

Oblastní plány rozvoje lesů

Ministerstvo zemědělství podle § 23 odst. 1 zákona č. 289/95 Sb., o lesích a změně a doplnění některých zákonů (lesní zákon) zadává zpracování oblastních plánů rozvoje lesů.

V roce 1997 budou zahájeny práce na oblastních plánech rozvoje lesů pro přírodní lesní oblasti:

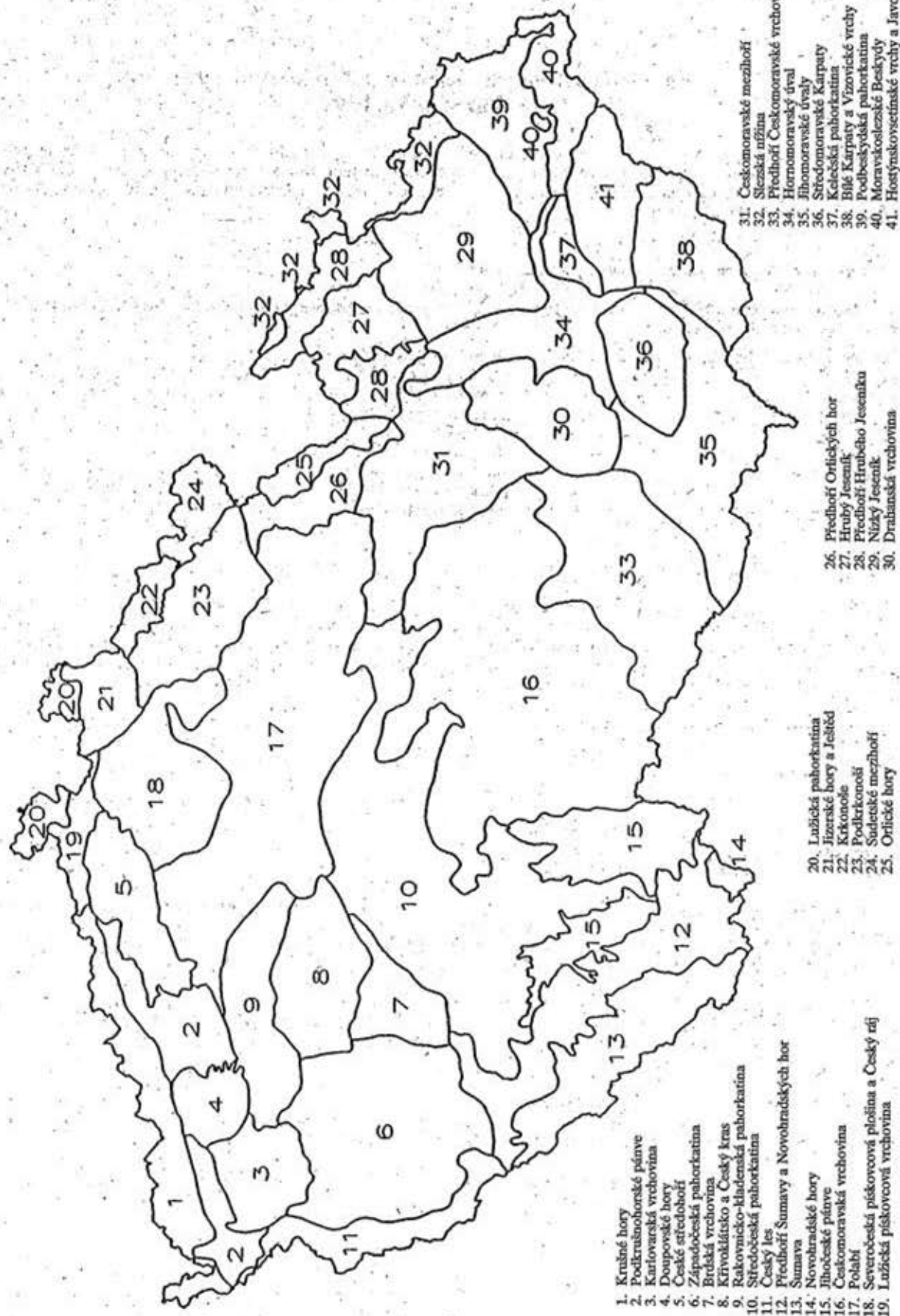
- 1 — Krušné hory
- 4 — Doupovské hory
- 7 — Brdská vrchovina
- 13 — Šumava
- 14 — Novohradské hory
- 30 — Drahanská vrchovina
- 31 — Českomoravské mezihorí
- 34 — Hornomoravský úval
- 35 — Jihomoravské úvaly
- 40 — Moravskoslezské Beskydy

Prostorové vymezení obsahuje mapa v příloze. Popis průběhu hranic přírodních lesních oblastí je v příloze č. 1 k vyhlášce č. 83/1996 Sb., o zpracování oblastních plánů rozvoje lesů a o vymezení hospodářských souborů.

Své náměty a připomínky k zásadám hospodaření v uvedených přírodních lesních oblastech mohou dotčené právnické a fyzické osoby uplatnit do 31. 8. 1997 na odboru státní správy lesů a myslivosti Ministerstva zemědělství, Těšnov 17, 117 05 Praha 1.

Ing. Vladimír Zatloukal v.r.
ředitel odboru
státní správy lesů a myslivosti

Přírodní lesní oblasti České republiky



Zásady regulace trhu pšenice potravinářské a žita ze sklizně roku 1997

V souladu s § 5 zákona ČNR č. 472/1992 Sb. o Státním fondu tržní regulace v zemědělství (dále jen „SFTR“), ve znění zákona ČNR č. 10/1993 Sb. a zákona č. 242/1995 Sb. a v souladu s čl. 7, odst. 2, písm. b) Statutu Státního fondu tržní regulace v zemědělství, schváleného usnesením vlády České republiky č. 128/1996, vydává Rada SFTR tyto „Zásady regulace trhu pšenice potravinářské a žita ze sklizně roku 1997“ (dále jen „Zásady“).

A) Intervenční nákup pšenice potravinářské ze sklizně roku 1997

1. Pro hospodářský rok 1997/98 se stanovuje minimální (garantovaná) cena pšenice potravinářské kvalitativních parametrů určených v bodě 4 pro jednotlivé měsíce takto:

od zahájení sklizně 1997 až do konce října 1997	3900 Kč/t (plus DPH)
listopad 1997	3930 Kč/t (plus DPH)
prosinec 1997	3960 Kč/t (plus DPH)
leden 1998	3990 Kč/t (plus DPH)
únor 1998	4020 Kč/t (plus DPH)
březen 1998	4050 Kč/t (plus DPH)
duben 1998	4080 Kč/t (plus DPH)
květen 1998	4110 Kč/t (plus DPH)
červen 1998	4140 Kč/t (plus DPH)

2. Výše uvedená minimální (garantovaná) cena je stanovena fco pěstitel.

3. Za minimální (garantovanou) cenu bude pšenici potravinářskou dále uvedené kvality nakupovat SFTR v případě, že cena na volném trhu v jednotlivých vymezených časových obdobích klesne pod její hranici. Posuzování vývoje cen placených pěstitelům bude prováděno na základě pramenů ČSÚ – týdenní ceny zemědělských výrobků. Důvodem pro zahájení nákupu za minimální (garantovanou) cenu bude skutečnost, že průměrná cena pšenice potravinářské vypočtená jako aritmetický průměr týdenních cen za tři po sobě jdoucí týdny klesne pod hranici 95 % stanovené garantované ceny.

4. Minimální (garantovaná) cena je stanovena pro pšenici potravinářskou odpovídající těmto kvalitativním parametrům:

vlhkost	max. 14,0 %
objemová hmotnost	min. 780,0 g/l
obsah příměsí	max. 6,0 %
obsah nečistot	max. 0,5 %
obsah lepku v sušině	min. 25,0 %
pádové číslo (Hagbergovo č.)	min. 220 sec.
pšenice musí být zdravá bez živých škůdců, závadných pachů a sněží	

Odběr vzorků se provádí podle ČSN ISO 950 (46 1024). Stanovení jednotlivých jakostních znaků se provádí z dávek (ze skládaných vzorků – podniková norma Zemědělského normalizačního střediska Praha PN – 185/93) postupem dle ČSN 46 1011, ČSN ISO 712 (46 1014) a ČSN ISO 3093 (46 1018). Příměs celkem a nečistoty celkem se posuzují podle ČSN 46 1100-2. Přepočet vlhkosti a nečistot na základní hodnoty uvedené v ČSN 46 1100-2 se provádí postupem uvedeným v ČSN 46 1010.

5. Minimální (garantovaná) cena bude vyplacena pouze těm zemědělským prvovýrobcům, kteří mají vypořádaný vyžádaný oprávněný majetkový nárok (restituční a transformační), pokud jsou povinnou osobou ve smyslu zákona č. 42/1992 Sb. v platném znění, či zákona č. 229/1991 Sb. v platném znění. Seznam subjektů s nevypořádanými majetkovými nároky před zahájením sklizně vyhotoví ředitelé územních odborů Ministerstva zemědělství ČR a předají je na SFTR.

6. Další podmínkou pro vyplacení minimální (garantované) ceny je vypořádání závazků vůči státu (daně, Fond národního majetku, Pozemkový fond, SFTR, Podpůrný garanční rolnický a lesnický fond). Stav ve vypořádání závazků vůči státu uvede pěstitel v čestném prohlášení, které bude součástí uzavřených smluv dle bodu 7) části A/ „Zásad“.

7. Pěstitel, který projeví zájem o dodávku pšenice potravinářské do zásob SFTR po vyhlášení intervenčního nákupu za minimální (garantovanou) cenu uzavře se SFTR smluvní vztah.

8. Intervenční nákup pšenice potravinářské za minimální (garantovanou) cenu budou provádět skladující organizace, které budou ve smluvním vztahu se SFTR.

B) Podpora soukromého skladování při termínových obchodech uzavřených mezi pěstiteli pšenice potravinářské a žita a mlýnskými subjekty.

1. SFTR poskytne mlýnským subjektům za podmínek uvedených v následujících bodech finanční podporu soukromého skladování pšenice potravinářské a žita ve výši diferencované podle měsíce skutečného nákupu od pěstitele takto:

při nákupu v lednu 1998	330 Kč/t
při nákupu v únoru 1998	370 Kč/t
při nákupu v březnu 1998	410 Kč/t
při nákupu v dubnu 1998	450 Kč/t
při nákupu v květnu 1998	490 Kč/t
při nákupu v červnu 1998	530 Kč/t

2. SFTR bude poskytovat finanční podporu skladování u pšenice potravinářské celkem do 425 tis. tun a u žita pro potravinářské účely celkem do 75 tis. tun, přičemž podpora všem zúčastněným mlýnským subjektům v jednom měsíci bude poskytnuta maximálně na 100 tis. tun pšenice potravinářské a 12,5 tis. tun žita.

3. Podmínky pro poskytnutí finanční podpory soukromého skladování:

- finanční podpora skladování bude poskytnuta pouze subjektům, jejichž předmětem činnosti zapsaným v obchodním rejstříku je výroba mlýnských výrobků,
- mlýnský subjekt – žadatel o podporu uzavře s pěstitelem pšenice potravinářské a žita nejpozději do 30. 4. 1997 kupní smlouvy o dodávce pšenice potravinářské a žita s termíny dodávek v měsících lednu 1998 až červnu 1998 (dále smlouva o termínových obchodech),
- mlýnský subjekt poskytne pěstitelům, s kterými má uzavřeny smlouvy o termínových obchodech nejpozději do 30. 4. 1997 zálohu na cenu ve výši 3000 Kč za 1 tunu pšenice potravinářské a žita, a to na množství, na které byla uzavřena smlouva o termínových obchodech,
- mlýnský subjekt zaplatí pěstitelům, s kterými má uzavřeny smlouvy o termínových obchodech, po dodání pšenice potravinářské dohodnutou cenu, nejméně však minimální (garantovanou) cenu dle části A) bod 1) těchto zásad, po dodání žita cenu dohodnutou, a to po odečtení záloh,
- ve smlouvě o termínových obchodech zakotví mlýnský subjekt požadavek na kvalitní parametry v této výši:

pšenice potravinářská:

vlhkost	max. 14,0 %
objemová hmotnost	min. 780,0 g/l
obsah příměsí	max. 6,0 %
obsah nečistot	max. 0,5 %
obsah lepku v sušině	min. 25,0 %
pádové číslo (Hagbergovo)	min. 220 sec.

žito pro potravinářské účely:

vlhkost	max. 14,0 %
objemová hmotnost	min. 730 g/l
obsah příměsí	max. 6,0 %
obsah nečistot	max. 0,5 %
pádové číslo (Hagbergovo)	min. 130 sec.

- smlouvy o termínových obchodech nebudou uzavírány s pěstiteli, kteří nemají vypořádaný závazky vůči SFTR. Seznam dlužníků poskytne mlýnským subjektům SFTR.

4. Finanční podpora soukromého skladování bude poskytnuta mlýnským subjektům vybraným ve výběrovém řízení. S vybranými mlýnskými subjekty uzavře SFTR smlouvu.

C) Nákup potravinářské pšenice ze sklizně roku 1997

- V případě potřeby zahájí SFTR nákup pšenice potravinářské za tržní cenu.

Ing. Josef LUX
místopředseda vlády ČR,
ministr zemědělství
a předseda Rady SFTR

Metodické postupy laboratorního zkoušení krmiv vydávané pro účely výkonu odborného dozoru Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v návaznosti na zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech a vyhlášku Ministerstva zemědělství č. 222/1996 Sb., kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků podléhajících zkázce.

Obsah:

1. Metodické postupy laboratorního zkoušení – k příloze č. 10 vyhlášky č. 222/1996 Sb.
2. Metodické postupy laboratorního zkoušení – k příloze č. 11 vyhlášky č. 222/1996 Sb.
3. Metodické postupy laboratorního zkoušení – k příloze č. 12 vyhlášky č. 222/1996 Sb.
4. Metodické postupy laboratorního zkoušení – k příloze č. 13 vyhlášky č. 222/1996 Sb.
5. Ověření přesnosti míchacích zařízení

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv doplňkových látek a premixů

Seznam postupů chemického zkoušení krmiv

Seznam zkušebních metod

Název postupu

1 Stimulátory růstu

- 1.1 Stanovení obsahu avilamycinu
- 1.2 Stanovení obsahu avoparcinu
- 1.3 Stanovení obsahu flavomycinu (flavosfolipol)
- 1.4 Stanovení obsahu olachindoxu
- 1.5 Stanovení obsahu monenzinu
- 1.6 Stanovení obsahu monenzinu
- 1.7 Stanovení obsahu salinomycinu
- 1.8 Stanovení obsahu salinomycinu
- 1.9 Stanovení obsahu tylosinu
- 1.10 Stanovení obsahu virginiamycinu
- 1.11 Stanovení obsahu zink bacitracinu difuzí na agaru
- 1.12 Stanovení obsahu zink bacitracinu

2 Antikokcidika

- 2.1 Stanovení obsahu amprolia
- 2.2 Stanovení obsahu amprolia
- 2.3 Stanovení obsahu diclazurilu
- 2.4 Stanovení obsahu lasalocidu
- 2.5 Stanovení obsahu maduramicinu
- 2.6 Stanovení obsahu metylbenzochátu
- 2.7 Stanovení obsahu narasinu
- 2.8 Stanovení obsahu narasinu
- 2.9 Stanovení obsahu nikarbazu
- 2.10 Stanovení obsahu nikarbazu
- 2.11 Stanovení obsahu robenidinu
- 2.12 Stanovení obsahu sulfachinoxalu
- 2.13 Stanovení obsahu meticlorpindolu
- 2.14 Stanovení obsahu meticlorpindolu
- 2.15 Stanovení obsahu kurasanu
- 2.16 Stanovení obsahu salinomycinu

- 2.17 Stanovení obsahu monenzinu
- 2.18 Stanovení obsahu dinitolmidu
- 2.19 Stanovení obsahu furazolidonu
- 2.20 Stanovení obsahu decoquinátu
- 2.21 Stanovení obsahu arprinocidu
- 2.22 Stanovení obsahu ethopabátu

3 Chemoterapeutika

- 3.1 Stanovení obsahu dimetridazolu
- 3.2 Stanovení obsahu dimetridazolu
- 3.3 Stanovení obsahu dimetridazolu

4 Vitaminy

- 4.1 Stanovení obsahu vitaminu A
- 4.2 Stanovení obsahu vitaminu A
- 4.3 Stanovení obsahu vitaminu A
- 4.4 Stanovení obsahu vitaminu E
- 4.5 Stanovení obsahu přidaného vitaminu E
- 4.6 Stanovení obsahu vitaminu E
- 4.7 Stanovení obsahu cholinu
- 4.8 Stanovení obsahu panthotenanu vápenatého
- 4.9 Stanovení obsahu vitaminu B₁, B₂, B₆
- 4.10 Stanovení obsahu vitaminu B₂
- 4.11 Stanovení obsahu vitaminu B₁
- 4.12 Stanovení obsahu vitaminu B₆
- 4.13 Stanovení obsahu vitaminu C
- 4.14 Stanovení obsahu vitaminu C
- 4.15 Stanovení obsahu vitaminu K₃
- 4.16 Stanovení obsahu vitaminu K₃

5 Mikroelementy

- 5.1 Stanovení obsahu manganu, zinku, železa a mědi
- 5.2 Stanovení obsahu kobaltu
- 5.3 Stanovení obsahu selenu
- 5.4 Stanovení obsahu jodu

6 Vehikula a pojiva

- 6.1 Stanovení obsahu oxidu křemičitého
- 6.2 Stanovení obsahu oxidu hlinitého

7 Výpočty

- 7.1 Vyhodnocování a výpočet výsledků stanovení doplňkových látek difuzní plotnovou metodou

8 Antioxidanty

- 8.1 Stanovení obsahu ethoxychinu
- 8.2 Stanovení obsahu BHT, BHA a galáty

9 Barviva

- 9.1 Stanovení obsahu kapsanthinu
- 9.2 Stanovení obsahu nativních a přidaných karotenoidů

10 Konzervanty

- 10.1 Stanovení obsahu kyseliny mravenčí
- 10.2 Stanovení obsahu oxidu siřičitého
- 10.3 Stanovení obsahu formaldehydu

11 Zchutňovadla

- 11.1 Stanovení obsahu sacharinu

12 Mikrobiotika

- 12.1 Stanovení počtu zárodků bakterií kmene Streptococcus
- 12.2 Stanovení počtu zárodků bakterií kmene Bacillus

1.1 Stanovení obsahu avilamycinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení avilamycinu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Avilamycin se stanoví difúzní plotnovou metodou na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Micrococcus luteus* ATCC 10 240.

3. Chemikálie

3.1 Aceton (poznámka 8.1)

3.2 Směs aceton–voda (1 + 1)

3.3 Avilamycin, základní standardní roztok s deklarovanou účinností

3.4 Avilamycin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží takové množství standardní substance avilamycinu (3.3), s přesností nejméně na 0,001 g, které s ohledem na deklarovanou účinnost vytvoří koncentraci avilamycinu 1 mg v 1 ml. Rozpustí se v acetonu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

3.5 Avilamycin, kalibrační standardní roztoky

Příprava: Ze základního roztoku avilamycinu (3.4) se vhodným zředěním směsí aceton–voda (3.2) připraví tři roztoky o koncentracích 2,1 a 0,5 µg/ml (poznámka 8.2).

3.6 Testovací mikroorganismus *Micrococcus luteus* ATCC 10 240

Příprava a udržování kmene: Základní kmen je udržován pravidelným přeočkováním na šikmém masopeptonovém agaru, inkubován 18 až 24 hodin při teplotě 37 °C a uchován při teplotě 4 °C.

Příprava inokulační suspence: Kultura kmene, přeočkována den před vlastním stanovením se převede 5 ml fyziologického roztoku (3.8) do sterilní zkumavky, touto suspensí se naočkuje rozechlátá živná půda ochlazená na teplotu 48 °C a opatrně promíchá.

3.7 Živná půda pro vlastní testaci (testovací půda)

Složení: Pepton 6,0 g
Extrakt kvasničný 15,0 g
Agar 15,0 g
Voda doplnit do 1 000 ml

Směs se upraví na pH = 6,0 a sterilizuje 15 minut při 115 °C

3.8 Fyziologický roztok Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm, nebo 250 mm × 250 mm

4.2 Rám kovový 340 mm × 340 mm, nebo 200 mm × 200 mm

4.3 Korkovrt o průměru 9 mm

4.4 Odstředivka laboratorní vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.5 Termostat vhodné konstrukce

4.6 Třepačka laboratorní

4.7 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.8 Vodováha

4.9 Pipeta podle Pasteura

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží přesně 5,00 g zkušebního vzorku, přidá se přesně 200,0 ml acetonu (3.1) a 30 minut se protřepává. Potom se extrakt nechá asi 30 minut usadit. Supernatant se rozředí směsí aceton–voda (3.2), s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah avilamycinu ve zkoušeném vzorku, na testovací koncentrace 2,0, 1,0 a 0,5 µg avilamycinu v 1 ml (poznámka 8.2).

5.1.2 Na sterilní plotnu (4.1) opatřenou kovovým rámem (4.2), utěsněným malým množstvím agarové půdy a upravenou do vodováhy (4.8), se nalije 300 ml nebo 60 ml (podle velikosti použité plotny) rozechláté testovací půdy (3.7), ochlazené na 40 °C a naočkován vhodné množství inokulační suspence (3.6). Po utužení agarové půdy se plotna (4.1) vloží na 1 hod. do chladničky a po jejím vyjmutí se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem v půdě 9 × 9 nebo 6 × 6 jamek. Do těchto jamek se vnaší testovací koncentrace standardních roztoků (3.5) a testované roztoky zkoušeného vzorku pomocí Pasteurových pipet. Kalibrační standardní roztoky (testovací koncentrace) se vnaší do 3 nebo 2 řad ve středu plotny (4.1), testované roztoky zkoušeného vzorku odpovídající příslušné koncentraci standardů po obou stranách plotny. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hod. při teplotě 37 °C.

Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem s přesností nejméně na 0,1 mm. Ze získaných hodnot měření se vypočte průměrná hodnota velikosti inhibičních zón jednotlivých koncentrací pro standard i zkoušený vzorek.

5.2 Krmné směsi

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží přesně 40,00 g zkušebního vzorku, přidá se přesně 200,0 ml acetonu (3.1) a dále se postupuje podle odstavce 5.1.1 a 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah avilamycinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aceton je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.2 Stanovení obsahu avoparcinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 257, 10/09/81

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny tři zkušební metody, z nichž dvě jsou pro stanovení avoparcinu v premixech bez i za přítomnosti ionoforových antikokcidů, jako např. monenzinu, lasalocidu, maduramicinu i dalších obdobného charakteru. Třetí z metod je uvedena pro krmiva.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení avoparcinu v premixech a krmivech.

2. Princip

Vzorek se rozpustí ve směsi aceton-voda-kyselina chlorovodíková a avoparcin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633, mikrobiologicky difúzní plotnovou metodou.

Za přítomnosti ionoforových antikokcidů se tyto odstraní předextrakcí vzorku dichlormethanem.

3. Chemikálie

3.1 Dichlormethan

3.2 Kyselina chlorovodíková ($h = 1,17 \text{ g/ml}$), zředěná 1 + 9

3.3 Kyselina fosforečná (H_3PO_4), koncentrovaná ($h = 1,7 \text{ g/ml}$)

3.4 Aceton (poznámka 8.1)

3.5 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$

3.6 Síran manganatý, tetrahydrát ($\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), pevný

3.7 Dihydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), pevný

3.8 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), pevný

3.9 Ethylalkohol-voda (1 + 4)

3.10 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.11 Extrakční roztok

Příprava: 650 ml acetonu (3.4) se smíchá s 325 ml vody a 25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá.

3.12 Avoparcin síran, standardní substance s ověřenou či deklarovanou účinností

3.13 Avoparcin, základní standardní roztok

Příprava: Podle obsahu účinné látky se odváží tolik standardní substance síranu avoparcinu (3.12) s přesností nej-

méně na 0,001 g, aby výsledný roztok obsahoval přesně 100 µg avoparcinu v 1 ml. Odvážené množství se převede pomocí fosforečnanového tlumivého roztoku (3.15) do odměrné baňky na 100 ml, po rozpuštění se doplní tímtež tlumivým roztokem po rysku a promíchá. Tento základní standardní roztok se uchovává při teplotě 5 °C a je stálý po dobu 7 dnů.

3.14 Avoparcin, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku avoparcinu (3.13), doplní fosforečnanovým tlumivým roztokem (3.15) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 10 µg avoparcinu. Připravuje se čerstvý těsně před zkoušením.

Z tohoto roztoku se připraví dalším ředěním tlumivým fosforečnanovým roztokem (3.15) testační koncentrace 4, 2 a 1 µg v 1 ml (poznámka 8.2).

3.15 Tlumivý fosforečnanový roztok

Příprava: 13,6 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.8) se rozpustí v 950 ml vody a jeho pH se upraví kyselinou fosforečnou (3.3) na hodnotu 4,5.

3.16 Živné půdy:

3.16.1 Udržovací půda

Příprava: Živný agar č. 2 „Sevac“ se připraví podle návodu výrobce. Agar se pak rozdělí po 7 až 9 ml do zkumavek, tyto se uzavřou a sterilizují 20 minut při teplotě 121 °C. Po sterilizaci se nechá utuhnout v šikmé poloze.

3.16.2 Sporulační půda

Příprava: Živný agar č. 2 v množství 40 g se připraví podle návodu výrobce, přidá se 0,4 g síranu manganatého (3.6) a do objemu 1 000 ml voda. Agar se pak rozdělí po 250 až 300 ml do Rouxových láhví (4.15) (nebo baněk na 500 ml) a sterilizuje 20 minut při teplotě 121 °C.

3.16.3 Testovací půda

Příprava: Odváží se hydrogenfosforečnan draselný 0,7 g
dihydrogenfosforečnan draselný 0,45 g
glukóza 10,0 g
kvasničný autolyzát 2,5 g
agar 18,0 g

Uvedené látky se rozmíchají v 1 000 ml vody, pH se upraví na hodnotu 6,0 a sterilizuje se po dobu 20 minut při teplotě 121 °C. Sterilní půda se rozlije po 250 ml do předem vysterilizovaných kuželových baněk

3.16.4 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Udržování kmene: Kultura se 1krát měsíčně přeočkovává na šikmý agar. Inkubuje se 16 až 18 hodin při teplotě 37 °C a uchovává v chladničce při teplotě 5 °C. (poznámka 8.3).

Příprava sporové suspence: Nárůst základní kultury na šikmém agaru se smyje 3 ml fyziologického roztoku (3.10) a přenese se asepticky do Rouxových láhví (4.15), obsahujících sporulační půdu (3.16.2). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.15) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dnů. Pak se prověřením sporulace pod mikroskopem (4.16) smyje narostlá kultura s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.10) centrifuguje, (4.3) k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziolo-

gického roztoku (3.10), suspence se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu centrifuguje (4.3). Toto promývání spor se opakuje třikrát. Nakonec se suspence spor převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspence spor představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspense se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspense na 100 ml agaru.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Přístroj extrakční (např. podle Soxhleta)
- 4.2 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou
- 4.3 Odstředivka laboratorní vhodné konstrukce s příslušenstvím (centrifugační kyvety se zátkami)
- 4.4 Autokláv
- 4.5 Třepačka vhodné konstrukce
- 4.6 Termostat
- 4.7 pH metr
- 4.8 Plotny skleněné 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm
- 4.9 Rámy kovové 240 mm × 240 mm nebo 200 mm × 200 mm
- 4.10 Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.11 Korkovrt o průměru 9 mm
- 4.12 Pipety podle Pasterura
- 4.13 Patrony extrakční
- 4.14 Baňka odpařovací na 500 ml
- 4.15 Láhve Rouxovy na 1 000 ml
- 4.16 Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Za nepřítomnosti ionoforových antikokcidik

5.1.1.1 Odváží se příslušné množství (poznámka 8.4) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do kuželové baňky vhodné velikosti, suspenduje se ve 2/3 celkového objemu extrakčního roztoku (3.11) (poznámka 8.4) a nechá se 30 min. volně stát. Potom se pomocí kyseliny chlorovodíkové (3.2) upraví hodnota pH na 1,5 až 2 a obsah se extrahuje 30 minut na třepačce (4.5). Po extrakci se upraví pomocí roztoku hydroxidu sodného (3.5) pH na hodnotu 4,5. Ve zbylé 1/3 extrakčního roztoku (3.11) se upraví pH na hodnotu 4,5 a po korekci na přidaná množství kyseliny a hydroxidu se přidá do kuželové baňky. Potom se pevný podíl nechá usadit a supernatant se jednak buď odstředí (4.3) nebo přefiltruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Tento supernatant nebo filtrát se naředí pomocí tlumivého fosforečnanového roztoku (3.15) na testovací koncentrace 4, 2 a 1 µg avoparcinu v 1 ml (poznámka 8.6).

5.1.1.2 Na sterilní skleněnou plotnu (4.8) s kovovým rámem (4.9), která je položena na vyrovnávací podložce (4.10) a utěsněná malým množstvím agarové půdy (3.16.1) se vylije 60 ml

rozehřáté testovací půdy (3.16.3), ochlazené na 55–60 °C a naočkované 0,1 ml až 0,3 ml sporové suspence (3.16.4). Po utužení agarové vrstvy se vloží plotna (4.8) na 1 hodinu do chladničky. Potom se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.11) v půdě 6 × 6 jamek, do nichž se vnáší jednotlivé testovací koncentrace standardu (3.14) a testované koncentrace zkoušeného vzorku (viz 5.1.1.1) pomocí Pasteurovy pipety (4.12). Testovací roztoky standardu se plní do dvou řad pod sebou ve středu plotny a po obou stranách se plní do dvou řad testované koncentrace zkoušeného vzorku, odpovídající příslušnému ředění standardu. Plotna se zakryje děrovaným alobalem a inkubuje se 16 až 18 hodin při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm. Ze získaných hodnot se výpočtem průměrná hodnota velikosti inhibičních zón jednotlivých ředění pro standard i zkoušený vzorek.

5.2.2 Za přítomnosti ionoforových antikokcidik

5.2.2.1 Nejprve se provede předběžná extrakce zkušební vzorku. Do střední části extrakčního přístroje (4.1) se vloží extrakční patrona (4.13) naplněná asi do poloviny odváženým vzorkem. Na vřehu se utěsní smotkem extrahované vaty. Do extrakční baňky se odměří asi 250 ml dichlormethanu (3.1), baňka se připojí k extrakčnímu přístroji (4.1) a celý přístroj se umístí na vodní lázeň (4.2), vyhřátá a udržovaná při teplotě 50 °C. Dichlormethan (3.1) po zahřátí destiluje a pomocí vodního chladiče extrakčního přístroje (4.1) kondenzuje do střední části, kde je umístěna patrona (4.13) se vzorkem. Po naplnění této střední části dichlormethanem (3.1) tento přeteče zpět do extrakční baňky a celý cyklus se opakuje. Toto se nechá opakovat asi 5krát až 7krát. Pak se extrakční přístroj (4.1) odstaví, patrona se vzorkem se vyjme a nechá po dobu 24 hod. vysušit při laboratorní teplotě.

Dále se postupuje podle 5.1.1.1 a 5.1.1.2.

5.2 Krmiva

Odváží se asi 50 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g do kuželové baňky, přidá se přesně 100,0 ml extrakčního roztoku (3.11), baňka se umístí na třepačku (4.5) a obsah se vytřepává po dobu 30 minut. Potom se obsah baňky převede do centrifugační kyvety, tato se vloží na odstředivku (4.3) a odstředí. Z čirého supernatantu se odpipetuje alikvotní podíl tak, aby výsledná koncentrace, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah avoparcinu v zkoušeném vzorku, byla asi 4 µg/ml. Z tohoto roztoku se připraví testované koncentrace 2, 1 a 0,5 µg avoparcinu v 1 ml (poznámka 8.6). Ředění se provede pomocí tlumivého roztoku (3.15).

Dále se postupuje podle 5.1.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah avoparcinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aceton je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Metoda EU uvádí pro krmiva koncentrace testačních roztoků 2, 1, 0,5 a 0,25 µg/ml.

8.3 Metoda EU uvádí dobu inkubace přes noc a při teplotě 30 °C.

8.4 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah avoparcinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace avoparcinu ve výtahu byla minimálně 10 µg/1 ml.

8.5 Metoda EU uvádí pro obsahy avoparcinu tyto hodnoty opakovatelnosti

od 2 do 10 mg/kg	2 mg/kg
od 10 do 20 mg/kg	20 % relat.
od 25 do 50 mg/kg	5 mg/kg
nad 50 mg/kg	10 % relat.

8.6 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.3 Stanovení obsahu flavomycinu (flavofosfolipolu)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení flavomycinu v premixech

2. Princip

Flavomycin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96 % (poznámka 8.1)

3.2 Ethylalkohol-voda, směs (1 + 1)

3.3 Medium antibiotické č.1 (fa OXOID)

3.4 Agar č.1

3.5 Živný agar č.2

3.6 Flavomycin, standardní substance známé aktivity

3.7 Flavomycin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží tolik standardní substance flavomycinu (3.6), s ohledem na deklarovanou účinnost, s přesností nejméně na 0,001 g tak, aby výsledná koncentrace flavomycinu byla 1 mg v 1 ml. Odvážené množství se rozpustí ve směsi ethylalkohol-voda (3.2), doplní touto směsí po rysku a promíchá.

Tento roztok je při uchování v chladničce stálý po dobu dvou měsíců.

3.8 Flavomycin, pracovní standardní roztok

Příprava: Základní standardní roztok (3.7) se naředí směsí ethylalkohol-voda na koncentraci 100 µg/ml a dále vodou na testační koncentrace 2, 1 a 0,5 µg v 1 ml (poznámka 8.3).

3.9 Testovací mikroorganismus *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Uchování kmene: Ve zkumavkách na šikmém udržovacím agaru při teplotě 5 °C, po třech týdnech se přeočkovává a kultivace se provádí 24 hod. při teplotě 37 °C.

Příprava suspenze k testování: Kultura kmene narostlá na udržovacím agaru se převede 5 ml fyziologického roztoku (3.10) do sterilní zkumavky a touto suspenzí (asi 3 ml) se naočkuje rozeřtá testovací půda při teplotě 48 °C.

3.10 Fyziologický roztok Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.11 Udržovací agar pro uchování kmene

Příprava: Odváží se 40 g živného agaru č. 2 (3.5), přidá se 1 000 ml horké vody, za stálého míchání se zahřívá až do vyčerpání roztoku. Rozlije se do zkumavek a sterilizuje 20 minut při teplotě 120 °C. Po sterilizaci se zkumavky uloží v šikmé poloze do ztuhnutí půdy.

3.12 Živná půda pro vlastní testaci

Příprava: Odváží se 30,5 g antibiotického media č. 1 (3.3), rozmíchá se ve 1 000 ml horké vody a sterilizuje 20 minut při teplotě 120 °C. Potom se sterilní médium rozlije do předem vysterilizovaných kuželových baňek na 300 ml.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm

4.2 Rám kovový 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm

4.3 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.4 Korkovrt o průměru 9 mm

4.5 Termostat vhodné konstrukce

4.6 Autokláv

4.7 Třepačka laboratorní

4.8 Vodováha

4.9 Pipeta podle Pasteura

4.10 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží asi 5 g zkušebního vzorku (poznámka 8.2) s přesností nejméně na 0,001 g, zalije 200 ml směsí ethylalkohol-voda (3.1) a zahřívá na vodní lázni (4.10) vytemperované na 85 °C po dobu 15 minut. Potom se baňka umístí na třepačku (4.7) a vytřepává po dobu 15 minut, ochladí a roztok se převede do odměrné baňky na 250 ml, doplní směsí ethylalkohol-voda (3.2) po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah flavomycinu ve zkoušeném vzorku, se připraví naředěním směsí ethylalkohol-voda (3.2) testované koncentrace 2 µg, 1 µg a 0,5 µg v 1 ml (poznámka 8.3).

Naočkováná testovací živná půda (3.12), 70 ml nebo 300 ml – podle velikosti použité plotny (4.1), se rozlije na skleněnou plotnu opatřenou rámem a utěsněnou malým množstvím agaru (3.4), umístěnou ve vodorovné poloze (4.8). Po ztuhnutí vrstvy se plotna (4.1) uloží na jednu hodinu do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.4) v půdě 6 × 6 nebo 9 × 9 jamek, do nichž se vnáší testací standardní i testované koncentrace zkoušeného vzorku pomocí Pasteurovy pipety (4.9). Testací koncentrace standardu se plní do dvou nebo tří řad u středu plotny (4.1), testované koncentrace zkoušeného vzorku po obou stranách plotny na strany odpovídající příslušným řadám testací

ních koncentrací standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hodin při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých zón se měří s přesností na 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah flavomycinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Navážka zkušební vzorku se volí s ohledem na očekávaný nebo deklarovaný obsah flavomycinu.

8.3 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.4 Stanovení obsahu olachindoxu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody zkoušení, spektrofotometrická (pro premixy) a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) (pro premixy i krmné směsi) (poznámka 8.1).

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení olachindoxu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Olachindox se stanoví ve vodném výluhu vzorku u premixů spektrofotometricky, nebo extrakcí směsí aceton-voda a vyčtení Carresových činidel, následujícím vytřepáním petroletherem, v premixech a krmných směsích metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 Pro metodu spektrofotometrickou (premixy)

3.1.1 Tlumivý roztok (Britton-Robinson)

Příprava: Odváží se 4,90 g kyseliny fosforečné (3.1.6), 2,40 g ledové kyseliny octové (3.1.7), 2,474 g kyseliny borité (3.1.8), rozpustí se a doplní na objem 1 000 ml. 100 ml tohoto promíchaného roztoku se smíchá s 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.9)

3.1.2 Olachindox, standardní substance se známou účinností

3.1.3 Olachindox, základní standardní roztok (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 50 mg standardní substance olachindoxu (3.1.2) 100% účinnosti

nebo přepočtené množství nižší účinnosti, rozpustí se v upravené vodě (3.1.4), doplní toutéž po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvý.

3.1.4 Upravená voda (čerstvě převařená a ochlazená destilovaná voda zbavená oxidu uhličitého)

3.1.5 Olachindox, pracovní standardní roztok (poznámka 8.1)

Příprava: Základní standardní roztok olachindoxu (3.1.3) se zředí 25krát upravenou vodou (3.1.4) tak, že tento roztok obsahuje 0,01 mg olachindoxu v 1 ml.

Připravuje se vždy čerstvý.

3.1.6 Kyselina fosforečná, 80% ($\rho = 1,633$ g/ml)

3.1.7 Kyselina octová, ledová ($\rho = 1,050$ g/ml)

3.1.8 Kyselina boritá

3.1.9 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 2$ mol/l

3.2 Pro metodu HPLC navíc (krmné směsi)

3.2.1 Aceton (poznámka 8.2)

3.2.2 Methylalkohol (poznámka 8.2)

3.2.3 Směs aceton-voda (9 + 1)

3.2.4 Carresovo činidlo I

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$, 3 g kyseliny octové ledové (3.1.7), doplní vodou po rysku a promíchá.

3.2.5 Carresovo činidlo II

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexakyanoželeznatanu draselného $(\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O})$, rozpustí ve vodě doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.2.6 Petrolether, bod varu 40 až 50 °C (poznámka 8.2)

3.2.7 Kyselina octová, roztok 1% ($\rho = 1,000$ g/ml)

3.2.8 Mobilní fáze [směs kyseliny octové (3.2.7) a methylalkoholu (3.2.2)] (9 + 1)

3.2.9 Olachindox, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 25,0 mg standardní substance olachindoxu (3.1.2) 100% účinnosti, nebo přepočtené množství nižší účinnosti, rozpustí se v asi 80 ml vody, doplní toutéž po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 0,25 mg olachindoxu.

3.2.10 Dusík žárovkárenský, kyslíku prostý

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Pro metodu spektrofotometrickou

4.1.1 Spektrofotometr registrační, vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.1.2 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.2 Pro metodu HPCL navíc

4.2.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (kolona pro chromatografii na re-

verzní fázi – např. BONDAPACK C18; 10 µm, 300 mm × 3,9 mm – např. WATERS)

4.2.2 Třepačka mechanická laboratorní

4.2.3 Odparka vakuová, rotační

4.2.4 Filtr s fritou S₄

4.2.5 Lázeň vodní s termostatem

4.2.6 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.2.7 Odpařovací baňka vhodného objemu

5. Postup

5.1 Metoda spektrofotometrická (premixy)

Do odměrné baňky na 200 ml se odváží asi 1 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se asi 100 ml upravené vody (3.1.4) a intenzivně se promíchává na míchačce (4.1.2) při laboratorní teplotě po dobu 15 minut. Potom se baňka doplní upravenou vodou (3.1.4) po rysku, promíchá a po 15 minutovém stání se obsah baňky filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z dalšího podílu filtrátu se odpipetuje alikvotní podíl tak, aby koncentrace olachindoxu, s ohledem na předpokládaný (deklarovaný) obsah ve zkoušeném vzorku, byla v odměrné baňce, do které je pipetováno, přibližně stejná jako u pracovního standardního roztoku olachindoxu (3.1.5). Zředí se vždy jen upravenou vodou (3.1.4).

Absorbance se měří na registračním spektrofotometru (4.1.1) v rozmezí vlnových délek 333 nm až 400 nm. Za naprosto shodných podmínek se měří absorbance pracovního standardního roztoku olachindoxu (3.1.5).

5.2 Metoda vysokoúčinné chromatografie (krmné směsi)

5.2.1 Kalibrace a měření (poznámka 8.3)

Do sady odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje diferencované 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 ml standardního roztoku olachindoxu (3.2.9), doplní vodou po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 a 15,0 µg olachindoxu v 1 ml.

5.2.1.1 Pracovní podmínky:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok mobilní fáze	2 ml/min.
Detekce UV vlnová délka	372 nm
Injektovaný objem	20 µl
Retenční čas (při použité koloně)	10 až 15 min.

5.2.1.2 Kalibrační roztoky (resp. alikvotní podíl roztoku zkoušeného vzorku) se nastříkují na kolonu a eluují se pomocí mobilní fáze (3.2.8). Z více nástřiků a jimi provedených chromatografických záznamů se zjistí průměrné hodnoty píků olachindoxu a to jak u kalibračních roztoků tak i roztoku zkoušeného vzorku. Zjištěné hodnoty u kalibračních roztoků se použijí k sestavení kalibračního grafu.

Koncentrace roztoku zkoušeného vzorku se zjistí z kalibračního grafu.

5.2.2 Vlastní provedení

Do kuželové baňky na 250 ml se odváží takové množství zkušebního vzorku, které obsahuje podle předpokládaného (deklarovaného) obsahu olachindoxu ve zkoušeném vzorku asi 0,5 mg ola-

chindoxu, s přesností nejméně na 0,001 g, přičemž navážka zkušebního vzorku musí být nejméně 2 g (případná úprava na požadované množství ředěním). Do baňky se přidá přesně 90,0 ml směsi aceton–voda (3.2.3), baňka se uzavře zátkou a po dobu dvou hodin se intenzivně protřepává na třepačce (4.2.2). Pak se k suspenzi přidá 5 ml Carresova činidla I (3.2.4), promíchá a 5 ml Carresova činidla II (3.2.4). Po opětovném promíchání se suspenze filtruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž prvních asi 10 ml se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se odpipetuje 50 ml do odpařovací baňky (4.2.7) a roztok se na odparce (4.2.3) odpaří na objem asi 5 ml při teplotě nejvýše 50 °C. Zbytek po odpaření se pomocí 25 ml vody a 50 ml petroletheru (3.2.6) (poznámka 8.4) převede do dělicí nálevky na 100 ml a protřepe. Po oddělení fází se spodní vodná fáze převede do druhé dělicí nálevky, opět se přidá 50 ml petroletheru (3.2.6) a znovu protřepe. Vodní fáze se převede do odměrné baňky na 50 ml, probublá dusíkem (3.2.10) a zahřeje na vodní lázni (4.2.5) při teplotě poněkud nižší než 60 °C pro odstranění stop petroletheru. Po ochlazení se odměrná baňka doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje za sníženého tlaku (4.2.6) přes filtr s fritou (4.2.4).

Dále se postupuje podle odstavce 5.2.1.1 a 5.2.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah olachindoxu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot 10^3 \cdot A_s \cdot F \cdot C_s}{A_s \cdot m}$$

kde A je korigovaná hodnota absorbance zkoušeného vzorku
A_s korigovaná hodnota absorbance pracovního standardního roztoku olachindoxu
C_s koncentrace olachindoxu v pracovním standardním roztoku v mg
F faktor ředění roztoku zkoušeného vzorku
m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Korigovaná hodnota absorbance standardu i zkoušeného vzorku se určí následovně:

Ze záznamu spektrofotometrické křivky se zjistí (a to jak u standardu, tak i zkoušeného vzorku) absorbance při vlnové délce 333 nm (= A₃₃₃), při vlnové délce 400 nm (= A₄₀₀) a při maximu absorpce (obvykle 375 nm = A_{max}) a korigovaná hodnota absorbance (A_s) se vypočte podle vzorce:

$$A_s = A_{\max} - (0,6269 \cdot A_{400} + 0,3731 \cdot A_{333})$$

6.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Obsah olachindoxu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{100 \cdot C}{m}$$

kde C je koncentrace olachindoxu v měřeném roztoku zkoušeného vzorku v µg/ml
m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy (spektrofotometrická metoda)

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi (metoda HPLC)

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Roztoky olachindoxu jsou značně fotolabilní, proto se baňky obalují hliníkovou folií a pracuje se při tlumeném světle. Nelze rovněž je uchovávat do druhého dne.

