

32000L0045

L 174/32

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

13.7.2000

DYREKTYWA KOMISJI 2000/45/WE**z dnia 6 lipca 2000 r.****ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów oznaczania witaminy A, witaminy E i tryptofanu w paszach****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Wspólnotę Europejską,

uwzględniając dyrektywę Rady 70/373/EWG z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz ⁽¹⁾, ostatnio zmienioną Aktem Przystąpienia Austrii, Finlandii i Szwecji ⁽²⁾, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) Dyrektywa 70/373/EWG stawia wymóg, aby urzędowe kontrole pasz w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami wynikającymi z przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych regulujących ich jakość i skład były przeprowadzane przy użyciu wspólnotowych metod pobierania próbek i analiz.
- (2) Dyrektywa Rady 70/524/EWG z dnia 23 listopada 1970 r. dotycząca dodatków paszowych ⁽³⁾, ostatnio zmieniona rozporządzeniem Komisji (WE) nr 2439/1999 z dnia 17 listopada 1999 r. ⁽⁴⁾ stanowi, że zawartość witaminy A i witaminy E musi być podana na etykiecie, w przypadkach gdy te substancje są dodawane do przedmieszek i pasz.
- (3) Dyrektywa Rady 79/373/EWG z dnia 2 kwietnia 1979 r. w sprawie wprowadzenia do obrotu mieszanek paszowych ⁽⁵⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą Komisji 2000/16/WE ⁽⁶⁾ i dyrektywą Rady 93/74/EWG z dnia 13 września 1993 r. w sprawie pasz przeznaczonych do szczególnych potrzeb żywieniowych ⁽⁷⁾, ostatnio zmieniona dyrektywą 96/25/WE ⁽⁸⁾, stanowią, że kwasy aminowe muszą być podawane na etykietach pasz.
- (4) Należy ustanowić wspólnotowe metody analiz w celu kontroli tych substancji.
- (5) Środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie zapewniają, aby analizy do celów urzędowej kontroli pasz i przedmieszek pod kątem zawartości witaminy A, witaminy E oraz tryptofanu były przeprowadzane zgodnie z metodami określonymi w załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie wprowadzają w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy przed dniem 31 sierpnia 2000 r. i niezwłocznie powiadomią o tym Komisję.

Państwa Członkowskie zastosują wspomniane środki od dnia 1 września 2000 r.

Przepisy przyjęte przez Państwa Członkowskie zawierają odniesienie do niniejszej dyrektywy lub odniesienie takie towarzyszy ich urzędowej publikacji. Metody dokonywania takiego odniesienia określane są przez Państwa Członkowskie.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa wchodzi w życie dwudziestego dnia po jej opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Wspólnot Europejskich*.

Artykuł 4

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 6 lipca 2000 r.

W imieniu Komisji

David BYRNE

Członek Komisji

⁽¹⁾ Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.

⁽²⁾ Dz.U. C 241 z 29.8.1994, str. 1.

⁽³⁾ Dz.U. L 270 z 14.12.1970, str. 1.

⁽⁴⁾ Dz.U. L 297 z 18.11.1999, str. 8.

⁽⁵⁾ Dz.U. L 86 z 6.4.1979, str. 30.

⁽⁶⁾ Dz.U. L 105 z 3.5.2000, str. 36.

⁽⁷⁾ Dz.U. L 237 z 22.9.1993, str. 23.

⁽⁸⁾ Dz.U. L 125 z 23.5.1996, str. 35.

ZAŁĄCZNIK

CZĘŚĆ A

OZNACZANIE WITAMINY A

1. Cel i zakres

Metoda ta służy do oznaczenia witaminy A (retinol) w paszach i przedmieszkach. Metoda ta pozwala na oznaczenie witaminy A występującej jako *trans*-retinyl w formie alkoholowej i jego izomerów *cis*. Zawartość witaminy A jest wyrażana w jednostkach międzynarodowych (IU) na kg. Jedna IU odpowiada aktywności 0,300 µg wszystkich izomerów *trans*-witaminy A w formie alkoholowej lub 0,344 µg wszystkich form *trans*-octanu witaminy A lub 0,550 µg wszystkich form *trans*-palmitynianu witaminy A.

Granica oznaczalności metody wynosi 2000 IU witaminy A/kg.

2. Zasada

Próbka jest hydrolizowana w etanolowym roztworze wodorotlenku potasu i witamina A jest ekstrahowana eterem naftowym. Rozpuszczalnik jest usuwany przez odparowanie, a pozostałość rozpuszczana w metanolu i, w razie potrzeby, rozcieńczana do wymaganego stężenia. Zawartość witaminy A jest oznaczana metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z fazą odwróconą (RP-HPLC) przy wykorzystaniu detektora UV lub fluorescencyjnego. Parametry chromatograficzne zostały tak dobrane, że nie zachodził rozdział między *trans*-witaminą A w formie alkoholowej i jej izomerami *cis*.

3. Odczynniki

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Eter naftowy, zakres wrzenia 40–60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, $\beta = 50 \text{ g/100 ml}$
- 3.5. Roztwór askorbinianu sodu, $\beta = 10 \text{ g/100 ml}$ (patrz objaśnienia ppkt 7.7)
- 3.6. Siarczek sodu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
- 3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ w glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (dla $x = 9$) (patrz objaśnienia ppkt 7.8)
- 3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $\beta = 2 \text{ g/100 ml}$ w etanolu (ppkt 3.1)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (ppkt 3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v). Dokładny współczynnik zostanie określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.
- 3.10. Azot, wolny od tlenu
- 3.11. Octan all-*trans*-witaminy A, o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności, np. $2,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$
- 3.11.1. Roztwór wzorcowy octanu all-*trans*-witaminy A: zważyć z dokładnością do 0,1 mg 50 mg octanu witaminy A (ppkt 3.11) do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (ppkt 3.8) i dopełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1400 IU witaminy A w 1 ml. Dokładną zawartość należy oznaczyć według ppkt 5.6.3.1
- 3.12. Bardzo czysty palmitynian all-*trans*-witaminy A o atestowanej aktywności, np. $1,80 \times 10^6 \text{ IU/g}$
- 3.12.1. Roztwór wzorcowy palmitynianu all-*trans*-witaminy A: zważyć z dokładnością do 0,1 mg, 80 mg palmitynianu witaminy A (ppkt 3.12) do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w 2-propanolu (ppkt 3.8) i dopełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 1 400 IU witaminy A na ml. Dokładną zawartość należy oznaczyć według ppkt 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-di-tetra-butylo-4-metylofenol (BHT) (patrz objaśnienia ppkt 7.5)

4. Aparatura

- 4.1. Odparowywacz próżniowy
- 4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe

- 4.2.1. Kolby płaskodenne lub stożkowe, 500 ml, ze szlifem
- 4.2.2. Kolby pomiarowe ze szklanymi korkami, z wąską szyjką, 10, 25, 100 i 500 ml
- 4.2.3. Rozdzielacze stożkowe, 1 000 ml, ze szklanymi korkami
- 4.2.4. Kolby gruszkowe, 250 ml, ze szlifowanym kielichem
- 4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa, długość płaszcza 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu
- 4.4. Karbowany sączeł bibułowy do rozdzielania faz, średnica 185 mm (np. Schleicher & Schuell 597 HY2/2)
- 4.5. Wyposażenie HPLC z systemem dozowania
- 4.5.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 250 mm x 4 mm, C₁₈, wypełnianie 5 lub 10 µm lub podobne (kryterium poprawności: pojedynczy pik dla wszystkich izomerów retinolu w warunkach HPLC)
- 4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z możliwością zmiany długości fali
- 4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami 10 mm
- 4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym
- 4.8. Zestaw do ekstrakcji (patrz rysunek 1) zawierający:
 - 4.8.1. Cylinder szklany o pojemności 1 l, ze szlifem i korkiem
 - 4.8.2. Nasadkę szklaną ze szlifem z bocznikiem i ruchomą nastawną rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Nastawna rurka powinna mieć zakończenie w kształcie litery U i przeciwny otwór skierowany ku górze tak, aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza stożkowego.

