřního standardu, extraktu (5.2) nebo hydrolyzátu (5.3)
- G = plocha píku tryptofanu, kalibračního standardního roztoku (3.17)
- H = objem koncentrovaného vnitřního standardního roztoku (3.16) v ml (= 2,00) přidaného do kalibračního standardního roztoku (3.17)
- W = hmotnost vzorku v g (opravená na původní hmotnost, jestliže byl vzorek sušen a/nebo odtučněn)
- MW = molekulová hmotnost tryptofanu (= 204,23)

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku nesmí překročit 10 % z vyššího výsledku.

8. Výsledky studijní spolupráce

Studijní spolupráce Společenství (čtvrté vzájemné porovnání) byla uspořádána tak, že byly tři vzorky analyzovány ve 12 laboratořích k ověření metody pro hydrolyzy. Replikované (5) analýzy byly prováděny u každého vzorku. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Vzorek 1 Krmivo pro prasata	Vzorek 2 Krmivo pro prasata doplněné L-tryptofanem	Vzorek 3 Krmný koncentrát pro prasata	
L	12	12	12
n	50	55	50
střed [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	6,0	2,2

- L: počet laboratoří předkládajících výsledky
- n: počet jednotlivých hodnot zadržených eliminačních odlehlých výsledků (identifikované Cochran-Dixonovým testem)
- s_r : standardní odchylka opakovatelnosti
- s_R : standardní odchylka reprodukovatelnosti
- r: opakovatelnost
- R: reprodukovatelnost
- CV_r : koeficient variace opakovatelnosti, %
- CV_R : koeficient variace reprodukovatelnosti, %

Další studijní spolupráce Společenství (třetí vzájemné porovnání) byla uspořádána tak, že dva vzorky byly analyzovány až ve 13 laboratořích k ověření metody pro extrakci volného tryptofanu. Replikované (5) analýzy byly prováděny u každého vzorku. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Vzorek 4 Směs pšenice se sójou	Vzorek 5 Směs pšenice se sójou (= vzorek 4) s přidaným tryptofanem (0,457 g/kg)	
L	12	12
n	55	60
střed [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: počet laboratoří předkládajících výsledky

n: počet jednotlivých hodnot zadržených eliminačních odlehlých výsledků (identifikované Cochran-Dixonovým testem)

s_r: standardní odchylka opakovatelnosti

s_R: standardní odchylka reprodukovatelnosti

r: opakovatelnost

R: reprodukovatelnost

CV_r: koeficient variace opakovatelnosti, %

CV_R: koeficient variace reprodukovatelnosti, %

Další studijní spolupráce Společenství byla uspořádána tak, že čtyři vzorky byly analyzovány až v sedmi laboratořích s cílem potvrzení tryptofanu pro hydrolyzy. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

Vzorek 1 Směsné krmivo pro prasata (CRM 117)	Vzorek 2 Nízko-tučná rybí moučka (CRM 118)	Vzorek 3 Sójová moučka (CRM 119)	Vzorek 4 Sušené odstředěné mléko (CRM 120)	
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
střed [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: počet laboratoří předkládajících výsledky

n: počet jednotlivých hodnot zadržených eliminačních odlehlých výsledků (identifikované Cochran-Dixonovým testem)

s_r: standardní odchylka opakovatelnosti

s_R: standardní odchylka reprodukovatelnosti

r: opakovatelnost

R: reprodukovatelnost

CV_r: koeficient variace opakovatelnosti, %

CV_R: koeficient variace reprodukovatelnosti, %

9. Poznámky

- 9.1 Následující speciální chromatografické podmínky mohou poskytnout lepší rozdělení mezi tryptofanem a α -methyl-tryptofanem.

Izokratické vymývání následované gradientovým čištěním kolony:

Kolona pro kapalinovou chromatografii: 125 mm x 4 mm, C₁₈, velikost částic náplně 5 μ m nebo obdobné

Teplota kolony: 32 °C

Mobilní fáze: A: 0,01 mol/l KH₂PO₄/metanol, 95 + 5 (objemově + objemově)
B: Metanol

Gradientový program:	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

Úroveň toku: 1,2 ml/min.

Celková doba běhu: přibližně 33 minut

- 9.2 Chromatografie se bude různit podle typu HPLC kolony a použitého plnicího materiálu. Vybraný systém musí být schopen poskytnout separační startovní čáru mezi tryptofanem a vnitřním standardem. Navíc je důležité, aby byly degradační produkty dobře odděleny od tryptofanu a vnitřního standardu. Hydrolyzáty bez vnitřního standardu by měly být chromatografovány, aby se překontrolovala startovní čára za vnitřního standardu pro nečistoty. Je důležité, aby doba běhu byla dostatečně dlouhá pro vymytí všech degradačních produktů, jinak mohou píky pozdního vymývání ovlivňovat následný průběh chromatografie.

V rozsahu činnosti, by měl chromatografický systém dát lineární odezvu. Lineární odezva by měla být měřena s konstantní (normální) koncentrací vnitřního standardu a měnicími se koncentracemi tryptofanu. Je důležité, aby velikosti pík tryptofanu a vnitřního standardu byly v lineárním rozsahu HPLC/flourescenčního systému. Pokud pík (píky) buď tryptofanu, a/nebo vnitřního standardu je (jsou) příliš malý (malé) nebo příliš vysoký (vysoké), měly by být analýzy opakovány se vzorkem jiné velikosti a/nebo změněným konečným objemem.

- 9.3 Hydroxid barnatý

Stářím se stává hydroxid barnatý hůře rozpustný. To se projevuje v nečirém roztoku pro stanovení pomocí HPLC, což může u tryptofanu způsobovat nižší výsledky.