Záznam spektra v oblasti vlnových délek 333 až 500 nm lze využít jako kvalitativní důkaz přítomnosti olachindoxu ve zkoušeném vzorku. Posuzuje se charakteristický průběh a poloha maxima ve srovnání se záznamem spektra standardu.

8.2 Petrolether a methylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, methylalkohol je navíc nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.3 S ohledem k vysoké fotolabilitě olachindoxu je nutné zkoušení provádět za omezeného přístupu UV záření.

8.4 Místo petroletheru je možno použít hexan.

1.5 Stanovení obsahu monenzinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení monenzinu v premixech a krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice: Monenzin je fermentační produkt kmene *Streptomyces cinnamonensis* a jeho sodná sůl, chemického složení $C_{30}H_{61}O_{11}Na$, se používá jako kokcidiostatikum.

2. Princip

Monenzin se stanoví na základě jeho inhibičního účinku na testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)

3.2 Extrakční roztok, ethylalkohol (3.1) – aceton – voda, směs (12 + 5 + 3) (poznámka 8.1)

3.3 Ředící roztok, ethylalkohol (3.1) – voda, směs (1 + 9)

3.4 Oxid hlinitý, bázičský, pro sloupcovou chromatografii, grade F 20

3.5 Síran draselný, krystalický

3.6 Monenzin, standardní substance – sodná sůl monenzinu s účinností vyjádřenou v obsahu čistého monenzinu.

Originální ampule se uchovávají v temnu při 5 °C.

3.7 Monenzin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží takové množství práškové standardní substance monenzinu (3.6) s přesností nejméně na 0,001 g, tak, aby s ohledem na deklarovanou účinnost byla koncentrace monenzinu – kyseliny 1 mg v 1 ml. Přidá se asi 45 ml extrakčního roztoku (3.2) a po rozpuštění se doplní (extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá. Je stálý 2 týdny při teplotě 5 °C a v temnu.

3.8 Monenzin, pracovní standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 20 ml základního standardního roztoku monenzinu (3.7), doplní ředícím roztokem (3.3) po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 20 ml do odměrné baňky na 100 ml, doplní vodou po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvý.

Tento roztok obsahuje 16 µg monenzinu v 1 ml.

3.9 Monenzin, pracovní standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku monenzinu (3.7), doplní extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá. Připravuje se vždy čerstvý.

Tento roztok obsahuje 100 µg monenzinu v 1 ml.

3.10 Chlorid sodný, pevný

3.11 Fyziologický roztok

Příprava: 8,0 g chloridu sodného (3.10) se rozpustí, doplní na 1 000 ml a sterilizuje 20 minut při 121 °C

3.12 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Příprava a udržování kmene: Kultura se uchovává na šikmé udržovací půdě (3.14.2) při teplotě 5 °C a 1krát měsíčně se přeočkovává. Po přeočkování se vždy inkubuje po dobu 24 h při teplotě 37 °C v termostatu (4.6).

3.13 Sporová suspenze testovacího mikroorganismu

Příprava sporové suspenze: Kultura vyrostlá na šikmém agaru se smyje asi 3 ml fyziologického roztoku (3.11) a přenes se asepticky do Rouxových láhví (4.11), obsahujících sporulační půdu (3.14.1). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.11) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dnů. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.13) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.11) odstředí (4.7), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.11), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.7). Toto promývání spor se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spor převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spor představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.14 Živné půdy

3.14.1 Sporulační půda, živný agar č. 2 sušený SEVAC

Příprava: 40 g živného agaru se rozpustí v 1 000 ml teplé vody, přidá se 400 mg síranu manganatého (3.15), povaří se, rozdělí po 250 ml do Rouxových láhví (4.11) a sterilizuje 20 minut při tlaku 0,05 MPa a teplotě 110 °C.

3.14.2 Udržovací půda, živná agar č. 2 SEVAC

Příprava: Stejná jako u sporulační půdy (3.14.1) kromě přidavku síranu manganatého, před sterilací se rozdělí do zkumavek po 7 až 9 ml a po sterilizaci se nechá utuhnout v šikmé poloze.

3.14.3 Testovací půda

Příprava: 0,7 g hydrogenfosforečnanu draselného, 0,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného 10,0 g glukosy, 15,0 g agaru (nebo Bacto-agaru Difco) a 2,5 g kvasničného autolyzátu „SEVAC“ se rozpustí v 1 000 ml vody, pH upraví na hodnotu 6,0 a rozlijí po 300 ml do baněk na 500 ml. Sterilizuje se 15 minut při tlaku 0,05 MPa.

3.15 Síran manganatý, pevný

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm
- 4.2 Rám čtvercový kovový o délce vnitřní hrany 340 mm nebo 200 mm
- 4.3 Korkovrt průměru 9 mm
- 4.4 Vodováha
- 4.5 Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.6 Termostat vhodných parametrů
- 4.7 Odstředivka vhodných parametrů s příslušenstvím
- 4.8 Lázeň vodní s termostatem
- 4.9 Trubice chromatografická s kohoutem, délky 500 mm, vnitřní světlost 20 mm, bez frity
- 4.10 Vata AKUVER
- 4.11 Láhev Rouxova
- 4.12 Pipeta podle Pasteura
- 4.13 Laboratorní třepačka
- 4.14 Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se asi 2 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g do kuželové baňky na 250 ml, přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.1) (poznámka 8.2) a třepa se 15 minut na třepačce (4.13). Potom se suspenze zfiltruje nebo odstředí.

Supernatant se naředí ředícím roztokem na testovací koncentraci 8; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml (poznámka 8.4).

5.1.2 Paralelně se připraví z pracovního standardního roztoku (3.8) ředěním vodou testační koncentrace standardů 8; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml.

5.1.3 300 ml (70 ml) rozechláté testovací půdy (3.14.3) zchlazené asi na 60 °C se naočkuje sporovou suspenzí (3.13). Naočkováná půda se rozlijí na plotnu (4.1) opatřenou rámem a umístěnou ve vodorovné poloze (4.4). Po ztuhnutí agarové vrstvy se plotna uloží na 1 hodinu do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem v půdě 9 × 9 (6 × 6) jamek, do nichž se vnášejí jednotlivé testované roztoky a testační standardy Pasteurovou pipetou (4.12). Standardy se plní do 3 řad pod sebou ve středu plotny, testované roztoky zkoušeného vzorku po obou stranách odpovídající koncentraci standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hodin při 37 °C.

Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Odváží se 10 až 20 g zkušební vzorku s přesností 0,01 g do kuželové baňky na 250 ml, přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.1) (poznámka 8.3) a nechá se volně extrahovat 3 hodiny za občasného promíchání nebo přes noc v chladničce. Po skončení extrakce se roztok zfiltruje.

5.2.2 Příprava chromatografické kolony: Na dno chromatografické trubice se vloží malý smotek vaty AKUVER (4.10), vsype se oxid hlinitý (3.4), a to po několika vrstvách, z nichž každá se mírně stlačí, do výše asi 7 cm. Potom se kvantitativně převede na kolonu 25 ml filtrátu a nechá protékat. Sloupec se promývá dalšími podíly extrakčního roztoku (3.2) po dávkách 5 ml. Eluát se jímá do odměrné baňky na 50 ml, tato se doplní extrakčním roztokem (3.2) po rysku a promíchá.

Dále se ředěním ředícím roztokem (3.3) připraví testovací koncentrace 8; 4 a 2 µg monenzinu v 1 ml (poznámka 8.4).

5.2.3 Vedle toho se připraví standardní kalibrační roztoky: 20 až 25 ml pracovního standardního roztoku (3.9) se převede na chromatografický sloupec (4.9) a eluuje stejně, jak uvedeno v odstavci 5.2.2.

5.2.4 300 ml (70 ml) rozechláté půdy (3.14.3) a zchlazené asi na 60 °C se naočkuje sporovou suspenzí (3.13). Naočkováná půda se rozlijí na plotnu (4.1) opatřenou rámem (4.2) utěsněným malým množstvím agarové půdy a umístěnou ve vodorovné (4.4) poloze. Po ztuhnutí agaru se uloží plotna (4.1) na 1 hodinu do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí v půdě korkovrtem (4.3) 9 × 9 (6 × 6) jamek asi 25 až 30 mm od sebe, do kterých se vnášejí jednotlivé testované roztoky a testační roztoky standardů. Standardy se plní do 3 (2) řad pod sebou ve středu plotny, po obou stranách se plní do 3 (2) řad testované roztoky zkoušeného vzorku, odpovídající svou koncentrací příslušnému ředění standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 18 až 20 hodin při teplotě 37 °C v termostatu (4.6). Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah monenzinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol a aceton jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Navážka zkušební vzorku i objem extrakčního roztoku je možno upravit s ohledem na deklarovaný obsah monenzinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace monenzinu ve výluhu byla minimálně 10 µg/1 ml.

8.3 Maximální hmotnost navážky krmné směsi je 40 g. Pokud při této navážce není možno dosáhnout požadované koncentrace monenzinu ve výluhu 10 µg/ml, je třeba do postupu zařadit odpaření určitého množství filtrátu na vakuové odparce při teplotě maximálně 40 °C. Odparek se rozpustí v extrakčním roztoku (3.2) a dále se postupuje podle bodu 5.2.2.

8.4 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.6 Stanovení obsahu monenzinu

Tato metoda je uvedena v Journal of Association of Official Analytical Chemists 71,(3), 480-488 (1988).

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení monenzinu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Monenzin se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem hexan-octan ethylnatý metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s postkolonovou derivatizací.

1.7 Stanovení obsahu salinomycinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení salinomycinu v premixech a krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice: Salinomycin je stimulant růstu a antikocidikum. Po chemické stránce je to sodná sůl polyetheru kyseliny monokarboxylové, sumárního vzorce $C_{42}H_{60}O_{11}Na$, produkované kmenem *Streptomyces albus*.

2. Princip

Salinomycin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)

3.2 Ethylalkohol 90% (poznámka 8.1)

3.3 Ethylalkohol 25%

3.4 Fyziologický roztok

Příprava: 8,0 g chloridu sodného (3.10) se rozpustí, doplní na 1 000 ml a sterilizuje 20 minut při 120 °C.

3.5 Síran manganatý ($MnSO_4$), pevný

3.6 Oxid hlinitý, bázecký pro sloupcovou chromatografii

3.7 Salinomycin, standardní substance o známé účinnosti

3.8 Salinomycin, základní standardní roztok (pro premixy i krmné směsi)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží takové množství standardní substance salinomycinu (3.7), s ohledem na deklarovanou účinnost, s přesností nejméně na 0,001 g, které vytvoří koncentraci salinomycinu 1 mg v 1 ml. Toto vypočtené a navážené množství se rozpustí v 96% ethylalkoholu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce při 4 °C a takto uchován je roztok stabilní po dobu 14 dní.

3.9 Salinomycin, pracovní standardní roztok

Příprava: Ze základního standardního roztoku salinomycinu se vhodným ředěním 25% ethylalkoholem (3.3) připraví testovací koncentrace 4; 2 a 1 µg v 1 ml (poznámka 8.3).

3.10 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Příprava a udržování kmene: Základní kmen je udržován pravidelným přeočkováním na šikmém masopeptonovém agar, inkubován při teplotě 37 °C 18 až 24 hodin a uchováván při teplotě 4 °C.

3.11 Živné médium č. 1 pro pěstování testovacího kmene

Složení:	Pepton	6,0 g
	Pankreat.hydrolyzát kaseinu	4,0 g
	Extrakt kvasničný	3,0 g
	Extrakt masový	1,5 g
	Glukosa	1,0 g
	Agar	12,0 g

Voda doplnit do 1 000 ml Sterilizuje se 15 minut při teplotě 121 °C.

3.12 Sporová suspenze testovacího mikroorganismu

Příprava: Nárůst kultury na šikmém agar se smyje 3 ml fyziologického roztoku (3.4) a přenese asepticky do Rouxovy láhve (4.11) obsahující 300 ml živného média č. 1 (3.11), ke kterému se přidalo 300 mg síranu manganatého (3.5). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu živného média.

Takto připravené Rouxovy láhve (4.11) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dní. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.13) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.4) odstředí (4.4), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.4), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.4). Toto promývání spor se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spor převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spor představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22-mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.13 Živné médium č. 2 pro vlastní testaci – testovací půda

Složení: Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)	0,69 g
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)	0,45 g
Extrakt kvasničný	2,5 g
Glukosa	10,0 g
Agar	12,0 g

Voda doplnit do 1 000 ml Sterilizuje se 15 minut při teplotě 121 °C.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm
- 4.2 Rám kovový 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm
- 4.3 Korkovrt o průměru 9 mm
- 4.4 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím
- 4.5 Termostat vhodné velikosti
- 4.6 Třepačka laboratorní
- 4.7 Podložka vyrovnávací regulovatelná
- 4.8 Vodováha
- 4.9 Pipety podle Pasteura
- 4.10 Trubice chromatografická s kohoutem, průměr 20 mm bez frity
- 4.11 Láhev Rouxova na 1 000 ml
- 4.12 Měřítka posuvná
- 4.13 Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se asi 10 g zkušebního vzorku s přesností 0,01 g do kuželové baňky na 250 ml (poznámka 8.2), přidá se přesně 100 ml ethylalkoholu (3.2) a 30 minut se protřepává na třepačce (4.6). Filtruje se přes suchý středně hustý filtr do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se dále ředí ethylalkoholem (3.3), s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah salinomycinu ve zkoušeném vzorku, na koncentrace 4; 2 a 1 µg salinomycinu v 1 ml (poznámka 8.3).

5.1.2 Testovací plotna se připraví následovně:

Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) s kovovým rámem (4.2) utěsněným malým množstvím agarové půdy, upraveným do vodováhy (4.8), se nalije 60 nebo 300 ml (podle velikosti použité plotny) rozehřáté testovací půdy (živné médium č. 2 – 3.13), která je ochlazená na teplotu 60 °C a naočkována vhodným množstvím sporové suspenze testovacího mikroorganismu (3.12). Po utužení agarové vrstvy se plotna (4.1) vloží na 1 hod. do chladničky. Potom se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.3) v půdě 6 × 6 nebo 9 × 9 jamek, do nich se vnášejí vzorky i standardy pomocí Pasteurových pipet (4.9). Testační koncentrace standardu (3.9) se plní do tří nebo dvou řad ve středu plotny, testované koncentrace vzorku (viz 5.1.1) po obou stranách plotny na strany odpovídající příslušnému ředění standardu. Plotny (4.1) se inkubují 16 až 18 hod. při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem (4.12) s přesností na 0,1 mm.

5.2. Krmné směsi

5.2.1 Do kuželové baňky vhodného objemu (poznámka 8.2) se odváží asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,01 g (poznámka 8.2), přidá se určené přesné množství (poznámka 8.2) ethylalkoholu (3.2) a 30 minut se vytřepává na třepačce (4.6). Vzniklá suspenze se převede na chromatografickou kolonu, která je připravena tak, že do chromatografické trubice (4.10) ve svislé poloze se na dno vloží smotek vaty, trubice se naplní do výšky asi 75 mm oxidem hlinitým (3.6). Eluát se dále ředí ethylalkoholem (3.3) s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah salinomycinu ve zkoušeném vzorku, na koncentrace 4; 2 a 1 µg salinomycinu v 1 ml (poznámka 8.3).

Dále se postupuje podle 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah salinomycinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržovat bezpečnostní pravidla

8.2 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah salinomycinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace salinomycinu ve výtahu byla 10 µg/1 ml.

8.3 Výtahy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.8 Stanovení obsahu salinomycinu

Tato metoda je uvedena v Journal of Association of Official Analytical Chemists 71,(3), 480-488 (1988).

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení salinomycinu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Salinomycin se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem hexan-octan ethylnatý metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s postkolonovou derivatizací.

1.9 Stanovení obsahu tylosinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 153, 29/05/72.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení tylosinu v pre-mixech a krmných směsích (poznámka 8.1).

2. Princip

Na vzorek je působeno horkým fosforečnanovým tlumivým roztokem, potom je extrahován ethylalkoholem, odstředěn tylosin se stanoví na základě inhibičního účinku na růst mikroorganismu *Micrococcus varians* ATCC 9341 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), pevný

3.2 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), pevný

3.3 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.2)

3.4 Médium antibiotické č. 1 (fa OXOID) (poznámka 8.3)

3.5 Agar

3.6 Pepton pro bakteriologii

3.7 Autolýzát kvasničný

3.8 Beef extrakt

3.9 Kasein enzymatický, hydrolyzát

3.10 Glukosa

3.11 Živný agar č. 2

3.12 Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 7,0

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 13,6 g hydrogenfosforečnanu draselného (3.1) a 5,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2), rozpustí ve vodě, toutéž doplní po rysku a promíchá.

3.13 Tlumivý roztok fosforečnanový o pH 8,0

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 16,7 g hydrogenfosforečnanu draselného (3.1) a 0,5 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2), rozpustí ve vodě, doplní toutéž po rysku a promíchá (poznámka 8.4).

3.14 Tylosin, standardní substance známé aktivity

3.15 Tylosin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží tolik standardní substance tylosinu (3.14), s ohledem na deklarovanou účinnost, s přesností nejméně na 0,001 g-tak, aby výsledná koncentrace tylosinu v 1 ml byla 1 mg (poznámka 8.5). Odvážené množství se rozpustí v 5 ml ethylalkoholu (3.3), doplní fosforečnanovým tlumivým roztokem o pH 7 (3.12) po rysku a promíchá.

Tento roztok uchovávaný v chladničce při teplotě 4 °C je stálý jeden týden.

3.16 Tylosin, pracovní standardní roztok

Příprava: Základní standardní roztok tylosinu (3.15) se naředí pomocí fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 8

(3.13) na koncentraci 100 g/ml a potom dále na testační koncentrace 4, 2 a 1 µg v 1 ml (poznámka 8.9).

3.17 Testovací mikroorganismus *Micrococcus varians* ATCC 9341 (CCM 552)

Uchování kmene: Ve zkumavkách na šikmém udržovacím agaru (3.19) při teplotě 5 °C, po třech týdnech se přeočkovává a kultivace se provádí 24 hod. při teplotě 37 °C.

Jeden den před použitím se přeočkuje na šikmý živný agar č.2 (3.11) a kultivuje 24 hod. při teplotě 37 °C.

Příprava suspenze k testování: Kultura kmene přeočkovaná jeden den před vlastním stanovením na živný agar č.2 (3.11) se převede 5 ml fyziologického roztoku (3.18) do sterilní zkumavky a touto suspenzí (asi 3 ml) se naočkuje rozehřátá živná půda (3.21) při teplotě 48 °C.

3.18 Fyziologický roztok

Příprava: 0,8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě, doplní vodou na 1 000 ml, promíchá a sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.19 Udržovací agar pro uchování kmene

Příprava: Odváží se 3,0 g peptonu pro bakteriologii (3.6)
2,0 g kaseinu enzymatického (3.9)
1,5 g autolýzátu kvasničného (3.7)
0,75 g beef extraktu (3.8)
0,5 g glukosy (3.10)
7,5 g agaru (3.5)

a tato směs se rozpustí v 1 000 ml vody, rozlije do zkumavek a sterilizuje 20 minut při teplotě 120 °C. Po sterilizaci se zkumavky vloží v šikmé poloze do ztuhnutí půdy.

3.20 Živný agar č. 2

Příprava: Odváží se 40 g živného agaru č. 2 (3.11), rozpustí v 1 000 ml vody, rozlije do zkumavek stejným způsobem jako udržovací agar (3.19).

3.21 Živná půda pro vlastní testaci

Příprava: Odváží se 30,5 antibiotického media č. 1 (3.4), rozpustí se v 1 000 ml vody, rozlije do kuželových baněk na 300 ml a sterilizuje se 20 minut v autoklávu (4.6) při teplotě 120 °C.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm

4.2 Rám kovový 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm

4.3 Korkovrt o průměru 9 mm

4.4 Termostat vhodné velikosti

4.5 Lázeň vodní s termostatem

4.6 Autokláv

4.7 Odstředivka s příslušenstvím

4.8 Třepačka laboratorní

4.9 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.10 Vodováha

4.11 Pipeta podle Pasteura

4.12 Chladnička

4.13 Odparka vakuová s příslušenstvím

5. Postup

Do kuželové baňky na 250 ml se odváží asi 10 g zkušební vzorku (poznámka 8.6) s přesností nejméně na 0,01 g a zalije 120 ml fosforečnanového tlumivého roztoku o pH 8 (3.13), ohřátého na 70 až 80 °C, umístí na vodní lázeň (4.5) o stejné teplotě a 10 minut se zahřívá. Potom se baňka umístí na třepačku (4.8) a 5 minut se protřepává. Po přidání 80 ml ethylalkoholu (3.3) se vytřepává opět 5 minut. Po ochlazení se roztok převede do odměrné baňky na 250 ml, doplní fosforečnanovým tlumivým roztokem o pH 8 (3.13) po rysku a promíchá. Filtruje se (poznámka 8.7) suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Další část filtrátu se naředí fosforečnanovým tlumivým roztokem o pH 8,0 (3.13), s ohledem na očekávaný obsah tylosinu ve zkoušeném vzorku, na testované koncentrace 4,0, 2,0 a 1,0 µg v 1 ml (poznámka 8.9).

Pro obsah tylosinu ve zkoušeném vzorku pod 10 mg/kg (poznámka 8.8) se alikvotní část extraktu převede do odpařovací baňky a odpaří za sníženého tlaku a teplotě 35 °C na odparce (4.13) do sucha. Odparek se rozpustí v ethylalkoholu (3.3) a potom se rozředí tímž na výše uvedené testované koncentrace.

Naočkovaná testovací živná půda (60 ml nebo 300 ml – podle velikosti použité plotny) se rozlije na skleněnou plotnu (4.1), opatřenou rámečkem (4.2) a utěsněnou malým množstvím agaru (3.5) a umístěnou ve vodorovné poloze. Po ztuhnutí agarové vrstvy se plotna uloží na 1 hod. do chladničky (4.12). Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.3) v půdě 6 × 6 nebo 9 × 9 jamek, do nichž se vnášejí testovací i testované koncentrace. Testovací koncentrace se plní do tří nebo dvou řad ve středu plotny (4.1), testované koncentrace zkoušeného vzorku po obou stranách plotny na strany odpovídající příslušnému ředění testovacího roztoku standardu. Plotna se inkubuje 16 až 18 hod. při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých inhibičních zón se měří s přesností nejméně na 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah tylosinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena. (poznámka 8.8)

8. Poznámky

8.1 Metoda EU uvádí mez stanovitelnosti 2 mg/kg

8.2 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.3 Metoda EU uvádí sterilní fyziologický salin.

8.4 Metoda EU uvádí směs tlumivého roztoku o pH 8 s methylalkoholem (6 + 4), která se navíc používá k ředění pro přípravu standardního roztoku i testovaných roztoků zkoušeného vzorku.

8.5 Metoda EU uvádí navíc vysušení standardní substance tylosinu po dobu 3 hodin ve vakuové sušárně (4.14) při teplotě 60 °C a testací koncentrace 1, 0,5 a 0,25 µg tylosinu v 1 ml.

8.6 Navážka zkušební vzorku se volí s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah tylosinu ve zkoušeném vzorku.

Metoda EU uvádí navážky u koncentrátů (s ohledem na obsah tylosinu ve zkoušeném vzorku) 10 g, u premixů a krmiv 20 g.

8.7 Metoda EU uvádí odstředění extraktu.

8.8 Metoda EU uvádí pro všechny obsahy 10 % relat.

8.9 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.10 Stanovení obsahu virginiamycinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 015, 18/10/84

1. Účel a použití

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení virginiamycinu v premixech a krmivech (poznámka 8.1).

Pro účely této metody se používá tato definice:

Virginiamycin je stimulant růstu, peptidové antibiotikum produkované kmenem *Streptomyces virginiae*, obchodním názvem Stafac.

2. Princip

Vzorek je extrahován směsí kyseliny citrónové a acetonu (poznámka 8.2) a po separaci pevného podílu se virginiamycin stanoví na základě inhibičního účinku na testovací mikroorganismus *Micrococcus varians* ATCC 9341 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Aceton (poznámka 8.3)

3.2 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), pevný

3.3 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), pevný

3.4 Kyselina citrónová, roztok $c(C_6H_8O_7 \cdot H_2O) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.5 Extrakt kvasničný

3.6 Kasein

3.7 Glukosa

3.8 Agar podle ČSL 4 nebo ekvivalentní čistoty

3.9 Agar živný č. 2 SEVAC nebo ekvivalentní účinnosti

3.10 Extrakční roztok – Kyselina citrónová (3.4) + aceton (3.1), směs (1 + 1) (poznámka 8.2)

3.11 Tlumivý roztok fosfátový o pH 6,0

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 2,00 g (poznámka 8.4) hydrogenfosforečnanu draselného (3.2) a 8,00 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.3), rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.12 Virginiamycin, standardní substance známé aktivity. Mikrobiologická aktivita 100 % odpovídá 1 000 µg/mg

3.13 Virginiamycin, základní standardní roztok

Příprava: Podle známé aktivity standardní substance virginiamycinu (3.12) se vypočte hmotnost navážky pro určitý objem tak, aby koncentrace v 1 ml byla 1 000 µg virginiamycinu. Toto odvážené množství s přesností nejméně na 0,001 g se rozpustí v extrakčním roztoku (3.10) (poznámka 8.5) a po rozpuštění se jím doplní na vypočtený objem a promíchá.

Tento standardní roztok má trvanlivost 4 týdny při uchování o teplotě 4 °C.

3.14 Virginiamycin, pracovní standardní roztok

Příprava: Stonásobným zředěním základního standardního roztoku (3.13) se připraví pracovní standardní roztok o koncentraci 10 µg virginiamycinu v 1 ml, ze kterého se připravují naředěním tlumivým roztokem (3.11) (poznámka 8.6) testační roztoky o koncentracích 2 µg; 1 µg a 0,5 µg v 1 ml.

Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

3.15 Živná půda pro uchovávání kmene a pro testování

Příprava: Odváží se: 40 g živného agarů č. 2 SEVAC (3.9)
3 g kvasničného extraktu (3.5)
4 g kaseinu (3.6)
1 g glukózy (3.7) a
4 g agarů podle ČSL 4 (3.8),

rozpuští za horka v 1 000 ml vody, hodnota pH se upraví na hodnotu 6,5. Pro testování se rozdělí do 300 ml kuželových baněk. Pro uchování kmene se rozdělí do zkumavek v dávkách po 7 ml.

Sterilizuje se 20 minut při teplotě 121 °C. Zkumavky po sterilizaci se uloží v šikmé poloze až do utuhnutí půdy.

3.16 Testovací mikroorganismus *Micrococcus varians* ATCC9341 (CCM 552)

Uchování kmene: Ve zkumavkách na šikmé živné půdě při teplotě 5 °C a každých 14 dní se přeočkovává a kultivace se provádí přes noc při teplotě 37 °C.

Příprava suspenze k testování: Kultura kmene, přeočkováná den před vlastním stanovením se převede 5 ml fyziologického roztoku (3.17) do sterilní zkumavky a touto suspenzí (asi 2 až 3 ml) se naočkuje rozehřátá živná půda při teplotě 48 °C až 50 °C a opatrně se promíchá.

3.17 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.18 Alkohol (poznámka 8.3)

3.19 Tween, methyllalkoholický roztok 5 g/l

3.20 Tlumivý fosforečnanový roztok (3.11) – methyllalkohol (3.18), směs (8 + 2)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm

4.2 Rám kovový (skleněný) čtvercový 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm

4.3 Korkovrt o průměru 9 mm

4.4 Vodováha

4.5 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.6 Odstředivka vhodné konstrukce

4.7 Autokláv

4.8 Třepačka

4.9 Termostat

4.10 pH metr

4.11 Pipeta podle Pasteura

4.12 Láhve Rouxovy na 1 000 ml

4.13 Odparka vakuová s příslušenstvím

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se příslušné množství (poznámka 8.7) zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,01 g a extrahuje se odpovídajícím objemem (poznámka 8.7) extrakčního roztoku (3.10) v kuželové baňce vhodného objemu na třepačce (4.8) po dobu 30 minut (poznámka 8.8). Pak se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Alternativně je možno extrakt separovat odstředěním (4.6). Potom se filtrát (supernatant) naředí tak, aby koncentrace podílu extraktu zkoušeného vzorku byla asi 5 µg/ml; na ředění se použije tlumivý roztok (3.11).

Vlastnímu stanovení se tento roztok dále ředí pomocí tlumivého roztoku (3.11) na koncentrace 2; 1 a 0,5 µg virginiamycinu v 1 ml (poznámka 8.10).

5.1.2 Naočkováná testovací živná půda (3.15) se rozlije na sterilní skleněnou plotnu (4.1) opatřenou kovovým, nebo skleněným rámem (4.2), utěsněnou malým množstvím agarové půdy a umístěnou ve vodorovné poloze (vodováha – 4.4). Po ztuhnutí agarové vrstvy se uloží plotna (4.1) na 1 hodinu do chladničky. Pak se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.3) 9 × 9 jamek, do nichž se vnášejí jednotlivé testační roztoky standardu virginiamycinu (3.14) a testované roztoky zkoušeného vzorku pipetou podle Pasteura (4.11). Testační roztoky standardu se plní do 3 středních jamek ve dvou řadách pod sebou a po obou stranách se plní testované roztoky zkoušeného vzorku, obdobně do dvou řad a to vždy k odpovídajícímu ředění standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hod. při teplotě 35 °C až 37 °C v termostatu.

5.1.3 Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm.

5.2 Krmiva (poznámka 8.8)

Do kuželové baňky vhodného objemu se odváží asi 50 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,01 g, přidá se přesně 200 ml extrakčního roztoku (3.19) a na třepačce (4.8) se vytřepává po dobu 30 minut. Potom se pevný podíl separuje odstředěním (4.6), odpipetuje se přesně 20 ml čirého supernatantu do odpařovací baňky, baňka se připojí k odparce (4.13) a při teplotě nepřesahující 40 °C se extrakt odpaří asi na 5 ml. Odparek se ředí směsí tlumivého fosforečnanového roztoku a methyllalkoholu (3.20) tak, aby výsledný roztok měl koncentraci, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah virginiamycinu ve zkoušeném vzorku, přibližně 1 µg/ml.

Z tohoto roztoku se naředěním pomocí směsi tlumivého fosforečnanového roztoku s methyllalkoholem (3.20) připraví testované koncentrace 0,5, 0,25 a 0,125 µg virginiamycinu v 1 ml (poznámka 8.10).

Dále se postupuje podle 5.1.2 a 5.1.3.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah virginiamycinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena (poznámka 8.9).

8. Poznámky

8.1 Metoda EU uvádí mez stanovitelnosti 2 mg/kg.

8.2 Metoda EU uvádí extrakční roztok methylalkoholický roztok Tweenu (3.19)

8.3 Aceton a methylalkohol jsou nebezpečnými hořlavými I. třídy, proto je nutné při jakékoli manipulaci dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.4 Metoda EU používá ke zředování směsi tlumivého fosforečnanového roztoku a methylalkoholu (3.20).

8.5 Metoda EU používá k rozpouštění (ředění) methylalkohol (3.18).

8.6 Metoda EU používá k ředění na testační koncentrace směs tlumivého fosforečnanového roztoku s methylalkoholem (3.20).

8.7 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah virginiamycinu tak, aby výsledná koncentrace virginiamycinu ve výluhu byla minimálně 10 µg/ml.

Metoda EU uvádí navážku 10 až 20 g pro materiály s obsahem pod 50 mg/kg nebo navážku 1 až 10 g pro materiály s obsahem nad 50 mg/kg

8.8 Metoda EU uvádí tento postup jako univerzální pro premixy i krmiva (s výjimkou navážky zkušebního vzorku).

8.9 Metoda EU uvádí pro obsahy virginiamycinu

do 10 mg/kg	opakovatelnost	2 mg/kg
od 10 do 25 mg/kg		20 % relat
od 25 do 50 mg/kg		5 mg/kg
nad 50 mg/kg		10 % relat

8.10 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

1.11 Stanovení obsahu zinku bacitracinu difúzí na agaru

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení zinku bacitracinu v premixech.

2. Princip

Zink bacitracinu se stanoví difúzní plotnovou metodou na základě inhibičního účinku na růst testovacího mikroorganismu *Micrococcus luteus* ATCC 10 240.

3. Chemikálie

3.1 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4), pevný

3.2 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4), pevný

3.3 Kyselina fosforečná, roztok $c(H_3PO_4) = 0,3 \text{ mol/l}$

3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(HCl) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.5 Voda destilovaná, sterilní

3.6 Hydroxid draselný, roztok $c(KOH) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.7 Živný agar č. 2

3.8 Kvasničný autolyzát

3.9 Masopeptonový agar

3.10 Tlumivý roztok o pH 6,5

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 27,85 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2), 22,15 g hydrogenfosforečnanu draselného (3.1), rozpustí ve vodě, toutéž doplní po rysku a promíchá.

3.11 Zn bacitracin, standardní substance o známé aktivitě

3.12 Zn bacitracin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odváží takové množství standardní substance Zn bacitracinu (3.11), s ohledem na deklarovanou aktivitu v m.j./g, s přesností nejméně na 0,0001 g tak, aby množství Zn bacitracinu v tomto objemu bylo 2 500 m.j. Výpočet navážky v mg (m) se provede podle vzorce:

$$m = \frac{2500 \text{ m.j.}}{y}$$

kde y je deklarovaná aktivita v m.j./mg

K odváženému množství se přidá 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.4), 25 ml roztoku hydroxidu draselného (3.6), 5 ml tlumivého roztoku (3.10), doplní vodou po rysku a promíchá.

Tento základní standardní roztok Zn bacitracinu obsahuje v 1 ml 50 m.j. Zn bacitracinu a je stabilní po dobu dvou týdnů při uložení v chladničce.

3.13 Zn bacitracin, kalibrační (testační) roztoky

Příprava: Základní standardní roztok Zn bacitracinu (3.12) se zředí tlumivým roztokem (3.10) na koncentrace 2; 1 a 0,5 m.j. v 1 ml (poznámka 8.1).

3.14 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.15 Testovací mikroorganismus *Micrococcus luteus* ATCC 10 240

Příprava a udržování kmene: Základní kmen je udržován pravidelným přeočkováním na šikmém masopeptonovém agaru (3.9), inkubován 18 až 24 hod. při teplotě 37 °C a uchováván při teplotě 4 °C.

Příprava sporové suspenze: Kultura kmene, přeočkována den před vlastním stanovením, se převede 5 ml fyziologického roztoku (3.14) do sterilní zkumavky, touto suspenzí se naočkuje rozehřátá živná půda (3.16) při teplotě 50 °C a opatrně promíchá.

3.16 Živná půda pro vlastní testaci (testovací půda)

Složení: Živný agar č.2 (3.7) 40 g
Kvasničný autolýzát (3.8) 15 g
Voda do 1 000 ml

Sterilizuje se 30 minut při teplotě 115 °C

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm, nebo 250 mm × 250 mm

4.2 Rám kovový 340 mm × 340 mm, nebo 200 mm × 200 mm

4.3 Třepačka laboratorní

4.4 Korkovrt o průměru 9 mm

4.5 Termostat vhodné konstrukce

4.6 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.7 Vodováha

4.8 Pipeta podle Pasteura

4.9 Měřítka posuvná

5. Postup

Do kuželové baňky na 250 ml se odváží folik zkušební vzorku v mg (m) a s přesností nejméně na 1 mg, které se vypočítá podle vzorce:

$$m = \frac{5000 \text{ m.j.}}{y}$$

kde y je očekávaný (deklarovaný) obsah Zn bacitracinu ve zkoušeném vzorku v m.j./mg (poznámka 8.2)

K odváženému množství se přidá 50 ml roztoku kyseliny fosforečné (3.3) a po dobu 30 minut se vytřepává na třepačce (4.3). Pak se roztokem kyseliny fosforečné upraví pH na hodnotu 2,0 a vytřepává se opět po dobu 10 minut. Nato se extrakt doplní fyziologickým roztokem (3.14) tak, aby celkový objem byl 100 ml a promíchá se. Extrakt se nechá usadit a potom se pomocí ředění tlumivým roztokem (3.10) připraví testované koncentrace 2, 1 a 0,5 m.j./ml (poznámka 8.1). Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) s rámem (4.2), utěsněným malým množstvím agarové půdy (3.16) a umístěné do vodováhy (4.7) se nalije 300 nebo 60 ml (podle velikosti použité plotny) rozehřáté testovací půdy (3.16) ochlazené na 50 °C a na očkované vhodné množství suspenze (3.15) spór. Po utužení půdy se plotna (4.1) umístí na 1 hod. do chladničky. Do zchlazené půdy se korkovrtem (4.4) v pravidelných vzdálenostech vyhloubí 9 × 9 nebo 6 × 6 jamek, do nichž se vnášejí jednotlivé kalibrační roztoky (testační koncentrace) a testované koncentrace zkoušeného vzorku pomocí Pasteurovy pipety. Kalibrační roztoky se vnášejí do tří nebo dvou řad ve středu plotny, testované roztoky zkoušeného vzorku příslušné koncentrace k odpovídajícím koncentracím kalibračních roztoků po obou stranách plotny. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 18 hod. při teplotě 37 °C.

Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem (4.9) s přesností nejméně na 0,1 mm. Ze získaných hodnot měření se vypočítá průměrná hodnota velikosti zón jednotlivých koncentrací pro standard i zkoušený vzorek.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah zinku bacitracinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Vlivy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

8.2 Je-li předpokládán obsah Zn bacitracinu ve zkoušeném vzorku uveden v mg/g, je nutné jej přepočítat vzhledem k deklarované účinnosti standardní substance na 1 m.j./g.

1.12 Stanovení obsahu zinku bacitracinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 015, 18/01/84

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení Zn bacitracinu v krmivech, proteinových koncentrátech a premixech. Mez stanovitelnosti metody je 5 mg/kg (5 ppm) (poznámka 8.1).

2. Princip

Vzorek je extrahován při pH 2 směsí okyseleného zředěného methylalkoholu, vysrážením sulfidem sodným je eliminován rušivý vliv ve vodě rozpustných měďnatých solí. Zn bacitracin se stanoví na základě inhibičního účinku mikroorganismu *Micrococcus luteus* (flavus) difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Mikroorganismus *Micrococcus luteus* (flavus) ATCC 10 240

3.1.1 Udržování kmene: Základní kmen (3.1) je udržován na šikmém masopeptonovém agaru (culture medium) (3.2.1), inkubován 24 hod. při teplotě 30 °C a uchovává se v chladničce při teplotě 4 °C a přeočkovává se vždy po dvou týdnech.

3.1.2 Příprava bakteriální suspenze (poznámka 8.2): Kultura narostlá na šikmém masopeptonovém agaru (3.2.1) se smíchá s 2–3 ml fyziologického roztoku (3.3), touto suspenzí se naočkuje 250 ml masopeptonového agaru (3.2.1) v Rouxově lahvi (4.5) a inkubuje 18 až 20 hodin při teplotě 30 °C. Narostlá kultura se smíchá s 25 ml fyziologického roztoku (3.3) a vzniklá suspenze se rozředí tímto roztokem (1 + 10). Propustnost této suspenze, měřená při vlnové délce 650 nm v květě o optické délce 10 mm, musí být alespoň 75 %.

Tato suspenze je stálá při teplotě 4 °C po dobu jednoho týdne (poznámka 8.2).

3.2 Živné půdy a činidla

3.2.1 Masopeptonový agar (poznámka 8.3)

Složení: Masový pepton 6,0 g
Trypton 4,0 g
Extrakt kvasničný 3,0 g
Extrakt masový 1,5 g
Glukosa 1,0 g
Agar 10,0 až 20,0 g
Voda doplnit do 1 000 ml

Směs se sterilizuje a pH po sterilizaci má být 6,5.

3.2.2 Testovací půda (poznámka 8.3)

Složení: 1,2-trypton 10,0 g
Extrakt kvasničný 3,0 g
Extrakt masový 1,5 g
Glukosa 1,0 g
Agar 10,0 až 20,0 g
Voda doplnit do 1 000 ml

Směs se sterilizuje a pH po sterilizaci má být 6,5.

3.3 Chlorid sodný, roztok 8 g/l (sterilizovaný)

3.4 Kyselina chlorovodíková, konc. ($h = 1,17$ g/ml)

3.5 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,1$ mol/l

3.6 Methylalkohol (poznámka 8.4), kyselina chlorovodíková (3.4) – voda, směs (80 + 17,5 + 2,5)

3.7 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 1$ mol/l

3.8 Sulfid sodný, roztok $c(\text{Na}_2\text{S}) = \text{asi } 0,5$ mol/l

3.9 Indikátor bromkrezolová violet, roztok 0,4 g/l v roztoku hydroxidu sodného

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 0,1 g bromkrezolové violeti, rozpustí v 18,5 ml 0,01 mol/l hydroxidu sodného, doplní po rysku vodou a promíchá.

3.10 Tlumivý roztok fosforečnanový o pH = 6,5

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 22,15 g dihydrogenfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 27,85 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), rozpustí ve vodě, toutéž doplní po rysku a promíchá.

3.11 Zn bacitracin, standardní substance o známé aktivitě

3.12 Zn bacitracin, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odváží množství standardní substance zinku bacitracinu (3.11), s ohledem na její aktivitu, odpovídající 1 050 m.j., přidá se 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.5), promíchá a ponechá stát 15 minut. Pak se přidá 30 ml vody, pomocí tlumivého roztoku (3.10) se upraví pH na 4,5 (asi 4 ml), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku odpovídá 21 m.j. Zn bacitracinu.

3.13 Zn bacitracin, kalibrační roztoky (testační koncentrace)

Příprava: Ředěním standardního roztoku Zn bacitracinu (3.12) pomocí tlumivého roztoku (3.10) se připraví testační koncentrace 0,42; 0,21; 0,105 a 0,0525 m.j./ml (poznámka 8.1)

3.14 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná, 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm (poznámka 8.5)

4.2 Rám kovový, 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm

4.3 Třepačka laboratorní

4.4 Termostat vhodné konstrukce

4.5 Láhev Rouxova

4.6 pH metr s příslušenstvím

4.7 Odstředivka laboratorní

4.8 Odparka rotační vakuová

4.9 Baňka odpařovací vhodného objemu (viz 4.8)

4.10 Pipeta podle Pasteura

5. Postup

5.1 Premixy a minerální krmiwa

5.1.1 Do kuželové baňky vhodného objemu se odváží asi 2 až 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 29,0 ml směsi methylalkohol–kyselina chlorovodíková–voda (3.6), přesně 1,0 ml roztoku sulfidu sodného (3.8) a krátce se promíchá. Po zkontrolování pH (má být asi 2) se obsah vytřepává na třepačce (4.3) po dobu 10 minut, přidá se přesně 30 ml tlumivého roztoku (3.10) a opět se vytřepává 15 minut. Pak se odstředí (4.7). Ze supernatantu se odpipetuje vhodný alikvotní podíl do odměrné baňky takového objemu, aby s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah Zn bacitracinu ve zkoušeném vzorku a po doplnění na tento objem byla získána koncentrace asi 0,42 m.j. Zn bacitracinu v 1 ml. Obsah baňky se doplní tlumivým roztokem (3.10) po rysku a promíchá.

5.1.2 Testovací půda (3.2.2) se naočkuje bakteriální suspenzí (3.1.2) při teplotě přibližně 48 °C. Po předběžných zkouškách na plotnách (4.1) s testovací půdou a různými koncentracemi Zn bacitracinu za účelem zjištění co nejčistších a největších inhibičních zón, se zjistí potřebné množství bakteriální suspence (3.1.2).

Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) (poznámka 8.5) se vlije takové množství testovací půdy naočkované, jak výše uvedeno, aby se vytvořila vrstva asi 2 mm tlustá (např. 60 ml na plotnu o rozměrech 250 mm × 250 mm), po usazení se vyhloubí jamky o rozměrech asi 10 až 13 mm a ve vzdálenostech asi 30 mm, do nich se vnáší pipetou dle Pasteura (4.10) jednotlivé koncentrace kalibračních roztoků standardu i extraktu zkoušeného vzorku v množství 0,10 nebo 0,15 ml podle velikosti jamek. Každá koncentrace se dává 4krát, takže jedno stanovení vyžaduje 32 inkubačních zón. Plotna se inkubuje v termostatu (4.4) při teplotě 30 °C po dobu 16 až 18 hod. Jednotlivé inhibiční zóny se měří s přesností nejméně na 0,1 mm.

5.2 Proteinové koncentráty

Do kuželové baňky vhodného objemu se odváží přesně 10,00 g zkušebního vzorku, přidá se přesně 49,0 ml směsi methylalkohol–kyselina chlorovodíková–voda (3.6), přesně 1,0 ml roztoku sulfidu sodného (3.8) a krátce se promíchá. Po kontrole pH (má mít hodnotu asi 2) se obsah vytřepává na třepačce (4.3) po dobu 10 minut, přidá se přesně 50,0 ml tlumivého roztoku (3.10), opět se vytřepává 15 minut a pak se obsah baňky odstředí (4.7). Ze supernatantu se odpipetuje vhodný alikvotní podíl do odpařovací baňky (4.9), roztokem hydroxidu sodného (3.7) a pomocí pH metru (4.6) nebo indikátoru (3.9) se upraví pH na hodnotu 6,5 a na od-

parce (4.8) při teplotě nepřesahující 35 °C se roztok odpaří na cca poloviční objem. Potom se roztok kvantitativně převede do odměrné baňky takového objemu, aby s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah Zn bacitracinu ve zkoušeném vzorku po doplnění na tento objem, byla jeho koncentrace přibližně 0,42 m.j./ml. Pak se obsah baňky doplní tlumivým roztokem (3.10) po rysku a promíchá.