5. Sposób postępowania

Uwaga: Witamina A jest wrażliwa na światło (UV) i utlenianie. Wszystkie czynności powinny być przeprowadzane w ciemności (z zastosowaniem szkła oranżowego lub szkła zabezpieczonego folią aluminiową) i bez tlenu (płukanie strumieniem azotu). Podczas ekstrakcji powietrze nad cieczą powinno być zastępowane azotem (unikając zbyt wysokiego ciśnienia, zwalniając korek od czasu do czasu).

5.1. Przygotowanie próbek

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez sito o otworach 1 mm, zważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielano ciepła. Rozdrabnianie musi być przeprowadzone tuż przed ważeniem i zmydleniem, gdyż w przeciwnym razie mogą wystąpić straty witaminy A.

5.2. Zmydlenie

W zależności od zawartości witaminy A zważyć, z dokładnością do 0,01 g, 2–25 g próbki do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (ppkt 4.2.1). Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu (ppkt 3.1), około 100 mg BHT (ppkt 13), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (ppkt 3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (ppkt 3.6). Złożyć chłodnicę (ppkt 4.3) na kolbę i umieścić kolbę na łaźni wodnej z mieszadłem magnetycznym (ppkt 4.7). Ogrzać do wrzenia i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (ppkt 3.4) przez chłodnicę (ppkt 4.3) i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez następne 25 minut, mieszając pod powolnym przepływem azotu. Następnie spuścić chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

5.3. Ekstrakcja

Przenieść, dekantując, zmydlony roztwór, ilościowo spłukując 250 ml wody, do rozdzielacza 1000 ml (ppkt 4.2.3) lub do aparatu do ekstrakcji (ppkt 4.8). Spłukać kolbę po zmydleniu kolejno 25 ml etanolu (ppkt 3.1) i 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) i przenieść popłuczyny do rozdzielacza lub do aparatu do ekstrakcji. Proporcja wody i etanolu w łączonych roztworach powinna wynosić około 2:1. Wstrząsać energicznie przez dwie minuty i pozostawić na dwie minuty.

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza stożkowego (ppkt 4.2.3)

Po rozdzieleniu warstw (patrz objaśnienia ppkt 7.3) przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza (ppkt 4.2.3). Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) i ponownie 50 ml eteru naftowego (ppkt 3.2).

Przemyć dwukrotnie połączone ekstrakty w rozdzielaczu stożkowym ostrożnie mieszając (aby zapobiec powstawaniu emulsji), 100-mililitrowymi porcjami wody, a następnie powtórzyć przemywanie kolejnymi 100-mililitrowymi porcjami wody, aż woda pozostanie bezbarwna po dodaniu roztworu fenoloftaleiny (ppkt 3.7) (wystarczy zwykle czterokrotne przemycie). W celu usunięcia suspensji wodnej przesączyć przemyty ekstrakt przez suchy karbowany sączeł do rozdzielania faz (ppkt 4.4) do kolby pomiarowej o pojemności 500 ml (ppkt 4.2.2). Spłukać rozdzielacz i sączeł przy użyciu 50 ml eteru naftowego (ppkt 3.2), dopełnić do kreski eterem naftowym (ppkt 3.2) i dobrze wymieszać.

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu do ekstrakcji (ppkt 4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielne (patrz objaśnienia ppkt 7.3) zastąpić korek szklanego cylindra (ppkt 4.8.1) nasadką szklaną ze szlifem (ppkt 4.8.2) i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U tak, aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez zwiększanie ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza o pojemności 1000 ml (ppkt 4.2.3). Dodać 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) do szklanego cylindra, zamknąć i dobrze wymieszać. Pozostawić do rozdzielenia się warstw i przenieść górną warstwę do rozdzielacza jak poprzednio. Powtórzyć procedurę ekstrakcyjną stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2), a następnie dwukrotnie porcję 50 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) i dolać warstwę eteru naftowego do rozdzielacza.

Przemycić połączone ekstrakty eteru naftowego jak opisano w ppkt 5.3.1 i postępować, jak tam podano.

5.4. Przygotowanie roztworu próbki do HPLC

Pobrać pipetą podwielokrotną porcję roztworu eteru naftowego (z ppkt 5.3.1 lub 5.3.2) do kolby gruszkowej o pojemności 250 ml (ppkt 4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na odparowywaczu próżniowym (ppkt 4.1) przy obniżonym ciśnieniu na łaźni wodnej w temperaturze nieprzekraczającej 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (ppkt 3.10) i zdjąć kolbę z odparowywacza. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (ppkt 3.10) i szybko rozpuścić pozostałość w znanej objętości metanolu (10–100 ml) (ppkt 3.3) (stężenie witaminy A powinno wynosić 5–30 IU/ml).

5.5. Oznaczanie za pomocą HPLC

Witamina A jest rozdzielana na kolumnie z fazą odwróconą C_{18} (ppkt 4.5.1), a stężenie jest mierzone przy użyciu detektora UV (325 nm) lub detektora fluorescencyjnego (wzbudzenie: 325 nm; emisja 475 nm) (ppkt 4.5.2).

Wstrzyknąć podwielokrotną porcję (np. 20 µl) roztworu metanolowego otrzymanego według ppkt 5.4 i eluować fazą ruchomą (ppkt 3.9). Obliczyć średnią wysokość pików (powierzchnię) kilku wstrzyknięć tego samego roztworu próbki i średnie wysokości pików (powierzchnie) z kilku wstrzyknięć roztworów kalibracyjnych (ppkt 5.6.2).

Warunki HPLC

Poniższe warunki podano jako przykładowe; inne warunki mogą być zastosowane pod warunkiem, że ich zastosowanie doprowadzi do otrzymania równoważnych wyników.

Kolumna chromatograficzna (ppkt 4.5.1):	250 mm × 4 mm, faza odwrócona C_{18} , wypełnienie 5 lub 10 µm lub równoważne
Faza ruchoma (ppkt 3.9):	Mieszanina metanolu (ppkt 3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v)
Przepływ:	1–2 ml/min
Detektor (ppkt 4.5.2):	Detektor UV (325 nm) lub fluorescencyjny (wzbudzenie: 325 nm/emisja 475 nm)

5.6. Kalibrowanie

5.6.1. Przygotowanie roboczych roztworów wzorcowych

Pobrać pipetą 20 ml podstawowego roztworu wzorcowego octanu witaminy A (ppkt 3.11.1) lub 20 ml podstawowego roztworu wzorcowego palmitynianu (ppkt 3.12.1) do 500-mililitrowej kolby płaskodennej lub stożkowej (ppkt 4.2.1) i hydrolizować jak opisano w ppkt 5.2, lecz bez dodatku BHT. Następnie ekstrahować eterem naftowym (ppkt 3.2), jak opisano w ppkt 5.3 i dopełnić do 500 ml eterem naftowym (ppkt 3.2). Odparować 100 ml tego ekstraktu na odparowywaczu próżniowym (patrz ppkt 5.4) prawie do sucha, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (ppkt 3.10) i ponownie rozpuścić pozostałość w 10 ml metanolu (ppkt 3.3). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 560 IU witaminy A na ml. Należy oznaczyć dokładną zawartość według ppkt 5.6.3.3. Roboczy roztwór wzorcowy należy sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

Pobrać pipetą 2,0 ml roboczego roztworu wzorcowego do kolby pomiarowej o pojemności 20 ml, dopełnić do kreski metanolem (ppkt 3.3) i zamieszać. Nominalne stężenie tego rozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego wynosi 56 IU witaminy A na ml.

5.6.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 5,0 i 10,0 ml rozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego do serii kolb pomiarowych o pojemności 20 ml, dopełnić do kreski metanolem (ppkt 3.3) i zamieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą 2,8, 5,6, 14,0 i 28,0 IU witaminy A na ml.

Wstrzyknąć kilka razy 20 μ l każdego roztworu kalibracyjnego i określić średnie wysokości pików (powierzchnie). Wykorzystując średnie wysokości pików (powierzchnie), wykreślić krzywą kalibracyjną uwzględniając wyniki kontroli UV (ppkt 5.6.3.3).

