

Tento dokument je třeba brát jako dokumentační nástroj a instituce nenesou jakoukoli odpovědnost za jeho obsah

► **B**

OSMÁ SMĚRNICE KOMISE

ze dne 15. června 1978,

kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(78/633/EHS)

(Úř. věst. L 206 , 29.7.1978, s. 43)

Ve znění:

	Úřední věstník		
	Č.	Strana	Datum
► M1 Směrnice Komise ze dne 30. července 1981,	L 246	32	29.8.1981
► M2 Směrnice Komise ze dne 20. prosince 1983,	L 15	28	18.1.1984

▼**B****OSMÁ SMĚRNICE KOMISE**

ze dne 15. června 1978,

kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(78/633/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

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,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

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.

▼**M1**▼**B***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 členskými státy.

⁽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.

▼ **B**

PŘÍLOHA

▼ **M2**

1. STANOVENÍ ZINKBACITRACINU

— difúzí na agaru —

1. ÚČEL A OBLAST POUŽITÍ

Metoda je určena pro stanovení obsahu zinkbacitracinu v krmivech a premixech. Dolní mez stanovitelnosti obsahu je 2 mg/kg (2 ppm) ⁽¹⁾.

2. PRINCIP

Vzorek se extrahuje při pH 2 se směsí methanolu/vody/kyseliny chlorovodíkové a roztokem síranu sodného. Přidání síranu sodného má urychlit rozpuštění solí mědi, které mohou být při stanovení obsahu překážkou. Extrakt upravený na pH 6,5 se koncentruje (je-li to nezbytné) a rozředí. Jeho antibiotická aktivity se stanovuje měřením difúze zinkbacitracinu na agaru, na nějž byl naočkován *Micrococcus luteus*. Difúze se projevuje vytvořením inhibičních zón mikroorganismu. Průměr těchto zón je považován za přímo úměrný logaritmu koncentrace antibiotik pro stupnici použitých koncentrací.

3. MIKROORGANISMUS: MICROCOCCUS LUTEUS (FLAVUS) 10240

3.1 Uchovávání kultury

Kultivační médium (4.1) v šikmých zkumavkách se naočkuje mikroorganismem *Micrococcus luteus* (flavus) a 24 hodin se nechá inkubovat při teplotě 30 °C. Kultura se skladuje v chladničce při teplotě okolo 4 °C. Očkování se obnovuje každé dva týdny.

3.2 Příprava bakteriální suspenze ⁽²⁾

Čerstvá kultura na agaru (3.1) v šikmé zkumavce se sklídí za pomoci 2 až 3 ml roztoku chloridu sodného (4.3). Touto suspenzí se naočkuje 250 ml kultivačního média (4.1) umístěného do Rouxovy baňky a nechá se inkubovat po dobu 18 až 20 hodin při teplotě 30 °C. Porost se sklídí pomocí 25 ml roztoku chloridu sodného (4.3) a zamíchá se. Suspenze se rozředí v poměru 1/10 roztokem chloridu sodného (4.3). Průchod světla suspenze musí být okolo 75 %, měřeno při 650 nm a tloušťce 1 cm ve srovnání s roztokem chloridu sodného (4.3). Tato suspenze může být uchována po dobu jednoho týdne při teplotě okolo 4 °C.

4. KULTIVAČNÍ MÉDIA A ČINIDLA

4.1 Kultivační médium ⁽³⁾

Masový pepton	6,0 g
Trypton	4,0 g
Kvasnicový extrakt	3,0 g
Masový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Voda	1 000 ml

pH 6,5 až 6,6 (po sterilizaci).

4.2 Zkušební médium ⁽³⁾

Trypton	10,0 g
Kvasnicový extrakt	3,0 g

⁽¹⁾ 1 mg zinkbacitracinu se rovná 42 mezinárodních jednotek (i.u.).

⁽²⁾ Ostatní metody mohou být použity pod podmínkou, že bylo zjištěno, že vytvářejí podobné bakteriální suspenze.

⁽³⁾ Může být použito jakékoliv komerční kultivační médium podobného složení a poskytující stejné výsledky.

▼ **M2**

Masový extrakt	1,5 g
Glukóza	1,0 g
Agar	10,0 až 20,0 g
Tween 80	1 ml
Voda	1 000 ml
pH 6,5 (po sterilizaci).	