Dále se postupuje podle 5.1.2.

5.3 Ostatní krmiva (krmné směsi)

Do kuželové baňky vhodného objemu se odváží přesně 10,0 g nebo 20,0 g (poznámka 8.6) zkoušeného vzorku, přidá se přesně 24,0 ml směsi methyalkohol–kyselina chlorovodíková–voda (3.6), přesně 1,0 ml roztoku sulfidu sodného (3.8) a vytřepává se na třepačce (4.3) po dobu asi 10 minut. Potom se přidá přesně 25,0 ml tlumivého roztoku (3.10), vytřepává se ještě 15 minut a pak se obsah odstředí. Ze supernatantu se odpipetuje přesně 20,0 ml do odpařovací baňky (4.9), roztokem hydroxidu sodného (3.7) se upraví pH roztoku na hodnotu 6,5 a na odparce (4.8) se odpaří přibližně na 4 ml při teplotě nepřesahující 35 °C. Potom se roztok kvantitativně převede do odměrné baňky takového objemu, aby s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah Zn bacitracinu ve zkoušeném vzorku po doplnění na tento objem, byla jeho koncentrace přibližně 0,42 m.j./ml. Pak se obsah baňky doplní tlumivým roztokem (3.10) po rysku a promíchá.

Dále se postupuje podle 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah zinku bacitracinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu:

pro obsahy do 10 mg/kg	2 mg/kg
pro obsahy od 10 mg/kg do 25 mg/kg	20 % relat.
pro obsahy od 25 mg/kg do 50 mg/kg	5 mg/kg
pro obsahy nad 50 mg/kg	10 % relat.

8. Poznámky

8.1 1 mg Zn bacitracinu je pro krmivářské účely ekvivalentní 42 m.j.

8.2 Mohou být použity i jiné způsoby přípravy, které dávají stejnou bakteriální suspensi.

8.3 Může být použit jakýkoliv komerčně vyráběný masopeptonový agar nebo testovací půda které dávají prokazatelně shodné výsledky.

8.4 Methyalkohol je nebezpečná hořlavina I. třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.5 Pro testování se volí dostatečné velké plotny umožňující v agarové půdě vytvoření nejméně 8 jamek.

8.6 Pro očekávaný (deklarovaný) obsah Zn bacitracinu ve zkoušeném vzorku 5 mg/kg se odváží např. 20 g.

8.7 Metoda EU udává tyto hodnoty opakovatelnosti:

2.1 Stanovení obsahu amprolia

1. Účel a rozsah

Pro stanovení amprolia v premixech jsou uvedeny tři metody, a to spektrofotometrická, izotachoforetická (poznámka 8.1) a metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení v krmných směsích. Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení amprolia v premixech a krmných směsích (poznámka 8.3).

Pro účely této metody se používá tato definice:

Amprolium je antikokcidikum, které se aplikuje v kombinaci s ethopabátem (Amprol Plus). Po chemické stránce je to 1-[4-(amino-2-propyl-5-pyrimidinyl)methyl]-2-picolinium hydrochlorid, sumárního vzorce $C_{14}H_{20}N_4Cl_2$.

2. Princip

Amprolium se stanoví v ethanonolovém extraktu reakcí s acetylaminonitrothiazolem v alkalickém prostředí po extrakci butylalkoholem spektrofotometricky nebo ve vodném výtahu na základě rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli metodou ITP (premixy) nebo po extrakci vzorku směsí methyalkohol–voda, následnou separací látek s vyšším retenčním časem na SEP-PAK patřícíce „Alumina A“, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s použitím UV detekce (premixy a krmné směsi)

3. Chemikálie

3.1 Spektrofotometrická metoda

3.1.1 Ethylalkohol 96%, předestilovaný, aldehydů prostý (poznámka 8.2)

3.1.2 Acetylaminonitrothiazol, reakční činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,250 g acetylaminonitrothiazolu, po rozpuštění v ethylalkoholu (3.1.1) se doplní tímtož po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvý a chrání se před denním světlem.

3.1.3 Hydroxid sodný, roztok 200 g/l, uhličitánů prostý

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 200,0 g hydroxidu sodného, rozpustí v čerstvě vyvařeném reddestilované vodě (prosté oxidu uhličitého), doplní toutž po rysku a promíchá.

Uchovává se pod kalciovým uzávěrem.

3.1.4 Amprolium, standardní substance (doporučuje se originál preparát z dovozu s garancí 100 % účinnosti, ne starší 3 let, popř. ověřený o účinnosti nejméně 95 %).

Chráni se pečlivě před denním světlem a uchovává se na chladném místě.

3.1.5 Amprolium, základní standardní roztok (poznámka 8.3)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 100,0 mg standardní substance amprolia (3.1.4) 100 % účinnosti nebo příslušné přepočtené množství substance

- nižší ověřené účinnosti, rozpustí v ethylalkoholu (3.1.1), tímž doplní po rysku a promíchá.
- 1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 1 mg amprolia.
- 3.1.6 Amprolium, pracovní standardní roztok, (poznámka 8.3).**
Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku amprolia (3.1.5), doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a promíchá.
1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 100 µg amprolia.
- 3.1.7 Butylalkohol (poznámka 8.2)**
- 3.2 Izotachoretická metoda**
- 3.2.1 Vedejší elektrolyt (poznámka 8.4)**
Příprava: Z izotermicky předestilovaného amoniaku (3.2.8) (poznámka 8.5) se připraví roztok $c(\text{NH}_4\text{OH}) = 0,005 \text{ mol/l}$, upravený na hodnotu $\text{pH} = 5,3$ izotermicky (poznámka 8.5) předestilovanou kyselinou propionovou (3.2.7) s přísávkem 5 ml 0,2% methylcelulózy (3.2.6) do 100 ml roztoku.
- 3.2.2 Koncový elektrolyt (poznámka 8.4)**
Příprava: Kyselina octová, roztok $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}) = 0,005 \text{ mol/l}$ připravená z izotermicky (poznámka 8.5) destilované kyseliny octové.
- 3.2.3 Amprolium, základní standardní roztok**
Příprava: (poznámka 8.3) Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,050 g standardní substance amprolia (3.1.4) s účinností 100 % nebo přepočtené množství substance o nižší účinnosti, rozpustí ve vodě, toutž doplní po rysku a promíchá.
1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,5 mg amprolia.
Při uchování v chladu (asi při 5 °C) je roztok stálý 1 měsíc.
- 3.2.4 Amprolium, pracovní standardní roztok**
Příprava: (poznámka 8.3) Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku amprolia (3.2.3), doplní po rysku vodou a promíchá. Uvedené ředění je pro případ, kdy teoretický obsah amprolia ve zkoušeném vzorku je 12,5 mg/g.
1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 25 µg amprolia. Přípravuje se vždy čerstvý.
Obecně se pracovní standardní roztok připraví tak, aby s ohledem na očekávaný obsah ve zkoušeném vzorku (teorie) v jeho 1 ml bylo tolik amprolia jako v 1 ml roztoku zkoušeného vzorku.
- 3.2.5 Hydroxid draselný, pevný**
- 3.2.6 Methylcelulóza**
- 3.2.7 Kyselina propionová ($h = 0,99 \text{ g/ml}$)**
- 3.2.8 Amoniak, koncentrovaný ($h = 0,89 \text{ g/ml}$)**
- 3.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie**
- 3.3.1 Methylalkohol (poznámka 8.2) (HPLC grade)**
- 3.3.2 Dioktýlsodíumsulfosuccinát, (dále jen DOSS)**
- 3.3.3 Chlorid vápenatý, dihydrát ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)**
- 3.3.4 Acetonitril (HPLC grade)**
- 3.3.5 Diethylamin (dále jen DEA)**
- 3.3.6 Kyselina octová ledová ($h = 1,05 \text{ g/ml}$)**
- 3.3.7 Amprolium, standardní substance (poznámka 8.3)**
- 3.3.8 Amprolium, základní standardní roztok (poznámka 8.3)**
Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 57 až 63 mg standardní substance amprolia (3.3.7), přidá se asi 80 ml extrakční směsi (3.3.12) a po rozpuštění se doplní toutž po rysku a promíchá.
1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 570 až 630 µg amprolia.
- 3.3.9 Amprolium, pracovní standardní roztok**
Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku amprolia (3.3.8), doplní se extrakční směsí (3.3.12) po rysku a promíchá.
1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 57 až 63 µg amprolia.
- 3.3.10 Amprolium, kalibrační standardní roztok**
Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 25 ml pracovního standardního roztoku amprolia (3.3.9), doplní po rysku extrakční směsí (3.3.12) a promíchá.
Koncentrace tohoto kalibračního standardního roztoku je přibližně 15 µg amprolia/ml.
- 3.3.11 Mobilní fáze**
Pro optimální složení mobilní fáze pro používanou kolonu (viz 4.3.1) se doporučuje empirické odvození složení mobilní fáze mícháním složek A a B tak, aby retenční čas píku amprolia odpovídal kapacitnímu faktoru $k = 10$ až 16.
Chromatografický systém je velmi citlivý na eluční sflu mobilní fáze, která pro danou kolonu musí být vhodným nastavením složek A a B mobilní fáze optimalizována.
Prakticky se postupuje takž se analýza spouští nejprve při poměru $A + B = 1 + 1$ a pro dosažení optima se tento poměr pozvolna mění tak, že jeho zvýšení ve prospěch složky A kapacitní faktor zvyšuje a naopak.
Příprava: Do dvou odměrných baňek (složky A a B) na 1 000 ml se odváží popř. odměří pipetou (toto pořadí je nutno dodržet):
- | | složka A | složka B |
|-------------------------------------|----------|----------|
| DOSS (3.3.2) (g) | 1,780 | 1,780 |
| Acetonitril (3.3.4) (ml) | 350 | 450 |
| Voda (ml) | 200 | 200 |
| Kyselina octová ledová (3.3.6) (ml) | 10 | 10 |
- Každý roztok se dobře promíchá, po řádném rozpuštění se přidají do každé baňky 3 ml DEA (3.3.5), doplní vodou po rysku a promíchají.
- 3.3.12 Extrakční směs**
Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří asi 200 ml směsi methylalkohol-voda (2 + 1), přidá se 2,220 g DOSS (3.3.2), 1,470 g dihydrátu chloridu vápenatého (3.3.3) a po rozpuštění se doplní po rysku výše uvedenou směsí a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometrická metoda

4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce

4.1.2 Miska třecí s tloučkem

4.2 Izotachoforetická metoda

4.2.1 Analyzátor izotachoforetický (ITP) se zapisovačem

4.2.2 pH metr

4.2.3 Třepačka (horizontální)

4.2.4 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

4.3.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím (čerpadlo, kolona – reverzní fáze C_{18} , 250×4 mm, 5 až 10 μ m, injektážní dávkovací zařízení – Rheodyne, UV detektor, registrační zařízení) popř. i tiskárna, datastanice s integračním software

4.3.2 Stříkačka injekční polyetylenová

4.3.3 Trubice skleněná o průměru 10 mm se zúženým hrdlem na konci

4.3.4 Třepačka laboratorní vhodné konstrukce

4.3.5 SEP-PAK patrona aluminia A

5. Postup (poznámka 8.11)

5.1 Metoda spektrofotometrická

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu (poznámka 8.3)

Do sady dělicích nálevky na 250 ml se diferencovaně odpipetuje 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 ml pracovního standardního roztoku amprolia (3.1.6), objem se upraví na 20 ml roztokem ethylalkoholu (3.1.1). Do každé dělicí nálevky se odpipetuje po 1 ml reakčního činidla roztoku acetylaminonitrothiazolu (3.1.2) a 6 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.3) (poznámka 8.6), nálevka se důkladně protřepe a ponechá asi 5 min v klidu. Potom se přidá přesně po 50 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.3), 10 ml butylalkoholu (3.1.7) a intenzivně protřepává po dobu 1 minuty. Po rozdělení fází se spodní vodná vrstva odpustí do další dělicí nálevky na 250 ml a butanolová vrstva se filtruje suchým řídkým papírovým filtrem do suché odměrné baňky na 50 ml. Tento postup se opakuje – vodná vrstva se protřepává s 10 ml butanolu po dobu 1 minuty a rozdělení vrstev po 10 minutách tak dlouho, až se odměrná baňka na 50 ml doplní po značku. Obsah odměrné baňky se promíchá a je-li obsah odměrné baňky kalný, filtruje se přes vrstvu bezvodého síranu sodného (nebo čistý suchý řídký filtr).

Podle použitého spektrofotometru s příslušně nastavenými parametry se proměří absorbance roztoku v kyteti o optické délce 10 mm při vlnové délce 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

Z nalezených hodnot absorbancí a známých koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní stanovení (poznámka 8.1)

Vzorek se zhomogenizuje ve třecí misce jemným rozetřením vzorku. Do kuželové baňky na 200 ml se odváží asi 2–20 g zhomogenizovaného zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (poznámka 8.8), přidá se 100 ml ethylalkoholu (3.1.1) a po opakovaném promíchání se ponechá 30 minut v temnu. Po-

tom se baňka třepe 60 minut na horizontální třepačce a nechá usadit. Extrakt se filtruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 100 ml. Pevný podíl v kuželové baňce se promíchá s dalšími 20 ml ethylalkoholu (3.1.1) a dekantát se filtruje do téže odměrné baňky. K pevnému podílu v kuželové baňce se přidá znovu o něco méně než 10 ml ethylalkoholu (3.1.1), promíchá a dekantát se opět filtruje do téže odměrné baňky, přičemž se jím promyje zejména okraje filtru. Extrakt v odměrné baňce se doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a po uzavření baňky se důkladně promíchá.

Z tohoto roztoku se odpipetuje do 250 ml dělicí nálevky takové množství extraktu, aby obsah amprolia nepřekročil 0,5 mg a pipetovaný objem se případně doplní na 10 ml ethylalkoholem (3.1.1). Potom se přidá do dělicí nálevky 50 ml hexanu (3.1.8) a obsah dělicí nálevky se třepe asi 1 minutu, poté se přidá 10 ml vody a obsah se intenzivně třepe 1 minutu. Po rozdělení fází (asi 10 minut) se vodná fáze vypustí do dělicí nálevky na 250 ml a je-li zbarvená, vytřepe se opět s 50 ml hexanu (3.1.8). V opačném případě se k obsahu dělicí nálevky přidá 10 ml ethylalkoholu (3.1.1) a obsah dělicí nálevky se promíchá krouživým pohybem, čímž se roztok vyjasní. Přidá se 1 ml roztoku AANT (3.1.2) a 6 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.3) a třepe se intenzivně po dobu 1 minuty. Dělicí nálevka se nechá asi 30 minut v klidu. Potom se přidá 50 ml hydroxidu sodného (3.1.3) a 10 ml butanolu (3.1.7) a intenzivně se třepe 1 min. Po rozdělení fází se spodní vodná vrstva odpustí do další dělicí nálevky na 250 ml a butanolová vrstva se filtruje suchým řídkým papírovým filtrem do suché odměrné baňky na 50 ml. Tento postup se opakuje – vodná vrstva se protřepává s 10 ml butanolu (3.1.7) po dobu 1 minuty a rozdělení vrstev po 10 minutách tak dlouho, až se odměrná baňka na 50 ml doplní po značku. Obsah odměrné baňky se promíchá a je-li obsah odměrné baňky kalný, filtruje se přes vrstvu bezvodého síranu sodného (nebo čistý suchý řídký filtrační papír).

Podle použitého spektrofotometru s příslušně nastavenými parametry se proměří absorbance roztoku v kyteti o optické délce 10 mm při vlnové délce 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

Množství amprolia se zjistí z kalibračního grafu.

5.2 Metoda kapilární izotachoforézy (poznámka 8.1)

5.2.1 Kalibrace

Ze základního standardního roztoku amprolia (3.3.8) o koncentraci 0,5 mg/ml se připraví kalibrační roztok tak, aby 1 ml tohoto kalibračního roztoku obsahoval přibližně tolik amprolia, kolik je předpokládán obsah v 1 ml roztoku zkoušeného vzorku. Z tohoto kalibračního roztoku (roztoku vzorku) se dávákuje pomocí dávkovacího kohoutu do předseparační kolony ITP přístroje (4.2.1) (150 μ A) a analytické kolony (20 μ A), obvyklou technikou a za naprosto stejných podmínek, při kalibraci i vlastním provedení. Pořídí se derivační záznam a z tohoto záznamu pro kalibrační roztok i roztok vzorku se změří délka zón amprolia jako vzdálenost vrcholů příslušných píků ve směru časové osy.

5.2.2 Vlastní provedení

Asi 2 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g se odváží do kuželové baňky na 200 ml, přidá se přesně 100 ml vody a 30 minut se protřepává. Suspense se filtruje středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml čirého filtrátu, doplní vodou po rysku a promíchá.

Dále se postupuje podle 5.2.1.

5.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (poznámka 8.3)

5.3.1 Kalibrační systém

Kalibrační standardní roztok amprolia (3.3.10) se nástříkuje do chromatografické kolony vždy mezi extraktem zkoušeného vzorku, a to vždy dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástříků musí být v toleranci maximálně 2 %. Bází odezvy je plocha píku. Pokud odezvy nástříků kalibračních standardních roztoků nevykazují žádný drift, je možno jejich hodnoty zprůměrovat a na této průměrné hodnotě založit jednobodovou kalibraci. V opačném případě je nutno počítat množství amprolia z naměřené hodnoty plochy píku jen na základě odezvy nástříků kalibračních standardních roztoků, které bezprostředně předcházejí nástříkům extraktu zkoušeného vzorku (poznámka 8.7).

Pracovní podmínky:

teplota kolony	teplota okolí
průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
detekce UV, vlnová délka	270 nm
injektovaný objem	20 µl
retenční čas při použití popsané chromatografické kolony	asi 12/min;

(má odpovídat kapacitnímu faktoru $k = 10$ až 15 viz 3.9.11 Mobilní fáze)

Při výše uvedených parametrech se pořídí chromatografický záznam a obvyklým způsobem se zjistí koncentrace amprolia v kalibračních roztocích i roztocích zkoušeného vzorku (poznámka 8.10).

5.3.2 Vlastní provedení

Do kónické baňky na 250 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, zvlášť pečlivě zhomogenizovaného (poznámka 8.8), aby po extrakci bylo dosaženo takové koncentrace stanovované látky, která bude přibližně shodná s koncentrací kalibračního standardního roztoku, tj. asi 15 µg/ml amprolia. Ke zkušebnímu vzorku se přidá přesně 100 ml extrakční směsi (3.3.12), baňka se uzavře zátkou a na třepačce (4.3.4) se vytřepává asi 60 minut. Potom se obsah baňky nechá sedimentovat.

Supernatant je nutno před nástříkem do kolony chromatografického přístroje (4.3.1) zbavit složek, jejichž eluční čas je vyšší, než eluční čas stanovovaného analytu. Tato operace se provede připojením patrony SEP-PAK (4.3.5) k polyetylenové stříkačce (4.3.2) o objemu asi 10 ml, do které se odlijí asi 8 až 10 ml supernatantu a jemně se protlačí připojenou patronou (4.3.5). První asi 3 ml se nezachycují a další podíl se použije k nástříku do kolony chromatografu (4.3.1) (poznámka 8.9). Tato operace se neprovádí s kalibračním standardním roztokem.

Dále se postupuje podle 5.3.1 s tím, že se vždy postupně dávkuje do chromatografické kolony dvakrát kalibrační standardní roztok a dvakrát extrakt zkoušeného vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku (poznámka 8.10)

6.1 Spektrofotometrická metoda

Obsah amprolia v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{25 \cdot 10^3 \cdot C}{m}$$

kde C je množství amprolia, zjištěné z kalibračního grafu v mg
m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.2 Izotachoforetická metoda (premixy)

Obsah amprolia v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{2 \cdot 10^3 \cdot C \cdot h_y}{h_o \cdot m}$$

kde h_y je délka zóny zkoušeného vzorku v mm
 h_o délka zóny standardu v mm
C koncentrace standardu v mg/ml
m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Obsah amprolia ve zkoušeném vzorku v mg/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace amprolia ve zkoušeném vzorku, zjištěná pomocí kalibračního standardního roztoku v g/ml
F faktor ředění
m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Spektrofotometrická metoda

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Izotachoforetická metoda (premixy)

Nebyla dosud stanovena.

7.3 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 V případě, že nelze jednoznačně u daného zkoušeného vzorku identifikovat zónu amprolia, je tato metoda pro zkoušení amprolia nepoužitelná.

8.2 Ethylalkohol, methylalkohol i butylalkohol jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy; (methylalkohol navíc nebezpečným jedem), proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.3 Všechny vzorky, obsahující amprolium je nutno chránit před přímým denním světlem.

8.4 Vedoucí i koncový elektrolyt pro premixy lze použít v tomto složení:

Vedoucí elektrolyt: (roztok octanu amonného $\text{c}(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4)$ = 0,01 mol/l)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 77,08 mg bezvodého octanu amonného, rozpustí v redestilované vodě, přidá se 5 ml roztoku 10 g/l PVA, doplní po rysku redestilovanou vodou a promíchá. Kyselinou octovou se popř. upraví na pH = 5,1.

Uchovává se v plastové nádobce v chladnu.

Koncový elektrolyt: (roztok beta-alaninu 0,01 mol/l)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 90 až 100 mg beta-alaninu, rozpustí se v 80 ml redestilované vody, pomocí kyseliny octové se upraví pH na hodnotu 4,7 až 4,9, doplní redestilovanou vodou po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce.

8.5 Izotermická destilace se provádí tak, že do větší baňky se zábrusem se přilije příslušná kapalina k předdestilování a do ní vloží menší nádobka s redestilovanou vodou. Po uzavření vnější nádoby se nechá 14 dní stát, přičemž dojde difúzí kapalných látek k jejímu předdestilování do redestilované vody. Po této době se nádobka s difundovanou kapalinou (látkou) vyjme a její koncentrace se určí titračně. Tímto způsobem se získá látka značné čistoty.

8.6 Přechod vybarveného komplexu do butylalkoholu není zcela kvantitativní, proto je nutné veškerá činidla odměřovat co nej přesněji a kalibrační graf sestavovat současně při analýze zkoušeného vzorku a za zcela shodných podmínek.

8.7 Pokud při analýze standardu dochází ke zdvojení nebo distorzi píků, může to být nízkým kapacitním faktorem [optimum je 10 až 16 (viz 3.3.12 – Mobilní fáze)].

V některých případech, pokud kolona nebyla po předchozích analýzách adekvátně vypláchnuta, může rovněž docházet k výše popsaným závadám. Pokud k tomu dojde, je třeba kolonu propláchnout po dobu 20 min vodou, 0,2 mol/l roztokem kyseliny šťavelové, opět vodou a acetonitrem, při použití lineárního gradientu eluce pro každý segment 20 min. Optimalizované složení mobilní fáze většinou vyhovuje dané chromatografické koloně po celou dobu její životnosti.

V případě, že je nutno „omladit“ chromatografickou kolonu, jestliže vyčištění podle výše uvedeného nebylo účinné, existuje poslední možnost záchrany kolony tím, že bude propláchnuta po dobu 30 min. 0,2% roztokem šťavelanu sodného a dále 30 min vodou, obojí při průtoku 1,5 ml/min. Doporučuje se 20 až 30 minutový gradient mezi změnou proplachovacích roztoků.

8.8 Navážka vzorku při vyšší deklaraci obsahu amprolia ve zkoušeném vzorku nesmí poklesnout pod 2 g a požadovaná koncentrace 15 g/ml se upraví vhodným ředěním.

8.9 Pokud není k dispozici SEP-PAK patrona, je možno použít tento náhradní postup:

Odváží se 5 g upraveného oxidu hlinitého do skleněné trubice o průměru 10 mm, při čemž na její zúžený konec se vloží chomáček vaty. Trubicí se použije ve svislé poloze jako sloupec a na její vrchní vstup se 10 ml extraktu zkoušeného vzorku nechá samospádem protéci. Další postup je stejný jako při použití patrony.

Úprava oxidu hlinitého:

Použije se acidický oxid hlinitý, 80 až 200 mesh, stupeň aktivity 1. Tento sorbent se smíchá s vodou v poměru 5 ml vody na 1 g. Po 30 minutách se zfiltruje středně hustým filtrem, na filtru se promyje methyalkoholem a nechá vysušit, nejdříve na vzduchu při laboratorní teplotě a pak při 100 °C za sníženého tlaku (asi 30 mm Hg sloupce).

8.10 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítává se obsah amprolia ve zkoušeném vzorku z tohoto software přímo z naměřených souborů.

8.11 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.2 Stanovení obsahu amprolia

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 108, 22/04/74

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení amprolia v krmných směsích a premixech. Mez stanovitelnosti metody je 40 mg/kg (40 ppm).

2. Princip

Vzorek je extrahován methyalkoholem, extrakt přečištěn na sloupci oxidu hlinitého a pomocí 2,7-dihydroxynaftalénu, hexakynoželozitanu draselného, kyanidu draselného a hydroxidu sodného se vytvoří s amproliem komplex, který se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 530 nm.

3. Chemikálie

3.1 Methyalkohol (poznámka 8.1)

3.2 Methyalkohol, roztok zředěný 2 + 1

3.3 Hexakynoželozitan draselný, hexahydrát $[K_2Fe(CN)_6 \cdot 6H_2O]$, roztok 2 g/l (tento roztok je stabilní po dobu 2 týdnů)

3.4 Kyanid draselný, roztok 10 g/l (poznámka 8.2) (tento roztok je stabilní po dobu 2 týdnů)

3.5 Hydroxid sodný, roztok 11,25 g/l

3.6 Hydroxid sodný, roztok v methyalkoholu

Příprava: Smíchá se 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.5) a 200 ml methyalkoholu (3.1)

3.7 2,7-Dihydroxynaftalén (dále jen DHN), roztok 25 mg/l v methyalkoholu

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 25 mg DHN, rozpustí v methyalkoholu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

3.8 Komplexotvorné činidlo

Příprava: Do kuželové baňky na 250 ml se zábrusem se odměří 90 ml roztoku DHN (3.7), 5 ml roztoku hexakynoželozitanu draselného (3.3) a důkladně promíchá. Potom se přidá 5 ml roztoku kyanidu draselného (3.4) (poznámka 8.2!!), baňka se zazátkuje a obsahem se velmi intenzivně protřepe (4.7). Pak se roztok ponechá ustát asi 30 až 35 minut, přidá se 100 ml roztoku hydroxidu sodného (3.6), promíchá a obsah se filtruje filtračním kelímkem (4.3) za mírně sníženého tlaku (4.2).

Činidlo se používá nejdříve za 75 minut po filtraci.

3.9 Oxid hlinitý (Al_2O_3) pro sloupcovou chromatografii

Příprava: 100 g oxidu hlinitého se roztírá v třecí misce (4.9) s 500 ml vody po dobu 30 minut, filtruje filtračním kelímkem (4.3) za mírně sníženého tlaku (4.2), promyje 3krát 50 ml methylalkoholu (3.1), vysuší odsáváním (4.2) a po ustání přes noc se vysuší při teplotě 100°C v sušárně (4.10). Po vychladnutí v exsikátoru se zkontroluje výtěžnost určitého množství standardního roztoku amprolia (3.11) podle postupu 5.1.2. Výsledkem zkoušky musí být propustnost 96 až 104 %.

3.10 Amprolium, standardní substance, bod tání = 248°C , absorpční koeficient ve vodě při vlnové délce 265 i 325 nm = $11 \cdot 10^3$

3.11 Amprolium, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 50 mg standardní substance amprolia (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí ve zředěném methylalkoholu (3.2), doplní jím po rysku a promíchá.

3.12 Amprolium, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje přesně 10,0 ml základního standardního roztoku amprolia (3.11), doplní zředěným methylalkoholem (3.2) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 20 μg amprolia.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety optické délky 10 mm)

4.2 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.3 Kelímek filtrační, skleněný se sintroem S_3

4.4 Trubice chromatografická skleněná, vnitřní průměr 9 mm, délka 400 až 500 mm

4.5 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím (kyvety centrifugační na 25 ml s víčky)

4.6 Míchačka laboratorní

4.7 Třepačka laboratorní

4.8 Vata obvazová

4.9 Miska třecí s kopistí

4.10 Sušárna laboratorní, vakuová

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady centrifugačních kyvet (4.5) se odpipetuje diferencovaně 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 ml pracovního standardního roztoku amprolia (3.12), první čtyři se doplní na objem 5 ml zředěným methylalkoholem (3.2). Do jedné kyvety se odpipetuje 5 ml samotného zředěného methylalkoholu (3.2) = kontrolní roztok.

5.1.2 Do každé centrifugační kyvety (4.5) se odpipetuje přesně 10,0 ml komplexotvorného činidla (3.8), po uzavření se každá promíchá a ponechá v klidu po dobu 18 minut. Potom se vloží do odstředivky (4.5), odstředí po dobu 3 minut a supernatant se dekantuje do vhodné nádoby. Měří se ihned na spektrofotometru

(4.1) v kyvetách o optické délce 10 mm při vlnové délce 530 nm proti kontrolnímu roztoku.

5.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jím odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Krmiva (krmné směsi) a premixy

Do kuželové baňky na 250 ml se zábrusem se odváží asi 10 g zkušební vzorku (pro premixy 3 až 6 g) s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 100,0 ml zředěného methylalkoholu (3.2), baňka se zazátkuje, vloží na třepačku (4.7) a vytřepává po dobu 60 minut. Potom se obsah baňky zfiltruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Tento filtrát se, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah amprolia ve zkoušeném vzorku, rozředí zředěným methylalkoholem (3.2) na roztok o koncentraci amprolia v rozmezí 5 až 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Na dno chromatografické trubice (4.4), vertikálně umístěné, se vloží smotek obvazové vaty (4.8) a na ní se udušá 5 g oxidu hlinitého (3.9). Na tento sloupec se odpipetuje přesně 25,0 ml extraktu zkoušeného vzorku, extrakt se nechá volně protéci sloupcem, prvních 5 ml eluátu se nezachycuje a dalších 5,0 ml se odměří do centrifugační kyvety (4.5).

Dále se postupuje podle 5.1.2.

Množství amprolia se zjistí z kalibračního grafu.

5.2.2 Koncentráty

Do kuželové baňky na 500 ml se zábrusem se odváží asi 0,5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 250 ml zředěného methylalkoholu (3.2) a po uzátkování se vytřepává na třepačce (4.7), nebo promíchává na míchačce (4.6) po dobu 60 minut. Potom se obsah baňky filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml filtrátu, doplní zředěným methylalkoholem (3.2) po rysku a promíchá. Do centrifugační kyvety (4.5) se odměří přesně 5,0 ml tohoto roztoku a dále se postupuje podle 5.1.2.

Množství amprolia se zjistí z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Krmiva (krmné směsi) a premixy

Obsah amprolia v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot 10^4 \cdot C \cdot F}{m}$$

kde C je množství amprolia v mg zjištěné z kalibračního grafu
m navážka zkušební vzorku v g
F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků stanovení dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg .

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky:

8.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Kyanid draselný je zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla, zejména je nutné neokyselovat jeho roztok či látku (vývin prudce jedovatého kyanovodíku).

8.3 V metodě ES jsou uvedeny následující hodnoty opakovatelnosti:

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu pro obsahy

do 100 mg/kg	10 mg/kg
od 100 do 5 000 mg/kg	10 % relat
od 5 000 do 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat

2.3 Stanovení obsahu diclazurilu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení diclazurilu v premixech pro obsahy 20 mg/kg až 4 000 mg/kg.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Diclazuril je účinné kokcidistatikum. Chemicky se jedná o 2,6-dichloro- α -(4-chlorofenyl)-4-(4,5-dihydro-3,5-dioxo-1,2,4-triazin-2(3H)-yl) benzenacetonnitril sumárního vzorce $C_{17}H_9Cl_3N_4O_2$ a molekulové hmotnosti 407,64.

2. Princip

Diclazuril se stanoví po extrakci vzorku okyseleným methylalkoholem a přečištění na kolonkách MegaBond Elut způsobem vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen metodou HPLC) metodou iontových párů na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3. Chemikálie

3.1 Voda destilovaná, čistoty pro HPLC

3.2 Tetrabutylamonium hydrogensíran (dále jen TBAHS) – čidlo iontových párů

3.3 Acetonitril, čistoty pro HPLC (dále jen ACN)

3.4 Methylalkohol, čistoty pro HPLC (poznámka 8.1)

3.5 n,n-Dimethylformamid (dále jen DMF)

3.6 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/l}$)

3.7 Diclazuril, standardní substance (Jansen Biotech – č. kat. R 64 433) (poznámka 8.2)

3.8 Vnitřní standard pro stanovení diclazurilu (Jansen Biotech č. kat. R 62 646) (poznámka 8.2)

3.9 Diclazuril, základní standardní roztok

Příprava: V DMF se rozpustí takové množství standardní substance diclazurilu (3.7), aby výsledná koncentrace tohoto základního standardního roztoku v $\mu\text{g/ml}$ byla číselně shodná s deklarovaným obsahem diclazurilu ve zkoušeném vzorku v $\mu\text{g/g}$ (= DO).

3.10 Vnitřní standard, základní roztok

Příprava: V DMF se rozpustí takové množství vnitřního standardu (3.8), aby výsledná koncentrace tohoto základního roztoku vnitřního standardu v $\mu\text{g/ml}$ byla číselně shodná s deklarovaným obsahem diclazurilu ve zkoušeném vzorku v $\mu\text{g/g}$ (= DO).

3.11 Referenční pracovní roztok

Příprava: Do odměrné baňky o obsahu [DO/4] ml (poznámka 8.6) se odpipetuje přesně 1 ml základního standardního roztoku diclazurilu (3.9) a přesně 1 ml základního roztoku vnitřního standardu (3.10), přidá se 3 ml vody (3.1) a směs DMF (3.5) – voda (3.1) v poměru (2+3) se doplní po rysku a promíchá.

3.12 Extrakční roztok methylalkoholu

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odpipetuje 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6), doplní po rysku methylalkoholem (3.4) a promíchá.

3.13 Octan amonný ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{NH}_4$), pevný

3.14 TBAHS, roztok c(TBAHS) = 0,01 mol/l

3.15 Mobilní fáze

Příprava: Složka A – Do 1 000 ml roztoku TBAHS (3.14) se odváží 5 g octanu amonného (3.14) a promíchá.

Složka B = acetonitril (ACN)

Složka C = methylalkohol

Pokud není k dispozici zařízení pro ternární eluci (poznámka 8.3), smíchají se složky A + B + C v poměru (50 + 25 + 25)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolóna – reverzní fáze, injekční dávkovací zařízení např. Rheodyne, UV detektor, popř. i datastanice s integračním softwarem a tiskárna či jiné registrační zařízení)

4.2 Kolóna – reverzní fáze C18, Hypersil ODS, $10 \times 4,6$, $3 \mu\text{m}$

4.3 Třepačka laboratorní

4.4 Rotační vakuová odparka

4.5 Baňka odpařovací na 250 ml

5. Postup

5.1 Příprava vzorku k měření

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží asi 1 g zkoušeného vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 1 ml základního roztoku vnitřního standardu (3.10) a přesně 200 ml extrakčního roztoku (3.12). Baňka se zazátkuje, vloží na třepačku (4.3) a třepáním se vzorek extrahuje po dobu asi 16 hod., nejlépe přes noc. Po ukončení extrakce se nechá pevná část sedimentovat asi 10 minut a pak se z čirého supernatantu odpipetuje přesně [4000/DO] ml (poznámka 8.6) do odpařovací baňky. Tato se vloží na vakuovou odparku (4.4) a roztok se odpaří při teplotě 45°C za sníženého tlaku do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 2 ml DMF (3.5) a pak se přidá ještě přesně 3 ml vody (3.1).

Takto připravený roztok se nastříkuje do kolony přístroje HPLC.

5.2 Pracovní podmínky měření

Teplota kolony	teplota okolí, vyrovnaná po celou dobu měření
Průtok mobilní fáze	2 ml/min (lze upravit s ohledem na tlakovou ztrátu)
Detekce UV	280 nm, šířka pásma 4 nm
Injektovaný objem	20 µl
Retenční čas	asi 16 min. při průtoku 2 ml a gradientově ternární eluci asi 35 min. při průtoku 1,4 ml/min., popsané koloně a izokratickém režimu
Doporučuje se použít	guard kolony (např. Tessek C18, 30 × 3,5 µm)
Rozsah	0,01 AUFS (poznámka 8.4)

5.3 Vlastní měření

Před nástřikem do kolony je nutno tuto po dobu 10 minut ekvilibrovat při uvedeném průtoku a složení mobilní fáze. Po ustálení základní linie se nástřikuje referenční pracovní roztok (3.11) a potom roztok zkoušeného vzorku.

Po ukončení každého měření při izokratickém režimu je nutné kolonu proplachovat asi 10 minut složkou mobilní fáze B. (3.15) a dalšímu nástřiku po proplachu musí předcházet desetiminutová ekvibrace kolony při stanoveném průtoku a stejném složení mobilní fáze.

Z každého měření se pořídí záznam a ze záznamu se odměřují píky vnitřního standardu a diclazurilu v referenčním roztoku i roztoku zkoušeného vzorku (poznámka 8.5).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah diclazurilu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce (poznámka 8.5):

$$X = \frac{C \cdot F \cdot p_2 \cdot p_3}{p_1 \cdot p_4}$$

- kde p_1 je plocha (výška) píku diclazurilu v referenčním roztoku v mm^2 (mm)
 p_2 plocha (výška) píku vnitřního standardu v referenčním roztoku v mm^2 (mm)
 p_3 plocha (výška) píku diclazurilu ve zkoušeném vzorku v mm^2 (mm)
 p_4 plocha (výška) píku vnitřního standardu ve zkoušeném roztoku v mm^2 (mm)
C koncentrace diclazurilu v referenčním roztoku v g/ml
F multiplikační faktor, který se vypočte ze vztahu

$$F = \frac{V}{m \cdot R}$$

a

$$R = \frac{4000}{201 \cdot DO} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Methyalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Metodika je vyvinuta a vyzkoušena speciálně s chemikáliemi od uvedené firmy.

8.3 Je-li k dispozici zařízení pro ternární eluci pak režim eluce se doporučuje následující:

Lineární gradient

Čas (min)	0	20	21	30	31	40
% složky A mobilní fáze	60	40	0	0	60	60
% složky B mobilní fáze	20	30	100	100	20	20
% složky C mobilní fáze	20	30	0	0	20	20

8.4 AUFS = absorbance unit full scale (plná výchylka v jednotkách absorbance).

8.5 Je-li k dispozici výpočetní technika a příslušné výpočtové software, vypočítá se obsah diclazurilu z hodnot měření přímo.

8.6 DO je deklarovaný obsah diclazurilu ve zkoušeném vzorku v µg/g.

2.4 Stanovení obsahu lasalocidu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení lasalocidu v premixech a v krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Lasalocid, obchodním názvem AVATEC, je fermentační antikoagulum se širokým spektrem účinnosti, polyetherový produkt z fermentace *Streptomyces lasaliensis*.

2. Princip

Lasalocid se stanoví na základě inhibičního účinku na testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ředící roztok: směs ethylalkohol 96% (3.2) – voda (1 + 9)

3.2 Ethylalkohol 96 %, 75 % a 20 % (objemově) (poznámka 8.1)

3.3 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.4 Octan ethylnatý

3.5 Lasalocid, standardní substance s ověřenou účinností

3.6 Lasalocid, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 25,00 mg standardní substance lasalocidu (3.5) 100% účinnosti (při jiné účinnosti přepočít); rozpustí se ve 125 ml ethylalkoholu 96 % (3.2) doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 100 µg lasalocidu.

Roztok uchovaný při teplotě 5 °C je stálý po dobu 4 měsíců.

3.7 Lasalocid, pracovní standardní roztok

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.6), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 10 µg lasalocidu.

Připravuje se vždy čerstvý v čase potřeby.

3.8 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Uchování kmene: Kultura se 1krát měsíčně přeočkovává na šikmý agar (3.16), inkubuje se 16 až 24 hodin při 37 °C a uchovává při teplotě 5 °C v chladničce.

Příprava sporové suspenze: Kultura vyrostlá na šikmém agaru se smyje asi 3 ml fyziologického roztoku (3.10) a přenechá se asepticky do Rouxových láhví (4.11), obsahujících sporulační půdu (3.9.1). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.11) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dnů. Sporulace se ověří pod mikroskopem (4.14) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.10) odstředí (4.8), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.10), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.8). Toto promývání spor se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spor převeze do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spor představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.9 Živné půdy

3.9.1 Sporulační půda, živný agar č. 2, sušený Sevac

Příprava: 40,0 g živného agaru (3.16) se připraví podle návodu výrobce, přidá se 400 mg síranu manganatého (3.11) do odměrné baňky na 1 000 ml, doplní vodou po rysku a promíchá. Po rozpuštění se půda rozdělí do Rouxových láhví (4.11) a sterilizuje 20 minut při tlaku 0,05 MPa, $t = 115^{\circ}\text{C}$.

3.9.2 Udržovací půda – živný agar č. 2, sušený Sevac

Příprava: Proveďte se podle návodu výrobce, rozdělí se do zkumavek po 7 až 9 ml, sterilizuje při tlaku 0,05 MPa a teplotě 115 °C po dobu 20 minut. Pak se nechá ve zkumavkách utuhnout v šikmé poloze.

3.9.3 Testovací půda

Příprava: 0,7 g hydrogenfosforečnanu draselného (3.12), 0,45 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.13), 10,0 g glukosy (3.14), 18,0 g agaru (3.16) (nebo Bactoagaru Difco) a 2,5 g kvasničného autolyzátu (3.15) se rozpustí v 1 000 ml vody, pH se upraví na hodnotu 6,0 a sterilizuje 15 minut při tlaku 0,05 MPa, $t = 110^{\circ}\text{C}$. Sterilní půda se rozlijí po 300 ml do předem vysterilizovaných kuželových baněk.

3.10 Fyziologický roztok

Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.11 Síran manganatý, monohydrát ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

3.12 Hydrogenfosforečnan draselný (K_2HPO_4)

3.13 Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4)

3.14 Glukosa

3.15 Kvasničný autolyzát Sevac

3.16 Agar

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm

4.2 Odparka vakuová, rotační

4.3 Rám kovový 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm

4.4 Korkovrt o průměru 9 mm

4.5 Vodováha

4.6 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.7 Termostat

4.8 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím

4.9 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.10 Třepačka (horizontální)

4.11 Láhev Rouxova

4.12 Pipeta podle Pasteura

4.13 Baňka odpařovací vhodného objemu

4.14 Mikroskop vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Premixy

Do kuželové baňky na 500 ml se zabroušenou zátkou se odváží vypočtené množství (poznámka 8.2) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g, přidá se přesně 125 ml ethylalkoholu 96 % (3.2) a po dobu 30 minut se extrahuje na (horizontální) třepačce (4.10), pak se přidá 125 ml vody a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se připraví testované roztoky o koncentracích 8, 4 a 2 µg/ml s použitím ředícího roztoku.

Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) opatřenou rámem (4.2) utěsněným k plotně malým množstvím agaru (3.16) a uloženou ve vodorovné poloze (4.5), se vylije 300 ml (60 ml) živné půdy (3.9.1) do které byla po rozechlání a zchlazení asi na 55 °C naočkovaná sporová suspenze (3.8). Po ztuhnutí půdy se plotna (4.1) uloží na 1 hodinu do chladničky při teplotě 5 °C. Po vyjmutí se korkovrtem (4.4) v pravidelných vzdálenostech vytvoří v půdě jamky v 9 řadách a 9 sloupcích.

Z pracovního standardního roztoku lasalocidu (3.7) se naředěním pomocí ředícího roztoku (3.1) připraví testací roztoky o koncentracích 8, 4 a 2 µg lasalocidu v 1 ml. Tyto se pomocí Pasteurovy pipety (4.12) vnášejí do jamek ve středu řady, po stranách se vnášejí testované roztoky zkoušeného vzorku podle odpovídajících koncentrací. Plotna (4.1) se inkubuje po dobu 18 ± 2 hod. v termostatu (4.7) při teplotě 37 °C. Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

5.2 Krmné směsi

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží vypočtené množství zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g (poznámka 8.2), suspenduje v přesně 250 ml octanu ethylnatého (3.4), baňka se zatáhne a po dobu 30 minut se vytřepává na (horizontální) třepačce (4.10). Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se odpipetuje přesně 30 ml do odpařovací baňky (4.13), nechá na odparce (4.2) odpařit do sucha, odparek se rozpustí v 5 ml n-hexanu (3.3) převede do dělicí nálevky vhodného objemu s 25 ml 75% ethylalkoholu (3.2) a intenzivně protřepává 1 minutu. Pak se ponechá asi 1 hod. ustát a ethylalkoholová fáze se odpustí do odměrné baňky na 25 ml, popřípadě doplní 75% ethylalkoholem (3.2) po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se připraví testovací roztoky o koncentracích 0,5; 1 a 2 µg lasalocidu v 1 ml, k ředění se použije 20% ethylalkohol (3.2).

300 ml rozehráté testovací půdy (3.9.3), zchlazené na teplotu 70 °C, se naočkuje 0,8 až 1 ml sporové suspenze (3.9.1), rozlije na plotnu (4.1) opatřenou rámem (4.3) utěsněným ke plotně malým množstvím agaru (3.16) a umístěnou ve vodorovné poloze (4.5). Po ztuhnutí agarové vrstvy se plotna (4.1) uloží na 1 hod. do chladničky, po jejím vyjmutí se v pravidelných vzdálenostech vyhloubí korkovrtem (4.4) 10 × 9 jamek.