5.6.3. Standaryzacja UV roztworów wzorcowych

5.6.3.1. Roztwór wzorcowy octanu witaminy A

Pobrać pipetą 2,0 ml podstawowego roztworu octanu witaminy A (ppkt 3.11.1) do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml (pkt 4.2.2) i dopełnić do kreski 2-propanolem (ppkt 3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 56 IU witaminy A na ml. Pobrać pipetą 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu octanu witaminy A do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do kreski 2-propanolem (ppkt 3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (ppkt 3.8) w spektrofotometrze (ppkt 4.6) między 300 nm a 400 nm. Maksimum ekstynkcji musi znajdować się między 325 nm a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

$$\left(E_{1\%}^{1\text{cm}} \text{ dla octanu witaminy A} = 1530 \text{ przy } 326 \text{ nm w 2-propanolu} \right)$$

5.6.3.2. Podstawowy roztwór wzorcowy palmitynianu witaminy A

Pobrać pipetą 2,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego palmitynianu witaminy A (ppkt 3.12.1) do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml (ppkt 4.2.2) i uzupełnić do kreski 2-propanolem (ppkt 3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 56 IU witaminy A na ml. Pobrać pipetą 3,0 ml tego rozcieńczonego roztworu palmitynianu witaminy A do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do kreski 2-propanolem (ppkt 3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (ppkt 3.8) w spektrofotometrze (ppkt 4.6) między 300 nm a 400 nm. Maksimum ekstynkcji musi znajdować się między 325 nm a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

$$\left(E_{1\%}^{1\text{cm}} \text{ dla palmitynianu witaminy A} = 957 \text{ przy } 326 \text{ nm w 2-propanolu} \right)$$

5.6.3.3. Roboczy roztwór wzorcowy witaminy A

Pobrać pipetą 3,0 ml nierozcieńczonego roboczego roztworu wzorcowego witaminy A, przygotowanego według ppkt 5.6.1, do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml (ppkt 4.2.2) i uzupełnić do kreski 2-propanolem (ppkt 3.8). Pobrać pipetą 5,0 ml tego roztworu do kolby pomiarowej o pojemności 25 ml i uzupełnić do kreski 2-propanolem (ppkt 3.8). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 6,72 IU witaminy A na ml. Zmierzyć spektrum UV tego roztworu względem 2-propanolu (ppkt 3.8) w spektrofotometrze (ppkt 4.6) między 300 nm a 400 nm. Maksimum ekstynkcji musi znajdować się między 325 nm a 327 nm.

Obliczenie zawartości witaminy A:

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

$$\left(E_{1\%}^{1\text{cm}} \text{ dla witaminy A w formie alkoholu} = 1821 \text{ przy } 325 \text{ nm w 2-propanolu} \right)$$

6. Obliczanie wyników

Na podstawie średniej wysokości pików (powierzchni) witaminy A roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w IU/ml z krzywej wzorcowej (pkt 5.6.2).

Zawartość witaminy A w IU/kg w próbce wyraża się następującym wzorem:

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

w którym:

β = stężenie witaminy A w roztworze próbki (ppkt 5.4) w IU/ml

V_1 = objętość roztworu próbki (ppkt 5.4) w ml

V_2 = objętość podwielokrotnej części roztworu pobranej (ppkt 5.4) w ml

m = masa próbki analitycznej w g

7. Objasnienia

- 7.1. Dla próbek o niskiej zawartości witaminy A może być użyteczne połączenie ekstraktów eteru naftowego z dwu nawazek (zważona ilość: 25 g) w jeden roztwór do oznaczania HPLC.
- 7.2. Masa próbki pobrana do analizy nie powinna zawierać więcej niż 2 g tłuszczu.
- 7.3. Jeśli rozdzielanie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (pkt 3.1), aby usunąć emulsję.
- 7.4. W przypadku oleju z dorsza i innych czystych tłuszczów czas zmydlania powinien zostać przedłużony do 45–60 minut.
- 7.5. Zamiast BHT można zastosować hydrochinon.
- 7.6. Rozdzielenie izomerów retinolu możliwe jest przy użyciu zwykłej kolumny (normalne wypełnienie).
- 7.7. Zamiast roztworu askorbinianu sodu można zastosować około 150 mg kwasu askorbinowego.
- 7.8. Zamiast roztworu siarczku sodu można zastosować około 50 mg EDTA.

8. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń tej samej próbki nie może przekraczać 15 % w odniesieniu do wyższego wyniku.

9. Wyniki porównań międzylaboratoryjnych ⁽¹⁾

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

L: liczba laboratoriów

n: liczba pojedynczych wartości

s_r: odchylenie standardowe dla powtarzalności

s_R: odchylenie standardowe odtwarzalności

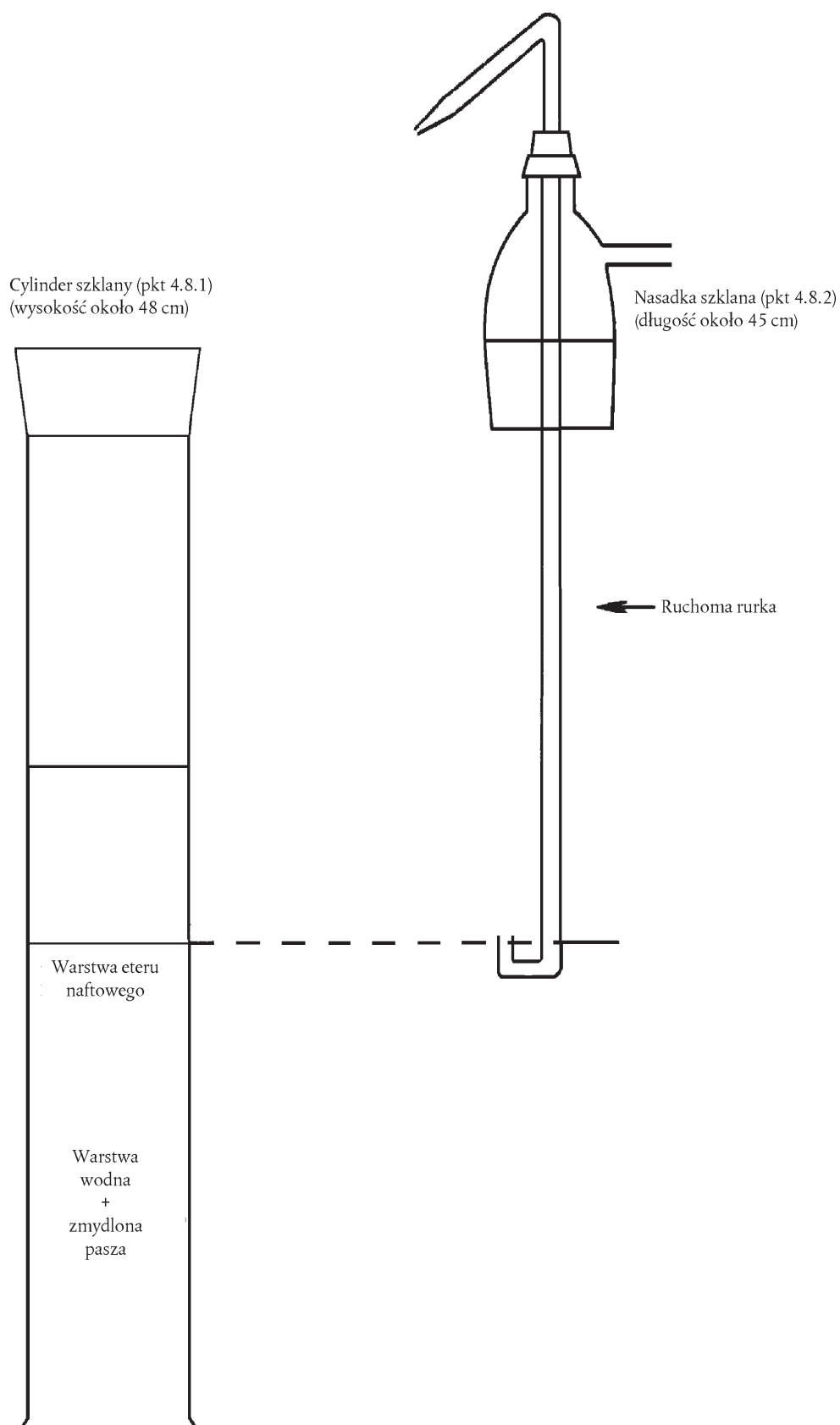
r: powtarzalność wyników

R: odtwarzalność wyników

CV_r: współczynnik zmienności powtarzalności

CV_R: współczynnik zmienności odtwarzalności

⁽¹⁾ Przeprowadzonej przez grupę roboczą ds. pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Rysunek 1: Aparat do ekstrakcji (pkt 4.8)

CZĘŚĆ B**OZNACZANIE WITAMINY E****1. Cel i zakres**

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

Granica oznaczalności metody wynosi 2 mg witaminy E/kg.