- 4.3 Roztok chloridu sodného 0,8 % (hmot./obj.): 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a rozředí se na 1 000 ml; sterilizuje se.
- 4.4 Směs methanolu, vody a kyseliny chlorovodíkové (4.6):
80/17,5/2,5 (obj./obj./obj.).
- 4.5 **Fosfátový tlumivý roztok, pH 6,5:**
- | | |
|--|----------|
| Hydrofosforečnan draselný, K_2HPO_4 | 22,15 g |
| Dihydrogenfosforečnan draselný, KH_2PO_4 | 27,85 g |
| Voda až do | 1 000 ml |
- 4.6 Kyselina chlorovodíková (d: 1,18 až 1,19).
- 4.7 Kyselina chlorovodíková (0,1 M).
- 4.8 1M roztok hydroxidu sodného.
- 4.9 0,5 M roztok síranu sodného.
- 4.10 Roztok bromokrezolového nachu 0,04 % (hmot./obj.): rozpustí se 0,1 g bromokrezolového nachu v 18,5 ml roztoku hydroxidu sodného 0,01 M. Objem se dorovná vodou na 250 ml a zamíchá se se.
- 4.11 Standardní substance: zinkbacitracin známé aktivity (v i.u.).

5. **STANDARDNÍ ROZTOKY**

Odváží se přesné množství standardního zinkbacitracinu (4.11) odpovídající 1 050 i.u. (podle uvedené aktivity). Přidá se 5 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové (4.7) a po dobu 15 minut se nechá usazovat. Přidá se 30 ml vody, pH se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) (přibližně 4 ml) upraví na 4,5 a objem se vodou dorovná na 50 ml a dobře zamíchá (1 ml = 21 i.u.).

Z tohoto zásobního roztoku se postupným ředěním fosfátovým tlumivým roztokem (4.5) připraví následující roztoky:

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. **PŘÍPRAVA EXTRAKTU A EXTRAHOVANÝCH ROZTOKŮ**6.1 **Extrakce**

6.1.1 Premixy a minerální krmiva

Odváží se 2,0 až 5,0 g vzorku se, přidá se 29,0 ml směsi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a krátce se protřepává. Zkontroluje se, zda je pH přibližně 2. 10 minut se protřepává, přidá se 30 ml sulfátového tlumivého roztoku (4.5), po dobu 15 minut se protřepává a odstředí se. Odebere se vhodná alikvotní část roztoku z povrchu a pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného (4.8) s pH metrem nebo roztokem bromokrezolového nachu (4.10) se pH upraví na 6,5, přičemž se jako indikátor používá pH metr nebo roztok bromokrezolového nachu (4.10). Rozředí se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= u_8).

▼ **M2**

6.1.2 Proteinové koncentráty

Odváží se 10,0 g vzorku se, přidá se 49,0 ml směsi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a krátce se protřepává. Zkontroluje se, zda je pH přibližně 2. 10 minut se protřepává, přidá se 30 ml sulfátového tlumivého roztoku (4.5), po dobu 15 minut se protřepává a odstředí se. Odebere se vhodná alikvotní část roztoku z povrchu a pomocí 1 M roztoku hydroxidu (4.8) se pH upraví na 6,5, přičemž se jako indikátor používá pH metr nebo roztok bromokrezolového nachu (4.10). Přibližně polovina objemu se odpařuje v rotační odparce při teplotě nepřesahující 35 °C.

Rozředí se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.1.3 Ostatní krmiva

Odváží se 10,0 g vzorku (20,0 g pro předpokládaný obsah zinkbacitracinu 5 mg/kg). Přidá se 24,0 ml směsi (4.4) a 1,0 ml roztoku síranu sodného (4.9) a po dobu 10 minut se homogenizuje. Přidá se 25 ml sulfátového tlumivého roztoku (4.5), po dobu 15 minut se protřepává a odstředí se. 20 ml roztoku se odebere z povrchu a pomocí 1 M roztoku hydroxidu sodného (4.8) se pH upraví na 6,5, přičemž se jako indikátor používá pH metr nebo roztok bromokrezolového nachu (4.10). Odpařuje se na přibližně 4 ml v rotační odparce při teplotě nepřesahující 35 °C. Rozředí se tlumivým fosfátovým roztokem (4.5) tak, aby se získal předpokládaný obsah zinkbacitracinu 0,42 i.u./ml (= u_8).

6.2 Zkušební roztoky

Z roztoku u_8 se připraví roztoky u_4 (předpokládaný obsah: 0,21 i.u./ml), u_2 (předpokládaný obsah: 0,105 i.u./ml) a u_1 (předpokládaný obsah: 0,0525 i.u./ml) prostřednictvím postupného rozředování (1 + 1) tlumivým fosfátovým roztokem (4.5).

7. POSTUP PŘI STANOVOVÁNÍ OBSAHU

7.1 Naočkování zkušebního média

Zkušební médium (4.2) se naočkuje bakteriální suspenzí (3.2) při teplotě přibližně 50 °C. Předběžnými testy na miskách se zkušebním médiem (4.2) se stanoví množství bakteriální substance umožňující získat nejrozsáhlejší a nejjasnější inhibiční zóny pro různé koncentrace zinkbacitracinu.