Z pracovního standardního roztoku lasalocidu (3.7) se naředěním za použití 20 % ethylalkoholu (3.2) připraví testací roztoky o koncentracích 0,5; 1 a 2 µg v 1 ml. Pomocí Pasteurovy pipety (4.12) se tyto testací roztoky vnášejí do jamek uprostřed řady a do 2 řad pod sebou. Po obou stranách se pak vnášejí testované roztoky zkušebního vzorku podle standardům odpovídajících koncentrací. Plotna (4.1) se inkubuje 18 až 20 hodin při teplotě 37 °C v termostatu (4.7). Průměry vzniklých inhibičních zón se odměřují posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah lasalocidu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavými I. třídy, proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 U premixů se hmotnost zkušebního vzorku volí s ohledem na očekávaný obsah lasalocidu ve zkušebním vzorku (teorie) tak, aby výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 100 g lasalocidu v 1 ml.

8.3 U krmných směsí se hmotnost zkušebního vzorku volí s ohledem na očekávaný obsah lasalocidu ve zkušebním vzorku (teorie) tak, aby zásobní roztok měl koncentraci 7,5 µg lasalocidu v 1 ml. Tak např. při teoretickém obsahu lasalocidu ve vzorku 75 mg/kg se odváží 20,0 g zkušebního vzorku.

2.5 Stanovení obsahu maduramicinu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody; pro premixy a modifikace pro krmné směsi.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení maduramicinu v premixech a krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Amonná sůl maduramicinu je monoglykosidní polyetherové ionforové antibiotikum, sumárního vzorce $C_{47}H_{83}NO_{17}$.

2. Princip

Maduramicin se stanoví po extrakci vzorku směsí acetonitrilu s dichlormethanem, derivatizací dansylhydrazinem a následným pročištěním na florisilu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s použitím fluorimetrické nebo UV detekce.

3. Chemikálie

3.1 Helium kyslíku prosté

3.2 Činidlo derivatizační – Dansylhydrazin (např. FLUKA) (dále jen DH)

3.3 Acetonitril, čistoty HPLC (dále jen ACN)

3.4 Dichlormethan (dále jen DCM)

3.5 Tetrabutylamonium hydrogensíran (např. ALDRICH) (dále jen TBAHS)

3.6 Voda destilovaná, čistoty pro HPLC

3.7 Směs extrakční, ACN–DCM v poměru (8 + 2)

3.8 Směs eluční, ACN–voda v poměru (9 + 1)

3.9 Síto molekulární, typ 3A, 8 – 12 mesh

3.10 Kyselina trichloroctová, roztok 150 g/l v acetonitrilu Uchovává se v chladničce nejvýše po dobu jednoho měsíce.

3.12 Dansylhydrazin (dále jen DH)

3.13 Derivatizační činidlo dansylhydrazin

Příprava: 0,380 DH (3.12) se odváží do odměrné baňky na 50 ml, rozpustí v ACN (3.3), doplní tímtož po rysku a dobře promíchá.

1 ml tohoto činidla obsahuje 7,6 mg DH.

Uchovává se v chladničce maximálně po dobu 1 měsíce.

3.14 Mobilní fáze

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 0,220 g TBAHS (3.5), rozpustí se ve 150 ml destilované vody (pro HPLC) (3.6), doplní acetonitrem (3.3) po rysku a probublá plyným heliem (3.1) nebo deaeruje na ultrazvukové lázni (4.9) asi 10 minut.

3.15 Maduramicin, standardní substance o 100% účinnosti

3.16 Maduramicin, základní standardní roztok

Příprava: Do tří odměrných baněk na 100 ml se odváží postupně 0,0700, 0,1000 a 0,1300 g standardní substance maduramicinu (3.15) 100% účinnosti nebo přepočtené množství nižší účinnosti, každá banka se doplní acetonitrilem (3.3) po rysku a promíchá.

Tyto základní standardní roztoky obsahují 0,7; 1,0 a 1,3 mg maduramicinu v 1 ml.

3.17 Maduramicin, pracovní standardní roztok

Příprava: Do tří odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje po 3 ml z každého ze základních standardních roztoků maduramicinu (3.16), každá z baněk se doplní extrakční směsí (3.7) po rysku a promíchá.

Tyto pracovní standardní roztoky obsahují 21,0; 30,0 a 39,0 µg maduramicinu v 1 ml.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím (čerpadlo, kolona — reverzní fáze C₁₈, 250 × 4,5–10 µm, injekční dýkavací zařízení — např. typu Rheodyne, fluorimetrický detektor — mřížkový typ s excitačním a emisním monochromátorem nebo UV detektorem, popř. datastanice s integračním software, tiskárna nebo jiné registrační zařízení) (dále jen přístroj HPLC)

4.2 Třepačka laboratorní vhodné konstrukce

4.3 Odparka vakuová (pro krmné směsi)

4.4 Baňka odpařovací vakuová na 250 ml s kulatým dnem (pro krmné směsi)

4.5 Mikropipeta o kapacitě 600 µl s výměnnými nástavci

4.6 Patronka čistící florisilová

4.7 Stříkačka injekční polyethylenová na 5 ml

4.8 Zkumavka reakční s teflonovým uzávěrem na 10 ml

4.9 Lázeň ultrazvuková nebo plynné helium

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Sestrojení kalibračního grafu a kontrola linearity odezvy použité instrumentace

5.1.1 Připraví se kalibrační roztoky standardu tak, že do tří odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje z každého pracovního standardního roztoku maduramicinu (3.17) po 5 ml, každá z baněk se doplní extrakční směsí (3.7) po rysku a promíchá.

Tyto kalibrační roztoky obsahují 4,2; 6,0 a 7,8 µg maduramicinu v 1 ml. Tyto se dále derivatizují podle 5.2.2.

5.1.2 Pracovní podmínky:

teplota kolony	teplota okolí
průtok mobilní fáze	2,0 ml/min
detekce	fluorimetrická
vlnová délka excitační	224 nm
šířka pásma (band width)	2 nm
vlnová délka emisní	515 nm
šířka pásma (band width)	40 nm
injektovaný objem	50 µl

retenční čas (při použití popsané kolony a při uvedených podmínkách detekce UV: citlivost

asi 8–10 min.
vlnová délka 224 nm
vhodná

Kolona chromatografu se uvede do rovnováhy, až se dosáhne ustálení základní linie při daném průtoku mobilní fáze (3.14) a pak se nastříkají derivatizované (viz 5.2.2) kalibrační roztoky resp. roztok zkoušeného vzorku. Nastříkují se vždy dvakrát, přičemž odezvy nástřiků stejného roztoku musí být v toleranci 2%. Z každého nástřiku se pořídí chromatografický záznam. Bází odezvy je výška piku.

5.1.3 Z naměřených hodnot výšek piků a jim odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf (poznámka 8.1)

5.2 Premixy

5.2.1 Do kónické baňky na 500 ml se odváží takové množství zkušebního vzorku, s přesností nejméně na 0,001 g, aby po extrakci vzorku popsáním způsobem bylo dosaženo přibližné koncentrace zásobního roztoku zkoušeného vzorku 6 µg maduramicinu v 1 ml (poznámka 8.3). K odvážení vzorku se přidá přesně 50 ml dichlormethanu (3.4), baňka se uzavře a na laboratorní třepačce (4.2) se extrahuje vzorek po dobu 30 minut. Pak se přidá přesně 200 ml acetonitrilu (3.3), 3,0 g molekulárního síta (3.9) a po uzavření baňky se extrahuje na laboratorní třepačce (4.2) dalších 30 minut. Pevná část vzorku se ponechá dokonale usadit a čirý supernatant se pipetuje k derivatizaci (poznámka 8.4) — zásobní roztok zkoušeného vzorku.

5.2.2 Derivatizace se provede odpipetováním 600 µl derivatizačního činidla DH (3.13) a 1 200 µl roztoku kyseliny trichloroctové (3.10) do reakční zkumavky, přidá se 5 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku (supernatantu), resp. kalibračního roztoku standardu (viz 5.1.1), baňka se uzavře a po dobu 10 sekund se řádně protřepává (poznámka 8.4). Derivatizovaný roztok se dekantuje do injekční stříkačky (4.7), spojené s florisilovou patronou (4.6), nechá se volně protéci, přičemž eluát se dále nepoužije.

Po protečení derivatizovaného roztoku se patrona promyje 5krát 3 ml acetonitrilu (3.3), pak se profoukne pístem injekční stříkačky (4.7), aby byla zbavena zbytků promývacího činidla. Injekční stříkačka (4.7) se odpojí od patrony (4.6), vytáhne se píst stříkačky (4.7) a tato se znovu spojí s patronou (4.6). Zachycená látka na patroně se eluuje eluční směsí (3.8) do odměrné baňky na 5 ml až po doplnění po rysku. Po uzavření baňky se dobře promíchá a takto získaný eluát se nastříkuje do přístroje HPLC (4.1).

Dále se postupuje podle 5.1.2.

Koncentrace maduramicinu se zjistí z kalibračního grafu.

5.3 Krmné směsi

Do kónické baňky na 500 ml se odváží takové množství zkušebního vzorku, s přesností nejméně na 0,001 g, aby po extrakci vzorku popsáním způsobem bylo dosaženo přibližné koncentrace 6 µg maduramicinu v 1 ml (poznámka 8.5). Např. při teoretickém obsahu 5 g/kg se odvažuje přesně 50,000 g vzorku. K odvážení vzorku se přidá přesně 50 ml dichlormethanu (3.4), baňka se uzavře a na laboratorní třepačce (4.2) se vzorek extrahuje po dobu 30 minut. Pak se přidá přesně 200 ml acetonitrilu (3.3) a 15,0 g molekulárního síta (3.9), baňka se znovu uzavře a na laboratorní třepačce (4.2) se extrahuje dalších 30 minut. Pevná část vzorku se nechá dokonale usadit a 60 ml čirého supernatantu se odpipetuje do odpařovací baňky (4.4). Roztok se na vakuové odparce (4.3) při 40 °C odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10 ml extrakční směsi (3.7), čímž se dosáhne přibližné koncentrace 6 µg maduramicinu v 1 ml (poznámka 8.4) — zásobní roztok zkoušeného vzorku.

Dále se postupuje podle 5.2.2 a 5.1.2.

Koncentrace maduramicinu se zjistí z kalibračního grafu (poznámka 8.1).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah maduramicinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{5 \cdot C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace maduramicinu ve zkoušeném vzorku zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

F faktor ředění

m навázka zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky v mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítá se obsah maduramicinu z tohoto software přímo z naměřených hodnot.

8.2 Doporučuje se pracovat při tlumeném světle.

8.3 Navázka zkušebního vzorku nemá být nižší než 1 g. Při deklarovaném obsahu maduramicinu v premixu např. 1 mg/g se odvažuje 1,5 g. Pokud byl deklarován vyšší obsah maduramicinu, je třeba navázku zkušebního vzorku vyšší než 1 g po vytřepání ředit extrakční směsí (3.7) na požadovanou koncentraci přibližně 6 µg/ml.

8.4 Vzorek po extrakci před i po derivatizaci je stabilní při teplotě 4 °C po dobu asi 8 hodin.

8.5 Navázka zkušebního vzorku nemá být nižší než 25 g. Pokud byl deklarován vyšší obsah maduramicinu, je třeba navázku zkušebního vzorku vyšší než 25 g po vytřepání ředit extrakční směsí na požadovanou koncentraci přibližně 6 µg/ml.

2.6 Stanovení obsahu methylbenzochátu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 329, 30/12/93

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení methylbenzochátu v krmivech. Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg (1 ppm).

2. Princip

Methylbenzochát je extrahován ze vzorku methylalkoholickým roztokem methansulfonové kyseliny, po přečištění extrakcí dichlormethanem je izolován na chromatografickém ionexovém

sloupci a znovu extrahován dichlormethanem, nakonec stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

3. Chemikálie

3.1 Dichlormethan

3.2 Methylalkohol pro HPLC (poznámka 9.1)

3.3 Mobilní fáze

Příprava: 75 dílů methylalkoholu (3.2) se smíchá s 25 díly vody (3.10), směs se filtruje membránovým filtrem 0,22 µm (4.5) a odplyní např. na ultrazvukové lázni (4.7) po dobu 10 minut.

3.4 Kyselina methansulfonová, roztok 20 g/l v methylalkoholu (3.2)

3.5 Kyselina chlorovodíková (h = 1,17 g/ml), zředěná (1 + 9)

3.6 Iontomění Amberlit CG – 120 (Na), 100 – 200 mesh – upravený

Příprava: 100 g iontomění se smíchá s 500 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), zahřeje na topné desce (4.6) k varu za neustálého míchání a po ochlazení se dekantuje. Filtruje se přes Büchnerovu nálevku (4.10.), do níž byl vložen středně hustý filtr, za mírně sníženého tlaku (4.4), promyje se 2krát 500 ml vody (3.10) a pak 250 ml methylalkoholu (3.2). Potom se propálí 250 ml methylalkoholu (3.2) a vysuší se prosáváním vzduchu přes filtrační koláč.

Uchovává se v suchém stavu v uzavřené nádobce.

3.7 Methylbenzochát (7-benzoyloxy-6-butyl-3-methoxykarbonyl-4-chinolon), standardní substance nejvyšší čistoty

3.8 Methylbenzochát, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 50 mg standardní substance methylbenzochátu (3.7) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí se v roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.9 Methylbenzochát, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml základního standardního roztoku methylbenzochátu (3.8), doplní methylalkoholem (3.2) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 50 µg methylbenzochátu.

3.10 Voda destilovaná, čistoty pro HPLC

3.11 Krmivo bez obsahu methylbenzochátu a rušících látek (slepý vzorek), což musí být analyticky ověřeno (poznámka 9.2)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (chromatografická kolona 300 mm × 4 mm, C-18, 10 µm či ekvivalentní typ, UV detektor, popř. detektor s diodovým polem pro rozsah 250 až 400 nm, datastanice s integračním software a tiskárnou)

4.2 Odparka vakuová rotační s příslušenstvím (odpařovací baňka na 500 ml s kulatým dnem)

4.3 Trubice chromatografická, skleněná 250 mm × 15 mm, opatřená na konci kohoutem a nádržkou na 200 ml

4.4 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

- 4.5 Filtry membránové 0,22 mm a 0,45 mm
- 4.6 Deska topná, elektricky vyhřívaná
- 4.7 Lázeň ultrazvuková
- 4.8 Třepačka laboratorní
- 4.9 Vata skelná
- 4.10 Nálevka Büchnerova

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 ml, pracovního standardního roztoku methylbenzochátu (3.9), každá z baněk se doplní po rysku mobilní fáze (3.3) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10 µg methylbenzochátu v 1 ml. Připravují se vždy čerstvě.

Dále se postupuje podle 5.2.2.

Z naměřených hodnot výšek (ploch) píků kalibračních roztoků a jím odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do kuželové baňky na 250 ml se odváží asi 20 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g, přidá se přesně 100,0 ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), baňka se uzatkuje, vloží na třepačku (4.8) a vytřepává po dobu 30 minut. Extrakt se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do dělicí nálevky na 500 ml, obsahující 100 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), se odpipetuje přesně 25,0 ml filtrátu extraktu, přidá 100 ml dichlormethanu (3.1) a po dobu jedné minuty se vytřepává. Po oddělení vrstev se dichlormethanová vrstva odpustí do odpařovací baňky na 500 ml (4.2), k vodné vrstvě se přidá dalších 40 ml dichlormethanu (3.1) a po vytřepání a oddělení vrstev se dichlormethanová vrstva odpustí do stejné odpařovací baňky. Extrakce dichlormethanem se provede ještě jednou s 40 ml a dichlormethanová vrstva se po oddělení opět převede do stejné odpařovací baňky. Odpařovací baňka se spojenými dichlormethanovými extrakty se vloží na odparku (4.2) a za sníženého tlaku a při teplotě 40 °C se obsah odpaří do sucha. Odparek se rozpustí ve 20 až 25 ml methylalkoholu (3.2), baňka se zazatkuje a ponechá na chromatografické dělení.

Dále se připraví chromatografická trubice (4.3) tak, že se umístí do vertikální polohy a na její dno (u kohoutu) se vloží smotek skelné vaty (4.9). Vedle toho se připraví suspenze 5 g upraveného iontoměniče (3.6) s 50 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), převede se na chromatografickou kolonu a nechá volně usadit. Roztok kyseliny nad hladinou iontoměniče se odpustí a sloupec se promývá vodou až již nově proteklý eluát nedává kyselou reakci (pH či lakmusový papírek). Pak se přidá na sloupec 50 ml methylalkoholu (3.2) a nechá stéci až po hladinu iontoměniče.

Na takto připravený sloupec se pomocí pipety převede opatrně celý rozpuštěný odparek dichlormethanového extraktu, odpařovací baňka se vypláchne 5 až 10 ml methylalkoholu (3.2), přičemž výplach se převádí rovněž na chromatografický sloupec. Po vsáknutí do vrstvy iontoměniče se sloupec promyje 50 ml methylalkoholu (3.2) při rychlosti průtoku nejvýše 5 ml/min. Tento eluát se nezachycuje. Methylbenzochát se eluuje ze sloupce 150 ml roztoku kyseliny methansulfonové (3.4), přičemž eluát se jímá do dělicí nálevky na 1 000 ml. Sloupec se promyje 5 až 10 ml methylalkoholu (3.2) a výplach se jímá do téže dělicí nálevky. Do dělicí nálevky se přidá 300 ml zředěné kyseliny chlorovodíkové (3.5), 130 ml dichlormethanu (3.1), vytřepává se jednu minutu a po oddělení vr-

stev se spodní dichlormethanová vrstva odpustí do odpařovací baňky na 500 ml (4.2). Extrakce vodné vrstvy dichlormethanem (3.1) se opakuje ještě 2krát dávkami po 70 ml dichlormethanu (3.1) a dichlormethanové vrstvy se vždy po oddělení odpustí do téže odpařovací baňky. Baňka se spojenými dichlormethanovými extrakty se vloží na odparku (4.2) a obsah se za sníženého tlaku při teplotě 40 °C odpaří do sucha. Odparek se rozpustí asi v 5 ml methylalkoholu (3.2), převede kvantitativně do odměrné baňky na 10 ml, odpařovací baňka se vypláchne 2krát malým množstvím (1 až 2 ml) methylalkoholu (3.2), výplachy se převedou do téže odměrné baňky, baňka se doplní po rysku methylalkoholem (3.2) a promíchá. Aliquotní podíl obsahující, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah methylbenzochátu ve zkušebním vzorku, a navážku vzorku, tolik methylbenzochátu vyhovujícího rozsahu kalibračního grafu se filtruje membránovým filtrem 0,45 mm (4.5) a filtrát se nastříkuje na kolonu přístroje HPLC.

5.2.2 Na přístroji HPLC se nastaví potřebné parametry:

- Průtok 1 až 1,5 ml/min
- Detekce UV 265 nm
- Injektovaný objem 20 až 50 µl

Dále se upraví stabilita chromatografického systému několika násobným dávkováním jednoho kalibračního roztoku (viz 5.1) obsahujícího 4 µg methylbenzochátu v 1 ml, až je dosaženo neměnnosti výšek či ploch píků a je zvolen optimální retenční čas.

Každý z kalibračních roztoků se nastříkuje do kolony přístroje HPLC několikrát a pro kalibrační graf se vezmou průměrné hodnoty.

Filtrát extraktu zkušebního vzorku i modelového vzorku (krmiva bez obsahu methylbenzochátu s přidáním standardního roztoku methylbenzochátu, viz 5.2.4) se analyzuje za naprosto stejných podmínek. Z každého měření se pořídí chromatografický záznam (poznámka 9.3).

5.2.3 Koncentrace methylbenzochátu se zjistí z výšek (ploch) chromatografického záznamu a kalibračního grafu.

5.2.4 Vedle analýzy zkušebního vzorku musí být provedena analýza modelového vzorku s krmivem bez obsahu methylbenzochátu (3.11) s přidáním určitého množství methylbenzochátu. Vzorek se připraví tak, že k navážce vzorku krmiva bez obsahu methylbenzochátu (3.11) se přidá formou základního standardního roztoku methylbenzochátu (3.8) tolik methylbenzochátu, který je podobné očekávanému (deklarovanému) obsahu ve zkušebním vzorku a jeho navážce. Po přidání ke krmivu se vzorek promíchá, nechá volně asi 10 minut a pak se postupuje podle 5.2.1, 5.2.2 a 5.2.3.

Zjištěný obsah methylbenzochátu v tomto vzorku by měl být nejméně 90 % teoretického (přidaného).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah methylbenzochátu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10 \cdot C \cdot F}{m} \quad (\text{poznámka 9.3}),$$

kde C je koncentrace zjištěná z kalibračního grafu v g/ml
F faktor ředění
m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti, validace výsledků (viz čl.8) a recovery testu (viz 5.2.4).

Vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu metylbenzochátu od 4 do 20 mg/kg hodnotu 10 % relat.

8. Validace výsledku

Může být provedena buď opakovaným měřením extraktu zkoušeného vzorku s přidáním methylbenzochátu, nebo porovnáním spekter extraktu zkoušeného vzorku a kalibračního roztoku pomocí detektoru s diodovým polem (4.1)

8.1 Opakované stanovení s přidáním methylbenzochátu:

K extraktu zkoušeného vzorku, získaného podle 5.2.1, se přidá přibližně takové množství kalibračního roztoku methylbenzochátu, jaké je ve zkoušeném vzorku.

Pík zkoušeného vzorku na chromatografickém záznamu se od tohoto píku může lišit pouze výškou, nikoliv polohou. Rovněž šířka píku tohoto v jeho poloviční výšce se může lišit nejvýše o 10 %.

8.2 Detekce pomocí detektoru s diodovým polem

a) Vlnové délky při maximální absorpci zkoušeného vzorku i standardu na vrcholu píku chromatografického záznamu musí být stejné v mezích rozlišovací schopnosti detekčního systému. Pro detekci s diodovým polem je to obvykle 2 nm.

b) Mezi 250 až 400 nm, spektrum zkoušeného vzorku a standardu na vrcholu píku chromatogramu, nesmí být rozdílné pro tyto části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorpce.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou získána stejná maxima a neobjeví se mezi dvěma spektry odchylka přesahující 15 % absorbance standardu.

c) Mezi 250 až 400 nm stoupání, vrchol i klesání absorbanční křivky píku zkoušeného vzorku nesmí být rozdílné od ostatních v této části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorpce.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou maxima stejná a když ve všech bodech odchylka mezi spektry nepřesahuje 15 % absorbance spektra na vrcholu píku.

Jestliže jedno z těchto kritérií není splněno, výsledek stanovení nelze pokládat za průkazný.

9. Poznámky

9.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

9.2 Pro účely této metody krmivo bez obsahu methylbenzochátu by mělo být podobného složení (typu) jako zkoušený vzorek a nesmí obsahovat detekovatelné množství methylbenzochátu.

9.3 Je-li přístroj vybaven výpočtovou technikou a integračním software, provede se výpočet přímou integrací.

2.7 Stanovení obsahu narasinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení narasinu v premixech a krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Narasin je fermentační antikokcidikum, vykazující široké spektrum účinku.

2. Princip

Narasin se stanoví na základě inhibičního účinku na růstový faktor testovacího mikroorganismu *Bacillus subtilis* ATCC 6633 difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)

3.2 Oxid hlinitý, báze ALCOA F 20, 0,12 až 0,30 mesh

3.3 Extrakční roztok, směs ethylalkohol (3.1) – voda (90 + 10)

3.4 Ředící roztok, směs ethylalkohol (3.1) – voda (20 + 80)

3.5 Narasin, standardní substance deklarované čistoty (uchovává se při teplotě 5 °C)

3.6 Narasin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží, podle obsahu účinné látky, takové množství standardní substance (3.6), aby výsledný roztok obsahoval 100 µg narasinu v 1 ml.

Odvážené množství se rozpustí v 50 ml extrakčního roztoku (3.3), doplní jím po rysku a promíchá.

Roztok je stálý při 5 °C po dobu 1 měsíce.

3.7 Narasin, pracovní standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Ředěním základního standardního roztoku (3.6) ředícím roztokem (3.4) se připraví koncentrace 4,0; 2,0 a 1,0 µg v 1 ml.

Tento roztok se připravuje vždy čerstvý.

3.8 Narasin, pracovní standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Odměří se přesně 5,00 ml základního standardního roztoku (3.6), smíchá s 20,00 ml extrakčního roztoku (3.3) potom se důkladně promíchá.

3.9 Testovací mikroorganismus *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CCM 1999)

Uchování kmene: Na šikmé udržovací půdě (3.11.2) při teplotě 5 °C a jednou měsíčně se přeočkovává. Po každém přeočkování se inkubuje po dobu 16 až 18 hod. při teplotě 37 °C.

3.10 Sporová suspenze testovacího mikroorganismu

Příprava sporové suspenze: Kultura vyrostlá na šikmém agaru se smyje asi 3 ml fyziologického roztoku (3.12) a přenesou se asepticky do Rouxových láhví (4.13), obsahujících sporulační půdu (3.11.1). Pomocí sterilních skleněných kuliček se mikroorganismus rovnoměrně rozetře po

povrchu agaru. Takto připravené Rouxovy láhve (4.13) se inkubují při teplotě 37 °C po dobu 7 až 10 dnů. Sporulace se ověřuje pod mikroskopem (4.14) a potom se narostlá kultura smyje s povrchu 25 ml fyziologického roztoku (3.12) odstředí (4.3), k sedimentu se přidá opět 25 ml fyziologického roztoku (3.12), suspenze se zahřívá 30 minut při teplotě 65 °C a znovu odstředí (4.3). Toto promývání spor se opakuje třikrát. Nakonec se suspenze spor převede do kuželové baňky a zahřívá se 30 minut při teplotě 65 °C. Takto připravená suspenze spor představuje základní inokulum, které uchováváno při teplotě 4 °C je použitelné po dobu 6 měsíců.

Koncentrace sporosuspenze se určuje experimentální testací. Má být taková, aby velikost inhibiční zóny při ředění 4 µg/ml byla 22 mm, což odpovídá asi 0,2 až 0,3 ml sporosuspenze na 100 ml agaru.

3.11 Živné půdy

3.11.1 Sporulační půda, živný agar sušený č. 2 SEVAC

Příprava: 40 g živného agaru se rozpustí podle návodu výrobce v odměrné baňce na 1 000 ml, přidá se 400 mg síranu manganatého kryst. (3.13), doplní se 1 000 ml vodou a promíchá. Pak se přelije do Rouxových láhví (4.13) a sterilizuje 20 minut v autoklávu (4.11) při tlaku 0,05 MPa.

3.11.2 Testovací půda

Příprava: 0,7 g hydrogenufosforečnanu draselného (3.14), 0,45 g dihydrogenufosforečnanu draselného (3.15), 10,00 g glukózy (3.16), 2,5 g kvasničného autolyzátu SEVAC (3.17) a 18,0 g agaru podle ČSL 2 (nebo Bacto-agar Difco) se za horka rozpustí v 1 000 ml vody, upraví se pH na hodnotu 6,0 a rozlije se po 270 ml do kuželových baněk na 500 ml a sterilizuje 15 minut při tlaku 0,05 MPa.

3.12 Fyziologický roztok Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě a doplní na 1 000 ml. Sterilizuje se 20 minut při 121 °C.

3.13 Síran manganatý, monohydrát ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pevný

3.14 Hydrogenufosforečnan draselný (K_2HPO_4)

3.15 Dihydrogenufosforečnan draselný (KH_2PO_4)

3.16 Glukosa

3.17 Kvasničný autolýzát Sevac

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm

4.2 Rám kovový 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm

4.3 Odstředivka laboratorní

4.4 Třepačka (horizontální)

4.5 Pipety podle Pasteura

4.6 Lázeň vodní

4.7 Korkovrt o průměru 9 mm

4.8 Vodováha

4.9 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.10 Termostát

4.11 Autokláv

4.12 Trubice chromatografická o průměru 19 mm, délce 500 mm, s kohoutem a bez frity

4.13 Láhev Rouxova

5. Postup

5.1 Premixy

5.1.1 Do kuželové baňky na 750 ml se zábrusem se odváží přesně 5,000 g zkušebního vzorku, přidá se 350 ml extrakčního roztoku (3.3) (poznámka 8.2), baňka se zazátkuje, vloží na (horizontální) třepačku (4.4) a extrahuje po dobu 30 minut nebo 2 hodin v klidu za občasného promíchání. Suspenze se filtruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 500 ml, filtr se promyje několikrát extrakčním roztokem (3.3), baňka se jím doplní po rysku a promíchá (poznámka 8.2).

Z tohoto zásobního roztoku se připraví testovací roztoky o koncentracích teoreticky s 1, 2 a 4 µg narasinu v 1 ml (poznámka 8.2).

5.1.2 Na plotnu (4.1), opatřenou rámem (4.2) utěsněným v dotyku s plotnou malým množstvím agaru a uloženou ve vodorovné poloze (4.8), se vylije 270 ml testovací půdy (3.11.2), předem rozehřáté a zchlazené na teplotu 55 °C a naočkované sporovou suspenzí (3.10). Po ztuhnutí se plotna uloží na 1 hod. do chladničky při teplotě 5 °C a pak se v pravidelných vzdálenostech vytvoří korkovrtem (4.7) jamky 9 řad po 9 sloupcích, pro vnišení testovacích i testačních roztoků. Testační roztoky standardu (viz 3.7) se vnáší Pasturovou pipetou (4.5) do 3 řad pod sebou ve středu plotny a testovací roztoky zkoušeného vzorku po stranách opět do tří řad pod sebou a podle druhu jejich teoretických koncentrací k příslušné koncentraci testačního roztoku standardu. Plotna (4.1) se inkubuje 16 až 20 hod. při teplotě 37 °C v termostatu (4.10). Průměry vzniklých inhibičních zón se měří posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Do kuželové baňky na 250 ml se zábrusem se odváží přesně 5,000 g zkušebního vzorku, přidá 20 ml extrakčního roztoku (3.3) a suspenduje se 3 hod. za občasného promíchání nebo 30 minut na třepačce (4.4) (poznámka 8.3). Připraví se chromatografická kolona (4.12) na jejíž dno se vloží malý smotek obvazové vaty, vsype se oxid hlinitý (3.2) po několika vrstvách, z nichž každá se mírně stlačí do výše asi 70 mm. Suspenze zkoušeného vzorku se vnese na kolonu a ponechá protékat. Eluát se jímá do odměrné baňky na 50 ml. Sloupec kolony se promývá podtlakem extrakčního roztoku (3.3) po 5 ml, pak se jím doplní odměrná baňka s eluátem po rysku a promíchá (poznámka 8.3).

Z tohoto roztoku se připraví testované roztoky o koncentracích 1; 2 a 4 µg narasinu v 1 ml, přičemž se ředí vodou.

5.2.2 Testační roztoky standardu se připraví tak, že pracovní standardní roztok (3.8) se celý zpracuje jako zkoušený vzorek počítaje vnesením na chromatografickou kolonu (4.12). Výsledná koncentrace tohoto standardního roztoku v 50 ml odměrné baňce je 10 g narasinu v 1 ml. Z tohoto roztoku ředěním vodou se připraví testační roztoky o koncentracích 1; 2 a 4 µg narasinu v 1 ml, které se vnáší na plotnu (4.1).

5.2.3 Dále se postupuje podle 5.1.2 s tím rozdílem, že se vyhloubí 10krát 9 jamek a testované i testační roztoky se plní do 2 řad.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah narasinu v mg/kg se vypočítá podle Přílohy-10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Navážka zkušebního vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah avoparcinu ve zkoušeném vzorku tak, aby výsledná koncentrace avoparcinu ve výluhu byla asi 70 µg/1 ml.

8.3 Při předpokládaném obsahu narasinu ve zkoušeném vzorku 70 mg/kg by měla být teoreticky koncentrace tohoto roztoku 7 µg narasinu v 1 ml.

2.8 Stanovení obsahu narasinu

Tato metoda je uvedena v Journal of Association of Official Analytical Chemists 71,(3), 480-484 (1988)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení narasinu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Obsah narasinu se stanoví po extrakci vzorku směsným rozpouštědlem hexan-octan ethylnatý metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

2.9 Stanovení obsahu nikarbazuinu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení nikarbazuinu v premixech a krmných směsích. Není použitelná za přítomnosti komponentů na bázi nitroslooučenin jako jsou furazolidon, nitrovin a obdobných dalších nitroláték, jakož i pro obsahy nikarbazuinu pod 50 mg/kg.

Pro účely této metody se používá tato definice: Nikarbazin je antikokcidikum, po chemické stránce je to 4,4'-dinitrocarbanilid kondenzát s 4,6-dimethyl-2-hydroxypyrimidin v poměru 1:1, sumárního vzorce $C_{19}H_{18}N_6O_6$.

2. Princip

Nikarbazin se stanoví spektrofotometricky po extrakci n-hexanem a chromatografické separaci v prostředí alkalického roztoku chloridu draselného.

3. Chemikálie

3.1 Nikarbazin, standardní substance podle BVC II (poznámka 8.1)

3.2 Nikarbazin, základní standardní roztok

Příprava: Přesně 25,00 mg standardní substance nikarbazuinu (3.1) se odváží do odměrné baňky na 100 ml, rozpustí v dimethylformamidu (3.5), doplní tímžéž po rysku a promíchá. 1 ml tohoto základního roztoku obsahuje 0,25 mg nikarbazuinu.

3.3 Nikarbazin, pracovní standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 50 ml základního standardního roztoku (3.2), doplní dimethylformamidem (3.5) po rysku a promíchá. 1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 125 µg nikarbazuinu.

3.4 Nikarbazin, pracovní standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.2), doplní dimethylformamidem (3.5) po rysku a promíchá. 1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 12,5 µg nikarbazuinu.

3.5 Dimethylformamid (poznámka 8.2)

3.6 Oxid hlinitý, bázičský pro sloupcovou chromatografii, stupeň aktivity I (poznámka 8.3)

3.7 Ethylalkohol 96 % aldehyduprostý, předestilovaný (poznámka 8.4)

3.8 n-Hexan (poznámka 8.4)

3.9 Síran sodný, bezvodý a předsušený

3.10 Hydroxid draselný, roztok $c(KOH) = 5 \text{ mol/l}$

3.11 Chlorid draselný, roztok $c(KCl) = 1 \text{ mol/l}$

3.12 Alkalické činidlo

Příprava: 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3.10) a 40 ml roztoku chloridu draselného (3.11) se smíchá s 50 ml vody zbavené oxidu uhličitého a promíchá. Připravuje se vždy čerstvý.

3.13 Kompenzační činidlo – chlorid draselný, roztok 75 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Trubice chromatografická, délky 250 mm a světlosti:
a) 25 mm s vložkou ze slinutého skla S_2 (pro krmné směsi)
b) 14 mm bez frity (pro premixy)

4.2 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při 435 nm

4.3 Lampa UV s filtrem o vlnové délce 366 nm

4.4 Lázeň vodní s termostatem

4.5 Odstředivka s příslušenstvím

4.6 Chladič zpětný vodní se zábrusem

5. Postup (poznámka 8.5)

5.1 Premixy

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1.1 Do odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje 4,0; 5,0 a 6,0 ml pracovního standardního roztoku (3.3), do

každé z baněk se přidá asi 10 ml ethylalkoholu (3.7), 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní se ethylalkoholem (3.7) po rysku a promíchá.

5.1.1.2 Absorbance roztoků se měří na spektrofotometru (4.2) při vlnové délce 435 nm proti samotnému ethylalkoholu (3.7) v kyvetách optické délky 10 mm.

Z naměřených hodnot absorbancí a jím odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní provedení

5.1.2.1 Nejprve se připraví sloupec v chromatografické trubici (4.1) tak, že do zúžené části trubice se zasune smotek obvazové vaty a trubice se naplní do jedné třetiny obsahu dimethylformamidem (3.5). Potom se postupně vnáší 10 g oxidu hlinitého (3.6) tak, aby byl stále pod hladinou dimethylformamidu. Po usazení oxidu hlinitého se na povrch sloupce nanese asi 7 až 10 mm vrstva síranu sodného (3.9).

5.1.2.2 Do zábrusové kuželové baňky na 250 ml se odváží přesně 1,000 g zkušebního vzorku, přidá se přesně 100 ml dimethylformamidu (3.5) a extrahuje se na vodní lázni (4.4) vyhřáté na 100 °C pod zpětným chladičem (4.6) po dobu 15 minut. Potom se obsah baňky ochladí na laboratorní teplotu a odstředí (4.5) při 3 000 ot/min. po dobu 5 minut, přičemž supernatant se chrání před denním světlem.

5.1.2.3 Na připravený sloupec v chromatografické trubici (4.1) se odpipetuje 5 ml supernatantu a stěny trubice se opláchnou 1 ml dimethylformamidem (3.5), přidávaným z pipety. Po nanesení vzorku se přidá 3krát po 5 ml dimethylformamidu (3.5), přičemž současně je nutno sledovat pomocí UV lampy (4.3) pohyb fluoreskujících balastních látek ve sloupci. Dokud jsou tyto ještě v trubici přítomny nelze přikročit k vymývání ethylalkoholem (3.7), nýbrž dalšími přídávky dimethylformamidu (3.5) pokračovat ve vyvíjení. Po úplném odstranění balastních látek (nenastává již fluorescence) se na vrchol chromatografického sloupce (4.1) opatrně nanese přesně 5 ml ethylalkoholu (3.7) za účelem eluce. Právě přesně 3 ml eluátu se nepoužije a pod trubici se postaví odměrná baňka na 25 ml. Eluce se obvykle provede přidáním 5krát po 5 ml ethylalkoholu (3.7), přičemž průchod nikarbazinu ve sloupci se sleduje UV lampou (4.3), zda nejsou ještě přítomny balastní látky. Po provedené eluci se odměrná baňka odstaví, doplní po rysku ethylalkoholem (3.7) a promíchá.

5.1.2.3.4 Potom se odpipetuje 5 ml roztoku do další odměrné baňky na 25 ml, přidá 10 ml ethylalkoholu (3.7), 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní po rysku ethylalkoholem (3.7) a promíchá.

5.1.2.3.5 Dále se postupuje podle 5.1.1.2, přičemž vlastní měření se provede 3krát a k vyhodnocení se použije průměrná hodnota.

5.1.2.3.6 Z naměřené absorbance, resp. její průměrné hodnoty se z kalibračního grafu zjistí koncentrace nikarbazinu.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.2.1.1 Do odměrných baněk na 25 ml se diferencovaně odpipetuje 10,0; 15,0 a 20,0 ml pracovního standardního roztoku (pro krmné směsi) (3.4), do každé z odměrných baněk se odpipetuje 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní se ethylalkoholem (3.7) po rysku a promíchá.

5.2.1.2 Absorbance roztoků se měří na spektrofotometru (4.2) při vlnové délce 435 nm v kyvetách optické délky 10 mm proti samotnému ethylalkoholu (3.7).

5.2.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jím odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf.

5.2.2 Vlastní provedení

5.2.2.1 Odváží se asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,01 g do zábrusové kuželové baňky na 200 ml a extrahuje se 3krát 25 ml n-hexanu (3.8), po odstátí a usazení (baňka se vždy uzavře), se n-hexanový extrakt odlije přes suchý řídký filtr. Hexanový extrakt se dále nepoužije. Filtr s eventuálně ulpělými podíly se vloží zpět do baňky, obsah baňky se vysuší na vroucí vodní lázni (4.4), pak se přidá 100 ml dimethylformamidu (3.5) a zahřeje k varu za občasného promíchání. Potom se odstaví, vytemperuje a odstředí se (4.5) 5 minut při 3 000 ot/min, přičemž supernatant se chrání před denním světlem. Supernatant převede kvantitativně do odměrné baňky obsahu 100 ml, doplní dimethylformamidem (3.5) po rysku a promíchá.

5.2.2.2 Příprava chromatografické trubice (4.1) se provede, jak uvedeno v 5.1.2.1, s tím rozdílem, že se použije trubice světlosti 25 mm s vložkou ze slinutého skla (4.1.a), nepřidává se smotek vaty a množství použitého oxidu hlinitého (3.6) je 17 g.

5.2.2.3 Na vrch připraveného sloupce se odpipetuje 25 ml supernatantu a postupně po malých dávkách (5 ml) se přidává dimethylformamid (3.5) a to tak dlouho, pokud pod zářením UV lampy (4.3) fluoreskují balastní látky. Po úplném odstranění balastních látek se přidá 5 ml ethylalkoholu (3.7). První 2–3 ml eluátu se nepoužije a potom se pod trubici se postaví odměrná baňka na 50 ml. Eluce se dále provádí ethylalkoholem (3.7), přičemž se průchod nikarbazinu trubici neustále sleduje pod UV lampou (4.3). Zhášející zóna nikarbazinu postupuje širším pásmem a prochází po zachycení 22 až 25 ml eluátu. Obsah odměrné baňky se doplní ethylalkoholem (3.7), a to buď přes sloupec (vymývání) nebo přímo, po rysku a promíchá.

5.2.2.4 Z tohoto eluátu se odpipetuje 15 ml do odměrné baňky na 25 ml, přidá se 5 ml alkalického činidla (3.12), doplní ethylalkoholem (3.7) po rysku a promíchá.

5.2.2.5 Vedle toho se připraví kompenzační slepý roztok a to odpipetováním 15 ml vlastního (pro každý vzorek) eluátu do odměrné baňky na 25 ml, přidá se 5 ml kompenzačního činidla (3.13), ethylalkoholem (3.7) se doplní po rysku a promíchá. Tento roztok slouží jako srovnávací při měření.

5.2.2.6 Absorbance roztoku se měří na spektrofotometru (4.2) při vlnové délce 435 nm v kyvetách optické délky 10 mm proti kompenzačnímu slepému roztoku (viz 5.2.2.5).

Z naměřené hodnoty absorbance se z kalibračního grafu zjistí koncentrace nikarbazinu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah nikarbazinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot C \cdot F}{m}$$

kde C je množství nikarbazinu ve zkoušeném vzorku zjištěné z kalibračního grafu v mg

m navážka zkušební vzorku v g

F faktor ředění (pro přesně dodržžený postup pro premixy = 2,5 a pro krmné směsi = 5 000)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Standardní substance nikarbazin musí vykazovat maximum absorpce při vlnové délce 366 nm, přičemž $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 890 \pm \pm 5\%$.

8.2 Dimethylformamid s roztokem hydroxidu sodného 100 g/l v ethylalkoholu (50 % v/v) nesmí dávat barevnou reakci.

8.3 Oxid hlinitý musí vyhovovat následujícím testu: Do zábrusové baňky na 250 ml se vsype 10 g oxidu hlinitého, přidá se 100 ml vody a silně vytřepává po dobu 2 minut. Po ustání se změní pH výluhu; má být v rozmezí 10,0 až 10,5 pH.

8.4 Ethylalkohol 96 %, n-hexan jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla. Veškerý použitý n-hexan je po regeneraci možno znovu použít.

8.5 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.10 Stanovení obsahu nikarbazinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 108, 22/04/74

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení nikarbazinu v premixech a krmivech. Stanovení je rušeno přítomností derivátů nitrofuranu, acetylenheptinu a karbadoxu. Mez stanovitelnosti je 20 mg/kg (20 ppm).

2. Princip

Vzorek je extrahován dimethylformamidem, extrakt přečištěn na chromatografickém sloupci s oxidem hlinitým a po eluci ethylalkoholem je u nikarbazinu vyvoláno pomocí alkalického ethylalkoholu žluté zabarvení, které se stanoví spektrofotometricky při 430 nm.

3. Chemikálie

3.1 N,n-dimethylformamid (dále jen DMF)

3.2 Oxid hlinitý pro sloupcovou chromatografii, vyžháný při teplotě 750 °C po dobu nejméně 2 hodin a ochlazený v exsíkátoru. Uchovává se v uzavřené nádobce z hnědého skla. Před použitím se zkouší podle popisu chromatografického dělení (viz 5.2.1) na úplnost konverze nikarbazinu pomocí známého množství nikarbazinu ve standardním roztoku. Výtěžek konverze musí být 100 % s maximální povolenou odchylkou 2 %.

3.3 Ethylalkohol 95% (poznámka 8.1)

3.4 Ethylalkohol 80% (poznámka 8.1)

3.5 Hydroxid sodný, roztok 500 g/l

3.6 Alkalické činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml, obsahující 80% ethylalkohol (3.4) se odpipetuje 1 ml roztoku hydroxidu sodného (3.5), doplní 80% ethylalkoholem po rysku a promíchá. Připravuje se vždy čerstvé.

3.7 Nikarbazin nejčistší, standardní substance

3.8 Nikarbazin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 125 mg standardní substance nikarbazinu (3.7) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v 75 ml DMF (3.1), krátce zahřeje, po vytemperování doplní tímtež (3.1) po rysku a promíchá. Udržuje se v temnu. 1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 1,25 mg nikarbazinu.

3.9 Nikarbazin, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10,0 ml základního standardního roztoku nikarbazinu (3.8), doplní DMF (3.1) po rysku a promíchá.

Z tohoto roztoku se odpipetuje 20,0 ml do odměrné baňky na 100 ml, doplní DMF (3.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 0,025 mg nikarbazinu. Připravuje se vždy čerstvý a udržuje se v temnu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety optické délky 10 mm)

4.2 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.3 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.4 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím (centrifugační kyvety na 120 ml)

4.5 Trubice chromatografická, vnitřní průměr 25 mm, délka 300 mm

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

Přesně 25 ml pracovního standardního roztoku nikarbazinu (3.9) se převede přes chromatografický sloupec, způsobem jak je uvedeno v 5.2.1 – druhý odstavec a z jeho B části eluátu se do sady odměrných baněk na 25 ml diferencovaně odpipetuje 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10,0 ml. Tyto kalibrační roztoky obsahují 0,025; 0,050; 0,075; 0,100 a 0,125 mg nikarbazinu.