2. Zasada

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

3. Odczynniki

- 3.1. Etanol, $\sigma = 96 \%$
- 3.2. Eter naftowy, zakres wrzenia 40–60 °C
- 3.3. Metanol
- 3.4. Roztwór wodorotlenku potasu, $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$
- 3.5. Roztwór askorbinianu sodowego, $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (patrz objaśnienia ppkt 7.7)
- 3.6. Siarczek sodu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ ($x = 7-9$)
- 3.6.1. Roztwór siarczku sodu, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ w glicerolu, $\beta = 120 \text{ g/l}$ (dla $x = 9$) (patrz objaśnienia ppkt 7.8)
- 3.7. Roztwór fenoloftaleiny, $\beta = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ w etanolu (ppkt 3.1)
- 3.8. Faza ruchoma do HPLC: mieszanina metanolu (ppkt 3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v). Dokładny współczynnik zostanie określony przez charakterystykę stosowanej kolumny.
- 3.9. Azot, wolny od tlenu
- 3.10. Octan DL- α -tokoferolu o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności
- 3.10.1. Roztwór wzorcowy octanu DL- α -tokoferolu: zważyć z dokładnością do 0,1 mg 100 mg octanu DL- α -tokoferolu (ppkt 3.10) do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (ppkt 3.1) i dopełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg DL- α -tokoferolu (kontrola UV, patrz ppkt 5.6.1.3; stabilizacja, patrz objaśnienia ppkt 7.4).
- 3.11. DL- α -tokoferolu o specjalnej czystości i certyfikowanej aktywności
- 3.11.1. Zważyć z dokładnością do 0,1 mg, 100 mg DL- α -tokoferolu (ppkt 3.10) do kolby pomiarowej o pojemności 100 ml. Rozpuścić w etanolu (ppkt 3.1) i dopełnić do kreski tym samym rozpuszczalnikiem. 1 ml tego roztworu zawiera 1 mg DL- α -tokoferolu (kontrola UV, patrz ppkt 5.6.2.3; stabilizacja, patrz objaśnienia ppkt 7.4).
- 3.12. 2,6-di-tetra-butylo-4-metylofenol (BHT) (patrz objaśnienia ppkt 7.5)

4. Aparatura

- 4.1. Odparowywacz próżniowy
- 4.2. Szkło laboratoryjne oranżowe
- 4.2.1. Kolby płaskodenne lub stożkowe o pojemności 500 ml, ze szlifem

- 4.2.2. Kolby pomiarowe ze szklanymi korkami, z wąską szyjką, 10, 25, 100 i 500 ml
- 4.2.3. Rozdzielacze stożkowe, 1000 ml, ze szklanymi korkami
- 4.2.4. Kolby gruszkowe, 250 ml ze szlifem
- 4.3. Chłodnica zwrotna kulkowa, długość płaszcza 300 mm, z połączeniami szlifowanymi, z nasadką do podłączenia gazu
- 4.4. Karbowany sączek bibułkowy do rozdzielania faz, średnica 185 mm (np. Schleicher & Schuell 597 HY2/2)
- 4.5. Wyposażenie HPLC z systemem dozowania
- 4.5.1. Kolumna do chromatografii cieczowej, 250 mm × 4 mm, C_{18} , wypełnianie 5 lub 10 μ m lub równoważna
- 4.5.2. Detektor UV lub fluorescencyjny, z możliwością zmiany długości fali
- 4.6. Spektrofotometr z kwarcowymi kuwetami 10 mm
- 4.7. Łaźnia wodna z mieszadłem magnetycznym
- 4.8. Zestaw do ekstrakcji (patrz rysunek 1) składający się z:
 - 4.8.1. Cylindra szklanego o pojemności 1l, ze szlifem i korkiem
 - 4.8.2. Nasadki szklanej ze szlifem z bocznikiem i ruchomą rurką przesuwającą się przez środek nasadki. Nastawna rurka powinna mieć zakończenie w kształcie litery U i przeciwny otwór skierowany ku górze, tak aby górna warstwa cieczy w cylindrze mogła być przeniesiona do rozdzielacza stożkowego.

5. Procedura

Uwaga: Witamina E jest wrażliwa na światło (ultrafioletowe) i utlenianie. Wszystkie czynności powinny być wykonywane w ciemności (z zastosowaniem szkła oranżowego lub szkła zabezpieczonego folią aluminiową) i bez tlenu (płukanie strumieniem azotu). Podczas ekstrakcji powietrze znad cieczy powinno być zastąpione azotem (zapobiega zbyt wysokiemu ciśnieniu, zwalniając korek od czasu do czasu).

5.1. Przygotowanie próbek

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez sito o otworach 1 mm, zważając, aby podczas rozdrabniania nie wydzielano ciepła. Rozdrabnianie musi być przeprowadzone tuż przed ważeniem i zmydleniem, gdyż w przeciwnym razie mogą wystąpić straty witaminy E.

5.2. Zmydlenie

W zależności od zawartości witaminy E zważyć, z dokładnością do 0,01 g, 2–25 g próbki do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (ppkt 4.2.1). Dodać kolejno, mieszając, 130 ml etanolu (ppkt 3.1), około 100 mg BHT (ppkt 3.12), 2 ml roztworu askorbinianu sodu (ppkt 3.5) i 2 ml roztworu siarczku sodu (ppkt 3.6). Złożyć chłodnicę (ppkt 4.3) na kolbę i umieścić kolbę na łaźni wodnej z mieszadłem magnetycznym (ppkt 4.7). Ogrzać do wrzenia i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez 5 minut. Następnie dodać 25 ml roztworu wodorotlenku potasu (ppkt 3.4) przez chłodnicę (ppkt 4.3) i pozwolić na skraplanie się kondensatu w chłodnicy przez następne 25 minut, mieszając pod powolnym przepływem azotu. Następnie spłukać chłodnicę około 20 ml wody i schłodzić zawartość kolby do temperatury pokojowej.

5.3. Ekstrakcja

Przenieść, dekantując, zmydlony roztwór, ilościowo spłukując 250 ml wody, do rozdzielacza 1000 ml (ppkt 4.2.3) lub do aparatu do ekstrakcji (ppkt 4.8). Spłukać kolbę po zmydleniu kolejno 25 ml etanolu (ppkt 3.1) i 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) i przenieść popłuczyny do rozdzielacza lub do aparatu do ekstrakcji. Proporcja wody i etanolu w łączonych roztworach powinna wynosić około 2:1. Wstrząsać energicznie przez dwie minuty i pozostawić na dwie minuty.

5.3.1. Ekstrakcja przy użyciu rozdzielacza stożkowego (pkt 4.2.3)

Po rozdzieleniu warstw (patrz objaśnienia ppkt 7.3) przenieść warstwę eteru naftowego do innego rozdzielacza (ppkt 4.2.3). Powtórzyć ekstrakcję dwukrotnie, używając 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) i ponownie 50 ml eteru naftowego (ppkt 3.2).

Przemyć dwukrotnie połączone ekstrakty w rozdzielaczu stożkowym ostrożnie mieszając (aby zapobiec powstawaniu emulsji), 100 ml porcjami wody, a następnie powtórzyć przemywanie kolejnymi 100 ml porcjami wody, aż woda pozostanie bezbarwna po dodaniu roztworu fenoloftaleiny (ppkt 3.7) (wystarczy zwykle czterokrotne przemycie). W celu usunięcia suspensji wodnej przesączyć przemyty ekstrakt przez suchy karbowany sączek do rozdzielania faz (ppkt 4.4) do kolby pomiarowej o pojemności 500 ml (ppkt 4.2.2). Sflukać rozdzielacz i sączek przy użyciu 50 ml eteru naftowego (ppkt 3.2), dopełnić do kreski eterem naftowym (ppkt 3.2) i dobrze wymieszać.