7.2 Příprava misek

Difúze na agaru se provádí na miskách se čtyřmi koncentracemi standardního roztoku (s_8 , s_4 , s_2 a s_1) a čtyřmi koncentracemi zkušebního roztoku (u_8 , u_4 , u_2 a u_1). Na každé misce musí být nezbytně umístěny čtyři koncentrace standardu a čtyři koncentrace extraktu. Za tímto účelem se zvolí takový rozměr misek, který umožňuje vytvořit v prostředí agaru alespoň osm otvorů o průměru 10 až 13 mm, jejichž středy jsou od sebe vzdáleny alespoň 30 mm. Test by měl být prováděn především na miskách, které jsou vyrobeny ze skleněné desky, na kterou se umístí hliníkové nebo plastové kroužky o výšce 20 mm a průměru 200 mm.

Na misky se nalije médium (4.2) naočkované podle bodu 7.1. v takovém množství, které umožňuje získat přibližně 2 mm tlustou vrstvu (60 ml na misku o průměru 200 mm). Nechá se ztuhnout, vytvoří se otvory a do nich se umístí přesně naměřené objemy zkušebních a standardních roztoků (mezi 0,10 a 0,15 ml na otvor v závislosti na průměru). Každá koncentrace se použije alespoň čtyřikrát tak, aby se při každém stanovení obsahu hodnotilo 32 inhibičních zón.

7.3 Inkubace

Misky se nechají inkubovat po dobu 16 až 18 hodin při teplotě 30 ± 2 °C.

▼ M2

8. HODNOCENÍ

Průměr inhibičních zón se změří s přesností na 0,1 mm. Průměrné rozměry pro každou koncentraci se zaznamenají na semilogaritmický graf znázorňující logaritmus koncentrací v závislosti na průměrech inhibičních zón. Nejlépe vyhovující přímky standardního a extrahovaného roztoku se zaznamenají např. následovně:

„Nejlépe vyhovující bod“ pro nejnižší úroveň standardního vzorku (SL) se stanoví za použití vzorce:

$$(a) \text{ SL} = \frac{7s_1 + 4s_2 + s_4 - 2s_8}{10}$$

„Nejlépe vyhovující bod“ pro nejvyšší úroveň standardního vzorku (SH) se stanoví za použití vzorce:

$$(b) \text{ SH} = \frac{7s_8 + 4s_4 + s_2 - 2s_1}{10}$$

Nahrazením u_1 , u_2 , u_4 a u_8 za s_1 , s_2 , s_4 a s_8 ve výše uvedených vzorcích se podobným způsobem vypočítají „nejlépe vyhovující body“ pro nejnižší úroveň extraktu (UL) a nejvyšší úroveň extraktu (UH).

Vypočítané hodnoty SL a SH se zaznamenají na stejný grafický papír a jejich spojením se získá „nejlépe vyhovující“ přímka standardního roztoku. Podobně se zaznamenají i hodnoty UL a UH a jejich spojením se získá „nejlépe vyhovující“ přímka extraktu.

Nejsou-li přímky ničím ovlivněny, měly by být rovnoběžné. Z praktických důvodů se přímky považují za rovnoběžné, pokud se hodnoty (SH-SL) a (UH-UL) neliší o více než o 10 % od své průměrné hodnoty.

Jestliže přímky nejsou rovnoběžné, je možné eliminovat buď u_1 a s_1 nebo u_8 a s_8 a hodnoty SL, SH, UL a UH se poté vypočítají za pomoci následujících vzorců:

$$(a') \text{ SL} = \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6} \quad \text{nebo} \quad \frac{5s_1 + 2s_2 - s_4}{6}$$

$$(b') \text{ SH} = \frac{5s_4 + 2s_2 - s_1}{6} \quad \text{nebo} \quad \frac{5s_8 + 2s_4 - s_2}{6}$$

a podobně pro hodnoty UL a UH. Při použití této alternativy by měla být dodržena stejná kritéria pro rovnoběžnost. Skutečnost, že byl výsledek vypočítán ze tří mezí, se poznamená v závěrečné zprávě.

Pokud jsou přímky považovány za rovnoběžné, vypočítá se logaritmus relativní aktivity ($\log A$) pomocí jednoho z následujících vzorců podle toho, zda byly pro hodnocení rovnoběžnosti použity tři nebo čtyři úrovně.