Do každé z baněk se přidá 5,0 ml alkalického činidla (3.6), doplní po rysku a promíchá. Během dalších 5 minut se měří na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 430 nm a v kyvetách o optické délce 10 mm proti směsi 20,0 ml ethylalkoholu (3.3) a 5,0 ml alkalického činidla (3.6).

Z naměřených hodnot absorpance a jím odpovídajících množství nikarbazinu v kalibračních roztocích se sestaví kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení (poznámka 8.2)

Do kuželové baňky se zábrusem, obsahu 250 ml se odváží s přesností nejméně na 0,001 g pro premixy asi 1 g a pro krmiva asi

10 g zkušební vzorku. Přidá se přesně 100,0 ml DMF (3.1), promíchá, nasadí zpětný chladič (4.2) a baňka se vloží do vroucí vodní lázně (4.3) na 15 minut, přičemž se obsahem baňky občas promíchá. Potom se obsah baňky ochladí pod tekoucí vodou, obsah se převede do centrifugační kyvety a odstředí se (4.4) po dobu 3 minut. Je-li třeba, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah nikarbazuinu ve zkoušeném vzorku, upravit koncentraci nikarbazuinu na rozmezí 2 až 10 mg, ředí se příslušným množstvím DMF (3.1). Supernatant extraktu se dávákuje na chromatografický sloupec.

5.2.1 Do chromatografické trubice (4.5), umístěné ve vertikální poloze, se vlije suspenze 30 g oxidu hlinitého (3.2) v DMF (3.1). Po usazení oxidu hlinitého se DMF (3.1) odpustí tak, aby jeho hladina byla 10 mm nad úrovní oxidu hlinitého. Potom se na sloupec převede přesně 25 ml supernatantu extraktu (pracovního standardního roztoku – viz 5.1), nechá se volně protéct tak, aby sloupec nezůstával suchý a pak se promývá 3krát 10 ml DMF (3.1). Eluuje se přesně 70 ml ethylalkoholu (3.3), přičemž prvních 10 ml eluátu se nezachycuje a další se rozdělí následovně:

- prvních 5 ml = roztok A
- dalších 50 ml = roztok B
- dalších 5 ml = roztok C

Roztoky A a C se zkouší přidáním alkalického činidla (3.6) zda nevyvolávají žluté zabarvení. Z roztoku B se odpipetuje do dvou odměrných baněk na 25 ml po 20,0 ml. Do jedné z baněk se přidá přesně 5,0 ml alkalického činidla (3.6), do druhé přesně 5,0 ml ethylalkoholu (3.3). Obsahem obou baněk se důkladně promíchá a během dalších 5 minut se proměří oba roztoky na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 430 nm proti směsi přesně 20,0 ml ethylalkoholu (3.3) a 5,0 ml alkalického činidla (3.6) v kyvetách o optické délce 10 mm. Od absorpance roztoku s přidaným alkalickým činidlem (3.6) se odečte absorpance roztoku s přidaným ethylalkoholem (3.3) a z rozdílu se zjišťuje množství přítomného nikarbazuinu ve zkoušeném vzorku z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah nikarbazuinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^4 \cdot C \cdot F}{m}$$

- kde C je množství nikarbazuinu v mg zjištěné z kalibračního grafu (z rozdílu absorpance)
- F faktor ředění (při dodržení postupu je F = 1)
- m навážka zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu

pod 100 mg/kg	10 mg/kg
od 100 do 5 000 mg/kg	10 % relat
od 5 000 do 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I.třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Všechny operace je nutné provádět při tlumeném světle.

2.11 Stanovení obsahu robenidinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 329, 30/12/93.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení robenidinu v premixech a krmivech (poznámka 9.1)

Pro účely této metody se používá tato definice: Robenidin je kokcidiostatikum účinné na některé druhy Eimerií. Po chemické stránce je to 1,3-bis-(p-chlorbenzylidenamino)guanidin hydrochlorid.

2. Princip

Robenidin se stanoví po extrakci vzorku okyseleným methylalkoholem, jeho přečištění na chromatografické koloně s oxidem hlinitým, metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3. Chemikálie

- 3.1** Oxid hlinitý acidický, stupeň aktivity I
- 3.2** Dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄) bezvodý
- 3.3** Hydrogenfosforečnan sodný, dodekahydrát (Na₂HPO₄ · 12 H₂O) nebo bezvodý (Na₂HPO₄)
- 3.4** Acetonitril, čistoty pro HPLC
- 3.5** Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná (h = 1,17 g/ml)
- 3.6** Methylalkohol, okyselený roztok (poznámka 9.2)

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odměří 4 ml konc. kyseliny chlorovodíkové (3.5), doplní se rysku methylalkoholem a promíchá

3.7 Mobilní fáze

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 0,34 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2), rozpustí se ve vodě toutéž doplní se rysku a promíchá (Roztok A).

Do další odměrné baňky na 100 ml se odváží 0,355 g bezvodého hydrogenfosforečnanu sodného nebo 0,896 g dodekahydrátu (· 12 H₂O) (3.3), rozpustí se ve vodě, toutéž doplní se rysku a promíchá (Roztok B).

Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 650 ml acetonitrilu (3.4), asi 200 ml vody, 50 ml roztoku A, 50 ml roztoku B, doplní se rysku a promíchá. Dearuje se probubláváním heliem (3.11) po dobu asi 10 minut. Deaerovat je možno i v ultrazvukové lázni (4.6) po dobu 15 minut.

3.8 Robenidin, standardní substance o 100 % nebo známé účinnosti

3.9 Robenidin, základní standardní roztok (poznámka 9.3)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 40 mg standardní substance robenidinu (3.8) 100 % účinnosti nebo vypočtené množství o nižší známé účinnosti, rozpustí se v okyseleném methylalkoholu (3.6), doplní toutéž po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 400 µg robenidinu.

3.10 Robenidin, pracovní standardní roztok (poznámka 9.3)

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku robenidinu (3.9), doplní mobilní fází (3.7) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 10 µg robenidinu.

3.11 Helium

3.12 Krmivo bez obsahu robenidinu i rušících látek – modelový vzorek (poznámky 9.4 a 9.10)

4. Přístroje a pomůcky

4.1. Chromatograf kapalinový vysokoúčinný s příslušenstvím (dále jen HPLC), čerpadlo, kolona – reverzní fáze C 18, 250 × 4,5–10 mm, např. injektážní kohout např. Rheodyne popř. i datastanice s integračním software a tiskárna (poznámka 9.5).

4.2. Odparka vakuová, rotační

4.3. Třepačka laboratorní

4.4. Kolona chromatografická, skleněná, opatřená ve spodní uzavíracím kohoutem, průměru 10 až 15 mm, délka 250 mm (poznámka 9.6)

4.5. Baňka odpařovací s kulatým dnem, obsahu 250 ml

4.6. Vata skelná

5. Postup (poznámka 9.12)

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do 5 odměrných baněk na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 15,0; 20,0; 25,0; 30,0 a 35,0 ml pracovního standardního roztoku robenidinu (3.10), každá z odměrných baněk se doplní mobilní fází (3.7) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky reprezentují koncentrace 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 a 7,0 µg robenidinu v 1 ml.

5.1.2 Do kolony přístroje pro HPLC (4.1) se dává každý roztok, kalibrační (standard) i zkoušený vzorek, dvakrát po ekvilibraci kolony, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástřiků téhož vzorku musí být v toleranci nejvýše 2 %. Vlastní měření se provede za následujících parametrů:

teplota kolony	teplota okolní atmosféry
průtok mobilní fáze	1,5 ml/min
detekce	vlnová délka 347 nm (poznámka 9.7)
injektovaný objem	20 µl
retenční čas	
(pro kolonu 250 × 4)	asi 10 minut;

5.1.3 Kolona se uvede do rovnováhy až dosáhne ustálení základní linie při průtoku mobilní fáze (3.7) na výše uvedenou hodnotu, pak se dává kalibrační, resp. roztok zkoušeného vzorku a za výše uvedených parametrů se pořídí záznam.

5.1.4 Z údajů příslušných odezev a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf. Bází odezvy je plocha píku.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží takové množství dobře zhomogenizovaného zkušebního vzorku, které by obsahovalo, podle předpokládaného obsahu robenidinu ve zkoušeném vzorku (teorie), 1 mg robenidinu (poznámka 9.8). Potom se do odměrné baňky přidá přesně 200 ml okyseleného methylnalkoholu

(3.6), baňka se uzavře a vytřepává se na třepačce (4.3) po dobu 30 minut. Po důkladném usazení pevného podílu vzorku se extrakt přefiltruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Tento zásobní roztok zkoušeného vzorku má předpokládanou koncentraci 5 µg robenidinu v 1 ml.

5.2.2 Chromatografická předčišťovací kolona se připraví tak, že na dno této chromatografické trubice (4.4) umístěné ve vertikální poloze se vloží smotek skelné vaty (4.6), upěchuje a ní se nasype 11 g oxidu hlinitého (3.1) a to pokud možno tak, aby náplň kolony nebyla příliš vystavena volné atmosféře. Na připravenou kolonu se odpipetuje 5 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku, nechá se úplně vsáknout do náplně kolony a eluuje se z kolony 100 ml methylnalkoholu (3.6) do odpařovací baňky s kulatým dnem (4.5) při průtoku 2 až 3 ml/min. Baňka se pak vloží do odparky (4.2) a obsah se nechá při teplotě 40 °C odpařit do sucha. Odparek se rozpustí v přesně odměřených 5 ml mobilní fáze (3.7). Před nástřikem do kolony přístroje (4.1) se doporučuje roztok odstědřit (4.7) z důvodu možné kontaminace částicemi oxidu hlinitého v sedimentu.

Dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2.3 Za účelem ověření dodržení správného postupu (poznámka 9.9) musí být provedena zkouška s modelovým vzorkem (recovery test): K navážce vzorku krmiva bez detekovatelného obsahu robenidinu (3.12) se přidá formou základního standardního roztoku robenidinu (3.9) takové množství robenidinu, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah robenidinu ve zkoušeném vzorku, jaké je obsaženo v navážce zkoušeného vzorku. Toto množství se přidá k příslušné navážce krmiva bez obsahu robenidinu (3.12), na kterou bylo vypočteno (navážka se volí stejná jako u zkoušeného vzorku), promíchá a po 10 minutách se postupuje podle 5.2.1.

5.2.4 Koncentrace robenidinu v roztoku zkoušeného vzorku se zjistí z kalibračního grafu (poznámka 9.10).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah robenidinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce (poznámka 9.10):

$$X = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace robenidinu, zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

F faktor ředění

m navážka zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena (poznámka 9.11).

8. Validace výsledku (poznámka 9.10)

Může být provedena buď opakováním nástřikem extraktu zkoušeného vzorku s přidávkou robenidinu do kolony přístroje HPLC a porovnáním píků tohoto a zkoušeného vzorku, nebo detekce pomocí detektoru s diodovým polem a srovnáním spekter extraktu zkoušeného vzorku a kalibračního roztoku robenidinu.

a/ Opakováním stanovením (co-chromatography) s přidávkou robenidinu:

K extraktu zkoušeného vzorku získaného podle 5.2.1 a 5.2.2 se přidá přibližně takové množství kalibračního roztoku robenidinu (viz 5.1.1), jaké je ve zkoušeném vzorku.

Oproti píku zkoušeného vzorku se v chromatografickém záznamu mohou píky robenidinu lišit pouze výškou, nikoliv polohou. Rovněž šířky píků v jejich poloviční výšce se mohou lišit o 10 %.

b/ Detekci pomocí detektoru s diodovým polem: v chromatografickém záznamu se

ba/ Vlnové délky při maximální absorpci zkoušeného vzorku i standardního spektra na vrcholu píku musí být stejné v mezích rozlišovací schopnosti detekčního systému. Pro detekci s diodovým polem je to obvykle 2 nm.

bb/ Mezi vlnovými délkami 250 a 400 nm spektrum zkoušeného vzorku i standardu na vrcholu píku nesmí být rozdílné pro tyto části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorpce.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou získána stejná maxima a mezi dvěma spektry se neobjeví odchylka přesahující 15 % absorpce standardu.

bc/ Mezi vlnovými délkami 250 až 400 nm stoupání, vrchol i klesání křivky absorpce píku extraktu zkoušeného vzorku nesmí být rozdílné od ostatních v této části spektra v rozsahu 10 až 100 % relativní absorpce.

Tohoto kritéria je dosaženo, když jsou maxima stejná a když ve všech bodech odchylka nepřevyšuje o 15 % absorpce spektra na vrcholu píku.

Jestliže jednoho z těchto kritérií není dosaženo výsledek stanovení nemůže být zcela průkazný.

9. Poznámky

9.1 Metoda EU uvádí mez stanovitelnosti 5 mg/kg (5 ppm)

9.2 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a zvláště nebezpečným jedem. Proto při jakékoli manipulaci s ním až do jeho úplné asanace je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

9.3 Robenidin je citlivý na denní světlo, proto je třeba nevystavovat žádný roztok jej obsahující přímému dennímu záření.

9.4 Pro účely této metody by jako krmivo bez obsahu robenidinu mělo být podobného typu jako zkoušený vzorek a nemělo by obsahovat detekovatelné množství robenidinu.

9.5 Metoda EU uvádí ještě detektor s diodovým polem

9.6 Metoda EU uvádí materiál trubice jantarové sklo

9.7 Metoda EU uvádí vlnovou délku 347 nm

9.8 Z důvodu reprezentativnosti vzorku se nedoporučuje navažovat méně než 1 g. Extrakt je nutno vhodně naředit methylalkoholem tak, aby 1 ml zásobního roztoku zkoušeného vzorku obsahoval teoreticky 5 µg robenidinu.

9.9 Převzato z metody EU

9.10 Je-li součástí příslušenství přístroje HPLC výpočtová technika s integračním software s programem pro přímé výpočty vypočítává se obsah pomocí tohoto přímo.

9.11 Metoda EU uvádí pro obsahy nad 15 mg/kg 10 % relat. zkoušeného vzorku obsahoval teoreticky 5 µg robenidinu v 1 ml.

9.12 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.12 Stanovení sulfaquinoxalinu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 032, 05/02/75,

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení sulfaquinoxalinu v premixech a krmných směsích. Mez stanovitelnosti je 20 mg/kg.

Stanovení ruší ostatní sulfonamidy a kyselina arsanilová ($C_6H_4AsNO_3$).

Pro účely této metody se používá tato definice: Sulfaquinoxalin je po chemické stránce (4-amino-N-2-quinoxaliny-benzensulfonamid).

2. Princip

Sulphoquinoxalin se stanoví po extrakci vzorku dimethylformamidem s chloroformem a po jeho alkalické hydrolyze diazotací a kopulací n-2-aminoethyl-1-naftylaminem, spektrofotometricky při vlnové délce 545 nm.

3. Chemikálie

3.1 N,N-dimethylformamid

3.2 Chloroform

3.3 Ethylalkohol (poznámka 8.1)

3.4 Alkalické hydrolyzační činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 10 g hydroxidu sodného a 25 g chloridu sodného, rozpustí ve vodě, doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.5 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/ml}$)

3.6 Dusitan sodný, roztok 1 g/l (připravuje se vždy čerstvý)

3.7 Sulfamát amonný, roztok 5 g/l (připravuje se vždy čerstvý)

3.8 N-2-aminoethyl-1-naphtylamin dihydrochlorid, roztok 1 g/l (dále jen ANC)

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 100 mg ANC, rozpustí v 1 % roztoku kyseliny chlorovodíkové, doplní toutéž po rysku a promíchá. Připravuje se vždy čerstvý.

3.9 Sulfaquinoxalin, standardní substance

3.10 Sulfaquinoxalin, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 250 mg standardní substance sulphaquinoxalinu (3.9) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí se v 50 ml roztoku hydroxidu sodného (25 ml 0,1 mol/l roztoku hydroxidu sodného + 25 ml vody), doplní vodou po rysku a promíchá.

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml tohoto roztoku, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto zředěnějšího standardního roztoku obsahuje 25 μg sulfaquinoxalinu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Baňka kuželová se zabroušenou zátkou, objemu 250 ml

4.2 Třepačka laboratorní

4.3 Kelímek filtrační skleněný S3

4.4 Nálevka dělicí na 250 ml

4.5 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.6 Zkumavky 150 mm $\times$ 25 mm

4.7 Lázeň vodní s termostatem

4.8 Spektrofotometr vhodné konstrukce s kyvetami o optické délce 20 mm

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje přesně 2, 4, 6, 8 a 10 ml zředěnějšího standardního roztoku sulfaquinoxalinu (3.10), do každé z baněk se připipetuje 8 ml kyseliny chlorovodíkové (3.5), doplní vodou po rysku a promíchá. Tyto roztoky obsahují 50, 100, 150, 200 a 250 μg sulfaquinoxalinu ve 100 ml. Z těchto roztoků standardu se odpipetuje po 10 ml do zkumavek (4.6), přidá se po 1 ml ANC a obsah zkumavek se promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 5, 10, 15, 20 a 25 μg sulfaquinoxalinu.

5.1.2 Absorbance každého roztoku se měří na spektrofotometru (4.8) v kyvetách optické délky 20 mm při vlnové délce 545 nm proti vodě jako slepému roztoku.

5.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jím odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

Do kuželové baňky 250 ml (4.1) se odváží s přesností nejméně na 0,001 g takové množství zkušebního vzorku, aby obsahovalo mezi 0,25 až 1,25 mg sulfaquinoxalinu. K navážce vzorku se přidá 20 ml N,N-dimethylformamidu (3.1), promíchá se baňka se vloží na vroucí vodní lázeň (4.7) na dobu 20 minut a po ochlazení proudem studené vody se přidá 60 ml chloroformu (3.2). Baňka se zatáhne, vloží se na třepačku (4.2) a vytřepává po dobu 30 minut. Pak se obsah baňky zfiltruje přes filtrační kelímek (4.3) pod mírně sníženým tlakem (4.5), baňka se vypláchne a filtr promyje 4 $\times$ 5 ml chloroformu (3.2). Filtrát se kvantitativně převede do dělicí nálevky (4.4) a filtr se ještě promyje do této dělicí nálevky 50 ml chloroformu (3.2). Zbytek na filtru se dále nepoužije.

Do dělicí nálevky (4.4) s extraktem vzorku se přidá 50 ml alkalického hydrolyzačního činidla (3.4) a 5 ml ethylalkoholu (3.3), důkladně se promíchá tak, aby se zabránilo vzniku emulze a to buď pomalým převracením dělicí nálevky asi 20 $\times$, nebo mírným kroužením podle podélné osy. Po oddělení vrstev, což trvá obvykle asi 15 minut, se odpustí spodní vrstva do jiné dělicí nálevky a horní vodná vrstva se převede do odměrné baňky na 250 ml. Spodní chloroformová vrstva se reextrahuje třikrát vždy 50 ml alkalického hydrolyzačního činidla (3.4), přičemž každá z vodních vrstev se přidává do téže odměrné baňky (viz výše). Tato odměrná baňka se pak doplní vodou po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 25 ml do odměrné baňky na 50 ml, přidá se přesně 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.5), doplní vodou po rysku a promíchá. Pokud je třeba, filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž prvních 15 ml filtrátu se nezachycuje.

Po 10 ml roztoku (filtrátu) se převede do dvou zkumavek (4.6) a do každé ze zkumavek se přidá po přesně 2 ml roztoku dusitanu sodného (3.6), promíchá, po 3 minutách stání ještě přesně po 2 ml roztoku sulfamátu amonného (3.7) a opět promíchá. Do první ze zkumavek se přidá pipetou přesně 1 ml roztoku ANC (3.8), do druhé přesně 1 ml vody a obsahy zkumavek se opět důkladně promíchají.

Každá ze zkumavek se uzavře pryžovou zátkou, opatřenou otvorem s trubičkou pro odvod plynu, nebo podobným zařízením, a pomocí mírně sníženého tlaku (4.5) se odsaje rozpuštěný dusík. Dále se postupuje podle 5.1.2.

Z rozdílu hodnot absorbancí roztoků s roztokem ANC a bez něj se zjistí množství sulfaquinoxalinu z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah sulfaquinoxalinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{50 \cdot C}{m}$$

kde C je množství sulfaquinoxalinu zjištěné z kalibračního grafu v mg
m navážka zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při teoretickém obsahu sulfaquinoxalinu:

20 až 100 mg/kg	10 mg/kg
100 až 5 000 mg/kg	10 % relat.
5 000 až 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

2.13 Stanovení obsahu meticlorpindolu

1. Účel a rozsah

Jsou zde uvedeny tři metody stanovení, spektrofotometrická pro premixy, metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro premixy a její modifikace pro krmné směsi.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení meticlorpindolu v premixech a krmných směsích.

Pro účely těchto metod se používá následující definice:

Meticlorpindol (clopidol, coyden) je chemické antikokcidikum o složení 2,6-di-methyl-3,5-dichlorhydroxypyridin (nebo 3,5-dichlor-2,6-dimethyl-4-pyridinol), sumárního vzorce $C_7H_7Cl_2NO$.

2. Princip

Meticlorpindol se stanoví po extrakci vzorku ethylalkoholem, za přítomnosti antioxidantu předextrakcí n-hexanem, spektrofotometricky porovnáním se standardem nebo po extrakci vzorku směsí methylalkoholu a hydroxidu amonného metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 Spektrofotometrická metoda

3.1.1 Ethylalkohol čistý 96 %, zvláště denaturovaný 1 % hexanu (poznámka 8.1)

3.1.2 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.1.3 Meticlorpindol, standardní substance nebo premix Lerbec o známé účinnosti resp. koncentraci meticlorpindolu

3.1.4 Meticlorpindol, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 30 mg standardní substance meticlorpindolu o 100 % účinnosti (3.1.3) s přesností 0,1 mg nebo přepočtené množství substance o nižší účinnosti, rozpustí se ve 150 ml ethylalkoholu (3.1.1), doplní jím po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,15 mg meticlorpindolu.

3.1.5 Meticlorpindol, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odpipetuje 25,0 ml základního standardního roztoku meticlorpindolu (3.1.4), doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního roztoku obsahuje 75 µg meticlorpindolu.

3.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

3.2.1 Methylalkohol (poznámka 8.1)

3.2.2 Methylalkohol, čistoty pro HPLC (dále jen HPLC) (poznámka 8.1)

3.2.3 Dihydrogenfosforečnan draselný KH_2PO_4 , pevný

3.2.4 Dihydrogenfosforečnan sodný NaH_2PO_4 , pevný

3.2.5 Meticlorpindol, standardní substance o 100 % účinnosti

3.2.6 Meticlorpindol, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 50 mg standardní substance meticlorpindolu (3.2.5) s přesností 0,1 mg, rozpustí v methylalkoholu (3.2.1), doplní jím po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 250 µg meticlorpindolu.

3.2.7 Meticlorpindol, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku meticlorpindolu (3.2.6), doplní se methylalkoholem (3.2.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 25 µg meticlorpindolu.

3.2.8 Tlumivý roztok o pH = 6,75

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 0,91 g dihydrogenfosforečnanu draselného (3.2.3) a 0,95 g dihydrogenfosforečnanu sodného (3.2.4), rozpustí asi ve 100 ml vody, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.2.9 Mobilní fáze

Příprava: Smíchá se 2,5 dílu methylalkoholu (HPLC) (3.2.2) se 7,5 díly tlumivého roztoku (3.2.8) a promíchá.

3.2.10 Amoniak (NH_3), koncentrovaný ($h = 0,91$ g/ml)

3.2.11 Amoniakální methylalkohol, roztok

Příprava: Smíchá se 5 ml amoniaku (3.2.9) a 95 ml methylalkoholu (3.2.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometrická metoda

4.1.1 Spektrofotometr registrační s příslušenstvím pro měření v UV oblasti spektra a s křemennými kyvetami optické délky 10 mm

4.1.2 Třepačka ultrazvuková

4.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie

4.2.1 Chromatograf kapalinový chromatograf s příslušenstvím (čerpadlo, kolona – reverzní fáze C 18, 250 × 4,5 až 10 µm, injektážní dávkovací zařízení Rheodyne, UV detektor) popř. datastanice s integračním softwarem, tiskárna nebo jiné registrační zařízení.

4.2.2 Lázeň ultrazvuková

4.2.3 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím

5. Postup (poznámka 8.5)

5.1 Premixy

5.1.1 Metoda spektrofotometrická (poznámka 8.3)

Do kuželové baňky na 500 ml, se zábrusem se odváží asi 1,5 g vzorku s přesností nejméně na 0,001 g. Za přítomnosti antioxidantu ve zkoušeném vzorku se provede odestraňování kurasanu n-hexanem (3.1.2) a to dekantací vzorku s 50 ml.

Ke vzorku se přidá 200 ml ethylalkoholu (3.1.1), baňka se zazátkuje, vloží na ultrazvukovou třepáčku (4.1.2) a vytřepává po dobu 10 minut (poznámka 8.4). Obsah baňky se zfiltruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 250 ml, filtr promyje ethylalkoholem (3.1.1) včetně výplachu původní baňky, doplní jím po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 5 ml do odměrné baňky na 50 ml, doplní ethylalkoholem (3.1.1) po rysku a promíchá.

Měří se na registračním spektrofotometru (4.1.1) od vlnové délky 230 do 330 nm v 10 mm kyvetách proti ethylalkoholu (3.1.1) a záznam se vyhodnotí způsobem uvedeným v 6.1. Maximum absorpce by mělo být při vlnové délce 270 nm.

Stejným způsobem a za naprosto shodných podmínek se měří pracovní standardní roztok meticlorpindolu (3.1.5).

5.1.2 Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

5.1.2.1 Kalibrace

Do kolony HPLC chromatografu (4.2.1) se nastřikuje postupně pracovní (kalibrační) standardní roztok (3.2.6) i roztok zkoušeného vzorku po ekvilibraci kolony vždy dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích příslušných nástřiků musí být v toleranci nejméně 2 %. Bází odezvy je plocha příslušného píku.

Pracovní podmínky: teplota kolony teplota okolní atmosféry
průtok mobilní fáze 1 ml/min.
detekce vlnová délka 265 nm UV spektra
injektovaný objem 20 µl
retenční čas (pro popsanou kolonu) asi 4,5 min.

Zkoušený vzorek i pracovní (kalibrační) standard musí být zkoušeny za naprosto shodných podmínek.

5.1.2.2 Vlastní provedení

Do kuželové baňky na 250 ml se odváží takové množství vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, aby množství meticlorpindolu, podle předpokládaného obsahu ve zkoušeném vzorku (teorie), bylo asi 2500 µg. Přidá se přesně 100 ml amoniakálního roztoku methylalkoholu (3.2.10) a extrahuje se na ultrazvukové lázni (4.2.2) po dobu 30 minut, přičemž je nutno obsah během extrakce několikrát ručně rozmíchat (poznámka 8.4). Baňka se odstaví a ponechá v klidu, aby pevná část vzorku sedimentovala nebo se sedimentace urychlí odstředěním (4.2.3). Z čirého supernatantu zkoušeného vzorku se odpipetuje 10 ml do odpařovací baňky a při 40 °C se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 10 ml mobilní fáze. Získaný roztok se použije přímo k nástřiku do chromatografické kolony.

Pracovní (teoretická) koncentrace tohoto roztoku zkoušeného vzorku je asi 25 µg meticlorpindolu v 1 ml.

Dále se postupuje podle 5.1.2.1. Koncentrace meticlorpindolu v roztoku zkoušeného vzorku se zjistí porovnáním příslušné odezvy roztoku zkoušeného vzorku s odezvou pracovního standardního roztoku meticlorpindolu (3.2.7) (poznámka 8.2).

5.2 Krmné směsi (metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie HPLC)

5.2.1 Kalibrace

Postupuje se zcela shodně, jak je uvedeno v 5.1.2.1.

5.2.2 Vlastní provedení

Postupuje se shodně, jak je uvedeno v 5.1.2.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot A_x \cdot C}{A_s \cdot m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
C koncentrace meticlorpindolu v 50 ml kalibračního roztoku standardu, s ohledem na účinnost standardní substance meticlorpindolu v mg
 A_s korigovaná hodnota absorpce roztoku pracovního standardu
 A_x korigovaná hodnota absorpce roztoku zkoušeného vzorku

Korigované hodnoty absorpce zkoušeného vzorku i standardu se vypočítají ze spektrofotometrického záznamu graficky: Body, určené minimálními absorpencemi před a po absorpční maxima se spojí přímkou a od bodu, kde tato přímka protne kolmici spuštěnou z bodu maxima absorpce, se měří k bodu absorpce maxima korigovaná hodnota absorpce.

6.2 Metoda HPLC

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce (poznámka 8.2):

$$Y = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace meticlorpindolu ve zkoušeném vzorku, zjištěná porovnáním odezvy zkoušeného vzorku a pracovního (kalibračního) standardního roztoku v µg/ml
F faktor ředění
m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Premixy

7.1.1 Metoda spektrofotometrická

Nebyla dosud stanovena.

7.1.2 Metoda HPLC

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Krmné směsi (metoda HPLC)

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol, methylalkohol a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavými látkami I. třídy, methylalkohol je vedle toho i zvlášť nebezpečným jedem, proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi až do úplné asanace zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Je-li součástí chromatografické sestavy (příslušenství) integrační a výpočtové software, vypočítávají se hledané koncentrace a obsah přímo zpracováním naměřených souborů.

8.3 Spektrofotometrická metoda stanovení meticlorpindolu není použitelná, pokud je současně ve vzorku přítomen metylbenzochát, protože výsledek analýzy je vyšší cca o 5 %.

8.4 Při extrakci vzorku nelze používat mechanickou třepačku, protože vzhledem k nízké rozpustnosti meticlorpindolu v ethylalkoholu není tímto způsobem extrakce účinná a snižuje výsledek analýzy minimálně o 10 %.

8.5 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.14 Stanovení meticlorpindolu

Tato metoda je překlad z LUFA č. 14.5.1 resp. 14.5.2.

1. Účel a rozsah

Pro stanovení meticlorpindolu jsou uvedeny dvě metody a to pro stanovení v premixech a krmných směsích. Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení meticlorpindolu (3,5-dichlor-2,6-dimethyl-4-pyridinol) v premixech a krmivech. Mez stanovitelnosti pro krmné směsi je 30 mg/kg.

2. Princip

Meticlorpindol se stanoví:

a) v premixech po extrakci vzorku zředěným hydroxidem sodným, odfiltrování a zředění alikvotního podílu kyselinou octovou spektrofotometricky při vlnových délkách 267, 297 a 327 nm.

b) v krmných směsích po extrakci směsí methylalkohol-chloroform-amoniak, odpaření extraktu a rozpuštění chloroformem a přečištění na sloupci oxidu hlinitého i následně na sloupci iontoměniče, spektrofotometricky při vlnových délkách 267, 297 a 327 nm s ohledem na korekci pozadí.

3. Chemikálie

3.1 Obecně

3.1.1 Meticlorpindol, standardní substance (fa Chemical Company Nederland, NV., Terneuzen, Niederlande)

3.1.2 Hydroxid sodný, roztok 20 g/l

3.1.3 Kyselina octová, přibližně 40% (h = 1,05 g/ml)

3.2 Pro krmné směsi navíc

3.2.1 Oxid hlinitý, neutrální (stupeň aktivity II)

Příprava: 60 g oxidu hlinitého, stupně aktivity I, se smísí s 1,8 g vody a silně protřepává po dobu 20 minut. Uchovává se v uzavřené nádobě a ve tmě.

3.2.2 Methylalkohol (poznámka 8.1)

3.2.3 Chloroform (DAB 7)

3.2.4 Amoniak, roztok 25% (h = 0,91 g/ml)

3.2.5 Methylalkohol 80% (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odpipetuje 800 ml methylalkoholu (3.2.2), doplní po rysku vodou a promíchá.

3.2.6 Extrakční směs methylalkohol-chloroform-amoniak

Příprava: 50 ml methylalkoholu (3.2.2) se smísí s 50 ml chloroformu (3.2.3) a 30 ml roztoku amoniaku (3.2.4). Přípravuje se vždy čerstvý.

3.2.7 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 6 mol/l

3.2.8 Octan sodný, trihydrát ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), roztok 100 g/l

3.2.9 Iontoměnič DOWEX, typ anex-Cl, 100 až 200 mesh, nejčistší (např. fa Serva, Feinbiochemica Heidelberg)

Příprava: (z předpisu fy DOW Chemical Company – převedení do acátové formy). Ve 3 000 ml kádince se zahřívá 350 g ionexu s 1 000 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2.7) po dobu 2 až 3 hodin na vroucí vodní lázni (4.2.4), potom se zfiltruje Büchnerovou nálevkou 4.2.5) a promývá do negativní reakce na chloridy (dusičnan stříbrný – 3.2.10). Potom se ionexem naplní skleněná trubice (4.2.8) a sloupec se promývá roztokem octanu sodného (3.2.8) tak dlouho až odtékající kapalina nedává reakci na chloridy (dusičnan stříbrný – 3.2.10), případně jen slabý zákal. Pak se odsaje, promyje asi 3 l vody, převede opět do 3 000 ml kádinky a zahřívá na vroucí vodní lázni (4.2.4) po dobu 3 hodin s 1 000 ml kyseliny octové (3.1.3). Opět se zfiltruje, jak výše uvedeno, a promývá do negativní reakce na chloridy (dusičnan stříbrný – 3.2.10).

Uchovává se pod vodou.

3.2.10 Dusičnan stříbrný, roztok 10 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Obecně

4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (křemenná květa o optické délce 10 mm)

4.2 Pro krmné směsi navíc

4.2.1 Trubice chromatografická, skleněná, dlouhá 300 mm (počítáno bez zásobníku), vnitřní průměr 20 mm, na horním konci opatřená zásobníkem o obsahu 250 ml, na spodním konci opatřená 4 mm kohoutem.

4.2.2 Trubice chromatografická, skleněná, dlouhá 100 mm (počítáno bez zásobníku), vnitřní průměr 13 mm, na horním konci opatřená zásobníkem o obsahu 125 ml, na spodním konci opatřená 2 mm kohoutem nad nímž je fritová S₀.

4.2.3 Třepačka

4.2.4 Lázeň vodní

4.2.5 Nálevka Büchnerova

4.2.6 Odstředivka vhodné konstrukce

4.2.7 Vata skelná

4.2.8 Trubice skleněná, dlouhá 50 mm, zakončená fritou S₀.

5. Postup (poznámka 8.3)

5.1 Premixy

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do odměrné baňky na 500 ml se naváží 125 mg standardní substance meticlorpindolu (3.1.1) s přesností nejméně 0,001 g, rozpustí se v 25 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.2), doplní vodou po rysku a promíchá.

Do sady odměrných baňek na 250 ml se odpipetuje diferencované 1 až 15 ml tohoto roztoku, doplní po rysku kyselinou octovou (3.1.3) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 1 až 15 µg meticlorpindolu v 1 ml.

Absorbance připravených roztoků se měří na spektrofotometru (4.1.1) v 10 mm křemenných kyvetách při vlnové délce 267 nm proti kyselině octové (3.1.3).

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní provedení

Do odměrné baňky na 1 000 ml (V_1) se odváží asi 1 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 50 ml roztoku hydroxidu sodného (3.1.2) a ponechá se 10 minut stát s občasným promícháním. Potom se doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do odměrné baňky na 250 ml (V_2) se odpipetuje 10 ml filtrátu (V_2), doplní kyselinou octovou (3.1.3) po rysku a promíchá.

Měří se absorbance na spektrofotometru (4.1.1) v 10 mm křemenných kyvetách při vlnových délkách 267, 297 a 327 nm proti kyselině octové (3.1.3). Absorbance tohoto vzorku naměřená při 267 nm se koriguje (poznámka 8.2) na pozadí podle vzorce:

$$A_{kor} = A_{267} + A_{327} - 2A_{297}$$

a koncentrace meticlorpindolu se zjistí z kalibračního grafu.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

Provede se podle 5.1.1.

5.2.2 Vlastní provedení

Do kužlové baňky se zábrusem, obsahu asi 250 ml se odváží asi 10 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,01 g, rozpustí se v přesně 100,0 ml extrakční směsi (V_1) (3.2.6), baňka se zazátkuje a obsah se vytřepává po dobu 20 minut. Potom se buď nechá 20 minut ustát, nebo se odstředí (4.2.6) při 4 000 ot/min. Do kádinky vhodného obsahu se odpipetuje 50 ml čirého roztoku nebo supernatantu (V_2) a odpaří na vroucí vodní lázni (4.2.4) asi na 5 ml, přidá se 15 ml methylalkoholu (3.2.2), zahřeje krátce k varu a smíchá se 150 ml chloroformu (3.2.3) (roztok 1).

Dále se připraví sloupec oxidu hlinitého. Na dno chromatografické trubice (4.2.1) se vloží smotek skelné vaty (4.2.7), trubice se umístí ve vertikální poloze a naplní 60 g oxidu hlinitého stupně aktivity II (3.2.1). Na oxid hlinitý se vloží opět smotek skelné vaty (4.2.7) do výše asi 3 cm a sloupec se prolije 100 ml chloroformu (3.2.3). Proteklý chloroform se dále ke stanovení nepoužije.

Na připravený sloupec oxidu hlinitého se převede kvantitativně roztok 1, nechá se ztéci až jeho hladina dosáhne po okraj vrchního smotku skelné vaty. Kádinka od roztoku 1 se vypláchne 50 ml chloroformu (3.2.3) a výplach se převede rovněž na sloupec. Tato operace se opakuje ještě 2krát vždy s 50 ml chloroformu (3.2.3)

a výplach po výtoku ze sloupce se pro stanovení dále nepoužije. Dále se stejná kádinka vypláchne ještě 110 ml methylalkoholu (3.2.5) a opět převede na sloupec oxidu hlinitého. Prvních 30 ml proteklého množství se dále nepoužije a dalších 70 až 80 ml, které obsahují meticlorpindol se jímá do kádinky. Poslední zbytky methylalkoholického extraktu se vytlačí ze sloupce stlačeným vzduchem do téže kádinky (roztok 2).

Dále se připraví ionexový sloupec. Do chromatografické trubice (4.2.2), umístěné ve vertikální poloze se převede tolik iontoměničce DOWEXu (3.2.9), až je trubice naplněna do výšky 6 cm. Pak se na ionex vloží smotek skelné vaty (4.2.7) a sloupec se promyje nejprve 50 ml kyseliny octové (3.1.3) potom 3krát vždy po 35 ml methylalkoholu (3.2.5).

Na takto připravený sloupec se převede roztok 2 a nechá se ztéci až k horní hladině ionexu. Kádinka od roztoku 2 se vypláchne 2krát vždy po 50 ml methylalkoholu (3.2.5) a výplach se vždy převede na sloupec. Roztok vytékající ze sloupce se dále nepoužije. Meticlorpindol se eluuje nejprve 50 ml a potom 48 ml kyseliny octové (3.1.3), eluát se jímá v odměrné baňce (V_3) (pro obsahy meticlorpindolu do 150 mg/kg na 100 ml, pro vyšší obsahy na 200 ml) doplní kyselinou octovou (3.1.3) po rysku a promíchá. Měří se na spektrofotometru (4.1.1) v křemenných kyvetách při vlnových délkách 265, 297 a 327 nm proti kyselině octové (3.1.3). Naměřená hodnota absorbance se koriguje na pozadí následovně: Hodnoty absorbance roztoku zkoušeného vzorku při vlnových délkách 297 a 327 nm se vynesou do systému souřadnic (délky stupnice proti vlnové délce) a získané body se spojí přímkou která se prodlouží až k hodnotě vlnové délky 267 nm a u příslušného dílku stupnice se zjistí její hodnota. Hodnota absorbance roztoku zkoušeného vzorku při vlnové délce 265 nm se vynesou do téhož systému souřadnic grafu. Rozdíl v dílcích stupnice této hodnoty a zjištěné z prodloužené přímkou odpovídá hodnotě pozadí. Tato hodnota se zjistí z kalibračního grafu a odpovídající hodnota koncentrace se odečítá z původně zjištěné (korigovaná hodnota).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Premixy

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2}{m \cdot V_3}$$

kde C je koncentrace meticlorpindolu v µg zjištěná podle korigované absorbance kalibračního grafu
 V_1 objem odměrné baňky k přípravě výluhu v ml
 V_2 pipetovaný objem filtrátu v ml
 V_3 konečný objem roztoku zkušební vzorku v ml
m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

6.2 Krmné směsi

Obsah meticlorpindolu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{C \cdot V_1 \cdot V_2}{m \cdot V_3}$$

kde C je koncentrace meticlorpindolu v µg zjištěná podle korigované absorbance (odečet pozadí) z kalibračního grafu
 V_1 objem extrakční směsi
 V_2 pipetovaný objem filtrátu
 V_3 objem odměrné baňky v ml, do které byl jímán eluát
m hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Pro premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Pro krmné směsi

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při teoretickém obsahu meticlorpindolu hodnotu: pod 100 mg/kg 5 mg/kg
nad 100 mg/kg 5 % relat

8. Poznámky

8.1 Methylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a zvlášť nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s ním je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Hodnoty absorbance pro vehikulum (balastní látky) premixů jsou velmi nepatrné a mají lineární závislost na vlnových délkách 267 a 327 nm. Meticlorpindol má silnou absorbanci při vlnové délce 267 nm, zatímco při 297 a 327 nm prakticky nulovou. Naměřené absorbance při 267 nm mohou být korigovány s ohledem na absorbanci vehikula při stejné vlnové délce (267 nm) podle uvedené rovnice.

8.3 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.15 Stanovení obsahu kurasanu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kurasanu v premixech.

2. Princip

Kurasan se stanoví po předextrakci ethylalkoholem a extrakci hexanem z chloridového výluhu, spektrofotometricky v UV oblasti při vlnové délce 361 nm.

3. Chemikálie

3.1 n-Hexan, spektrálně čistý (poznámka 8.1)

3.2 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 2 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$

3.4 Síran sodný, bezvodý (vyžíhaný)

3.5 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr pro měření v UV oblasti spektra.

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Do kuželové baňky na 100 ml se zábrusem se odváží asi 2 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g a přidá se 10 ml ethylalkoholu (3.5). Baňka se uzavře zátkou a vytřepává. Po usazení se ethylalkohol odlije, přidá se znovu 10 ml ethylalkoholu (3.5) a opět vytřepává. Toto se provede ještě 2krát, vždy po vytřepání a usazení vzorku se ethylalkohol odlije a dále se nepoužije. Ke vzorku v baňce se přidá 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) a po zazátkování baňky se vytřepává a výluh se filtruje suchým středně hustým filtrem do odměrné baňky na 100 ml. Extrakce vzorku 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) se provede ještě 2krát výluh se po usazení pevného podílu vždy slijí přes filtr do stejné 100 ml odměrné baňky. Tato se doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.3) po rysku a promíchá. Z tohoto zásobního roztoku se odpipetuje 10 ml do dělicí nálevky na 100 ml, přidají 4 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2), 10 ml n-hexanu (3.1) a vytřepává. Po oddělení fází se vodná fáze odpustí do další dělicí nálevky a hexanová fáze se filtruje přes suchý, středně hustý filtr, na němž je tenká vrstva síranu sodného (3.4), do odměrné baňky na 50 ml. K vodné fázi se přidá opět 10 ml n-hexanu (3.1) a znovu vytřepává, po oddělení se opět vodná vrstva odpustí do původní dělicí nálevky, hexanová vrstva se filtruje do stejné 50 ml odměrné baňky. Přídavek 10 ml n-hexanu (3.1) k vodné vrstvě, vytřepání a filtrace hexanového extraktu se provede ještě jednou a spojené hexanové extrakty se doplní v 50 ml odměrné baňce po rysku n-hexanem (3.1) a promíchají.

5.2 Absorbance se měří na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 361 nm v květech 10 mm oproti čistému n-hexanu (3.1).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah kurasanu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^6 \cdot A}{A_1 \cdot m}$$

kde A je absorbance naměřená při vlnové délce 361 nm
m alikvotní podíl navážky zkušebního vzorku v g
A₁ absorpční koeficient kurasanu (152,26)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

2.16 Stanovení obsahu salinomycinu

Metoda je uvedena v metodách pro zkoušení stimulatorů růstu pod číslem 1.6.

2.17 Stanovení obsahu monenzinu

Metoda je uvedena v metodách pro zkoušení stimulatorů růstu pod číslem 1.5.

2.18 Stanovení obsahu dinitolmidu

Tato metoda je překlad z Official Journal no L 108, 22/04/74

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dinitolmidu (3,5-dinitro-o-toluenamid) v krmivech, premixech a koncentrátech. Stanovení je rušeno nitrofuranovými deriváty. Mez stanovitelnosti je 40 mg/kg.

2. Princip

Dinitolmid se stanoví po extrakci vzorku acetonitrilem, vyčištění extraktu na sloupci oxidu hlinitého, odpaření alikvotního podílu do sucha a rozpuštění odparku v dimethylformamidu. Po vytvoření komplexu reakcí s ethylendiaminem se měří spektrofotometricky při vlnové délce 560 nm.

3. Chemikálie

3.1 Acetonitril 85 %

Příprava: Před použitím se smíchá 850 ml čistého acetonitrilu a 150 ml vody, destiluje se a jímá se frakce vrací mezi 75 až 77 °C.

3.2 Oxid hlinitý pro sloupovou chromatografii

Příprava: Oxid hlinitý se žhárá po dobu 2 hod. při teplotě 750 °C, ochladí v exsikatoru a uchovává v nádobce z hnědého skla a se zabroušenou zátkou. Před použitím se ve vhodné nádobce z hnědého skla zvlhčí tak, že se smíchá 10 g oxidu hlinitého a 7 ml vody, nádobka se zazátkuje, zahřívá po dobu 5 minut na vroucí vodní lázni (4.5) za intenzivního třepání a pak se za stálého třepání nechá vychladnout. Aktivita oxidu hlinitého se zkouší stanovením známé koncentrace standardního roztoku dinitolmidu (3.6). Výťažnost zkoušky musí být 100 ± 2 %.