5.3.2. Ekstrakcja przy użyciu aparatu do ekstrakcji (ppkt 4.8)

Gdy warstwy zostaną rozdzielne (patrz objaśnienia ppkt 7.3) zastąpić korek szklanego cylindra (ppkt 4.8.1) nasadką szklaną ze szlifem (ppkt 4.8.2) i ustawić niższy koniec rurki w kształcie litery U tak, aby znajdował się tuż ponad granicą rozdziału faz. Przez zwiększanie ciśnienia azotu dopływającego przez nasadkę przenieść górną warstwę eteru naftowego do rozdzielacza o pojemności 1000 ml (ppkt 4.2.3). Dodać 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) do szklanego cylindra, zamknąć i dobrze wymieszać. Pozostawić do rozdzielania się warstw i przenieść górną warstwę do rozdzielacza jak poprzednio. Powtórzyć procedurę ekstrakcyjną stosując kolejną porcję 100 ml eteru naftowego (ppkt 3.2), a następnie dwukrotnie porcję 50 ml eteru naftowego (ppkt 3.2) i dolać warstwy eteru naftowego do rozdzielacza.

Przemyć połączone ekstrakty eteru naftowego, jak opisano w ppkt 5.3.1 i postępować, jak tam podano.

5.4. Przygotowanie roztworu próbki do HPLC

Pobrać pipetą podwielokrotną porcję roztworu eteru naftowego (z ppkt 5.3.1 lub 5.3.2) do kolby gruszkowej o pojemności 250 ml (ppkt 4.2.4). Odparować rozpuszczalnik prawie do sucha na odparowywaczu próżniowym (ppkt 4.1) przy obniżonym ciśnieniu na łaźni wodnej w temperaturze nieprzekraczającej 40 °C. Przywrócić ciśnienie atmosferyczne przez wpuszczenie azotu (ppkt 3.10) i zdjąć kolbę z odparowywacza. Usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (ppkt 3.10) i szybko rozpuścić pozostałość w znanej objętości metanolu (10–100 ml) (ppkt 3.3) (stężenie DL- α -tokoferolu powinno wynosić 5–30 IU/ml).

5.5. Oznaczanie za pomocą HPLC

Witamina E jest rozdzielana na kolumnie z fazą odwróconą C_{18} (ppkt 4.5.1), a stężenie jest mierzone przy użyciu detektora fluorescencyjnego (wzbudzenie: 295 nm; emisja 330 nm) lub detektora UV (292 nm) (ppkt 4.5.2).

Wstrzyknąć podwielokrotną porcję (np. 20 μ l) roztworu metanolowego otrzymanego według ppkt 5.4 i eluować fazą ruchomą (ppkt 3.9). Obliczyć średnią wysokość piku (powierzchnię) kilku wstrzyknięć tego samego roztworu próbki i średnie wysokości pików (powierzchnie) z kilku wstrzyknięć roztworów kalibracyjnych (ppkt 5.6.2).

Warunki HPLC

Poniższe warunki podano jako przykładowe; inne warunki mogą być zastosowane pod warunkiem, że ich zastosowanie doprowadzi do otrzymania równoważnych wyników.

Kolumna chromatograficzna (ppkt 4.5.1):	250 mm $\times$ 4 mm, faza odwrócona C_{18} , wypełnienie 5 lub 10 μ m lub równoważne
Faza ruchoma (ppkt 3.8):	Mieszanina metanolu (ppkt 3.3) i wody, np. 980 + 20 (v + v)
Przepływ:	1–2 ml/min
Detektor (ppkt 4.5.2):	Detektor fluorescencyjny (wzbudzenie: 295 nm/emisja 330 nm) lub detektor UV (292 nm)

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

5.6.1. Wzorzec octanu DL- α -tokoferolu

5.6.1.1. Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego

Pobrać pipetą 20 ml podstawowego roztworu wzorcowego octanu DL- α -tokoferolu (ppkt 3.10.1) do kolby płaskodennej lub stożkowej o pojemności 500 ml (ppkt 4.2.1) i hydrolizować, jak opisano w ppkt 5.2. Następnie ekstrahować eterem naftowym (ppkt 3.2), jak opisano w ppkt 5.3, i dopełnić do 500 ml eterem naftowym (ppkt 3.2). Odparować 25 ml tego ekstraktu na odparowywaczu próżniowym (patrz ppkt 5.4) prawie do sucha, usunąć pozostały rozpuszczalnik strumieniem azotu (ppkt 3.10) i ponownie rozpuścić pozostałość w 25,0 ml metanolu (ppkt 3.3). Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 45,5 μ g DL- α -tokoferolu na ml, co odpowiada 50 μ g octanu DL- α -tokoferolu na ml. Roboczy roztwór wzorcowy należy sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

5.6.1.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml rozcieńzonego roboczego roztworu wzorcowego do serii kolb pomiarowych o pojemności 20 ml, dopełnić do kreski metanolem (ppkt 3.3) i zamieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą odpowiednio 2,5, 5,0, 10,0 i 25,0 µg octanu DL-α-tokoferolu na ml, co odpowiada stężeniom 2,28, 4,55, 9,10 i 22,8 µg DL-α-tokoferolu na ml.

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

5.6.1.3 Standaryzacja UV roztworu wzorcowego octanu DL-α-tokoferolu (ppkt 3.10.1)

Rozcieńczyć 5,0 ml roztworu wzorcowego octanu DL-α-tokoferolu (ppkt 3.10.1) do 25,0 ml etanolem i zdjąć spektrum UV tego roztworu wobec etanolu (ppkt 3.1) w spektrofotometrze (ppkt 4.6) między 250 nm a 320 nm.

Maksimum absorpcji powinno wystąpić przy 284 nm:

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

Przy tym rozcieńczeniu wartość ekstynkcji powinna wynosić 0,84–0,88.

5.6.2. Wzorzec DL-α-tokoferolu

5.6.2.1. Przygotowanie roboczego roztworu wzorcowego

Pobrać pipetą 2,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego DL-α-tokoferolu (ppkt 3.11.1) do kolby pomiarowej o pojemności 50 ml, rozpuścić w metanolu (ppkt 3.3) i dopełnić do kreski metanolem. Nominalne stężenie tego roztworu wynosi 40,0 µg DL-α-tokoferolu na ml, co odpowiada 44,0 µg octanu DL-α-tokoferolu na ml. Roztwór mianowany należy sporządzić bezpośrednio przed użyciem.

5.6.2.2. Przygotowanie roztworów kalibracyjnych i krzywej kalibracyjnej

Przenieść 1,0, 2,0, 4,0 i 10,0 ml roboczego roztworu wzorcowego do serii kolb pomiarowych o pojemności 20 ml, dopełnić do kreski metanolem (ppkt 3.3) i zamieszać. Nominalne stężenia tych roztworów wynoszą odpowiednio 2,0, 4,0, 8,0 i 20,0 µg DL-α-tokoferolu na ml, co odpowiada stężeniom 2,20, 4,40, 8,79 i 22,0 µg octanu DL-α-tokoferolu na ml.

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

5.6.2.3. Standaryzacja UV roztworu wzorcowego DL-α-tokoferolu (ppkt 3.11.1)

Rozcieńczyć 2,0 ml podstawowego roztworu wzorcowego DL-α-tokoferolu (ppkt 3.11.1) do 25,0 ml etanolem i spektrum UV tego roztworu wobec etanolu (ppkt 3.1) w spektrofotometrze (ppkt 4.6) między 250 nm a 320 nm. Maksimum absorpcji powinno wystąpić przy 292 nm.

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

Przy tym rozcieńczeniu wartość ekstynkcji powinna wynosić 0,6.

6. Obliczanie wyników

Na podstawie średniej wysokości pików (powierzchni) witaminy roztworu próbki określić stężenie roztworu próbki w IU/ml (w odniesieniu do octanu DL-α-tokoferolu) z krzywej wzorcowej (ppkt 5.6.1.2 lub 5.6.2.2).