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

$$(d) \log A = \frac{(u_1 + u_2 + u_4 - s_1 - s_2 - s_4) \times 0,401}{u_4 + s_4 - u_1 - s_1}$$

▼ **M2**

nebo

$$(d') \log A = \frac{(u_2 + u_4 + u_8 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,401}{u_8 + s_8 - u_2 - s_2}$$

Aktivita extraktu vzorku = aktivita odpovídajícího standardu x A

$$(u_8 = s_8 \times A)$$

Jestliže se relativní aktivita nachází mimo rozmezí od 0,5 do 2,0, zkouška se zopakuje, přičemž se odpovídajícím způsobem upraví koncentrace extraktu nebo, jestliže to není nutné, standardních roztoků. Jestliže není možné dostat relativní aktivitu do požadovaného rozmezí, je třeba považovat výsledek za přibližný a tato skutečnost by měla být uvedena v závěrečné zprávě.

Pokud přímky nejsou považovány za rovnoběžné, stanovení se opakuje. Není-li dosaženo rovnoběžnosti, považuje se stanovení za nevyhovující.

Výsledek se vyjádří v miligramech zinkbacitracinu na kilogram krmiva.

9. **OPAKOVATELNOST**

Rozdíl výsledků mezi dvěma paralelními stanovení prováděnými na stejném vzorku stejným laborantem nesmí být vyšší než:

- 2 mg/kg, v absolutní hodnotě, u obsahů zinkbacitracinu nižších než 10 mg/kg,
- 20 % nejvyššího výsledku pro obsahy od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, v absolutní hodnotě, u obsahů zinkbacitracinu od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % nejvyššího výsledku pro obsahy nad 50 mg/kg.

▼ **B**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**

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

▼ **B****3.2. Příprava bakteriální suspenze ^(a)**

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 naočkejte 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 transmitance suspenze musí být okolo 40 %, měřeno při 578 nm v 1 cm kyvetě proti roztoku chloridu sodného (4.3).

4. KULTIVAČNÍ MÉDIA A CHEMIKÁLIE**4.1. Kultivační médium ^(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 (po sterilizaci)	

4.2. Zkušební médium**4.2.1. Základní vrstva ^(c)**

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 přídavkem 2,0 g silikonové protipěnicí emulze ^(d).

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

4.4. Methanol, čistý.

4.5. Methanol 50 % (objemových): zřed'ete 500 ml methanolu (4.4) 500 ml vody.

4.6. Methanol 80 % (objemových): zřed'ete 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): rozpust'ete 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.

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

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

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

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

▼B

- 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 zřeďte, 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.

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. **Přečištění (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.

▼B

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, zřed'te 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 methanolvým 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 (= U₈).

7.3. Zkušební roztoky

Kde je to nutné (tj. když bylo pomínuto předčištění), zřed'te extrakt získaný v bodě 7.1.1 50 % methanolem (4.5), abyste obdrželi očekávaný obsah flavofosfolipolu 0,2 µg/ml (= U₈).

Z roztoku U₈ připravte roztok U₄ (očekávaný obsah: 0,1 µg/ml), U₂ (očekávaný obsah: 0,05 µg/ml) a U₁ (očekávaný obsah: 0,025 µg/ml) s použitím postupného ředění (1 + 1) 50 % methanolem (4.5).

8. ZKUŠEBNÍ POSTUP**8.1. Očkování zkušebního média**

Očkejte 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 (S₈, S₄, S₂, S₁) a čtyřech koncentrací zkušebního roztoku (U₈, U₄, U₂, U₁). 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.

▼B

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 pomínuto 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 s 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.

▼B

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 popsanych 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)).

▼B

- 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 pásku 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.

▼B

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 nechte vychladnout (viz poznámka d)).

Vymyjte kelímek celkem asi 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a přidejte kyselinu pomalu a opatrně do kádinky (může proběhnout prudká reakce díky tvorbě CO₂). Přidejte po kapkách kyselinu chlorovodíkovou (3.1) za míchání, dokud neustane šumění. Opařte 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. Uveďte 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 žihejte znovu při 450 až 475 °C. Toto žihání, 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), opařte 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 žihán, 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.

(*) Zelené picniny (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. Proveďte 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. Nechte vychladnout, přidejte několik kapek vody a následně 10 až 15 ml kyseliny fluorovodíkové (3.4) a opařte do sucha při asi 150 °C. Pokud zůstane nějaký křemičitý zbytek, rozpusťte jej znovu v několika mililitrech kyseliny fluorovodíkové (3.4) a opařte 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.

▼B

- c) Žihání 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 příkladně 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.

▼B

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 pomínut 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 okysličujícího 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 pomínuto.

6. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

S použitím kalibrační křivky vypočtete 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,

▼B

- 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

$$\frac{\text{Ca} + \text{Mg}}{\text{P}}$$

· 2, může být přídavek roztoku chloridu lanthanitého (3.11) do roztoku pro analýzy a do kalibračních roztoků pominuto.