3.3 N,N-dimethylformamid 95 %

Příprava: Smíchá se 95,0 ml N,N-dimethylformamidu s 5,0 ml vody.

3.4 1,2 diaminoethan s max. obsahem vody 2 %

3.5 Dinitolmid (3,5-dinitro-o-toluenamid), standardní substance. Bod tání: 177 °C

Absorpční koeficient v N,N-dimethylformamidu při vlnové délce 266 nm = $10,1 \cdot 10^3$

3.6 Dinitolmid, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 40 mg standardní substance dinitolmidu (3.5) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v acetonitrilu (3.1), doplní tímžé po rysku a promíchá.

Z tohoto roztoku se odpipetuje přesně 20,0 ml do odměrné baňky na 100 ml, doplní acetonitrilem (3.1) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 40 µg dinitolmidu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety o optické délce 10 mm)

4.2 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.3 Kelímek filtrační skleněný s fritou, průměr 60 mm, porosita S_3

4.4 Zařízení na filtraci za sníženého tlaku

4.5 Lázeň vodní s termostatem na 50 °C

5. Postup

Do kuželové baňky se zabroušenou zátkou, obsahu 250 ml, se odváží pro koncentráty a premixy asi 1 g a pro krmiva asi 10 g zhomogenizovaného zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,1 mg, přidá se 65 ml acetonitrilu (3.1), promíchá, nasadí zpětný chladič (4.2) a vloží na vodní lázeň (4.4) 50 °C teploty. Zahřívá se po dobu 30 minut za stálého třepání, potom se ochladí pod proudem studené vody, přidá se 20 g oxidu hlinitého (3.2), protřepává se po dobu 3 minut a nechá ustát.

Roztok s oxidem hlinitým (3.2) se filtruje za sníženého tlaku tak, že se nejdříve slijí čistý roztok, pak se převede na kelímek i oxid hlinitý pomocí několika ml acetonitrilu (3.1) a kapalina se z kelímku odsaje do připojené baňky. Po uvolnění sníženého tlaku se suspenduje filtrační koláč několika ml acetonitrilu (3.1) a znovu odsaje do téže baňky. Tato operace se opakuje tolikrát, dokud obsah v baňce nedosáhne asi 90 ml. Obsahu baňky se pomocí acetonitrilu kvantitativně převede do odměrné baňky na 100 ml (V_1). Potom se obsah baňky doplní acetonitrilem (3.1) po rysku a promíchá. Jestliže je třeba roztok ředit, pak se odpipetuje potřebný alikvotní podíl (V_2) obsahující, s ohledem na očekávaný obsah dinitolmidu ve zkušebním vzorku, 5 až 15 mg dinitolmidu v 1 ml a ředí se acetonitrilem (3.1) — zásobní roztok (V_3).

Ze zásobního roztoku (V_1 nebo V_3) se odpipetuje do tří kádínek (a, b, c) po 4 ml (V_4). Do jedné z kádínek (c) se přidá 1 ml standardního roztoku dinitolmidu (3.6), pak se všechny tři kádinky umístí na vodní lázeň (4.5), ohřátou na 50 °C, tato se umístí pod dobře táhnoucí odťah a roztoky se odpaří do sucha v proudě suchého vzduchu. Pak se tyto kádinky ochladí na teplotu laboratoře. Do jedné kádinky (a) se přidá přesně 10,0 ml dimethylformamidu (3.3), do ostatních dvou (b, c) pak přesně po 2,0 ml dimethylformamidu (3.3), ponechají se po několik minut reagovat, při mírném promíchávání až do úplného rozpuštění sedimentu. Potom se přidá do kádínek (b, c) přesně 8,0 ml diaminoethanu (3.4) a obsahy se promíchají. Přesně za 5 minut po přidání diaminoethanu se měří absorbance všech tří roztoků na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 560 nm proti dimethylformamidu (3.3).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah dinitolmidu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{(A_b - A_a) \cdot C \cdot V_1 \cdot V_4}{2 \cdot (A_c - A_b) \cdot m \cdot V_2 \cdot V_3}$$

kde A_a je absorbance roztoku a (blank)
 A_b absorbance roztoku b (vzorek)
 A_c absorbance roztoku c (s přidávkou standardu)
 m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
 V_1 objem zásobního roztoku v ml
 V_2 pipetovaný objem zásobního roztoku v ml
 V_3 pipetovaný objem pro ředění v ml
 V_4 objem ředěného zásobního roztoku v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při teoretickém obsahu dinitolmidu hodnotu:

pod 100 mg/kg	10 mg/kg
od 100 do 5 000 mg/kg	10 % relat.
od 5 000 do 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat.

2.19 Stanovení obsahu furazolidonu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 032, 05/02/75

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení furazolidonu v krmivech a premíchách. Mez stanovitelnosti metody je 10 mg/kg (10 ppm).

2. Princip

Po předběžné extrakci vzorku petroletherem (odtučnění) je vzorek extrahován acetonem, extrakt přečištěn na chromatografické koloně oxidu hlinitého, odpařen do sucha a po rozpuštění odparku v pentylalkoholu je furazolidon vyextrahován roztokem močoviny a stanoven spektrofotometricky při vlnové délce 375 nm.

3. Chemikálie

3.1 Aceton (poznámka 8.1)

3.2 Oxid hlinitý pro chromatografii, neutrální, 100 až 240 mesh

Příprava: 500 g oxidu hlinitého se rozetře v misce (4.9) s 1 000 ml horké vody, supernatant se dekantuje a dále nepoužije. Tento postup se provede ještě jednou a nakonec se oxid hlinitý filtruje přes Büchnerovu nálevku (4.10), vysuší v sušárně (4.11) při 105 °C do konstantní hmotnosti.

3.3 Pentylalkohol (poznámka 8.1) (možno použít i směs izomérů)

3.4 Petrolether (poznámka 8.1) s bodem varu 40 až 60 °C (extrakční činidlo)

3.5 Močovina, roztok 90 g/100 ml

Příprava: 90 g močoviny se vaří se 80 ml vody až do úplného rozpuštění a po vychlazení se doplní na 100 ml.

3.6 Furazolidon, standardní substance nejvyšší čistoty

3.7 Furazolidon, standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky (4.2) na 250 ml se odváží přesně 25,0 mg standardní substance furazolidonu (3.6), rozpustí v acetonu (3.1), tímžé doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 100 µg furazolidonu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety o optické délce 10 mm)

4.2 Baňky odměrné z tmavého skla (poznámka 8.2) na 100 a 250 ml

4.3 Dělicí nálevky z tmavého skla (poznámka 8.2) na 100 ml

4.4 Přístroj extrakční vhodné konstrukce (např. Soxhlet či Twisselmann) s topným tělesem v bezpečnostním provedení.

4.5 Patrony extrakční 25 × 80 mm, nebo 28 × 100 mm

4.6 Trubice chromatografická, skleněná, vnitřní průměr 10 mm, délka 300 mm

4.7 Lázeň vodní (parní) s termostatem

4.8 Vata skelná

4.9 Miska třecí vhodné velikosti s kopistí

4.10 Nálevka Büchnerova

4.11 Sušárna laboratorní s teploměrem do 120 °C

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Na dno chromatografické trubice (4.6), umístěné vertikálně, se vloží smotek vaty (4.8), udusá se pomocí vhodné tyčinky na sloupec vysoký 2 až 3 mm, přidá se oxid hlinitý (3.2) ve směsi s acetonem (3.1) v takovém množství, aby po usazení oxidu hlinitého byl sloupec vysoký asi 200 mm. Pod kolonu se umístí nádoba vhodného objemu. Aceton z kolony se odpustí až po výšku hladiny vrstvy oxidu hlinitého a dále se nepoužije (odlije).

5.1.2 Na vrch kolony se odpipetuje přesně 25 ml standardního roztoku furazolidonu (3.7) a promývá 3krát po 40 ml a 1krát 30 ml acetonu (3.1), přičemž eluát se jímá do podložené nádoby. Dále se postupuje podle 5.1.3.

Totéž se provede s 5,0, 7,5, a 10,0 ml standardního roztoku furazolidonu (3.7).

5.1.3 Acetonový eluát každého z kalibračních (standardních) roztoků resp. extraktu zkoušeného vzorku se odpaří na vroucí vodní lázni (4.7) do sucha (poznámka 8.3), odparek se rozpustí v 10 ml pentylalkoholu (3.3) a převede kvantitativně do dělicí nálevky (4.3). Nádoba v níž byl rozpuštěn odparek se ještě vypláchne 10 ml pentylalkoholu (3.3) a tento se přidá do stejné dělicí nálevky (4.3). Totéž se opakuje s 10 ml roztoku močoviny (3.5) a opět se převede do téže dělicí nálevky (4.3). Obsah dělicí nálevky se intenzivně vytřepává po dobu dvou minut. Po oddělení vrstev (3 až 4 minuty) se spodní vodná vrstva odpustí do odměrné baňky na 100 ml (4.2), do téže dělicí nálevky se znovu přidá 10 ml roztoku močoviny (3.5), protřepává a po oddělení vrstev se spodní vodná vrstva vypustí do stejné odměrné baňky (4.2). Totéž se opakuje ještě 3krát, potom se odměrná baňka doplní roztokem močoviny (3.5) po rysku a promíchá.

Měří se na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 375 nm proti samotnému roztoku močoviny (3.5) v kyvetě optické délky 10 mm.

5.1.4 Z naměřených hodnot absorbancí a jím odpovídajícím koncentracím furazolidonu se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

Do extrakční patrony (4.5) se odváží takové množství zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, které s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah furazolidonu ve zkoušeném vzorku obsahuje přibližně 1 mg furazolidonu, patrona se vloží do extrakčního přístroje (4.4). Extrahuje se petroletherem (3.4) tak, aby u typu Soxhlet došlo minimálně k 13 až 17 přetokům, u typu Twisselmann se extrahuje nejméně 30 minut od počátku zpětné konden-

zače extrakčního činidla (3.4). Po skončení extrakce se z patrony (4.5) odstraní zbytek extrakčního činidla pomocí prosávání horkým suchým vzduchem, nebo volným odpařením v době táhnutí digestoři (pozor na otevřený oheň). Potom se patrona se vzorkem umístí znovu do vyčištěného extrakčního přístroje (4.4) a extrahuje acetonem (3.1) tak, aby u typu Soxhlet došlo minimálně k 25 přetokům a u typu Twisselmann po dobu nejméně 30 minut. Konkrétní podmínky a množství použitých extrakčních činidel (3.4 i 3.1) se musí určit experimentálně u konkrétně použitého extrakčního přístroje (4.4). Acetónový extrakt se na vroucí vodní lázni (4.7) odpaří na objem 5 až 10 ml a ochladí na laboratorní teplotu.

Na vrch chromatografické kolony, připravené podle 5.1.1 se převede acetónový extrakt zkoušeného vzorku, nádoba v níž byl extrakt odpařován se vypláchne 3krát po 40 ml a 1krát 30 ml acetonu (3.1), přičemž výplach se převádí rovněž na chromatografickou kolonu. Eluát se jímá do podložené nádoby.

Dále se postupuje podle 5.1.3.

Množství furazolidonu se zjistí z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah furazolidonu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C}{m}$$

kde C je množství furazolidonu v µg zjištěné z kalibračního grafu
m návážka zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnost a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

od 10 do 20 mg/kg	50 % relat.
od 20 do 100 mg/kg	10 mg/kg
od 100 do 5 000 mg/kg	10 % relat.
od 5 000 do 10 000 mg/kg	500 mg/kg
nad 10 000 mg/kg	5 % relat.

8. Poznámky

8.1 Aceton, petrolether a Pentylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Všechny operace při tomto stanovení je nutno provádět minimálně při tlumeném světle.

8.3 Případně přítomné malé množství diacetonalalkoholu, vzniklého kondenzací acetonu na oxidu hlinitém musí být odstraněno, neboť by rušilo další extrakci.

2.20 Stanovení obsahu decoquinatu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 969.55

Účel, rozsah a princip

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu decoquinatu v premixech a krmných směsích.

Vzorek se extrahuje methanoličným roztokem chloridu vápenatého a obsah decoquinatu se stanoví fluorometricky.

2.21 Stanovení obsahu arprinocidu

Tato metoda je uvedena v Merck Sharp and Dohme Research Laboratories.

Účel, rozsah a princip

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu arprinocidu v premixech a krmných směsích.

Vzorek se extrahuje chloroformem a obsahu arprinocidu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí při 254 nm.

2.22 Stanovení obsahu ethopabátu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 964.29

Účel, rozsah a princip

Postup specifikuje podmínky pro stanovení ethopabátu v krmivech.

Obsah ethopabátu se stanoví po extrakci vzorku směsí methanol-voda a přečištěním chromatografií na pevné fázi metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s použitím UV detekce při 280 nm.

3.1 Stanovení obsahu dimetridazolu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dimetridazolu v premixech a v krmných směsích.

Pro účely této metody se používá následující definice:

Dimetridazol je chemoterapeutikum, zabírající černohlavostí krůt a zmetání krav. Po chemické stránce je to 1,2-dimethyl-5-nitro-imidazol, sumárního vzorce $C_7H_7N_3O_2$.

2. Princip

Dimetridazol se stanoví polarograficky po extrakci kyselinou chlorovodíkovou v prostředí octanu sodného.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(HCl) = 0,178 \text{ mol/l}$

3.2 Octan sodný, roztok $c(CH_3COONa) = 2 \text{ mol/l}$

3.3 Dusík žárovkárenský

3.4 Dimetridazol, standardní substance s účinností nejméně 90 %

3.5 Dimetridazol, standardní roztok (pro premixy)

Příprava: Odváží se asi 60 mg standardní substance dimetridazolu (3.4), s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v kyselině chlorovodíkové (3.1) a zředí vodou na takový objem, aby 1 ml tohoto standardního roztoku obsahoval 4 % teoretického obsahu dimetridazolu v 1 g zkoušeného vzorku.

3.6 Dimetridazol, standardní roztok (pro krmné směsi)

Příprava: Vypočtené množství standardní substance dimetridazolu (3.4) se rozpustí v kyselině chlorovodíkové (3.1) a zředí vodou tak, aby roztok obsahoval v 1 ml 0,06 mg dimetridazolu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Polarograf vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.2 Míchačka elektromagnetická

4.3 Třepačka (horizontální)

5. Postup (poznámka 8.1)

5.1 Premixy

Do kuželové širokohrdlé baňky se odváží asi 2 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a 10 minut se míchá na elektromagnetické míchačce (4.2). Po 15 minutách volného stání se převede do odměrné baňky na 150 (200) ml, doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Do dvou odměrných baněk na 25 ml se odpipetuje po 2 ml filtrátu, do jedné z baněk se přidá přesně 1 ml standardního roztoku dimetridazolu (3.5) do druhé baňky 1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), do obou baněk se odpipetuje po 10 ml roztoku octanu sodného (3.2), doplní po rysku vodou a promíchá.

Do polarografických nádobek se převedou přesně stejné díly obou roztoků a po 10 minutové deaeraci dusíkem (3.3) se roztoky polarografují proti SCE od 0 do -1,1 V. Výšky vln, které mají půlvlnový potenciál přibližně při -0,5 V, se změří.

5.2 Krmné směsi

Do kuželové baňky na 500 ml se odváží asi 20 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 250 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), baňka se uzavře zátkou a 20 minut se vytřepává na třepačce (4.3). Po 15 min. stání se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se odpipetuje po 5 ml do dvou odměrných baněk na 25 ml, do první z nich se odpipetuje ještě 1 ml standardního roztoku dimetridazolu (3.6) (3.6), do druhé pak 1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1). Do obou se pak odpipetuje po 10 ml roztoku octanu sodného (3.2), doplní vodou po rysku a promíchá.

Do polarografických nádobek se převedou přesně stejné díly obou roztoků a po 5 min deaeraci proudem (3.3) dusku se roztoky polarografují metodou diferenční pulzní při modulační amplitudě 50 mV proti argentochloridové elektrodě od +100 do -700 mV.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Premixy

Obsah dimetridazolu v mg/g (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot C \cdot F \cdot h}{(h_s - h) \cdot m}$$

kde h je výška vlny roztoku vzorku v mm

h_s výška vlny vzorku se standardem v mm

C hmotnost dimetridazolu ve standardním přídávku v mg

F faktor ředění

m navážka vzorku v g

6.2 Krmné směsi

Obsah dimetridazolu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{10^3 \cdot C \cdot F \cdot K \cdot h}{(h_s - h) \cdot m}$$

kde h je výška vlny roztoku zkoušeného vzorku v mm

h_s výška vlny roztoku zkoušeného vzorku se standardem v mm

C hmotnost dimetridazolu ve standardním přídávku v mg

K korekční faktor (experimentálně zjištěný = 1,047)

F faktor ředění

m navážka vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Premixy

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Krmné směsi

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

3.2 Stanovení obsahu dimetridazolu

Tato metoda je uvedena v LUFA č. 14.6.1

Účel, rozsah a princip

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dimetridazolu v krmných směsích.

Obsah dimetridazolu se stanoví po extrakci vzorku methylethylem a přečištění chromatografií na pevné fázi spektrofotometricky.

3.3 Stanovení dimetridazolu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dimetridazolu v premixech a krmných směsích.

Dimetridazol se používá jako chemoterapeutikum. Po chemické stránce se jedná o 1,2-dimethyl-5-nitroimidazol (sumárního vzorce $C_5H_7N_3O_2$, $M_r = 141,1$).

2. Princip

Obsah dimetridazolu se stanoví po extrakci ze vzorku směsným rozpouštědlem methylalkohol-voda (v premixech doplňkových látek) a přečištěním extraktu metodou SPE (v krmných směsích), metodou RP-HPLC na C_{18} s UV detekcí při vlnové délce 309 nm.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční roztok, methylalkohol + voda (9+1)

3.2 Eluční roztok, voda + acetonitril (7+3)

3.3 Dimetridazol (dále jen DMT), základní látka

3.3.1 Dimetridazol, základní roztok:

Příprava Do odměrné baňky na 200 ml se naváží asi 100 mg dimetridazolu (2.3), rozpustí v asi 180 ml extrakčního roztoku (2.1) na ultrazvukové lázni a po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,5 mg DMT.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokoúčinný (dále jen HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolona-reverzní fáze, injekční dávkovací zařízení, UV detektor, popř. i datastanice s integrovaným softwarem a tiskárna či jiné registrační zařízení)

4.2 Kolona reverzní fáze C_{18} , NovaPak 4 μm , 150 $\times$ 3,9 mm

4.3 Kolonka SPE, Alumina B Cartridges

4.4 Laboratorní třepačka

4.5 Membránový filtr 0,45 μm

4.6 Laboratorní odstředivka

5. Postup

5.1 Extrakce a separace na pevné fázi

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku (nejméně 2 g zkušební vzorku, nejvíce 20 g), aby po extrakci a následném ředěním byla koncentrace dimetridazolu 10 až 25 mg/l (pro premixy doplňkových látek 2 g, pro krmné směsi 15 g). Pak se přidá přesně 100,0 ml extrakční směsi (2.1) a kónická baňka se uzavře zátkou se zábrusem. Obsah se promíchá a extrahuje na laboratorní třepačce (4.4) po dobu 60 minut. Poté se obsah baňky nechá usát, a extrakt se filtruje přes suchý hustý skládaný papírový filtr do suché podložené nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Je-li třeba, extrakt se naředí na požadovanou koncentraci extrakčním roztokem (2.1) podle tabulky 1.

Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na pevné fázi. Kolonka SPE (4.3) se připojí k polyetylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlije asi 3 ml extraktu získaného podle prvního odstavce čl. 5.1. Na kolonku se nadávkuje asi 1 ml extraktu se nechá 20 sekund kondicionovat a pak se extrakt pomalu protlačí připojenou kolonkou. První podíl extraktu (0,1 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu (4.2).

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se vlastní extrakt (3.1) filtruje přes membránový filtr (4.5) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.6) při 3000 ot/min. Na chromatografickou kolonu se nástřikuje objem 10 μl extraktu.

Tabulka 1. Ředění premixů doplňkových látek

Obsah [mg/kg]	Ředění	Způsob ředění [ml/ml]
do 1500	2,5	10/25
od 1500 do 7500	12,5	2/25
od 7500 do 15 000	25	1/25
od 15 000 do 30 000	50	0,5/25
více jak 30 000	100	1/50

5.2 Vlastní měření

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Průtok	0,75 ml/min
Teplota	okolí
UV-detektor	309 nm
AUFS	1,000
Objem nástřiku	10 μl
Retenční čas	asi 2,4 min. (pro uvedenou kolonu)

5.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se postupně pipetuje 1,0 – 1,5 – 2,0 a 2,5 ml základního roztoku DMT (2.3.1), odměrné baňky se doplní extrakční směsí (2.1) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci 10 – 15 – 20 a 25 mg/l DMT.

Pracovní roztoky dimetridazolu (10 μl) se po ustavení rovnováhy na koloně nástřikují na chromatografickou kolonu (4.2) a ze získaných průběhů ploch jim odpovídajícím píkům se sestrojí kalibrační graf.

6. Výpočet

Obsah dimetridazolu (X) v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot R \cdot V}{m \cdot R_e}$$

kde C je koncentrace dimetridazolu odečtená z kalibrační křivky v mg/l

V objem extraktu v ml

R ředění

R_e recovery (0,99)

m hmotnost zkušební vzorku v g

7. Opakovatelnost

Nebyla zatím stanovena

- 1) Pye Unicam HPLC Applications, Number One, Analysis of Drugs in Animal Feedstuff.
- 2) VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungsanstalten), Methodenbuch Band III, 2.Erg. 1988, kapitola 14.19.1.
- 3) Analytical Methods Committee (Royal Society of Chemistry) /EEC Committee of Experts: Determination of Ronidazol in Animal Feeds by High-performance Liquid Chromatography. Analyst 108,1521-1524,1983.

4.1 Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu A a vitamínu E vedle sebe a to jak v krmných směsích, tak v premixech.

Vitamin A patří do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. V premixech je dávkován ve formě stabilního esteru palmitátu nebo acetátu. Pracovním postupem je vitamin A převeden na volný alkohol, který se v podobě all-trans (izomer s nejvyšší biologickou účinností) + cis izomeru stanoví metodou HPLC.

Vitamin E patří rovněž do skupiny vitaminů rozpustných v tucích. Do premixů je dávkován ve formě alfa-tokoferol acetátu, který se pracovním postupem převede na alfa-tokoferol, který se stanoví metodou HPLC.

2. Princip

Zkušební vzorek se zmydlní ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a uvolněné vitaminy A a E se extrahují na pevné fázi.

Eluát z pevné fáze se přímo dávkuje do systému HPLC a stanoví na přímé fázi metodou externího standardu pomocí UV detekce (vitamin A) nebo FF detekce (vitamin E).

3. Chemikálie

- 3.1 Ethylalkohol, absolutní (poznámka 8.1)
- 3.2 Ethylalkohol, denaturovaný 1% hexanu (poznámka 8.1)
- 3.3 Cyklohexan (poznámka 8.1)
- 3.4 Hydroxid draselný (KOH), roztok 500 g/l
- 3.5 Kyselina askorbová (poznámka 8.2)
- 3.5.1 Kyselina askorbová, 20% roztok. Roztok je třeba připravovat denně čerstvý
- 3.6 Sulfid sodný dekahydrát ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$) (poznámka 8.2)
- 3.7 Alkalický roztok sulfidu sodného
Příprava: 112 g sulfidu sodného (3.6) se rozpustí v 1 000 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4)
- 3.8 Butylhydroxytoluen (dále jen BHT) (poznámka 8.2)
- 3.9 Standard vitamínu A (all-trans-retinol palmitát)
- 3.10 Standard vitamínu E (DL-alfa-tokoferol)
- 3.11 Mobilní fáze
Příprava: směs 96,5 % cyklohexan + 3,5 % ethylalkohol absolutní (V/V)

3.12 Příprava základních standardních roztoků

3.12.1 Základní standardní roztok vitamínu A

Naváží se tolik standardní substance vitamínu A (3.9), aby se do práce vzalo 50 000 m.j. Toto množství se zmydlní a extrahuje podle postupu 5.1. Získá se základní standardní roztok vitamínu A o koncentraci cca 66 m.j./ml.

Skutečná koncentrace vitamínu A v základním standardním roztoku se zjistí spektrofotometricky proměřením absorbance proti cyklohexanu při vlnové délce 325 nm. (v cyklohexanu má koncentrace vitamínu A 33 333 m.j./ml absorbanci 1735, tedy koncentrace 10 m.j./ml by měla vykazat absorbanci 0,5205).

Získaný základní standardní roztok se uchovává v odměrce z tmavého skla v ledničce (poznámka 8.11).

3.12.2 Základní standardního roztoku vitamínu E

Naváží se přesně cca 50 mg DL alfa-tokoferolu (3.10) do 100 ml odměrky a doplní po značku cyklohexanem. Tento základní standardní roztok má koncentraci cca 500 µg/ml.

Skutečnou koncentraci vitamínu E v zásobním roztoku lze kontrolovat spektrofotometrickým měřením při vlnové délce 292 nm proti cyklohexanu (v cyklohexanu má koncentrace vitamínu E 50 µg/ml absorbanci 0,420).

Získaný základní standardní roztok se uchovává v odměrce z tmavého skla v ledničce (poznámka 8.11).

3.12.3 Pracovní standardní roztoky vitaminů A a E

Pracovní standardní roztoky se připravují ředěním základního standardního roztoku (3.12.1 nebo 3.12.2) tak, aby z nich připravené kalibrační koncentrace pro nástřik do HPLC systému dosahovaly přibližně hodnot, které odpovídají koncentracím vzniklým zpracováním vzorku.

Koncentrace pracovních standardních roztoků se doporučují pro:

vitamin A: 0,045 až 10 m.j./ml (max. 15 m.j./ml)
vitamin E: 1,5 až 50 µg/ml (max. 80 µg/ml).

Při současném stanovení vitamínu A a E v jednom nástřiku je možno připravit směsný pracovní standardní roztok.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Vysokoučinný kapalinový chromatograf [čerpadlo, kolona přímá fáze Si, např. Tessek 150 × 3,5 µm; injektážní dávkovací zařízení (autosampler, rheodyne), UV nebo FF detektor (poznámka 8.10), data stanice s integračním software, tiskárna nebo jiné registrační zařízení]
- 4.2 Wagnerovo kolo nebo vodní lázeň s mícháním
- 4.3 Kolony EXTRELUT (MERCK, kat. č. 11737)

5. Postup (poznámka 8.4)

5.1 Příprava vzorku

Podle předpokládaného obsahu vitamínu A se naváží dobře rozemletý a zhomogenizovaný zkušební vzorek podle následující tabulky:

deklarované množství vitamínu A (m.j./kg)	navážka vzorku (g)
4 000— 50 000	30
50 000— 200 000	20
200 000—1 000 000	10
1 000 000—5 000 000	5

(poznámka 8.6)

Mletí se provede těsně před zpracováním a to tak, aby při něm nedošlo k zahřátí vzorku.

5.2 Zmýdelnění:

K naváženému vzorku ve zmýdelňovací baňce se přidá 130 ml ethylalkoholu (3.1), 30 ml roztoku (3.7), dále 1 g kyseliny askorbové (3.5) a na špičku nože BHT (3.8) (poznámka 8.2).

Zmýdelňování probíhá za stálého míchání pod zpětným chladičem v atmosféře dusku při teplotě 80 °C po dobu 30 minut (poznámka 8.7). Po uplynutí této doby se baňka vyjme z vodní lázně a nechá se pod zpětným chladičem ochladit na laboratorní teplotu. V případě potřeby se vychladlý obsah baňky zfiltruje přes skládaný filtr (prvních 10 ml vylijeme do odpadu).

5.3 Extrakce:

Pipetuje se 40 ml filtrátu a doplní do 50 ml odměrné baňky roztokem kyseliny askorbové (3.5.1). Po řádném promíchání eventuálně vzniklé emulze se pipetuje 15 ml na kolonu EXTRELUT. Po 15 minutách se zakotvená organická fáze vymyje cyklohexanem. Eluát se jímá do 50 ml odměrné baňky po rysku a takto připravený vzorek se přímo dává do HPLC systému. (Všechny operace je nutné provádět za omezeného přístupu světla).

5.4 Vlastní postup

Z pracovních standardních roztoků se naředěním asi na 70, 100 a 130 % vypočtené nástříkové koncentrace vzorku sestaví tříbodový kalibrační graf, kde plocha píků je úměrná koncentraci standardů.

Předpokládaná nástříková koncentrace vitamínu A (E) ve (ze) vzorku se vypočte podle vztahu:

$$C = 1,5 \cdot 10^{-3} \cdot D \cdot m$$

kde C je předpokládaná nástříková koncentrace (vit A — m.j./ml, vit E — µg/ml)

D deklarovaná hodnota (vit A — m.j./g, vit E — µg/g)

m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Do kapalinového chromatografu se po ustavení rovnováhy kolony nástříkuje standard i vzorek dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích příslušných nástříků se nesmí lišit o více než 2 %.

Doporučené podmínky pro analýzu:

teplota kolony	teplota okolí
průtok mobilní fáze	0,9 ml/min
injektovaný objem	20 µl
kolona	např. Tessek 150 × 3,5 µm (přímá fáze Si)
retenční čas	při popsané koloně vitamín A = 3,7 min.
retenční čas	vitamín E = 1,6 min.)

detekce:

	UV	š.p.	FF exc.	š.p.	FF em.	š.p.
vit A	325 nm	2–5 nm	325 nm	20 nm	480 nm	40 nm
vit E	292 nm	2–5 nm	292 nm	2 nm	330 nm	40 nm

(poznámka 8.8)

6. Výpočet

Obsah vitamínu A a vitamínu E (poznámka 8.5) se ve zkoušeném vzorku se v m.j./kg resp. mg/kg se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{666,667 \cdot C_1}{m}$$

kde C_1 je koncentrace příslušného solutu zjištěná z kalibrace metodou vnějšího standardu (m.j./l, resp. µg/ml)
m hmotnost navážky zkoušeného vzorku v g

Výsledek analýzy je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti.

7. Opakovatelnost

Nebyla zatím stanovena

8. Poznámky

8.1 Cyklohexan, ethylalkohol jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Kyselina askorbová a BHT se přidávají jako antioxidanty a Na_2S pro vázání těžkých kovů.

8.3 Uvedený vzorec platí, pouze pokud se použitý pracovní postup neliší od popsané metody.

Další příklad volby navážky a výpočtu nástříkových koncentrací pro:

a) krmné směsi

Vzorek má deklarovanou hodnotu vitamínu A 5 000 m.j./kg a vitamínu E 30 000 mg/kg. Podle tabulky (5.1) se naváží 30 g vzorku. Dosazením do vzorce pro C (5.3), se získá pro vitamín A hodnota nástříkové koncentrace $C = 0,225$ m.j./ml a pro vitamín E hodnota nástříkové koncentrace $C = 1,35$ µg/ml.

b) premixy

Vzorek má deklarovanou hodnotu vitamínu A 1 400 000 m.j./kg a vitamínu E 3 000 000 mg/kg. Podle tabulky (5.1) se naváží 5 g vzorku. Dosazením do vzorce pro C (5.3), se získá pro vitamín A hodnota nástříkové koncentrace $C = 10,05$ m.j./ml a pro vitamín E hodnota nástříkové koncentrace $C = 22,5$ µg/ml.

8.4 Všechny operace je nutné provádět za omezeného přístupu světla.

8.5 Výsledek stanovení obsahu vitamínu A je třeba interpretovat jako obsah all-trans a cis izomeru.

Výsledek stanovení obsahu vitamínu E je třeba interpretovat jako celkový obsah alfa-tokoferolu. Kromě této modifikace se ještě může vitamin E v přírodních materiálech (tj. surovinách) vyskytovat v podobě beta, gama i delta tokoferolu, nebo i alfa, beta, gama, delta tokotrienolu. Tyto nativní obsahy jsou však velmi nízké a jejich zastoupení je v různých materiálech různé. Z teoretického hlediska však je nutno na tento fakt upozornit.

8.6 Jestliže se při deklarované hodnotě 1 000–4 000 m.j./kg vitamínu A paralelní výsledky liší navzájem o více jak 2 %, je doporučeno zvýšit navážku na 60 g vzorku a zdvojnásobit množství všech použitých chemikálií při zmýdelňování vzorku.

8.7 Saponifikaci je možné provádět přes noc (min. 12 hod.) za normální teploty v uzavřených Erlenmayrových baňkách uchyćených v rotační míchačce (tzn. Wagnerovo kolo). Dosáhneme tím menšího rozptylu výsledků.

8.8 BHT (buthylhydroxytoluén) má velmi podobné podmínky FF detekce jako alfa-tokoferol (excitační vln. délka 283 nm, emisní vln. délka 310 nm). Při správných podmínkách chromatografie (především kvalita kolony) je peak BHT separován (reteční čas je nižší než u vitamínu E). V případě špatné separace může nastat stav, kdy retenční časy BHT a vitamínu E jsou shodné, což samozřejmě vede k nesprávným výsledkům.

8.10 UV detektor a FF detektor jsou zapojeny v sérii, což umožňuje stanovení vit. A i vit. E na jeden nástřik.

8.11 Základní standardní roztok není třeba vždy připravovat čerstvý, protože „slábnutí“ standardu lze spektrofotometricky sledovat. S aktualizovanou hodnotou se počítá ve výpočtu.

4.2 Stanovení obsahu vitamínu A

4.2A Stanovení obsahu vitamínu A –

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 083, 30/03/73.

1A. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dva rovnocenné způsoby stanovení, pro nižší obsahy do 2 000 mg/kg a modifikace pro obsahy vyšší než 2 000 mg/kg. Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení vitamínu A (retinolu) v krmivech, koncentrátech a premixech. Mez stanovitelnosti metody je 10 000 m.j./kg pro vysoce pigmentovaná krmiva a 4 000 m.j./kg pro ostatní (poznámka 8.1).

2A. Princip

Vzorek je hydrolyzován za tepla hydroxidem draselným v ethylalkoholu za přítomnosti antioxidantu, směs je extrahována 1,2-dichlorethanem, extrakt odpařen do sucha a po rozpuštění odparů je roztok čištěn přes chromatografický sloupec oxidu hlinitého (poznámka 8A.2).

Pro krmiva s obsahem do 200 000 m.j./kg je vitamin A stanovován spektrofotometricky při vlnové délce 610 nm po převedení na barevný komplex, pro krmiva s obsahem nad 200 000 m.j./kg spektrofotometricky přímo v UV oblasti spektra při vlnové délce 325 nm.

3A. Chemikálie

3A.1 Obecně

3A.1.1 Ethylalkohol 96 % (poznámka 8A.3)

3A.1.2 Askorban sodný, roztok 100 g/l

3A.1.3 Dusík kyslíku prostý

3A.1.4 Hydroxid draselný, roztok 500 g/l

3A.1.5 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 0,1 mol/l

3A.1.6 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 0,5 mol/l

3A.1.7 1,2-Dichlorethan

3A.1.8 Petrolether (poznámka 8A.3), bodu varu 30 až 50 °C, je-li třeba přečištěný následovně:

100 ml petroletheru se v dělicí nálevce míchá s dávkami koncentrované kyseliny sírové a odděluje až kyselina zůstane zcela bezbarvá. Po odstranění kyseliny se petrolether promývá postupně 500 ml vody, dvakrát po 250 ml roztoku hydroxidu sodného (100 g/l) a pak ještě 3krát po 500 ml vody. Po posledním oduštění vodné vrstvy se přidá aktivní uhlí a bezvodý síran sodný, ponechá stát 1 hod., zfiltruje se a předestiluje (poznámka 8A.3).

3A.1.9 Oxid hlinitý, standardizovaný podle Brockmanna

Příprava: Oxid hlinitý se žhře po dobu 8 hod. v mušlové peci (4A.6) při teplotě 750 °C, ochladí v exsikatoru a uchovává v nádobce z hnědého skla uzavřené zabroušenou zátkou. Před použitím se 10 g oxidu hlinitého ve vhodné nádobce zvlhčí přesně 0,7 ml vody, nádobka se uzatkuje a na vroucí vodní lázni (4A.1) se zahřívá po dobu 5 minut za stálého míchání. Po ochlazení se přezkouší aktivita takto upraveného oxidu hlinitého pomocí známého množství retinolu (3A.1.17) (asi 500 m.j.) podle postupu 5A.3 a 5A.4 kontrolním testem.

3A.1.10 Oxid hlinitý, bázičský – stupeň aktivity I (např. od fy Woelm, Merck či srovnatelné kvality)

3A.1.11 Diethylether (poznámka 8A.3), peroxidů i stop vody zbavený na sloupci s bázičským oxidem hlinitým (3A.1.10). Na 250 ml diethyletheru se použije 25 g oxidu hlinitého.

3A.1.12 Petrolether–diethylether, směsi (96+4), (92+8), (88+12), (84+1) a (80+20) (poznámka 8.3)

3A.1.13 Sulfid sodný, roztok c(Na₂S) = 0,5 mol/l v 70% glycerínu

3A.2 Pro krmiva s obsahem vitamínu A pod 200 000 m.j./kg, navíc

3A.2.1 Benzen (poznámka 8A.3)

3A.2.2 Chloroform, speciálně čištěný

Úprava: Na sloupec asi 50 g bázičského oxidu hlinitého (3.1.10) se převede 200 ml chloroformu v dávkách po 50 ml, prvních 50 ml se doporučuje znovu vrátit na průtok kolonou.

3A.2.3 Chlorid antimonitý, roztok – komplexotvorné činidlo

Příprava: Asi 25 g chloridu antimonitého (SbCl₃), předem uchovaného v exsikatoru (tedy vysušeného) se smíchá se 100 ml chloroformu (3A.2.2) a v míchání se pokračuje až je chlorid antimonitý téměř zcela rozpuštěn (malý nerozpuštěný zbytek nevádí). Do této směsi se přidá 2 ml acetahydridu, promíchá a uloží do chladničky uzavřený v nádobce z hnědého skla zabroušenou zátkou. Takto uchované činidlo je stabilní po dobu několika týdnů.

3A.2.4 Retinol, standardní substance vitamínu A o známé aktivitě, ověřené spektrofotometricky

3A.2.5 Indikátor fenolftalein

3A.3 Pro krmiva (premixy, koncentráty) s obsahem nad 200 000 m.j. v 1 kg

3A.3.1 Isopropylalkohol pro chromatografii

4A. Přístroje a pomůcky

- 4A.1 Spektrofotometr pro měření ve viditelné i UV oblasti spektra s příslušenstvím (kyvety optické délky 10 mm, skleněné i křemenné), popřípadě registrační typ
- 4A.2 Odparka vakuová s příslušenstvím (baňky s kulatým dnem různého obsahu)
- 4A.3 Trubice chromatografická, skleněná vnitřní průměr asi 13 mm, délka 300 mm
- 4A.4 Lázeň vodní s termostatem
- 4A.5 Chladič zpětný vodní, se zábrusem
- 4A.6 Nálevky dělicí vhodných obsahů

5A. Postup (poznámka 8A.4)

5A.1 Navážky zkušební vzorku (s přesností nejméně na)

Koncentráty (obsahy nad 20 000 m.j./kg)	0,1 až 1,0 g (0,001 g)
Premixy (obsahy mezi 400 až 20 000 m.j./kg)	3 až 5 g (0,001 g)
Minerální směsi	10 až 20 g (0,01 g)
Krmiva (obsahy pod 400 m.j./kg)	30 g (0,1 g)

Navazuje se ve všech případech do kuželové baňky se zábrusem obsahu 500 ml.

5A.2 Hydrolyza a extrakce (poznámka 8A.5)

Do kuželové baňky s odváženým vzorkem se přidá postupně 40 ml ethylalkoholu (3A.1.1), 2 ml roztoku askorbanu sodného (3A.1.2) (poznámka 8A.6), 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3A.1.4) a 2 ml roztoku siřnku sodného (3A.1.13), zahřívá se na vodní lázni (4A.4) při teplotě 70 až 80 °C pod zpětným chladičem (4A.6) po dobu 30 minut. Potom se rychle ochladí proudem studené vody. K hydrolyzátu se přidá 50 ml ethylalkoholu (3A.1.1) a přesně 100,0 ml 1,2-dichlorethanu (3A.1.7), směs se intenzivně protřepe a po usazení se kapalná část dekantuje do dělicí nálevky. Po přidání 150 ml roztoku hydroxidu draselného (3A.1.5) se vytrpává po dobu 30 sekund a po oddělení vrstev se spodní dichlorethanová vrstva odpustí do jiné dělicí nálevky, přidá 40 ml roztoku hydroxidu draselného (3A.1.6) a vytrpává opět po dobu 10 sekund. Po oddělení vrstev se spodní dichlorethanová vrstva opět odpustí do další dělicí nálevky a postupně promývá 6 až 8krát po 40 ml vody, přičemž vždy po oddělení vrstev a odpustění se vodní vrstva zkouší na alkalickou reakci indikátorem fenolftaleín. Po zjištění negativní reakce vodné vrstvy se extrakt zbaví posledních zbytků vody pomocí ponoření proužku filtračního papíru. Alikvotní část filtrátu se odpaří na odparce (4A.2) za sníženého tlaku při teplotě 40 °C do sucha, odparek se rozpustí ihned v 5 ml petroletheru (3A.1.8).

Dále se postupuje podle obsahu vitamínu A ve zkoušeném vzorku.

5A.2.1 Krmiva s obsahem vitamínu A vyšším než 20 000 m.j./kg

Roztok připravený podle 5A.2 se převede do odměrné baňky na 50 ml, doplní petroletherem (3A.1.8) po rysku a promíchá. Alikvotní podíl obsahující, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu A ve zkoušeném vzorku, asi 200 m.j. vitamínu A se odpipetuje do odpařovací baňky a na odparce (4A.2) se odpaří za sníženého tlaku do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 25,0 ml isopropylalkoholu (3A.3.1) a roztok se měří na spektrofotometru (4A.4) v křemenných kyvetách při vlnových délkách 310, 325 a 334 nm (u registračního typu se pořídí záznam spektra od 310 do 334 nm). Maximum absorpce by mělo být při vlnové délce 325 nm.

Poměr absorbancí $A_{310} : A_{325} : A_{334} : A_{325}$ musí být 6 : 7 tj. 0,857 s maximální odchylkou 0,830 až 0,880. Není-li tato podmínka splněna, přečistí se extrakt připravený podle 5A.2 na chromatografickém sloupci podle 5A.4 a postupuje se podle 5A.2.2 jako u krmiv s obsahem vitamínu A nižším než 20 000 m.j./kg (poznámka 8A.7).

5A.2.2 Krmiva s obsahem vitamínu A nižším než 20 000 m.j./kg

5A.2.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady vhodných nádobek se diferencovaně odváží množství odpovídající 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,0 a 15,0 m.j. standardní substance retinolu (3A.2.4) s přesností nejméně na 0,001 g. Do každé nádoby se přidá přesně 0,3 ml benzenu (3A.2.1), po rozpuštění promíchá, přidá dále přesně 3,0 ml komplexotvorného činidla (3A.2.3) a po promíchání se každý roztok proměří na spektrofotometru (4A.1) ve skleněných kyvetách při vlnové délce 610 nm.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících množství se sestrojí kalibrační graf. Kalibrační graf se pravidelně ověřuje s čerstvě připravenými kalibračními roztoky i komplexotvorného činidla (3A.2.3).

5A.2.2.2 Vlastní provedení

Z chromatografické trubice (4A.3), umístěné vertikálně, se připraví chromatografický sloupec, do něhož se převede 10 g oxidu hlinitého (3A.1.9), předběžně rozmíchaného s petroletherem (3A.1.8) na kaši tak, aby sloupec byl asi 200 mm vysoký.

Na takto připravenou kolonu se převede roztok připravený podle 5A.2 (poznámka 8A.4) a okamžitě se dávkuje na kolonu 20 ml petroletheru (3A.1.8). Eluce se provádí postupně přidávanými 10 ml dávkami směsi petrolether-diethylether (3A.1.12) v pořadí stoupajícího obsahu diethyletheru tj. (96 + 4), (92 + 8), (88 + 12), (84 + 16) a (80 + 20) a to buď pod tlakem shora kolony nebo snížením tlaku na spodu kolony tak, aby průtok roztoku sloupcem byl 2 až 3 kapky za sekundu. Při eluci se sloupec v krátkých intervalech osvětluje rtuťovou lampou (4A.5). První je eluován karoten (poznámka 8.8), retinol je úplně eluován směsí (3A.1.12) (80 + 20). Fluoreskující zóna retinolu je zcela čistě oddělena od následující žluté zóny xanthofylu. Frakce ve kterých je obsažen retinol se shromáždí do odpařovací baňky a roztok se na odparce (4A.2) za sníženého tlaku odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 2,0 ml benzenu (3A.2.1), po rozpuštění a promíchání se z tohoto odpipetuje přesně 0,3 ml do vhodné nádoby, přidá přesně 3,0 ml komplexotvorného činidla (3A.2.3), přičemž se roztok zbarví modře. Přesně 30 sekund po přidání komplexotvorného činidla promíchání se měří absorpance roztoku na spektrofotometru (4A.1) ve skleněných kyvetách při vlnové délce 610 nm.

Množství vitamínu A v měřeném roztoku se zjistí z kalibračního grafu.