Zawartość witaminy E w próbce w mg/kg wyraża się następującym wzorem:

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

w którym:

β = stężenie witaminy E w roztworze próbki (ppkt 5.4) w $\mu\text{g/ml}$

V_1 = objętość roztworu próbki (ppkt 5.4) w ml

V_2 = objętość podwielokrotnej części roztworu pobranej (ppkt 5.4) w ml

m = masa próbki analitycznej w g

7. Objasnienia

- 7.1. Dla próbek o niskiej zawartości witaminy E może być użyteczne połączenie ekstraktów eteru naftowego z dwu nawazek (zważona ilość: 25 g) w jeden roztwór do oznaczania HPLC.
- 7.2. Masa próbki pobrana do analizy nie powinna zawierać więcej niż 2 g tłuszczu.
- 7.3. Jeśli rozdzielanie faz nie następuje, dodać około 10 ml etanolu (ppkt 3.1), aby usunąć emulsję.
- 7.4. Po pomiarze spektrofotometrycznym roztworu octanu DL- α -tokoferolu lub DL- α -tokoferolu, otrzymanego odpowiednio według ppkt 5.6.1.3 lub 5.6.2.3, dodać około 10 mg BHT (ppkt 3.12) do roztworu (ppkt 3.10.1 lub 3.10.2) i przechowywać roztwór w lodówce (maksimum cztery tygodnie).
- 7.5. Zamiast BHT można zastosować hydrochinon.
- 7.6. Rozdzielenie α -, β -, γ - i δ -tokoferolu możliwe jest przy użyciu zwykłej kolumny (normalne wypełnienie).
- 7.7. Zamiast roztworu askorbinianu sodu można użyć około 150 mg kwasu askorbinowego.
- 7.8. Zamiast roztworu askorbinianu sodu można zastosować około 150 mg kwasu askorbinowego.

8. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń tej samej próbki nie może przekraczać 15 % w odniesieniu do wyższego wyniku.

9. Wyniki porównań międzylaboratoryjnych ⁽¹⁾

	Przedmieszki	Pasza z przedmieszki	Koncentrat mineralny	Pasza białkowa	Pasza dla prosiąt
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
średnia [mg/kg]	17 380	1187	926	315	61,3
s_r [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
R [mg/kg]	1075	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]	2324	182,0	155,4	52,9	21,8
CV_R [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: liczba laboratoriów

n: liczba pojedynczych wartości

s_r : odchylenie standardowe powtarzalności

s_R : odchylenie standardowe odtwarzalności

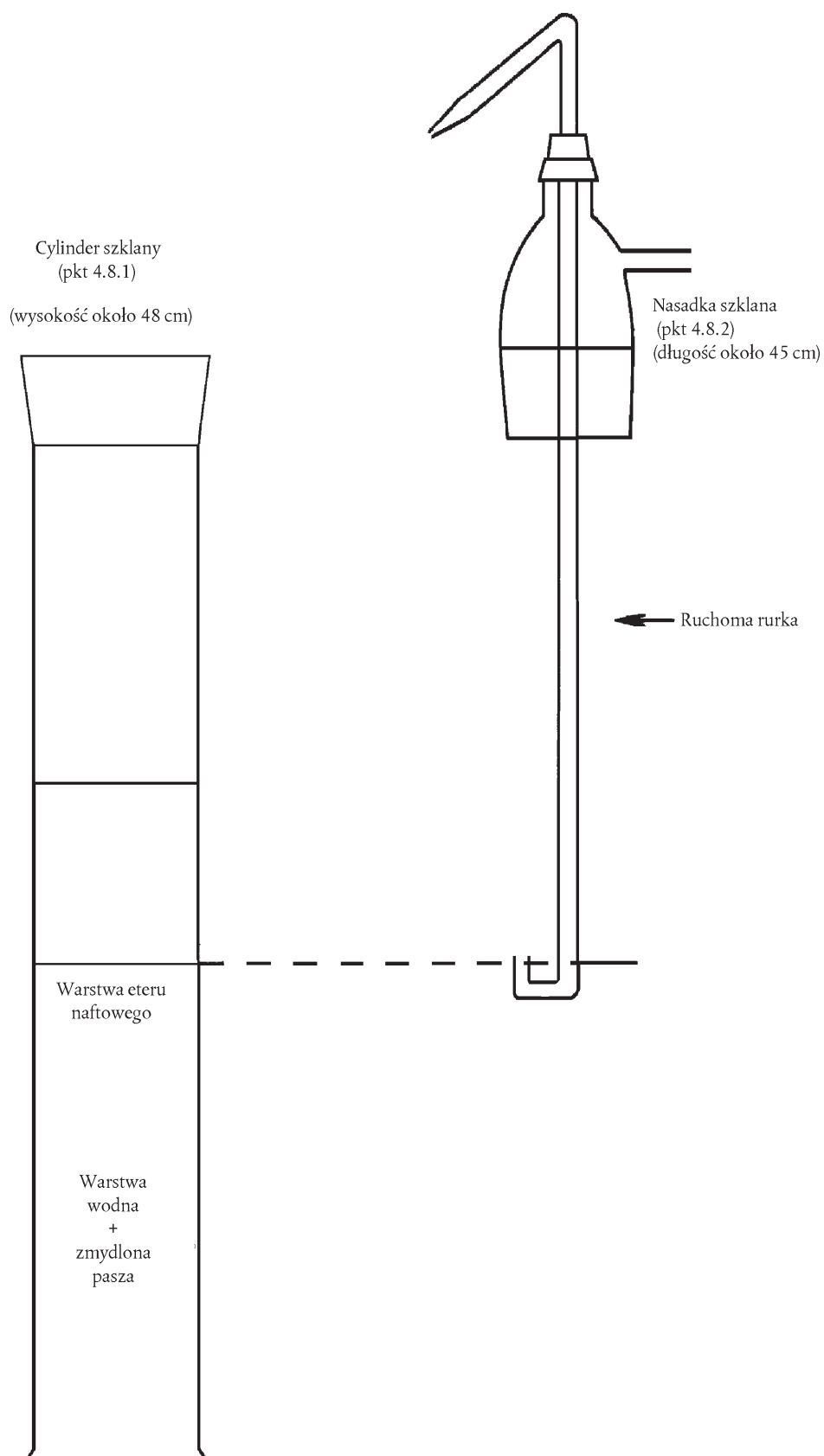
r: powtarzalność wyników

R: odtwarzalność wyników

CV_r : współczynnik zmienności powtarzalności

CV_R : współczynnik zmienności odtwarzalności

⁽¹⁾ Przeprowadzonej przez grupę roboczą ds. pasz Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Rysunek 1: Aparat do ekstrakcji (ppkt 4.8)

CZĘŚĆ C**OZNACZANIE TRYPTOFANU****1. Cel i zakres**

Metoda ta służy do oznaczenia ogólnego i wolnego tryptofanu w paszach. Metoda nie rozróżnia form D i L.

2. Zasada

Dla oznaczenia całkowitego tryptofanu próbka jest hydrolizowana w środowisku zasadowym nasyconego roztworu wodorotlenku barowego i ogrzewana do temperatury 110 °C przez 20 godzin. Po hydrolizie dodany jest wzorzec wewnętrzny.

Dla oznaczenia wolnego tryptofanu próbka jest ekstrahowana w środowisku lekko kwaśnym w obecności wzorca wewnętrznego.

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

3. Odczynniki

- 3.1. Należy stosować wodę podwójnie destylowaną lub wodę o porównywalnej jakości (przewodnictwo < 10 µS/cm)
- 3.2. Substancja wzorcowa: tryptofan (czystość/zawartość 99 %), suszony w próżni nad pięciotlenkiem fosforu
- 3.3. Standard wewnętrzny: α-metylo-tryptofan (czystość/zawartość 99 %), suszony w próżni nad pięciotlenkiem fosforu
- 3.4. Wodorotlenek baru, oktahydrat (należy uważać, aby nie wystawiać $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ na nadmierne działanie powietrza dla uniknięcia tworzenia się węglanu baru BaCO_3 , który mógłby utrudniać oznaczenie) (patrz objaśnienia ppkt 9.3)
- 3.5. Wodorotlenek sodu
- 3.6. Kwas ortofosforowy, w = 85 %
- 3.7. Kwas chlorowodorowy, $\rho_{20} = 1,19 \text{ g/ml}$
- 3.8. Metanol, czystość HPLC
- 3.9. Eter naftowy, temperatura wrzenia 40–60 °C
- 3.10. Roztwór wodorotlenku sodu, c = 1 mol/l:

Rozpuścić 40,0 g NaOH (ppkt 3.5) w wodzie i uzupełnić wodą do 1 l.
- 3.11. Kwas chlorowodorowy, c = 6 mol/l:

Odmierzyć 492 ml HCl (ppkt 3.7) i uzupełnić wodą do 1 l.
- 3.12. Kwas chlorowodorowy, c = 1 mol/l:

Odmierzyć 82 ml HCl (ppkt 3.7) i uzupełnić wodą do 1 l.
- 3.13. Kwas chlorowodorowy, c = 0,1 mol/l:

Odmierzyć 8,2 ml HCl (ppkt 3.7) i uzupełnić wodą do 1 l.
- 3.14. Kwas ortofosforowy, c = 0,5 mol/l:

Odmierzyć 34 ml kwasu ortofosforowego (ppkt 3.6) i uzupełnić wodą (ppkt 3.1) do 1 l.