6A. Výpočet a vyjádření výsledku

6A.1 Krmiva s obsahem vitamínu A vyšším než 20 000 m.j./kg (měření v UV oblasti – viz 5A.2.1)

Obsah vitamínu A v m.j./kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{A_{325} \cdot A_0 \cdot F}{m} \quad (\text{poznámka 8A.4})$$

kde A_{325} je maximální absorpance, která se nachází mezi 323 nm až 327 nm vlnové délky

A_0 absorpční koeficient pro vitamin A (retinol) (1 830)

F faktor ředění

m hmotnost navážky zkušební vzorku

6A.2 Krmiva s obsahem vitamínu A nižším než 20 000 m.j./kg (měření ve viditelné oblasti)

Obsah vitamínu A v m.j./kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{10^3 \cdot F \cdot m_1}{m}$$

kde m_1 je množství vitamínu A v m.j. zjištěné z kalibračního grafu

F faktor ředění

m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé m.j./kg.

7A. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 75 000 m.j./kg	20 % relat.
od 75 000 do 150 000 m.j./kg	15 000 m.j.
od 150 000 do 250 000 m.j./kg	10 % relat.
od 250 000 do 500 000 m.j./kg	25 000 m.j.
nad 500 000 m.j./kg	5 % relat.

8A. Poznámky

8A.1 1 m.j. = 0,3 µg retinolu

8A.2 Pro krmiva s obsahem vitamínu A nad 20 000 m.j./kg je tento krok vyžadován jen v určitých případech (viz poznámka 8A.7)

8A.3 Ethylalkohol, petrolether, diethylether, benzen a isopropylalkohol jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné dodržovat bezpečnostní pravidla. Zejména případná destilace (regenerace) těchto látek se provádí zahřívacím médiem v bezpečnostním provedení.

8A.4 Všechny operace se provádějí při tlumeném světle, pokud možno v nádobkách z hnědého skla, nebo vhodně uzpůsobených proti průniku světla.

8A.5 U mléčných krmných směsí nebo v krmivech obohacených surovin, které mají sklon ke shlukování či botnání se dávky činidel uvedené v 5A.2.1 zdvojnásobují.

8A.6 Pokud se hydrolýza provádí v duskové atmosféře, roztok askorbátu sodného není nutné přidávat.

8A.7 U krmiv s vitamínem A vyšším než 20 000 m.j./kg se dělení na chromatografickém sloupci provede jen v případě, pokud měření podle 5A.2.1 nespĺňuje tam uvedené požadavky. Jestliže se chromatografické dělení ukáže nezbytné, odebere se z roztoku připraveného podle 5A.2 alikvotní podíl obsahující, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu A ve zkoušeném vzorku, 500 m.j. vitamínu A a postupuje podle 5A.2.2.2.

8A.8 Obsah karotenu může být stanoven měřením absorbance při vlnové délce 450 nm.

4.2B Stanovení obsahu vitamínu A

1B. Účel a rozsah

Pro stanovení v premixech jsou uvedeny dvě metody a to buď za přítomnosti robenidinu a antioxidačních látek, nebo za nepřítomnosti jedné nebo obou z nich.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení vitamínu A v premixech a krmných směsích, včetně mléčných.

Pro účely této metody se používá definice:

Vitamin A (retinol), je po chemické stránce 3,7-dimethyl-9(2,6,6-trimethyl-1-cyklohexan-1-yl)2,4,6,8-nonantetraen-1-ol, sumárního vzorce $C_{20}H_{30}O$.

2B. Princip

Vitamin A se stanoví spektrofotometricky po zmydelnění vzorku, extrakci do vhodného extrakčního činidla, eventuálně po chromatografickém oddělení nebo ještě reextrakci pro odstranění robenidinu.

3B. Chemikálie

3B.1 Obecně

3B.1.1 Dusík žárovkárenský (v tlakové láhvi opatřené redukčním ventilem)

3B.1.2 Vitamin A, standardní substance (retinol) o známé účinnosti

3B.1.3 Hydroxid draselný, pevný

3B.1.4 Hydroxid draselný, roztok 100 g/l ve zředěném ethylalkoholu

Příprava: Odváží se 100 g hydroxidu draselného (3B.1.3) do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí ve 100 ml vody, po ochlazení doplní po rysku ethylalkoholem (3B.1.6) a promíchá.

3B.1.5 Hydroxid draselný, roztok 200 g/l ve zředěném ethylalkoholu

Příprava: Odváží se 200 g hydroxidu draselného (3B.1.3) do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí se 200 ml vody, po ochlazení se doplní po rysku ethylalkoholem (3B.1.6) a promíchá.

3B.1.6 Ethylalkohol 96% (poznámka 8B.1)

3B.1.7 Směs ethylalkohol-voda (1 + 1)

3B.1.8 n-Hexan, spektrálně čistý (poznámka 8B.1)

3B.1.9 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 0,01 mol/l

3B.1.10 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 1 mol/l

3B.1.11 Síran sodný, bezvodý

3B.1.12 Křemelin-Hyflo-Supercel

3B.2 Pro chromatografické dělení (navíc)

3B.2.1 Aceton (poznámka 8B.1)

3B.2.2 Eluční směs A: n-hexan (3B.1.8) – aceton (3B.2.1), směs (98 + 2) (poznámka 8B.1)

3B.2.3 Eluční směs B: n-hexan (3B.1.8) – aceton (3B.2.1), směs (95 + 5) (poznámka 8B.1)

3B.2.4 Oxid hlinitý pro chromatografii, neutrální aktivita II–IV

Příprava: Oxid hlinitý aktivita I se deaktivuje 24 hod. před použitím přidáním potřebného množství vody k odváženému množství v zábrusové baňce, směs se důkladně roztřepe až se případné hrudky zcela rozpadnou.

Uchovává se vzduchotěsně uzavřen.

3B.2.5 Hydroxid draselný, roztok 50 g/50 ml.

4B. Přístroje a pomůcky

4B.1 Obecně

4B.1.1 Spektrofotometr registrační s příslušenstvím pro měření v UV oblasti spektra

4B.1.2 Aparatura zmýdelňovací pro práci v inertním prostředí

4B.1.3 Lázeň vodní s termostatem

4B.1.4 Odparná vakuová rotační s příslušenstvím

4B.1.5 Chladič zpětný, vodní

4B.1.6 Výbojka rtuťová vysokotlaká s filtrem o vlnové délce 366 nm

4B.2 Pro chromatografické dělení (navíc)

4B.2.1 Trubice chromatografická s kohoutem, vnitřní průměr 8 mm až 11 mm

5B. Postup (poznámka 8B.2 a 8B.6)

5B.1 Premixy

5B.1.1 Bez chromatografického dělení

5B.1.1.1 Do zmýdelňovací baňky na 250 ml se odváží asi 2,5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,001 g (poznámka 8B.4), přidá se 5 ml ethylalkoholu (3B.1.6) a vzorek se nechá provlhčit. Potom se přidá 50 ml roztoku hydroxidu draselného (3B.1.4) na baňku se nasadí zpětný chladič (4B.1.5), zavede se přívod dusíku (3B.1.1) a 5 minut se jím vzorek probublává. Potom se baňka vloží na vodní lázeň (4B.1.3) a při teplotě 80 °C se zmýdelňuje po dobu 20 minut pod neustálým proudem dusíku (3B.1.1). Po sejmutí z vodní lázně se obsah baňky ochladí, přidá se 50 ml vody a po promíchání se obsah baňky převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl vzorku zůstal v baňce. Směs v dělicí nálevce se důkladně vytřepe 3krát 30 ml n-hexanu (3B.1.8) tak, že vždy se odměřenou částí n-hexanu propláchne pevný podíl v baňce. Hexanové extrakty se spojí v dělicí nálevce na 250 ml, přidá se 30 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3B.1.9), důkladně se protřepe, po oddělení a odpuštění spodní vodné fáze se hexanový extrakt promyje ještě třikrát 50 ml vody, až již vodná fáze reaguje neutrálně (např. na pH papírek). Hexanový extrakt se vysuší přidávkou malého množství vyžhnaného síranu sodného (3B.1.11), zfiltruje středně hustým filtrem, na který se přidá malé množství křemeliny (3B.1.12) do odměrné baňky na 100 ml, doplní n-hexanem (3B.1.8) po rysku a promíchá.

5B.1.1.2 Při předpokládání obsahu vitamínu A ve zkušebním vzorku nejméně 2 000 m.j./g se směs v dělicí nálevce vytřepává s 30 ml n-hexanu (3B.1.8) nejméně 5krát, spojené extrakty po promytí roztokem kyseliny chlorovodíkové (3B.1.10) a vodou, po vysušení síranem sodným (3B.1.11) se zfiltrují za výše uvedených podmínek do odměrné baňky na 200 ml, doplní n-hexanem (3B.1.8) po rysku a obsah baňky se promíchá.

5B.1.1.3 Za přítomnosti robenidinu ve zkušebním vzorku se odpipetuje 10 ml hexanového extraktu do dělicí nálevky vhodného objemu, přidá se 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3B.1.10) a po vytřepání a oddělení se spodní vodná vrstva odpustí a dále se nepoužije. Vytřepání s 20 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3B.1.10) se provede ještě jednou, hexanový extrakt se promyje dvakrát 10 ml vody, přičemž spodní vodná fáze se vždy odpustí a dále nepoužije. Oddělená a důkladně promytá hexanová fáze (extrakt) se filtruje středně hustým filtrem přes malé množství síranu sodného (3B.1.11) do odpařovací baňky (4B.1.4), obsah se na odparce (4B.1.4) odpaří do sucha a odparek se rozpustí v 10 ml n-hexanu (3B.1.8).

5B.1.1.4 Po naředění na koncentraci vhodnou pro používání registračního spektrofotometru (4B.1.1) pomocí n-hexanu (3B.1.8) se měří absorbance v rozsahu vlnových délek 300 až 340 nm, v kyvetě optické délky 10 mm proti čistému n-hexanu (3B.1.8), který nevykazuje žádnou absorbanci při těchto vlnových délkách. Maximum absorbance zkušebního vzorku by mělo být při vlnové délce 325 ± 2 nm.

5B.1.2 Za chromatografického dělení (poznámka 8B.2)

5B.1.2.1 Postupuje se podle 5B.1.1.1 popř. 5B.1.1.2 a chromatografické dělení se provede následovně:

5B.1.2.2 Na dno chromatografické trubice (4B.2.1) se vloží malý smotek obvazové vaty, trubice se umístí do svislé polohy a vata se převrství asi 5 ml n-hexanu (3B.1.8). Asi 4 až 6 g oxidu hlinitého (3B.1.3) se suspenduje v n-hexanu (3B.1.8) a po částech se vlije do chromatografické trubice (4B.2.1), která se jím naplní do výšky asi 70 mm. Navrch sloupce oxidu hlinitého (3B.1.3) se přidá vrstva bezvodého síranu sodného (3B.1.11) o výšce asi 5 až 10 mm. Nakonec se sloupec propláchne asi 10 ml n-hexanu (3B.1.8).

5B.1.2.3 Na připravený sloupec se odpipetuje přesně 10,0 ml hexanového extraktu zkušebního vzorku a po jeho vsáknutí do sloupce se ihned přidá 20 ml n-hexanu (3B.1.8). Průtok kolonou se pozoruje ve světle rtuťové výbojky (4B.1.6); balastní látky světélkují světle modře. Tyto se eluují směsí hexan–aceton (3B.2.2) a po jejich odstranění se eluuje žlutozelená zóna vitamínu A pomocí směsi hexan–aceton (3B.2.3), která se jímá do baňky odparky (4B.1.4). Po skončení eluce se baňka s eluátem vloží do odparky (4B.1.4) a obsah baňky se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v tolika ml n-hexanu (3B.1.8), aby koncentrace byla vhodná pro použitý spektrofotometr (4B.1.1).

5B.1.2.4 Současně se zkušebním vzorkem se provede určení tzv. ztrátového faktoru (F_z):

Ze standardní substance vitamínu A (retinolu) (3B.1.2) se připraví standardní roztok o koncentraci přesně 10 nebo 15 m.j./ml v množství asi 50 ml. Z tohoto roztoku se odpipetuje přesně 5 ml do 20 ml odměrné baňky, doplní n-hexanem (3B.1.8) po rysku, promíchá a proměří, jak uvedeno ve 5B.1.1.4 (A_s). Na sloupec chromatografické kolony (4B.2.1) se odpipetuje přesně 10 ml tohoto naředěného standardního roztoku a dále se postupuje podle 5B.1.2.3. Tento roztok se rovněž proměří podle 5B.1.1.4 (A_z). Ztrátový faktor se určí jako podíl absorbancí bez chromatografického dělení a po něm (viz 6B.2).

5B.2 Krmné směsi (poznámka 8B.2)

5B.2.1 Do zmýdelňovací baňky obsahu 250 ml se odváží přesně 25,000 g zkušebního vzorku, přidá se 25 ml ethylalkoholu (3B.1.6) a po provlhčení vzorku se přidá 75 ml roztoku hydroxidu draselného (3B.1.5) promíchá se, po dobu 5 min. se probublává dusíkem (3B.1.1), na baňku se nasadí zpětný chladič (4B.1.5) a baňka se umístí na vodní lázeň (4B.1.3) vyhřátou na teplotu 80 °C. Zmýdelňuje se pod stálým přívodem dusíku 30 minut za ob-

časného promíchání krouživým pohybem. Potom se přes chladíč přidá opatrně 30 ml vody, baňka se sejme a prudce ochladí pod tekoucí vodou. Obsah baňky se promíchá, nechá usadit pevný podíl a převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Do dělicí nálevky se přidá 40 ml n-hexanu (3B.1.8), vytřepe se a pak ještě 2krát s 30 ml n-hexanu (3B.1.8) tak, že se odměřenou dávkou n-hexanu vždy promyje pevný podíl ve zmydelňovací baňce. Hexanové extrakty se spojí do dělicí nálevky na 250 ml a promyjí se 3krát 50 ml vody. Po rozdělení fází se spodní vodná fáze vždy odpustí a dále se nepoužije. Po promytí se hexanový extrakt převede do vhodné nádoby (kádinky), přidá se 1 až 2 g bezvodého síranu sodného (3B.1.11), promíchá se, nechá ustat asi 20 minut, zfiltruje suchým středně hustým filtrem do suché odměrné baňky na 100 ml, doplní n-hexanem (3B.1.8) po rysku a promíchá.

5B.2.2 K přípravě chromatografického sloupce se použije oxid hlinitý (3B.1.3), který se odměří v odměrném válci v množství 7 ml a ve vhodné kádince se suspenduje v n-hexanu (3B.1.8). Potom se převede do chromatografické trubice (4B.2.1), opatřené na dně malým smotkem obvazové vaty zvlhčené n-hexanem (3B.1.8). Po usazení sloupce se na vrch sloupce přidá asi 10 mm vrstva bezvodého síranu sodného (3B.1.11) a malý smotek obvazové vaty.

5B.2.3 Z hexanového extraktu se odpipetuje buď přesně 50 ml (při předpokládaném obsahu vitamínu A ve zkoušeném vzorku do 10 000 m.j./kg) nebo přesně 25 ml (při předpokládaném obsahu nad 10 m.j./g), zahustí se na odparce (4B.1.4) na 10 ml až 15 ml při teplotě 60 °C, vlije se na povrch chromatografického sloupce (4B.2.1) a ponechá volně protékat. Po vsáknutí do sloupce se sloupec promývá 60 ml až 80 ml n-hexanu (3B.1.8), průběh promývání se pozoruje ve světle rtuťové výbojky (4B.1.6). Lze pozorovat dvě světlé zóny; první zářivě modrá jsou balastní látky, tato postupuje rychleji; druhá žlutozeleně fluoreskující je zóna vitamínu A a postupuje pomaleji. Intenzita fluorescence je přímo závislá na obsahu vitamínu A ve zkoušeném vzorku. Jakmile dojde ke zřetelnému oddělení zón, eluují se balastní látky eluční směsí n-hexan-aceton (3B.2.2) a po jejich úplném odstranění se provede eluce směsí n-hexan-aceton (3B.2.3). Tato část eluátu se zachycuje do odpařovací baňky (4B.1.4). Tento eluát se odpaří v proudu dusíku (3B.1.1) na odparce (4B.1.4) do sucha a odparek se rozpustí v přesně 10,0 ml n-hexanu (3B.1.8).

5B.2.4 Tento roztok se proměří na spektrofotometru (4B.1.1), jak je uvedeno ve 5B.1.1.4.

5B.2.5 Současně se zkoušeným vzorkem se provede určení tzv. ztrátového faktoru (F_z) chromatografické kolony podle 5B.1.2.4.

5B.3. Mléčné krmné směsi (poznámka 8.2)

5B.3.1 Do zmydelňovací baňky na 250 ml se odváží 10,000 g zkušební vzorku, přidá se 30 ml vody o teplotě asi 55 °C, baňka se umístí na vodní lázeň (4B.1.3) vyhřátou na teplotu 55 °C až 60 °C a míchá až do úplného rozpuštění vzorku. Potom se přidá 70 ml ethylalkoholu (3B.1.6) a 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3B.1.4) a po 5 minutovém probublávání dusíkem (3B.1.1) se zmydelňuje na vodní lázni (4B.1.3) při teplotě 80 °C, pod zpětným chladičem (4B.1.5) a za stálého přívodu dusíku (3B.1.1) po dobu 30 minut, přičemž se obsah občas promíchá krouživým pohybem. Potom se přidá opatrně přes chladíč 30 ml vody, baňka se rychle ochladí pod tekoucí vodou a obsah baňky se převede do dělicí nálevky na 250 ml. Zmydelňovací baňka (4B.1.2) se vypláchne asi 30 ml n-hexanu (3B.1.8) a tento se převede rovněž do dělicí nálevky. Směs se důkladně protřepe a po oddělení fází se spodní vodná fáze vypustí do jiné dělicí nálevky, kde se ještě dvakrát po sobě vytřepe vždy s 30 ml n-hexanu (3B.1.8). Hexanové extrakty se spojí v jedné dělicí nálevce, kde se promyjí třikrát po sobě vždy 50 ml směsí ethylalkohol-voda (3B.1.7), přičemž vodná fáze se vždy odpustí a dále se nepoužije. Hexanový extrakt se vysuší přidávkem 1 g až 2 g bezvodého síranu sodného (3B.1.11) a to buď do dělicí nálevky nebo na suchý filtr střední hustoty, jímž se hexanový ex-

trakt filtruje do odměrné baňky na 100 ml. Filtér se promyje n-hexanem (3B.1.8), odměrná baňka se jím doplní po rysku a promíchá.

5B.3.2 Tento roztok se proměří na spektrofotometru (4B.1.1), jak je uvedeno ve 5B.1.1.4.

6B. Výpočet a vyjádření výsledku

6B.1 Premixy

Obsah vitamínu A v m.j./kg (X) se vypočítá podle vzorců:

$$X = \frac{10^3 \cdot A_{\max} \cdot A_0 \cdot F \cdot F_z}{m}$$

kde $A_{\max}$ je maximální absorbance, která se musí nacházet mezi 323 nm až 327 nm vlnové délky
 A_0 absorpční koeficient pro vitamin A (1 830)
 F zředovací koeficient
 m hmotnost navážky zkušební vzorku v g
 F_z ztrátový faktor chromatografického dělení, který se vypočítá podle vzorce:

$$F_z = \frac{A_s}{A_c}$$

6B.2 Krmné směsi (po chromatografickém dělení)

Obsah vitamínu A v m.j./kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{A_{\max} \cdot A_0 \cdot F \cdot F_z}{m}$$

kde $A_{\max}$ je maximální absorbance, která se musí nacházet mezi 323 nm až 327 nm vlnové délky
 A_0 absorpční koeficient pro vitamin A (1 830)
 F zředovací koeficient
 m hmotnost navážky zkušební vzorku
 F_z ztrátový faktor chromatografického dělení, který se vypočítá podle vzorce:

$$F_z = \frac{A_s}{A_c}$$

kde A_s je absorbance standardního roztoku vitamínu A bez chromatografického dělení
 A_c absorbance standardního roztoku vitamínu A po chromatografickém dělení

6B.3 Mléčné krmné směsi

Obsah vitamínu A v m.j./kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{10^3 \cdot A_{\max} \cdot A_0 \cdot F}{m}$$

kde $A_{\max}$ je maximální absorbance, která se musí nacházet mezi 323 nm až 327 nm vlnové délky
 A_0 absorpční koeficient pro vitamin A (1 830)
 F zředovací koeficient
 m hmotnost navážky zkušební vzorku

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou sou-

běžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé m.j./g.

7B. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8B. Poznámky

8B.1 Ethylalkohol, n-hexan a aceton jsou nebezpečnými hořlavými I. třídou, proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi zachovávat bezpečnostní pravidla.

8B.2 Při stanovení je naprosto nezbytné chránit roztoky vitamínu A proti účinkům jakéhokoli záření, zejména denního světla, proto chromatografické dělení je nutno provádět v temné komoře při oranžovém osvětlení. Kontrolovat eluci vitamínu A lze jen občasnými ozářením sloupce rtuťovou výbojkou, opatřenou UV filtrem.

8B.3 Tento postup se aplikuje při stanovení vitamínu A v premixech

- a) za nepřítomnosti robenidinu a interferujících látek
- b) za přítomnosti robenidinu a nepřítomnosti interferujících látek (modifikace)

8B.4 Navážka zkušebního vzorku by měla obsahovat 1 000 až 10 000 m.j. vitamínu A.

8B.5 Tento postup se aplikuje při stanovení vitamínu A v premixech

- a) za nepřítomnosti robenidinu a přítomnosti interferujících látek
- b) za přítomnosti robenidinu i interferujících látek (modifikace)

8B.6 Výluhy zkušebního vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

4.3 Stanovení obsahu vitamínu A a vitamínu E

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje postup stanovení obsahu vitamínu A a E v premixech a krmných směsích. Metodou se stanoví vitamin A v kompletních krmivech i premixech doplňkových látek od obsahu nad 800 m.j./kg a vitamin E v kompletních krmivech i premixech doplňkových látek od obsahu nad 2,5 mg/kg.

Účinnou formou vitamínu A obecného vzorce $C_{16}H_{23}-R$ je retinol a neoretinol ($R = CH_3-C=CH-CH_2OH$), kdy retinol je all-trans isomer a neoretinol je cis,trans-isomer a jsou esterově vázány na mastné kyseliny (tyto dvě formy převažují jako nativní vitamin A). Obsah vitamínu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách, ve zkratce m.j. (international unit I.U.) retinolu (vitamin A) na kg. Mezinárodní jednotka vitamínu A (m.j., IU) odpovídá aktivitě 0,3 µg retinolu (all-trans-vitamin A-alkoholu) což odpovídá 0,344 µg acetátu vitamínu A což odpovídá 0,550 µg palmitátu vitamínu A.

Vitamin E je DL- α -tokoferol sumárního vzorce $C_{28}H_{46}O_2$. Obsah vitamínu E se vyjadřuje v mg/kg, přičemž 0,91 mg DL- α -tokoferolu odpovídá 1,0 mg DL-acetátu tokoferolu (poměr rel. molekulových hmotností tokoferolu/acetátu tokoferolu = 430,7/472,8).

2. Princip

Zkušební vzorek se zmýdelní alkalickým hydroxidem a vitamin A a vitamin E se extrahuje do organického rozpouštědla. Extrakt se zakonzcentruje a odparek se rozpustí v methylalkoholu, je-li nutné, naředí se na požadovanou koncentraci. Obsah vitamínu A se stanoví metodou HPLC na reverzní fázi s UV detekcí při vlnové délce 325 nm nebo fluorescenční detekcí při vlnových délkách Ex: 325 nm, Em: 480 nm. Separační podmínky (průtok mobilní fáze a síla elučního roztoku) se nastaví takové, aby nedocházelo dělení cis a trans isomerů vitamínu A. Obsah vitamínu E se stanoví HPLC metodou s UV detekcí při vlnové délce 292 nm nebo fluorescenční detekcí při vlnových délkách Ex: 295 nm, Em: 330 nm. V případě použití programovatelného UV detektoru se zjišťuje obsah vitamínu A i vitamínu E v jediném nástřiku.

3. Chemikálie

3.1 Hexan, p.a. (poznámka 8.1)

3.2 Methylalkohol, HPLC grade (poznámka 8.1)

3.3 Ethylalkohol, denaturovaný hexanem 1 % (poznámka 8.1)

3.3.1 Ethylalkohol, vodný roztok 35 %

3.4 Hydroxid draselný

3.4.1 Hydroxid draselný, ethylalkoholický roztok (35 % ethylalkohol) 100 g/l

3.4.2 Hydroxid draselný, ethanolický roztok (35 % ethylalkohol) 200 g/l

3.5 Kyselina askorbová,

3.6 Hydrochinon pevný, $C_6H_6O_2$, $M_r = 110,11$

3.7 Síran sodný, bezvodý

3.8 Indikátor fenolftalein, roztok 0,1 %

Příprava: 1 g fenolftaleinu se rozpustí v 80 ml ethylalkoholu a doplní vodou na 100 ml. Takto připravený roztok se zředí 10krát.

3.9 Eluční roztok

Příprava: methylalkohol – voda (98 + 2), poměr se musí upravit tak, aby odpovídal použité koloně a aby nedocházelo k separaci cis- a trans-isomerů vitamínu A.

3.10 Dusík, žárovkárenský, prostý kyselých látek a plynů

3.11 All-trans-vitamin-A-acetát

3.12 All-trans-vitamin-A-palmitát, asi 500 000 IU/g

3.13 DL- α -tokoferol-acetát, asi 1360 IU/g

3.14 Chlorid sodný, nasycený roztok v 35 % ethylalkoholu (3.3.1)

3.15 Kyselina chlorovodíková, zředěná, $c(HCl) = 1 \text{ mol/l}$

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Vysokoúčinný kapalinový chromatograf (čerpadlo, kolona: C_{18} Nova-Pak 4 µm, 150×3,9 mm (Waters) nebo Nova-Pak 4 µm, 250×4,6 mm (Waters), UV nebo FF detektor, časově programovatelný s programovatelnou vlnovou délkou: retinol – 325 nm tokoferol – 292 nm, dávkovací zařízení, datastanice s integračním software)

4.2 Vodní lázeň s regulovatelnou teplotou

- 4.3 Rotační vakuová odparka
4.4 Membránový filtr 0,45 µm
4.5 Laboratorní odstředivka

5. Postup

5.1 Příprava vzorku a práce se vzorky

Roztoky vitamínu A i vitamínu E se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem, jsou citlivé na oxidační a kyselé látky (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření). Při zpracování vzorku je nutno se vyhnout přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Pokud možno, vzorek se nemele, ale pouze se roztírá v porcelánové misce. Homogenizace a úprava vzorku se děje těsně před jeho zmýdlením a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám retinolu a tokoferolu.

5.2 Zmýdlení vzorku

Podle obsahu vitamínu A a vitamínu E se do kulaté baňky s plochým dnem na 250 nebo 500 ml se zábrusem naváží 1 až 5 g (premixy doplňkových látek) nebo 15 až 20 g (krmné směsi) zkušební vzorku s přesností na 0,01 g a zalije se 25 ethylalkoholu (3.3). V případě, že vzorek není dostatečně smočený, přidá se ještě 5 ml ethylalkoholu (3.3.1). Postupně se přidá 750 mg kyseliny askorbové (3.5), 500 mg pevného hydrochinonu (3.6) a 75 ml roztoku hydroxidu draselného (pro premixy doplňkových látek 3.4.1, pro krmné směsi 3.4.2). Na baňku se nasadí zpětný chladič a po pěti minutovém odstraňování rozpuštěného kyslíku proudem dusíku (3.10) se baňka ponoří do vodní lázně (4.2) a obsah baňky se zmýdľuje po dobu 30 minut (premixy doplňkových látek) nebo 60 minut (krmné směsi) při teplotě 80 °C za stálého míchání. Po ukončení zmýdlení se zpětný chladič opláchně 30 ml roztoku ethylalkoholu (3.3.1), přidá se 34 ml vody a obsah baňky se ochladí na laboratorní teplotu.

5.3 Extrakce

Do dělicí nálevky na 500 ml se přidá 15 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.14) a zmýdlený roztok se převede do dělicí nálevky tak, aby pevný podíl zůstal v baňce. Pevný podíl v baňce se vypláchne 30 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.14) a kapalina se převede do dělicí nálevky. K pevnému podílu ve zmýdľovací baňce se přidá 60 ml hexanu (3.1) a krouživým pohybem se promíchá. Po usazení sedimentu se hexanový podíl převede do dělicí nálevky k vodno-ethanolické fázi, dělicí nálevky se uzavře a třepe po dobu 30 sekund. Obě fáze se nechají asi 2–5 minut rozdělit. Při špatném dělení obou fází se může do dělicí nálevky přidat asi 5 ml roztoku ethylalkoholu (3.3.1) k rozrušení vzniklé emulze. Extrakce vodné fáze s hexanem se provádí ještě dvakrát a to tak, že se vodná fáze extrahuje nejprve s 50 ml hexanu (3.1) a poté opět s 50 ml hexanu, přičemž po rozdělení fází (viz výše) se hexanové extrakty spojují v dělicí nálevce na 250 ml. K oplachování zátky dělicí nálevky se používá roztok ethylalkoholu (3.3.1). V případě obsahu tuku nad 30 g/kg se extrakce opakuje 4krát, pro obsahy tuku nad 70 g/kg se extrakce opakuje 5krát a hexanové extrakty se spojují v dělicí nálevce na 500 ml. Spojené extrakty se propálčnou 50 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou otáčí tak, aby nedocházelo k tvorbě emulze. Potom se extrakt propálčnou 2krát 100 ml vody, přičemž se dělicí nálevkou vždy krátce krouží, tak dlouho, až je promývací voda neutrální (po přidání roztoku fenolftaleinu (3.8) zůstává roztok bezbarvý).

5.4 Úprava hexanového extraktu

5.4.1 Krmné směsi a premixy doplňkových látek (varianta A)

Extrakt se filtruje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml nebo 500 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu

sodného (3.7). Nálevka i filtr se propálčnou 50 ml hexanu (3.1). Obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce (4.3) za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10). Odparek se rozpustí v definovaném množství methylalkoholu (3.2), viz tabulka 1 a tabulka 2.

Tabulka 1 Hmotnost zkušební vzorku a objem methylalkoholového extraktu

Zkušební vzorek	Hmotnost (g)	Objem extraktu (ml)
Mléčné krmné směsi	10	25
Krmné směsi s obsahem retinolu do 8000 m.j./kg	15	10
Krmné směsi s obsahem retinolu od 8000 do 12 000 m.j./kg včetně	15	15
Krmné směsi s obsahem retinolu nad 12 000 m.j./kg	15	25
Premixy doplňkových látek	5	25

Tabulka 2 Ředění premixů doplňkových látek z methylalkoholického extraktu

Obsah vitamínu A (1000 m.j./kg)	Ředění	Způsob ředění (ml/ml)
do 250	1	—
od 250 do 600	2,5	10/25
od 600 do 1500	5	5/25
od 1500 do 2750	12,5	2/25
od 2750 do 6000	25	1/25
více jak 6000	50	1/50

5.4.2 Premixy doplňkových látek (varianta B)

Extrakt se filtruje do odměrné baňky na 200 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (3.7). Nálevka i filtr se propálčnou 20 ml hexanu (3.1) a odměrná baňka se doplní hexanem po značku a promíchá. Podle tabulky 3 se obsah odměrné baňky naředí na požadovanou koncentraci tak, že hexanový extrakt se pipetuje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml a obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10). Odparek se rozpustí ve 25 ml methylalkoholu.

Tabulka 3 Ředění (zakonzentrování) premixů doplňkových látek hexanového extraktu

Obsah vitamínu A (1000 m.j./kg)	Ředění / Zakonzentrování	Způsob ředění / Zakonzentrování (ml/ml)
do 250	0,25	100 / 25
od 250 do 1200	0,5	50 / 25
od 1200 do 2800	1	25 / 25
od 2800 do 8000	2,5	10 / 25
od 8000 do 14 000	5	5 / 25
od 14 000 do 55 000	12,5	2 / 25
od 55 000 do 100 000	25	1 / 25
více jak 100 000	50	0,5 / 25

5.4.3 Krmné směsi a premixy doplňkových látek v přítomnosti robenidinu

V případě obsahu robenidinu v premixech doplňkových látek se robenidin extrahuje kyselinou chlorovodíkovou (3.15). Podle tabulky 3 se do dělicí nálevky na 250 ml pipetuje definované množství hexanového extraktu, v případě nutnosti se objem hexanové fáze upraví na cca 10 ml hexanem (pro obsahy vitamínu A nad 8 000 000 m.j./kg) a přidá se 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15). Obsah se protřepe, po rozdělení fází se vodná fáze odpustí a extrakce se provede ještě 2krát s 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.15). Po odpuštění posledního podílu vodné fáze se obsah dělicí nálevky promyje 3krát 100 ml vody do odstranění kyselé reakce, hexanová fáze se přefiltruje přes vrstvu síranu sodného, (3.7) do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml, přičemž filtr s vrstvou síranu sodného i dělicí nálevky se propláchnou 20 ml hexanu, obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C téměř až k suchu. Varná baňka se sejme a zbývající roztok se odpaří k suchu po proudem dusíku (3.10). Odparek se rozpustí ve 25 ml methyalkoholu.

V případě obsahu robenidinu v krmných směsích se postupuje podle čl. 5.3, přičemž se extrakt filtruje do varné baňky s kulatým dnem na 250 ml nebo 500 ml přes suchý skládaný papírový filtr s vrstvou síranu sodného (3.7). Nálevka i filtr se propláchnou 50 ml hexanu (3.1). Obsah baňky se odpaří na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 55 °C na objem asi 10 ml extraktu, obsah se hexanem kvantitativně převede zpět do dělicí nálevky na 250 ml a dále se postupuje podle prvního odstavce čl. 5.4.3. Odparek se rozpustí v definovaném množství methyalkoholu podle tabulky 1.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (4.4) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.5) po dobu 2 minut při 2000 ot/min. Objem nástřiku methyalkoholového extraktu na chromatografickou kolonu pro krmné směsi je 50 µl, pro premixy doplňkových látek 10 µl.

5.5 Stanovení metodou HPLC

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok	1 ml/min.
Kolona	C ₁₈ a) Nova-Pak 4 µm, 150 × 3,9 mm (Waters) nebo b) Nova-Pak 4 µm, 250 × 4,6 mm (Waters)
Injektovaný objem	krmné směsi 50 µl premixy 10 µl
Detektor	UV a FF (poznámka 8.2)
AUFS	1,000
Retenční čas	pro kolonu a) Retinol 2,1 min. Tokoferol 5,6 min. pro kolonu b) Retinol 4,3 min. Tokoferol 13,6 min.

Tabulka 5 Časové změny vlnových délek UV-detektoru

Chromatografická kolona 250 mm		Chromatografická kolona 150 mm	
Čas (min.)	Vlnová délka (nm)	Čas (min.)	Vlnová délka (nm)
0,0	325	0,0	325
6,0	292	4,0	292

FF-detektor, časově programovatelný s programovatelnou vlnovou délkou:

Tabulka 6 Časové změny vlnových délek FF-detektoru

Chromatografická kolona 250 mm		Chromatografická kolona 150 mm	
Čas (min.)	Vlnová délka (nm)	Čas (min.)	Vlnová délka (nm)
	Ex/Em		Ex/Em
0,0	325/480	0,0	325/480
0,0	295/330	4,0	295/330

5.6 Kalibrace

5.6.1 Příprava pracovního roztoku

5.6.1.1 Příprava pracovního roztoku pro krmné směsi

Do kulaté baňky s plochým dnem na 250 ml se zábrusem naváží asi 75 mg vitamínu A (3.11 nebo 3.12) a 50 mg vitamínu E (3.13), přičemž se dbá na ustanovení čl. 5.1, standard se převrství 10 ml ethylalkoholu (3.3) a dále se postupuje podle čl. 5.2 a 5.3. Konečný objem methyalkoholového extraktu je 250 ml.

1 ml tohoto roztoku obsahuje vitamin A (retinol) – 150 IU, vitamin E (tokoferol) – 0,2 mg.

5.6.1.2 Příprava pracovního roztoku pro premixy doplňkových látek

Do kulaté baňky s plochým dnem na 250 ml se zábrusem naváží asi 100 mg vitamínu A (3.11 nebo 3.12) a 150 mg vitamínu E (3.13), přičemž se dbá na ustanovení čl. 5.1, standard se převrství 10 ml ethylalkoholu (3.3) a dále se postupuje podle čl. 5.2 a 5.3. Konečný objem methanolového extraktu je 250 ml.

1 ml tohoto roztoku obsahuje vitamin A (retinol) – 200 IU, vitamin E (tokoferol) – 0,6 mg.

5.6.2 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibračního grafu

5.6.2.1 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibračního grafu pro krmné směsi

Do sady odměrných baněk na 50 ml se odpipetuje postupně 1,0 – 2,5 – 5,0 – 7,5 a 10 ml methanolového extraktu vitamínu A a vitamínu E, získaného podle čl. 5.5.1.1., doplní se methyalkoholem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní roztoky odpovídají koncentraci 3000 – 7500 – 15000 – 22500 a 30000 IU/l vitamínu A (retinol) a 4,0 – 10 – 20 – 30 a 40 mg/l vitamínu E (tokoferol). Takto připravený roztok se nástřikuje postupně na kolonu HPLC o objemu nástřiku 50 µl.

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační graf.

5.6.2.2 Příprava kalibračního roztoku a sestrojení kalibračního grafu pro premixy doplňkových látek

Do sady odměrných baněk na 25 ml se odpipetuje postupně 1,0 – 2,0 – 5,0 – 7,5 a 10 ml methanolového extraktu vitamínu A a vitamínu E, získaného podle čl. 5.5.1.2., doplní se methyalkoholem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní roztoky odpovídají koncentraci 16000 – 40000 – 60000 a 80000 IU/l vitamínu A (retinol) a 24 – 48 – 120 – 180 a 240 mg/l vitamínu E (tokoferol). Takto připravený roztok se nástřikuje postupně na kolonu HPLC o objemu nástřiku 10 µl.

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační graf.

5.6.2.3 Příprava kalibračního roztoku a sestavení kalibračního grafu pro krmné směsi a suroviny s nízkým obsahem vitaminů

Do sady odměrných baněk na 100 ml se odpipetuje postupně 0, 25 – 0,5 – 1,0 a 2,0 ml methanolového extraktu vitaminu A a vitaminu E, získaného podle čl. 5.5.1.1., doplní se methylethyletherem (3.2) po značku a promíchá. Takto připravené kalibrační pracovní roztoky odpovídají koncentraci 250 – 500 – 1500 a 3000 IU/l vitaminu A (retinol) a 0,5 – 1,0 – 2,0 a 4,0 mg/l vitaminu E (tokoferol). Takto připravený roztok se nastříkuje postupně na kolonu HPLC o objemu nástřiku 50 µl:

6. Výpočet

Obsah vitaminu A vyjádřený v IU/kg (X) a obsah vitaminu E v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$X(Y) = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace vitaminu odečtená z kalibrační křivky v IU/l (retinol) nebo mg/l (tokoferol)
m hmotnost zkoušeného vzorku v g
F ředění (zakoncentrování) v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky /kg nebo mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, methylethylether i ethylethylether jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Fluorescenční detekce je vhodné používat u vzorků, obsahujících úsůšky pícnin a přidávaná barviva (carophyll). V tomto případě je nutné konečné koncentrace methylethyletherových extraktů upravit na kalibrační křivku pro FF-detektor.

4.4 Stanovení obsahu vitaminu E

Stanovení vitaminu E se provádí podle metody 4.1, kde je popsáno stanovení vitaminu A i E.

4.5 Stanovení obsahu přidaného vitaminu E

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitaminu E v premixech a v krmných směsích.

Pro účely této metody se používá definice: Vitamin E je po chemické stránce tokoferol (2,5,7,8-tetra-methyl-2)4,8,12-trimethyltridecyl (-6-chromatol), sumární vzorec $C_{29}H_{50}O_2$.

2. Princip

Přidaný vitamin E (octan tokoferolu) se stanoví po extrakci

vzorku diethyletherem resp. hexanem přímo, resp. po přečištění na sloupci oxidu hlinitého, metodou plynové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.2 Diethylether (poznámka 8.1)

3.3 Oxid hlinitý, aktivní I, (deaktivovaný 7 % vody) (např. Woelm N)

3.4 Octan tokoferolu, standardní substance vitaminu E se známou účinností

3.5 Vnitřní standard (Squalan) pro premixy: přesně 350 mg squalanu se rozpustí ve 250 ml odměrné baňce v n-hexanu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

3.6 Vnitřní standard (Squalan) pro krmné směsi: přesně 62,5 mg squalanu se rozpustí ve 250 ml odměrné baňce v n-hexanu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf plynový s příslušenstvím

4.2 Trubice chromatografická o průměru 10 mm

4.3 Sušárna laboratorní elektrická s termostatem

4.4 Zařízení extrakční (např. typu Soxhlet nebo Soxtec)

4.5 Lázeň vodní s termostatem

4.6 Třepačka laboratorní

4.7 Odparka vakuová, rotační

4.8 Kolona chromatografická skleněná s nepolární stacionární fází

4.8.1 Předepsané parametry:

– náplň kolony: SE-30, OV 1, OV 101, DC 200, SP 2 100

– nosič: Inerton pro plynovou chromatografii, nebo Chromosorb WAW-DMCS 100/120 mesh nebo SUPELCO-PORT 100/120 mesh a stacionární fáze % SP 2 100

– nosný plyn: dusík, průtok 50 ml/min.

– detektor: plameně-ionizační FID

– teploty: nástřik 270 °C až 275 °C

termostat 245 °C až 270 °C

detektor 270 °C až 295 °C

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Premixy

5.1.1 Odváží se 10,00 g zkoušeného vzorku do extrakční tuby, extrahuje na extrakčním přístroji (4.4) (postup viz Příloha 9, část 3.1) diethyletherem (3.2) po dobu 4 hod, u poloautomatu Soxtec (4.4) 20 minut extrakce a 40 minut promývání. Extrakt se odpaří na odparce (4.7) do sucha a odparek se rozpustí ve 4,00 ml roztoku vnitřního standardu (3.5).

5.1.2 Do nastaveného chromatografického přístroje (4.1) s předepsanými parametry (4.8.1) se dávákuje 1 µl připraveného extraktu a pořídí se chromatografický záznam.

5.1.3 Vedle toho se provede stanovení korekčního faktoru K:

Do odměrné baňky na 25 ml se přesně odváží 100,00 mg standardní substance octanu tokoferolu (3.4) a 25 až 30 mg vnitřního standardu squalanu (3.5), rozpustí v n-hexanu (3.1), doplní jím po rysku a promíchá. Do chromatografického přístroje (4.1) se dává 1 µl tohoto roztoku a pořídí se chromatografický záznam za naprosto stejných podmínek jako u zkoušeného vzorku. Stanovení korekčního faktoru se provede 2krát a to vždy před stanovením každého vzorku.

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Podle předpokládaného obsahu vitamínu E ve zkoušeném vzorku se do zábrusové baňky na 250 ml odváží s přesností nejméně na 0,001 g takové množství zkušebního vzorku, aby navážený vzorek obsahoval cca 1 mg vitamínu E. Do baňky se přidá přesně 150 ml n-hexanu (3.1), uzavře zátkou, umístí do vodní lázně (4.5) vyhřáté na 50 °C až 60 °C na dobu 30 minut, pak se 10 minut vytřepává na třepačce (4.6). Obsah baňky se přefiltruje středně hustým filtrem do vhodné nádoby.

5.2.2 Chromatografická trubice (4.2) se naplní do výšky asi 6 cm až 7 cm oxidem hlinitým (3.3) na smotek obvazové vaty umístěný na spodku sloupce. Na sloupec se převede přesně 50 ml filtrátu vzorku, eluuje se 2krát po 10 ml n-hexanu (3.1) do kulaté zábrusové baňky na 250 ml a eluát se odpaří na vakuové odparce (4.7) do sucha. Odparek se rozpustí v 1 ml vnitřního standardu (3.6) a do připraveného chromatografického přístroje (4.1) na předepsané parametry se dává 1 µl.

5.2.3 Vedle toho se provede stanovení korekčního faktoru K:

Do zábrusové odměrné baňky na 25 ml se přesně odváží 6,25 mg vnitřního standardu squalanu (3.5) a 6,25 mg standardní substance octanu tokoferolu (3.4), doplní hexanem po rysku a promíchá. Dávkuje se 1 µl tohoto roztoku a pořídí chromatografický záznam za naprosto stejných podmínek jako u zkoušeného vzorku. Stanovení korekčního faktoru se provede 3krát a to vždy před každým stanovením ve vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Premixy

Obsah vitamínu E v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot K \cdot p_T \cdot m_2}{p_S \cdot m_0}$$

kde p_T je plocha píku standardu octanu tokoferolu (vitamínu E) ve zkoušeném vzorku v mm^2

p_S plocha píku vnitřního standardu squalanu (3.5) v mm^2

m_2 množství vnitřního standardu squalanu přidaného k odparku v mg

m_0 navážka zkušebního vzorku v g

K korekční faktor

Korekční faktor (K) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{100 \cdot p_S \cdot C_T}{p_T \cdot C_S \cdot E_T}$$

kde C_T je koncentrace standardu octanu tokoferolu v mg/ml

C_S koncentrace vnitřního standardu squalanu v mg/ml

E_T účinnost standardní substance octanu tokoferolu v %

p_S, p_T viz legenda výše

Ze tří určených korekčních faktorů se vypočítá aritmetický průměr, který se dosadí do výpočtového vzorce obsahu vitamínu E.