3.15. Stężony roztwór tryptofanu (ppkt 3.2), $c = 2,50 \mu\text{mol/ml}$:

W kolbie pomiarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2553 g tryptofanu (ppkt 3.2) w kwasie chlorowodorowym (ppkt 3.13) i dopełnić do kreski kwasem chlorowodorowym. Przechowywać w temperaturze -18°C nie dłużej niż cztery tygodnie.

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

W kolbie pomiarowej o pojemności 500 ml rozpuścić 0,2728 g α -metylo-tryptofanu (ppkt 3.3) w kwasie chlorowodorowym (ppkt 3.13) i dopełnić do kreski kwasem chlorowodorowym. Przechowywać w temperaturze -18°C nie dłużej niż cztery tygodnie.

3.17. Kalibracyjny roztwór wzorcowy tryptofanu i wzorca wewnętrznego:

Odmierzyć 2,00 ml stężonego roztworu tryptofanu (ppkt 3.15) i 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α -metylo-tryptofanu) (ppkt 3.16). Rozcieńczyć wodą (ppkt 3.1) i metanolem (ppkt 3.8) w przybliżeniu do tej samej objętości i tego samego stężenia metanolu (10–30 %) w końcowym hydrolizacie.

Roztwór należy przygotować bezpośrednio przed użyciem.

Chronić przed bezpośrednim działaniem światła podczas przygotowywania.

3.18. Kwas octowy

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

3.20. Etanolamina $> 98 \%$

3.21. Roztwór 1 g 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (ppkt 3.19) w 100 ml metanolu (ppkt 3.8)

3.22. Faza ruchoma do HPLC: 3,00 g kwasu octowego (ppkt 3.18) + 900 ml wody (ppkt 3.1) + 50,0 ml roztworu (ppkt 3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (ppkt 3.19) w metanolu (ppkt 3.8) (1 g/100 ml). Doprowadzić pH do 5,00, stosując etanolaminę (ppkt 3.20). Uzupełnić wodą (ppkt 3.1) do 1000 ml.

4. **Aparatura**

4.1. Wyposażenie HPLC z detektorem spektrofлуorometrycznym

4.2. Kolumna do chromatografii cieczowej, 125 mm $\times$ 4 mm, C_{18} , wypełnianie 3 μm lub równoważne

4.3. pH-metr

4.4. Kolba propylenowa o pojemności 125 ml, z szeroką szyjką i nakrętką.

4.5. Sączek membranowy 0,45 μm

4.6. Autoklaw: 110 (± 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 ($\pm 0,1$) bar

4.7. Wyrząsacz mechaniczny lub mieszadło magnetyczne

4.8. Mieszadło Vortex.

5. **Procedura**

5.1. Przygotowanie próbek

Rozdrobnić próbkę tak, aby przesiewała się przez sito o otworach 0,5 mm. Próbkę o dużej wilgotności należy przed rozdrobnieniem wysuszyć powietrzem w temperaturze nieprzekraczającej 50°C lub przez wymrażanie. Próbkę o dużej zawartości tłuszczu należy ekstrahować eterem naftowym (ppkt 3.9) przed rozdrobnieniem.

5.2. Oznaczanie wolnego tryptofanu (ekstrakt)

Odważyć, z dokładnością do 1 mg, odpowiednią ilość (1–5 g) przygotowanej próbki (ppkt 5.1) do kolby stożkowej. Dodać 100,0 ml kwasu chlorowodorowego, $c = 0,1 \text{ mol/l}$ (ppkt 3.13) i 5,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (ppkt 3.16). Wstrząsać lub mieszać przez 60 minut przy użyciu wstrząsarki mechanicznej lub mieszadła magnetycznego (ppkt 4.7). Pozostawić do oddzielenia się osadu i przenieść pipetą 10,0 ml roztworu znad osadu do zlewki. Dodać 5 ml kwasu ortofosforowego, $c = 0,5 \text{ mol/l}$ (ppkt 3.14). Doprowadzić do pH 3,0 za pomocą wodorotlenku sodu, $c = 1,0 \text{ mol/l}$ (ppkt 3.10). Dodać odpowiednią ilość metanolu (ppkt 3.8) do uzyskania stężenia 10 i 30 % metanolu w końcowym roztworze. Przenieść do kolby pomiarowej o odpowiedniej objętości właściwej dla chromatografii (w przybliżeniu taka sama objętość jak kalibracyjnego roztworu wzorcowego (ppkt 3.17)).

Przesączyć kilka ml roztworu przez sącze membranowy 0,45 µm (ppkt 4.5) przed wstrzyknięciem do kolumny chromatograficznej. Przeprowadzić chromatografię zgodnie z ppkt 5.4.

Chronić roztwór wzorcowy i ekstrakty przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Jeśli niemożliwe jest dokonanie analizy ekstraktów tego samego dnia, ekstrakty można przechować w temperaturze 5 °C nie dłużej niż przez trzy dni.

5.3. Oznaczenie całkowitego tryptofanu (hydrolizat)

Odważyć, z dokładnością do 0,2 mg, od 0,1 do 1 g przygotowanej próbki (ppkt 5.1) do kolby propylenowej (ppkt 4.4). Próbkę analityczną powinna zawierać około 10 mg azotu. Dodać 8,4 g oktahydratu wodorotlenku baru (ppkt 3.4) i 10 ml wody. Wymieszać przy użyciu mieszadła Vortex (ppkt 4.8) lub mieszadła magnetycznego (ppkt 4.7). Pozostawić osłonięty teflonem magnes w mieszaninie. Spłukać ściany naczynia przy użyciu 4 ml wody. Nałożyć nakrętkę i zamknąć luźno naczynie. Przenieść kolbę do autoklawu (ppkt 4.6) i utrzymywać w stanie wrzącej wody i pary przez 30–60 minut. Zamknąć autoklaw i autoklawować przy temperaturze 110 ± 2 °C przez 20 godzin.

Przed otwarciem autoklawu obniżyć temperaturę nieco poniżej 100 °C. W celu uniknięcia krystalizacji $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, dodać do gorącej mieszaniny 30 ml wody o temperaturze pokojowej. Łagodnie wstrząsać lub mieszać. Dodać 2,00 ml stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (α -metylo-tryptofanu) (ppkt 3.16). Studzić naczynia na łaźni wodnej lub lodowej przez 15 minut.

Następnie dodać 5 ml kwasu ortofosforowego, $c = 0,5$ mol/l (ppkt 3.14). Utrzymując naczynie w zimnej łaźni, zobojętnić za pomocą HCl, $c = 6$ mol/l (ppkt 3.11), mieszając i doprowadzić do pH 3,0 za pomocą HCl, $c = 1$ mol/l (ppkt 3.12). Dodać odpowiednią ilość metanolu (ppkt 3.8) dla uzyskania stężenia metanolu między 10 a 30 % w końcowym roztworze. Przenieść do kolby pomiarowej odpowiedniej pojemności i rozcieńczyć wodą do określonej objętości właściwej do chromatografii (np. 100 ml). Dodatek metanolu nie powinien powodować wytrącania.

Przesączyć kilka ml roztworu przez sącze membranowy 0,45 µm (ppkt 4.5) przed wstrzyknięciem do kolumny chromatograficznej. Przeprowadzić chromatografię zgodnie z ppkt 5.4.

Chronić roztwór wzorcowy i ekstrakty przed bezpośrednim działaniem światła słonecznego. Jeśli niemożliwe jest dokonanie analizy ekstraktów tego samego dnia, ekstrakty można przechować w temperaturze 5 °C nie dłużej niż przez trzy dni.

5.4. Analiza HPLC

Poniższe parametry izokratycznej elucji podano jako przykładowe; inne parametry mogą być stosowane pod warunkiem, że ich zastosowanie doprowadzi do otrzymania równoważnych wyników (patrz objaśnienia ppkt 9.1 i 9.2).

Kolumna do chromatografii cieczowej (ppkt 4.2):	125 mm × 4 mm, C_{18} , wypełnianie 3 µm lub równoważna
Temperatura kolumny:	Temperatura pokojowa
Faza ruchoma (ppkt 3.22):	3,00 g kwasu octowego (ppkt 3.18) + 900 ml wody (ppkt 3.1) + 50,0 ml roztworu (ppkt 3.21) 1,1,1-trichloro-2-metylo-2-propanolu (ppkt 3.19) w metanolu (ppkt 3.8) (1 g/100 ml). Doprowadzić do pH 5,00 przy użyciu etanolaminy (ppkt 3.20). Dopełnić do 1000 ml wodą (ppkt 3.1)
Przepływ:	1 ml/min
Całkowity czas analizy:	około 34 min
Długość fali przy detekcji:	wzbudzenie: 280 nm, emisja 356 nm
Objętość wstrzykiwana:	20 µl

6. Obliczanie wyników

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

- A = pole piku wzorca wewnętrznego, roztwór wzorcowy kalibracyjny (ppkt 3.17)
- B = pole piku tryptofanu, ekstrakt (ppkt 5.2) lub hydrolizat (ppkt 5.3)
- C = objętość w ml (2 ml) stężonego roztworu tryptofanu (ppkt 3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (ppkt 3.17)
- D = stężenie w $\mu\text{mol/ml}$ (= 2,50) stężonego roztworu tryptofanu (pkt 3.15) dodanego do roztworu kalibracyjnego (pkt 3.17)
- E = objętość w ml (2 ml) stężonego roztworu wzorca wewnętrznego tryptofanu (ppkt 3.16) dodanego przy ekstrakcji (ppkt 5.2) (= 5,00 ml) lub do hydrolizatu (ppkt 5.3) (= 2,00 ml)
- F = pole piku wzorca wewnętrznego, ekstrakt (ppkt 5.2) lub hydrolizat (ppkt 5.3)
- G = pole piku tryptofanu, roztwór wzorcowy kalibracyjny (ppkt 3.17)
- H = objętość w ml (= 2 ml) stężonego roztworu wzorca wewnętrznego (ppkt 3.16) dodanego do roztworu wzorcowego kalibracyjnego (ppkt 3.17)
- W = naważka próbki w g (odniesiona do masy wyjściowej, jeśli poduszano i/lub odtuszczano)
- MW = ciężar cząsteczkowy tryptofanu (= 204,23)

7. Powtarzalność

Różnica między wynikami dwóch równoległych oznaczeń wykonanych w tej samej próbce nie może przekraczać 10 % w odniesieniu do wyższego wyniku.

8. Wyniki porównań międzylaboratoryjnych

We Wspólnocie przeprowadzono badania porównawcze, w których trzy próbki były analizowane przez maksymalną liczbę 12 laboratoriów w celu nadania atestu metodzie hydrolizy. Na każdej próbce powtórzono analizy (pięciokrotnie). Ich wyniki podano w poniższej tabeli:

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

L: liczba laboratoriów

n: liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochra, próba wartości oddalonych wg Dixon)

s_r : odchylenie standardowe powtarzalności

s_R : odchylenie standardowe odtwarzalności

r : powtarzalność wyników

R : odtwarzalność wyników

CV_r : współczynnik zmienności powtarzalności, %

CV_R : współczynnik zmienności odtwarzalności, %

W kolejnym badaniu porównawczym we Wspólnocie (trzecie porównanie wyników różnych laboratoriów) dwie próbki były analizowane przez maksymalną liczbę 13 laboratoriów w celu nadania atestu metodzie ekstrakcji wolnego tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizy (pięciokrotnie). Ich wyniki podano w poniższej tabeli:

	Próbka 4 Mieszanaka pszenicy i soi	Próbka 5 Mieszanaka pszenicy i soi (= próbka 4) z dodatkiem trypto- fanu (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
średnia [g/kg]	0,391	0,931
s _r [g/kg]	0,005	0,012
r [g/kg]	0,014	0,034
CV _r [%]	1,34	1,34
s _R [g/kg]	0,018	0,048
R [g/kg]	0,050	0,134
CV _R [%]	4,71	5,11

L: liczba laboratoriów

n: liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochрана, próba wartości oddalonych wg Dixona)

s_r: odchylenie standardowe powtarzalności

s_R: odchylenie standardowe odtwarzalności

r: powtarzalność wyników

R: odtwarzalność wyników

CV_r: współczynnik zmienności powtarzalności, %

CV_R: współczynnik zmienności odtwarzalności, %

W kolejnym badaniu porównawczym we Wspólnocie 4 próbki były analizowane przez maksymalną liczbę 7 laboratoriów w celu nadania atestu metodzie hydrolizy tryptofanu. Na każdej próbce powtórzono analizy (pięciokrotnie). Ich wyniki podano w poniższej tabeli.

	Próbka 1 Mieszana pasza dla trzody chlewnej (CRM 117)	Próbka 2 Nisko tłuszczowa mączka rybna (CRM 118)	Próbka 3 Mączka sojowa (CRM 119)	Próbka 4 Odtłuszczone mleko w proszku (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Średnia [g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
s _r [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
r [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
CV _r [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
s _R [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
R [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
CV _R [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L: liczba laboratoriów

n: liczba pojedynczych zachowanych wyników eliminujących wartości oddalone (według Cochрана, próba wartości oddalonych wg Dixona)

s_r: odchylenie standardowe powtarzalności

s_R: odchylenie standardowe odtwarzalności

r: powtarzalność wyników

R: odtwarzalność wyników

CV_r: współczynnik zmienności powtarzalności, %

CV_R: współczynnik zmienności odtwarzalności, %

9. Objasnienia

- 9.1. Następujące szczególne warunki chromatograficzne mogą dać lepszy rozdział tryptofanu i α -metylo-tryptofanu.

Izokratyczna elucja po gradientowym czyszczeniu kolumny:

Kolumna do chromatografii cieczowej: 125 mm × 4 mm, faza odwrócona C_{18} , wypełnianie 5 μ m lub równoważna

Temperatura w kolumnie: 32 Code en erreur: 8eJC

Faza ruchoma: A: 0,01 mol/l KH_2PO_4 /metanol, 95 + 5 (v + v)
B: metanol

Program gradientowy:	0 min	100 % A	0 % B
	15 min	100 % A	0 % B
	17 min	60 % A	40 % B
	19 min	60 % A	40 % B
	21 min	100 % A	0 % B
	33 min	100 % A	0 % B

Przepływ: 1,2 ml/min

Całkowity czas analizy: około 33 minut

- 9.2. Analiza chromatograficzna może się różnić w zależności od typu aparatu HPLC i wypełnienia kolumny. Wybrany system musi umożliwić uzyskanie linii podstawy między pikami tryptofanu i wzorca wewnętrznego. Ponadto jest ważne, aby produkty degradacji zostały dobrze oddzielone od tryptofanu i wzorca wewnętrznego. Hydrolizaty bez wzorca wewnętrznego powinny być poddane analizie chromatograficznej w celu określenia linii podstawy i miejsca elucji zanieczyszczeń. Ważne jest, aby czas analizy był wystarczająco długi dla elucji wszystkich produktów degradacji, ponieważ ostatnie piki na chromatogramie mogą zakłócać kolejną analizę.

W zakresie badanych stężeń układ chromatograficzny powinien zapewniać liniową odpowiedź. Liniową odpowiedź powinno się mierzyć przy stałym (normalnym) stężeniu wzorca wewnętrznego i zmieniających się stężeniach tryptofanu. Ważne jest, aby wielkość pików tryptofanu i wzorca wewnętrznego zawierała się w liniowym zakresie układu HPLC z detekcją fluorescencyjną. Jeżeli piki tryptofanu i/lub wzorca wewnętrznego są zbyt małe lub zbyt duże, analiza powinna być powtórzona przy zmianie wielkości odważki i/lub objętości roztworu końcowego.

9.3. Wodorotlenek barowy

Z czasem wodorotlenek barowy jest coraz trudniejszy do rozpuszczenia. W wyniku uzyskujemy nieklarowne roztwory do analizy HPLC, które mogą być przyczyną zaniżania wyników oznaczania tryptofanu.