6.2 Krmné směsi

Obsah vitamínu E v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{3 \cdot 10^3 \cdot K \cdot p_T \cdot m_2}{p_S \cdot m_0}$$

kde m_2 je množství vnitřního standardu squalanu přidaného k odparku v mg

m_0 navážka zkušebního vzorku v g

p_T, p_S, K viz legenda v 6.1, výpočet K viz 6.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Premixy

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí při teoretickém obsahu vitamínu E 1,5, 10^3 mg/kg překročit hodnotu $R_p = 88,2$ mg

7.2 Krmné směsi

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí při teoretickém obsahu vitamínu E 20 mg/kg překročit hodnotu $R_p = 2,15$ mg

8. Poznámky

8.1 Diethylether a n-hexan jsou nebezpečnými hořlavinami třídy, proto je nutno při jakékoli manipulaci dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Výluhy zkoušeného vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

4.6 Stanovení obsahu vitamínu E

Stanovení vitamínu E se provádí podle metody 4.3, kde je popsáno stanovení vitamínu A i E.

4.7 Stanovení obsahu cholinu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě rovnocenné metody, dosud rozhodčí metoda spektrofotometrická a perspektivní izotachoforetická.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení cholinu v premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Cholin je vitagen blízký vitamínům skupiny B. Jako přídavek pro fortifikaci krmiv se používá ve formě chloridu cholinu, což je po chemické stránce hydroxyethyltrimethyl-amonium hydroxid, sumárního vzorce $C_5H_{14}ClNO$.

2. Princip

Cholin se stanoví spektrofotometricky po extrakci vzorku ethylalkoholem na základě reakce acetonového komplexu s reineckátem amonným v prostředí roztoku fosforečnanu sodného, nebo na základě rozdílné pohyblivosti iontů v elektrickém poli metodou kapilární izotachografie.

3. Chemikálie

3.1 Pro metodu spektrofotometrickou

3.1.1 Reineckát amonný (diamo-tetrakis- isothiokyanátchromitan amonný), roztok 20 g/l v ethylalkoholu (3.1.4)

3.1.2 Fosforečnan trisodný dodekahydrát ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), nasycený roztok (cca 298 g/l)

3.1.3 Aceton (zcela čistý nebo přefiltrovaný středně hustým filtrem) (poznámka 8.1)

3.1.4 Ethylalkohol 96 %, 2krát destilovaný (poznámka 8.1)

3.1.5 Chlorid cholinu, standardní substance

3.1.6 Chlorid cholinu, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,2000 g standardní substance chloridu cholinu (3.1.5) se 100 % účinností (nebo přepočtené množství na účinnost 100 %), rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 2 mg chloridu cholinu. Uchovávaný při teplotě 4 °C je stálý po dobu jednoho týdne.

3.1.7 Chlorid cholinu, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku chloridu cholinu (3.1.6), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 0,2 mg chloridu cholinu. Přípravuje se vždy čerstvý.

3.2 pro metodu izotachoretickou

3.2.1 Chlorid cholinu, standardní substance s účinností nejméně 95 %, na minerálním nosiči.

3.2.2 Chlorid cholinu, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,3000 g standardní substance chloridu cholinu (3.2.1) 100 % účinností (nebo množství přepočtené na 100 % účinnost), rozpustí v redestilované vodě (3.2.6), doplní touto po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 3 mg chloridu cholinu a při uchování za teploty 4 °C je stálý jeden týden.

3.2.3 Chlorid cholinu, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje tolik základního standardního roztoku chloridu cholinu (3.2.2), aby 1 ml tohoto roztoku obsahoval takové množství cholinu, jako je předpokládán obsah v 1 ml výluhu ze zkoušeného vzorku.

Přípravuje se vždy čerstvý.

3.2.4 Kyselina octová, roztok $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}) = 0,1 \text{ mol/l}$, izotermicky předdestilovaná (poznámka 8.2)

3.2.5 Octan draselný, pevný

3.2.6 Voda redestilovaná

3.2.7 Vedoucí elektrolyt

Příprava: Do kádinky vhodného objemu se odváží 0,491 g octanu draselného (3.2.5), rozpustí v 950 ml redestilované vody (3.2.6), roztokem kyseliny octové (3.2.4) se upraví pH na hodnotu 5,0, kvantitativně převede do odměrné baňky na 1 000 ml, doplní se redestilovanou vodou (3.2.6) po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce při teplotě 4 °C.

3.2.8 Koncový elektrolyt

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří přesně 100 ml roztoku kyseliny octové (3.2.4), doplní redestilovanou vodou (3.2.6) po rysku a promíchá.

Uchovává se v chladničce při teplotě 4 °C.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Pro metodu spektrofotometrickou

4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce

4.1.2 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.1.3 Kefímek filtrační skleněný s fritou SiO_2

4.1.4 Třepačka (horizontální) laboratorní

4.2 Pro metodu izotachoretickou

4.2.1 Analyzátor izotachoretický se zapisovačem

4.2.2 Třepačka laboratorní vhodné konstrukce

5. Postup

5.1 Metoda spektrofotometrická

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1.1 Do kuželových baněk asi na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 2,5; 5,0; 7,5 a 10,0 ml pracovního standardního roztoku chloridu cholinu (3.1.7), každá z baněk se doplní na objem asi 10 ml vodou, přidá se pipetou 10 ml roztoku fosforečnanu sodného (3.1.2), 5 ml roztoku reineckátu amonného (3.1.1), důkladně se promíchá a nechá ustát na chladném místě po dobu 30 minut.

5.1.1.2 Vzniklá sraženina se odfiltruje za sníženého tlaku (4.1.2) filtračním kefímkem (4.1.3) a promyje se 2krát promývacím roztokem reineckátu amonného, připraveného odpipetováním 2 ml roztoku reineckátu amonného (3.1.1) do 1 000 ml vody. Po úplném odsátí vody se sraženina na filtru rozpustí max. 20 ml acetonu (3.1.3), filtrát se jímá do připojené baňky a potom se kvantitativně převede do odměrné baňky na 25 ml (V_3). Nakonec se odměrná baňka doplní po rysku acetonem (3.1.3) s promíchá.

5.1.1.3 Absorbance roztoků se měří na spektrofotometru (4.1.1) v květáčích o optické délce 10 mm, při vlnové délce 525 nm proti čistému acetonu (3.1.3).

5.1.1.4 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.1.2 Vlastní provedení

5.1.2.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží, s přesností nejmenší na 0,001 g, tolik zkušebního vzorku, aby navážka vzorku obsahovala asi 120 mg chloridu cholinu, provliče se přesně 10 ml ethylalkoholu (3.1.4) a vytřepává se na (horizontální) třepačce (4.1.4) po dobu 10 minut. Pak se přidá přesně 50 ml vody, zahřáté na 50 °C a vytřepává se dalších 10 minut. Po přidání dalších přesně 140 ml vody se vytemperuje, promíchá a obsah baňky se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z čirého filtrátu se odpipetuje 20 ml (V_2) do kuželové baňky na 50 ml, přidá 20 ml roztoku fosforečnanu sodného (3.1.2), 10 ml roztoku reineckátu amonného (3.1.1), důkladně se promíchá a ponechá ustat po dobu 30 minut na chladném místě.

5.1.2.2 Dále se postupuje podle 5.1.1.2 a 5.1.1.3. Naměřené množství chloridu cholinu se zjistí z kalibračního grafu.

5.2 Metoda izotachoforetická

5.2.1 Do kuželové baňky na 500 ml se odváží přesně 5,000 g zkušebního vzorku, přidá se přesně 250 ml redestilované vody (V_1) (3.2.6) a vytřepává se po dobu 30 minut na třepačce (4.2.2). Filtruje se suchým hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Filtrát se ředí dále na pracovní koncentrace následovně:

Při předpokládaném obsahu cholinu chloridu v mg/g	Způsob ředění	Stupeň ředění
do 30	20 ml (V_2) do 100 ml (V_3)	5
nad 30	10 ml (V_2) do 100 ml (V_3)	10

Ředění se provádí redestilovanou vodou (3.2.6).

Vlastní analýza se provede na předseparační koloně pro izotachoforetickou metodu obvyklou technikou, pořídí se záznam a vyhodnotí.

Vedle toho se provede analýza vhodně naředěného pracovního standardního roztoku chloridu cholinu (3.2.3) analogickým způsobem, jak výše uvedeno.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah chloridu cholinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot C}{m \cdot V_2}$$

kde C je množství chlorid cholinu zjištěné z kalibračního grafu v mg

m	navážka zkušebního vzorku v g
V_1	celkový objem extrakčního činidla v ml (200)
V_2	pipetovaný objem extraktu v ml
V_3	objem, ve kterém je rozpuštěna sraženina v ml

6.2 Metoda izotachoforetická (poznámka 8.3)

Obsah chloridu cholinu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{10^3 \cdot C \cdot L_V \cdot V_1 \cdot V_3}{L_S \cdot V_2 \cdot m}$$

kde C je koncentrace chloridu cholinu v pracovním standardním roztoku v mg

L_V	délka zóny zkoušeného vzorku v mm
L_S	délka zóny standardního roztoku cholinu v mm
m	navážka zkušebního vzorku v g
V_1	objem extrakčního činidla v ml
V_2	pipetovaný objem filtrátu
V_3	konečný objem v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na celé jednotky v mg/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Spektrofotometrická metoda

Nebyla dosud stanovena.

7.2 Izotachoforetické metody

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aceton a ethylalkohol jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Izotermická destilace se provádí tak, že do větší nádoby (např. prázdného exsikátoru) s látkou, která se má izotermicky předestilovat se vloží menší nádoba s redestilovanou vodou, větší nádoba se hermeticky uzavře a nechá volně stát asi 6 týdnů. Potom se menší nádoba, obsahující již izotermicky předestilovanou látku, vyjme a stanoví se koncentrace pro další použití.

8.3 Pro vyhodnocení a výpočet obsahu cholinu lze, v případě připojení analyzátoru na počítač, použít vhodného programu.

4.8 Stanovení obsahu pantothenanu vápenatého

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení pantothenanu vápenatého v premixech.

2. Princip

Pantothenan vápenatý se stanoví na základě růstové odpovědi testovacího mikroorganismu *Saccharomyces carlsbergensis* 4288 (ATCC 9080) difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Pantothenan vápenatý, standardní substance o účinnosti 100 %

3.2 Pantothenan vápenatý, základní standardní roztok

Příprava: 0,100 g standardní substance pantothenanu vápenatého (3.1) se odváží do 100 ml odměrné baňky, rozpustí se v tlumivém roztoku (3.4), doplní tímžéž po rysku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 000 µg pantothenanu vápenatého.

3.3 Pantothenan vápenatý, pracovní standardní roztok

Příprava: 10 ml základního standardního roztoku pantothenanu vápenatého (3.2) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml, doplní tlumivým roztokem (3.4) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 100 µg pantothenanu vápenatého.

3.4 Tlumivý roztok octanový o pH = 4,5 (Extrakční činidlo)

Příprava: Do 1 000 ml odměrné baňky se odváží 5,0 g octanu sodného, přidá 5 ml kyseliny octové ledové, doplní redestilovanou vodou po rysku a promíchá.

3.5 Testovací mikroorganismus, kultura kmene *Saccharomyces carlsbergensis* 4228

Příprava: Jednou za 14 dní se kultura přeočkovává na šikmou udržovací půdu (3.9.1), inkubuje se při teplotě 30 °C po dobu 24 hod. a uchovává se při teplotě 4 °C.

3.6 Inokulum

Příprava: Čerstvá, maximálně 24 hod. stará kultura uchovávaná na šikmé ploše se v množství jedné klíčky naočkuje do 10 ml inokulační půdy (3.9.3) a inkubuje se 4 hod. při teplotě 30 °C. Z vyrostlé suspenze se používá 1 ml jako inokulum k naočkování 80 ml testovací půdy, předem rozvařená a zchlazená na teplotu 40 °C. Suspenze se uchovává při teplotě 4 °C a je stálá po dobu dvou dnů.

Reaktivace kmene: Při dlouhodobém pasážování na pevných půdách kvasinky ztrácejí svou specifickou citlivost na daný vitamin, proto se provádí jejich aktivace. K reaktivaci kmene se používá inokulační půdy, do které se přidává pantothenan vápenatý (3.1). Půda se rozlije po 20 ml do kuželových baněk na 100 ml a očkuje jednou klíčkou kvasinky. Několikrát opakovaným přeočkováním získá kmen opět původní vlastnosti; reaktivuje se 1krát měsíčně.

3.9 Živné půdy

3.9.1 Udržovací půda

Příprava: Sušená půda Malt-Extrakt-Agar „Oxoid“ nebo polotuhá agarová půda. Sladinkový agar „SEVAC“ se připraví podle návodu výrobce.

3.9.2 Testovací půda

Příprava: Sušená půda pro stanovení kyseliny pantothenové „SEVAC“ v množství 80,0 g se rozpustí ve 150 ml vařící (redistilované) vody (3.10). Vedle toho se v 850 g sušené půdy rozvaří 30,0 g agaru. Roztoky se smíchají, filtrují řídkým filtrem pH se upraví na 5,5 a filtrát se rozdělí do baněk na 100 ml. Sterilizuje se v autoklávu 15 minut při 0,05 MPa. Půda se uchovává při teplotě 4 °C.

3.9.3 Inokulační půda

Příprava: Sušená půda pro stanovení kyseliny pantothenové „SEVAC“ se v množství 12,0 g rozpustí v redestilované vodě (3.10) a doplní jí na 1 000 ml. Půda se dále rozlije do baněk po 10 ml, přidá se pantothenan vápenatý (3.1) v množství 0,3 µg na 10 ml půdy a sterilizuje se v autoklávu po dobu 15 minut při 0,05 MPa.

Půda se uchovává při teplotě 4 °C a její pH má být 4,5.

3.9.4 Reaktivací půda

Příprava: Inokulační půda s přídatkem 0,1 ml pantothenanu vápenatého (3.1) na 1 ml se rozlije po 20 ml do baněk.

3.10 Redestilovaná voda

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotny skleněné 250 mm × 250 mm

4.2 Rámy kovové čtvercové

4.3 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.4 Vodováha

4.5 Korkovrt

4.6 Autokláv

4.7 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.8 Termostat vhodné konstrukce

4.9 Pipeta podle Pasteura

5. Postup

5.1 Odváží se 1,000 g zkušební vzorku do kuželové baňky na 200 ml, suspenduje se 30 ml extrakčního činidla – tlumivého octanového roztoku (3.4) a potom se sterilizuje v autoklávu (4.6) po dobu 15 minut při 0,11 MPa. Po ochlazení se přidá 70 ml redestilované vody (3.10) a promíchá. Po případné úpravě pH na 5,5 se odstředí (4.7). S ohledem na předpokládaný obsah pantothenanu vápenatého ve zkoušeném vzorku a navážku zkušební vzorku se provede další ředění tak, aby vznikly testované koncentrace 4 : 2 : 1 s teoretickými obsahy pantothenanu vápenatého 2,500; 1,250; 0,625 µg/ml.

5.2 Vedle toho se připraví z pracovního standardního roztoku (3.3) testací koncentrace 2,500; 1,250 a 0,625 µg pantothenanu vápenatého v 1 ml, přičemž se k ředění použije redestilovaná voda (3.10).

5.3 Na sterilní skleněnou plotnu (4.1) opatřenou kovovým rámem (4.2) a umístěnou ve vodorovné poloze (vodováha – 4.4) se vylije 100 ml testovací půdy (3.9.2) naočkované testovací kulturou. Po ztuhnutí agarové vrstvy se vyhloubí korkovrtem (4.5) důlky ve vzdálenostech 25 až 30 mm od sebe a do nich se vnáší Pasteurovou pipetou jednotlivá ředění standardů (testacích koncentrací) a zkoušeného vzorku (testované koncentrace). Ředění standardů se plní do tří řad ve středu plotny, ředění zkoušeného vzorku odpovídající příslušnému ředění standardů se plní do tří řad po obou stranách testacích koncentrací standardů. Plotna (4.1) se inkubuje v termostatu (4.8) po dobu 16 až 18 hod. při teplotě 30 °C.

5.4 Vzniklé růstové zóny se měří ve dvou vzájemně kolmých rovinách posuvným měřítkem s přesností na 0,1 mm.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah pantothenanu vápenatého v mg/kg se vypočte podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

4.9 Stanovení vitaminů B₁, B₂ a B₆

1. Účel a rozsah

Pro stanovení vitaminů B₁, B₂ a B₆ jsou uvedeny dvě metody a to metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení vitaminů B v krmných směsích a samostatná metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro stanovení vitaminů B v premixech.

2. Princip

Vitaminy B₁ (thiamin), B₂ (riboflavin) a B₆ (pyridoxin) (poznámka 8.1) se extrahují ze vzorku krmné směsi vodou a po hydrolyze kyselinou chloristou se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) s využitím iontových párů na reverzní fázi. Detekce vitaminu B₂ a B₆ se provádí přímo fluorimetricky, zatímco vitamin B₁ se před detekcí nejprve oxiduje derivatizačním činidlem v reakční smyčce postkolonové derivatizace.

V premixech se stanoví komplex vitaminů B po extrakci zkušební vzorku za studena extrakčním roztokem, metodou iontových párů na reverzní fázi s použitím UV detekce.

3. Chemikálie

3.1 Hexakynoželzeitan draselný [K₃Fe(CN)₆], pevný

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 0,1 mol/l

3.3 Kyselina chloristá 70%

3.4 Kyselina fosforečná, koncentrovaná

3.5 Acetonitril, čistoty HPLC

3.6 Amoniak, roztok 25%

3.7 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 6 mol/l

3.8 Hydroxid sodný, roztok 150 g/l

3.9 Činidlo iontových párů – roztok sodné soli kyseliny hexan-sulfonové (dále jen HSA Na)

3.10 Vitaminy B₁, B₂ a B₆, standardní substance

3.11 Vitamin B₁, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 25 mg standardní substance vitaminu B₁ (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,1 mg vitaminu B₁. Roztok uchovaný v chladničce je stálý po dobu několika měsíců.

3.12 Vitamin B₂, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 500 ml se odváží 10 mg standardní substance vitaminu B₂ (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,02 mg vitaminu B₂. Roztok uchovaný v chladničce je stálý po dobu několika měsíců.

3.13 Vitamin B₆, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odváží 25 mg standardní substance vitaminu B₆ (3.10) s přesností nejméně na 0,1 mg, rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 0,1 mg vitaminu B₆. Roztok uchovaný v chladničce je stálý po dobu několika měsíců.

3.14 Směsný pracovní standardní roztok vitaminů B₁, B₂ a B₆

Příprava: Do kuželové baňky na 250 ml se odpipetuje:
2 ml základního standardního roztoku vitaminu B₁ (3.11)
10 ml základního standardního roztoku vitaminu B₂ (3.12)
2 ml základního standardního roztoku vitaminu B₆ (3.13)

přidá se asi 50 ml vody a za míchání 2 ml kyseliny chloristé (3.3).

Baňka se zazátkuje, umístí na třepačku (4.4) a protřepává se po dobu 30 minut. Pak se za stálého míchání přidává postupně roztok hydroxidu draselného (3.7) až roztok dosáhne pH 3,2 (poznámka 8.2), obsah baňky se kvantitativně převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní mobilní fází (3.15) po rysku a promíchá. Dále se roztok odstaví v chladničce do druhého dne, aby se kvantitativně vysrážel chloristanový iont ve formě chloristanu draselného, tento se odfiltruje suchým hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se odpipetuje 5 ml do odměrné baňky na 10 ml, doplní se mobilní fází (3.15) po rysku a promíchá.

Konečná koncentrace tohoto směsného standardního roztoku je pro:

vitamin B ₁	1,0 µg/ml
vitamin B ₂	1,0 µg/ml
vitamin B ₆	1,0 µg/ml

3.15 Mobilní fáze (poznámka 8.7)

Příprava: V odměrné baňce na 1 000 ml se smíchá 95 ml acetonitrilu (3.5), 0,5 ml amoniaku (3.6) a 800 ml vody, doplní toutéž po rysku a promíchá. Po rozpuštění se přidá 950 mg HSA Na (3.9) a po jeho rozpuštění se pH roztoku upraví kyselinou fosforečnou (3.4) na hodnotu 2,85. 930 ml tohoto roztoku se doplní vodou na 1 000 ml, promíchá a filtruje přes filtr 0,45 µm.

3.16 Derivatizační roztok

Příprava: Do kádinky vhodného objemu se odváží 0,5 g hexakynoželzeitanu draselného (3.1), rozpustí v 50 ml vody a 6 ml tohoto roztoku se přidá do 100 ml roztoku hydroxidu sodného (3.8).

3.17 Methylalkohol, HPLC grade

3.18 Kyselina octová, HPLC grade (h = 1,05 g/cm³)

3.19 Diethylamin, (C₂H₅)₂NH, M_r = 73,14 (dále jen DEA)

3.20 Extrakční roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 2 000 ml se odlije 500 ml vody, naváží se 2,84 g 1-HSA Na (3.4), přidá se 40 ml kyseliny octové (3.2), 8 ml DEA (3.5) a po rozpuštění se přidá 500 ml methylalkoholu. Doplní se vodou po značku a promíchá. Pod pH metrem se upraví pH roztoku na hodnotu pH 3,70 kyselinou fosforečnou.

3.21 Mobilní fáze

Příprava: V odměrné baňce na 2 000 ml se v 500 ml vody rozpustí 2,84 g 1-HSA Na (3.4), přidá se 300 ml methanolu, 40 ml kyseliny octové (3.2) a 8 ml DEA (3.5). Doplní se vodou po značku a promíchá. Pod pH metrem se upraví pH na hodnotu (3,70 ± 0,025) kyselinou fosforečnou.

3.2.2 Základní roztok komplexu vitamínu B

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 50,0 mg vitamínu B₁, B₂ a B₆ a rozpustí se ve vodě mírně zalkalizované hydroxidem draselným, po rozpuštění se doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,2 mg/ml vitamínu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Chromatograf kapalinový vysokotlačný (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolona – reverzní fáze C₁₈, 300 × 4,4 μm, injektážní dávkovací zařízení např. Rheodyne, UV detektor nebo fluorimetrický detektor – mířkový typ s excitací a emisním monochromátorem, popř. datastnice s integračním software, tiskárna či jiné registrační zařízení

4.2 Pumpa derivatizační

4.3 Smyčka reakční derivatizační (doporučené parametry: délka 6 m, průměr kapiláry 0,254 mm, materiál PEEK)

4.4 Třepačka laboratorní

4.5 Termostat vhodné konstrukce

4.6 pH metr

4.7 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.8 Membránový filtr (0,45 μm)

5. Postup (poznámka 8.3)

5.1 Premix

Při zpracování vzorku se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 0,5 mm a menší. Vzorek se nemele, ale pouze se roztírá v porcelánové misce. Homogenizace a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám vitamínu B. Roztoky vitamínu B se musí chránit před přímým slunečním světlem a UV světlem (roztoky se chrání hliníkovou folií nebo se uchovávají ve skle nebo v jiném materiálu, které nepropouští UV-záření).

5.1.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se naváží 5 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g, přidá se 100,0 ml extrakčního roztoku (3.20), baňka se uzavře zátkou a extrahuje se na laboratorní třepačce (4.4) po dobu 65 minut. Po extrakci se upraví pH směsi na hodnotu 3,7 pod pH-metrem (4.6) kyselinou fosforečnou (3.4) nebo DEA (3.19) (poznámka 8.2). Roztok se filtruje přes suchý hustý skládaný filtr do suché podložné zkumavky, přičemž první podíl (asi 5 ml) se nepoužije.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu (4.1) se roztok filtruje přes membránový filtr (4.8) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.7) po dobu 2 minut při 3500 ot/min.

5.1.2 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se pipetuje postupně 1,0 – 2,0 – 5,0 a 10,0 ml základního roztoku vitamínu B (3.22) a doplní se extrakčním roztokem (3.20) po značku a promíchá, čímž se získají kalibrační roztoky o koncentraci vitamínu B v mg/l 4,0 – 8,0 – 20,0 a 40,0. pH tohoto roztoku se upraví pod pH metrem (4.6) na hodnotu pH 3,7 kyselinou fosforečnou (poznámka 8.3).

Takto připravené roztoky se nástřikují postupně na chromatografickou kolonu vysoučinného kapalinového chromatografu (4.1) o objemu nástřiku 25 μl.

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch pík se sestojí kalibrační graf.

5.1.3 Vlastní stanovení

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Teplota	okolí
Průtok	1,2 ml/min
Detekce	UV-programovatelný
Objem nástřiku	25 μl
AUFS	1,000

Pořadí eluce jednotlivých pík a podmínky detekce

	Vlnová délka (nm)	Čas eluce (min)
Vitamin B ₆	291 nm	4,3
Vitamin B ₁	273 nm	8,2
Vitamin B ₂ (poznámka 8.8)	267 nm	18,5

5.2 Krmné směsi

5.2.1 Kalibrace a kontrola lineární odezvy instalované instrumentace

Do odměrných baněk na 10 ml se diferencovaně odpipetuje 1, 2, 4 a 5 ml směsného pracovního roztoku (3.14), doplní mobilní fází (3.15) po rysku a promíchá. Takto připravené kalibrační roztoky vitamínů B₁, B₂ a B₆ představují koncentrace 0,2, 0,4 a 0,8 a 1,0 μg/ml.

Kalibrační roztoky se použijí pro kalibraci systému a pro kontrolu linearity odezvy instalované instrumentace.

Pracovní podmínky:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok mobilní fáze	1,0 ml/min.
Detekce	fluorimetrická (poznámka 8.6)
Objem nástřiku	125 μl
Průtok derivatizačního roztoku v derivatizační smyčce	0,3 ml/min. (při stanovení vitamínu B ₁)

Pořadí eluce jednotlivých pík a podmínky detekce:

Vlnová délka (nm)		Štěrba (nm)		čas eluce (min.)	
vitamin B ₁	excitace 360	emise 435	excitace 20	emise 60	23
vitamin B ₂	excitace 440	emise 565	excitace 20	emise 60	28
vitamin B ₆	excitace 295	emise 395	excitace 20	emise 60	8

Při detekci vitamínu B₁ je nutno uvést v činnost derivatizační smyčku (4.3), která musí být termostatována na teplotu 50 °C.

Kolona se nejprve uvede do rovnováhy až dosáhne ustálení základní linie při daném průtoku mobilní fáze (3.15) a pak se nástřikují jednotlivé roztoky a to v tomto doporučeném pořadí: kalibrační standardní roztoky (viz 5.1.1), roztoky zkoušeného vzorku. Na jeden nástřik se stanoví vitaminy B₂ a B₆. Vitamin B₁ se stanoví na další nástřik, kdy je v činnosti derivatizační smyčka (4.3). Každý nástřik, jak kalibračního tak i roztoku zkoušeného vzorku, musí

být proveden dvakrát, přičemž příslušné odezvy musí být v toleranci nejvýše 2 %. Za popsání podmínek (viz 5.1.2) se pořídí chromatografický záznam.

Z naměřených hodnot ploch píků a jím odpovídajících koncentrací kalibračních roztoků se sestaví kalibrační graf (poznámka 8.4).

5.2.2 Vlastní provedení

Do odměrné kuželové baňky na 250 ml se odváží tolik zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, aby po extrakci, úpravě pH a doplnění mobilní fáze (3.15) na objem 100 ml, bylo dosaženo deklarovaných koncentrací přibližně v polovině rozsahu pro všechny tři stanovované složky (poznámka 8.5). K navážce vzorku se přidá asi 60 ml vody, za promíchávání ještě 2 ml kyseliny chloristé (3.3), baňka se uzavře, umístí na třepačku (4.4) a protřepává po dobu 30 minut. Pak se opatrně, za stálého míchání, přidává roztok hydroxidu draselného (3.8) až do dosažení hodnoty pH 3,2. Obsah baňky se převede do odměrné baňky na 100 ml, doplní mobilní fází po rysku a promíchá. Baňka s roztokem se umístí do druhého dne v chladničce, za účelem kvantitativního vysrážení chloristanového iontu jako chloristan draselný, potom se filtruje suchým, hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Z tohoto filtrátu se doplní odměrná baňka na 10 ml po rysku. Dále se postupuje podle 5.2.1.

Naměřená koncentrace se zjistí z kalibračního grafu (poznámka 8.4).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah jednotlivých vitaminů vyjádřených jako hydrochloridy v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce (poznámky 8.1 a 8.4):

$$X = \frac{C_1 \cdot F}{m}$$

kde C_1 je koncentrace jednotlivých vitaminů zjištěná z kalibračního grafu v $\mu\text{g/ml}$

F faktor ředění

m navážka zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Vitamin B_6 je v nativní formě přítomen v podobě pyridoxinu, pyrodoxalu a pyrodoxaminu. Uvedené složky jsou v přírodním materiálu zastoupeny v různém poměru, přičemž všechny formy jsou biologicky aktivní. Uvedená metoda stanoví pouze vitamin B_6 v podobě pyridoxinu. Výsledek je nutno interpretovat jako součet obsahů přidaného vitaminu B_6 , který je přítomen ve formě pyridoxinu hydrochloridu a nativního obsahu přítomného ve formě pyridoxinu a hydrolyzou je na hydrochlorid převeden.

8.2 Chromatografický systém tvorby iontových párů je velmi citlivý na pH, které ovlivňuje disociaci především vitaminu B_1 a který se ve vodném roztoku chová jako báze.

8.3 Doporučuje se pracovat při tlumeném světle, protože všechny tři formy stanovovaných látek jsou na světle nestabilní.

8.4 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítá se obsah jednotlivých vitaminů přímo z naměřených koncentrací.

8.5 Doporučuje se odvažovat nejméně 1 g zkušební vzorku. U vzorků s vyšším obsahem stanovovaných složek je tedy třeba koncentrace v polovině rozsahu kalibračního grafu dosáhnout přiměřeným naředěním filtrátu (viz 5.2) před nástřikem do kolony.

8.6 Detekční limity uvedené metody jsou:

0,05 $\mu\text{g/ml}$ pro vitaminy B_1 i B_2

0,01 $\mu\text{g/ml}$ pro vitamin B_6

Výsledky stanovení obsahu vitaminu B_1 a B_6 jsou uváděny jako hydrochloridy.

8.7 Hodnota pH mobilní fáze závisí na použité chromatografické koloně.

8.8 Pořadí a retenční časy závisí na podmínkách chromatografického dělení a použité koloně.

4.10 Stanovení obsahu vitaminu B_2

1. Účel a rozsah

Jsou uváděny dvě metody stanovení vitaminu B_2 v premixech – fluorimetrická a difúzní plotnová a jedna metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) pro stanovení vitaminu B_2 v premixech i krmných směsích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

Vitamin B_2 je po chemické stránce riboflavin, je jedním z vitaminů B-komplexu. Tvoří žlutou, ve vodném roztoku silně žlutozeleně fluoreskující látku a je velmi fotolabilní.

2. Princip

Vitamin B_2 v premixech se stanoví fluorimetricky v mírně okyseleném prostředí na základě fluorescence při vlnové délce 440 nm nebo difúzní plotnovou metodou na základě růstové odpovědi testovacího mikroorganismu *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (CCM 1825).

Vitamin B_2 v premixech i krmných směsích se stanoví po extrakci zkušební vzorku za tepla zředěnou kyselinou chloristou, její neutralizací hydroxidem draselným, a následnou enzymatickou hydrolyzou (takadiastasa), metodou iontových párů na reverzní fázi s použitím fluorimetrické detekce.

3. Chemikálie

3.1 Metoda fluorimetrická

3.1.1 Kyselina octová, ledová (CH_3COOH) ($\rho = 1,05 \text{ g/ml}$)

3.1.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.1.3 Manganistan draselný (KMnO_4), roztok 30 g/l

3.1.4 Hydroxylamin hydrochlorid, roztok 30 g/l

3.1.5 Dithioničitán sodný, pevný

3.1.6 Octan sodný, trihydrát, roztok 100 g/l

3.1.7 Riboflavin, standardní substance vitaminu B_2 se známou (ověřenou) účinností

- 3.1.8 Vitamin B₂ (riboflavin), základní standardní roztok**
- Příprava: Do kádinky se odváží se přesně 40 mg standardní substance riboflavinu (3.1.7), o účinnosti 100 % nebo vypočítané množství nižší účinnosti, předem vysušené (3 hod. při teplotě 100 °C) a v exsikátoru ochlazené. Přidá se asi 800 ml vody a 10 ml ledové kyseliny octové (3.1.1). Po promíchání se směs zahřívá na vroucí vodní lázni (4.1.2) až do úplného rozpuštění, potom se ochladí a kvantitativně převede do odměrné baňky na 1 000 ml. Doplní se vodou po rysku a promíchá.
- Tento roztok standardu je stálý několik měsíců za předpokladu jeho uložení ve tmě a chladu.
- Před vlastním stanovením se připraví pracovní standardní roztok riboflavinu zředěním základního standardního roztoku na koncentraci 2 µg riboflavinu v 1 ml.
- 3.2 Metoda difúzní plotnová**
- 3.2.1 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$**
- 3.2.2 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$**
- 3.2.3 Octan sodný, roztok $c(\text{CH}_3\text{COONa}) = 2,5 \text{ mol/l}$**
- 3.2.4 Kyselina octová, roztok 10%**
- 3.2.5 Voda redistilovaná**
- 3.2.6 Riboflavin (vitamin B₂) standardní substance se známou či ověřenou účinností**
- 3.2.7 Vitamin B₂ (riboflavin), základní standardní roztok**
- Příprava: Odváží se přesně 0,05 g standardní substance riboflavinu (3.2.6) o účinnosti 100 % nebo vypočtené množství nižší účinnosti do odměrné baňky na 500 ml, rozpustí se v 10 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2.2), po jeho rozpuštění se přidá 8,5 ml roztoku kyseliny octové (3.2.4); doplní roztokem kyseliny sírové (3.2.1) po rysku a promíchá.
- Tento základní standardní roztok má koncentraci 0,1 mg riboflavinu v 1 ml. Je stálý v chladničce po dobu 1 měsíce.
- Těsně před použitím se ředí na testovací roztoky o koncentracích 2,1 a 0,5 µg vitaminu B₂ v 1 ml.
- 3.2.8 Fyziologický roztok**
- Příprava: 8 g chloridu sodného se rozpustí ve vodě, doplní vodou na 1 000 ml, promíchá a sterilizuje se 20 minut při 121 °C.
- 3.2.9 Testovací organismus *Lactobacillus rhamnosus* 7469 (CCM 1825)**
- Příprava: Kultura se uchovává na šikmé udržovací agarové půdě při teplotě 4 °C, nejméně jednou za 2 týdny se přeočkovává a inkubuje 48 hod. při teplotě 37 °C.
- 3.2.10 Inokulum**
- Příprava: Ze šikmé agarové se suspendují 1 až 2 kličky náterů testovacího mikroorganismu (3.2.9) do sterilního inkubačního roztoku a inkubuje se 24 hod. při teplotě 37 °C. Před použitím se kultura vyrostlá v inkubačním roztoku odstředí, supernatant se slijí a kultura se převede 5 ml izotonického roztoku (3.2.8) do zkumavky. Tím se vyloučí vliv standardní substance vitaminu B₂ přidaného do inkubačního roztoku.
- 3.2.11 Živné půdy**

3.2.11.1 Udržovací půda – sušená půda Lactoagar Sevac

Příprava: Proveďte se buď podle návodu výrobce nebo 5,7 g Lactoagaru se nechá botnat 15 minut ve vodě a potom se za varu rozpustí. Při teplotě 60 °C se doplní horkou vodou na objem 100 ml, promíchá, rozdělí do zkumavek a připraví se šikmé agarové půdy. Hodnota pH po sterilizaci je 6,5 až 6,9.

Rehydratovaný agar lze uchovávat v chladničce po dobu 3 měsíců.

3.2.11.2 Inokulační půda

Příprava: Proveďte se buď podle návodu výrobce, nebo 20 g sušené půdy se rozpustí v 500 ml vody, přidá se standardní roztok vitaminu B₂ (3.2.7) tak, aby koncentrace vitaminu B₂ v 1 ml byla 0,1 µg, rozdělí se po 40 ml do kuželových baňek a sterilizuje.

3.2.11.3 Testovací půda

Příprava: Proveďte se podle návodu výrobce nebo 46 g sušené půdy se rozpustí v malém množství horké vody, promíchá se s 20 mg rozvařeného agaru a doplní vodou na 1 000 ml. Rozděluje se do kuželových baňek na 100 ml sterilizuje 10 minut při tlaku 0,05 MPa, pH po sterilizaci má být 6,2 až 6,8.

3.3 Metoda HPLC

3.3.1 Kyselina chloristá (HClO_4), koncentrovaná 70%

3.3.1.1 Kyselina chloristá, zředěná 0,2 mol/l

Příprava: V odměrné baňce na 2 000 ml se v 1 000 ml vody rozpustí 33,5 ml kyseliny chloristé (3.1), promíchá, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní se vodou po značku a promíchá.

3.3.2 Hydroxid draselný, roztok $c(\text{KOH}) = 2 \text{ mol/l}$

Příprava: V odměrné baňce na 1 000 ml se rozpustí v 500 ml vody 112 g hydroxidu za stálého chlazení. Po rozpuštění se obsah odměrné baňky doplní po značku a promíchá.

3.3.3 Kyselina fosforečná (H_3PO_4), koncentrovaná 85% ($\rho = 1,7 \text{ g/cm}^3$)

3.3.4 Amoniak, vodný roztok (NH_4OH), koncentrovaný, ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$)

3.3.5 Hydroxid sodný, zředěný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,005 \text{ mol/l}$

3.3.6 Reagent iontových párů (dále jen 1-HSA Na) – sodná sůl kyseliny hexansulfonové, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{SO}_3\text{Na}$, $M_r = 188,22$

3.3.7 Acetonitril, HPLC grade

3.3.8 Methylalkohol, HPLC grade

3.3.9 Kyselina octová, ($\rho = 1,05 \text{ g/cm}^3$), HPLC grade

3.3.10 Diethylamin, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{NH}$, $M_r = 73,14$ (dále jen DEA)

3.3.11 Vitamin B₂ (riboflavin), $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_6$, $M_r = 376,4$

3.3.11.1 Základní roztok vitaminu B₂

Příprava: V odměrné baňce na 250 ml se rozpustí v asi 150 ml hydroxidu sodného (3.5) 50,0 mg riboflavinu, doplní roztokem hydroxidu sodného po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,2 mg/ml vitaminu B₂

3.3.11.2 Pracovní roztok pro krmné směsi

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se pipetuje 2 ml základního roztoku vitamínu B₂, doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,004 mg vitamínu B₂

3.3.12 Zředovací roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se nalije 200 ml vody, přidá se 400 ml acetonitrilu (3.7), 0,5 ml roztoku amoniaku (3.4), rozpustí se 100 mg 1-HSA-Na (3.6), doplní vodou po značku a promíchá. pH tohoto roztoku se upraví kyselinou fosforečnou (3.3) na hodnotu (3,5 ± 0,05) (pH-metr).

3.3.13 Mobilní fáze

Příprava: V odměrné baňce na 1 000 ml se ve 250 ml vody rozpustí 1,42 g 1-HSA Na (3.6), přidá se 150 ml methanolu (3.8), 20 ml kyseliny octové (3.9) a 4 ml DEA (3.10). Doplní se vodou po značku a promíchá. pH se upraví na hodnotu (3,70 ± 0,05) kyselinou fosforečnou (3.3).

3.3.14 Takadiastasa, 1,4 IU/mg, uchovávat do teploty 4 °C

3.3.15 Takadiastasa, 40 IU/mg, uchovávat do teploty 4 °C

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Metoda fluorimetrická

4.1.1 Fluorimetr opatřený žlutozeleným filtrem

4.1.2 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.1.3 Chladič zpětný vodní

4.2 Metoda difúzní plotnová

4.2.1 Plotny skleněné 360 mm × 360 mm nebo 250 mm × 250 mm

4.2.2 Rámy čtvercové kovové 340 mm × 340 mm nebo 200 mm × 200 mm

4.2.3 Odstředivka vhodné konstrukce

4.2.4 Korkovrt o průměru (8 ± 1) mm

4.2.5 Vodováha

4.2.6 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.2.7 Autokláv

4.2.8 Mikropipeta podle Pasteura

4.3 Metoda HPLC

4.3.1 Vysokoučinný kapalinový chromatograf [čerpadlo, kolona C₁₈ – Nova-Pak 4 µm, 250 × 4,6 mm (Waters), 20 µm, injekční dávkovací zařízení (autosampler, Rheodyne), FF detektor, data stanice s integračním softwarem, tiskárna nebo jiné registrační zařízení]

4.3.2 membránový filtr (0,45 µm)

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Metoda fluorimetrická

5.1.1 Do kuželové baňky na 200 ml se zábrusem se odváží přesně 2,000 g zkušební vzorku, přidá přesně 50 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2) vyluhuje na vodní lázni (4.1.2) 85 °C teplé

pod zpětným chladičem (4.1.3) po dobu 30 minut za častého míchání, pak se baňka ochladí a opatrným přidáváním roztoku octanu sodného (3.1.6) se upraví na pH = 4,5. Přidá se do obsahu přesně 100 ml vody, promíchá a ponechá asi 1 hod. sedimentovat. Po usazení pevného podílu se obsah baňky filtruje suchým hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do další odměrné baňky na 50 nebo 100 ml se odpipetuje takový objem filtrátu, aby výsledná koncentrace vitamínu B₂ byla 0,15 až 30 µg v 1 l. Tento roztok se pipetuje do dvou zkumavek (kádek) v množství po 10 ml, do první z nich se přidá přesně 1 ml vody, do druhé se přidá přesně 1 ml pracovního standardního roztoku riboflavinu (3.1.8), do obou pak 0,5 ml roztoku kyseliny octové (3.1.1), po promíchání dále 0,25 ml roztoku manganistanu draselného (3.1.3) a znovu promíchá. Přesně za 2 min se přidá 0,15 ml roztoku hydroxylaminu hydrochloridu (3.1.4) a promíchá, přičemž roztok se musí do 15 sekund odbarvit. Jinak je nutné přidat více hydroxylaminu hydrochloridu (3.1.4).

5.1.2 Intenzita fluorescence roztoků se proměří na fluorimetru (4.1.1). Primární záření je při vlnové délce 440 ± 5 nm, sekundární při 520 nm. Potom se do obou roztoků přidá malé množství (nejvýše 20 mg) dithionititanu sodného (3.1.5), promíchá se a za 20 sekund se měří fluorescence. Naměřená hodnota se odečte od hodnoty naměřené před přidáním dithionititanu sodného (3.1.5).

5.2 Metoda difúzní plotnová

5.2.1 Do kuželové baňky na 200 ml se zábrusem se odváží 1 až 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se přesně 75 ml roztoku kyseliny sírové (3.2.1) a extrahuje se na vodní lázni (4.1.2) pod zpětným chladičem (4.2.8) při 60 až 70 °C po dobu 30 minut. Po vychlazení se přidá přesně 5 ml roztoku octanu sodného (3.2.3), 20 ml vody, promíchá a filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Koncentrace výluhu se má pohybovat od 4 do 12 µg vitamínu B₂. Výluh se dále ředí vodou na teoretické koncentrace testovacích roztoků 2,1 a 0,5 µg v 1 ml.

5.2.2 Na skleněnou plotnu (4.2.1) vyrovnanou do vodorovné polohy (vodováha (4.2.5)) opatřenou kovovými rámy (4.2.2) utěsněnými agarem se rozlije 75 ml roztoku a na teplotu 40 °C zchlazeného testovacího agaru (3.2.11.3), který se naočkoval 1–2 ml inokula (3.2.10). Po ztuhnutí se vyhloubí korkovrtem (4.2.4) jamky vzdálené od sebe 25 až 30 mm. Do dvou jamek ve středu plotny se plní mikropipetou (4.2.8) testovací roztoky standardu (3.2.7), příslušné naředěné testované roztoky zkoušeného vzorku se plní po obou stranách rovněž do 2 jamek. Pak se plotna lehce zakryje děrovaným alobalem a inkubuje se 20 až 24 hod. při teplotě 37 °C.

5.2.3 Vzniklé zóny se měří ve dvou na sebe kolmých rovinách posuvným měřítkem s přesností 0,1 mm a z naměřených hodnot se zjistí průměrné hodnoty růstových zón standardu i zkoušeného vzorku.

5.3 Metoda HPLC

5.3.1 Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se naváží 5 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g, přidá se 100,0 ml kyseliny chloristé (3.3.1.1) a extrahuje se za občasného míchání na topném hnízdě za varu pod vodním chladičem po dobu 60 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidá 10,0 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3.2) tak, aby výsledné pH leželo v oblasti pH 4, 5 až 5,4 (poznámka 8.3), popřípadě se pH upraví na tuto hodnotu kyselinou fosforečnou (3.3.3) nebo amoniakem (3.3.4), přidá se 5 g takadiastasy (3.3.14) nebo 250 mg takadiastasy (3.3.15), uzavře se zátkou a hydrolyzuje se při teplotě 45 °C po dobu 16 hodin za občasného promíchání. Poté se obsah baňky vytemperuje na laboratorní teplotu, přidá se 90,0 ml zředovacího roztoku (3.3.12), obsah baňky se

promíchá a kyselinou fosforečnou (3.3.3) se upraví pH na hodnotu pH (3,7 ± 0,05) (poznámka 8.1). Nechá se stát asi dvě hodiny v chladničce aby se vysrážel nerozpustný chloristan draselný (KClO₄). Ještě studený roztok se filtruje přes suchý hustý filtr do suché podložené zkumavky, přičemž první podíl (asi 5 ml) se nepoužije.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu (4.3.1) se roztok filtruje přes membránový filtr (4.3.2) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce (4.2.3) po dobu 2 minut při 3500 ot/min.

5.3.2 Vlastní stanovení

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Teplota	okolí
Průtok	1,2 ml/min
Detektor	Fluorescenční ($\lambda_{\text{exc}} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$)
Objem nástřiku	20 μl
GAIN	1000
Retenční čas	18,5 min.

5.3.3 Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se pipetuje postupně 1,0 – 2,0 – 3,0 a 5,0 ml pracovního roztoku vitamínu B₂ (3.3.11.2), přidá se 25,0 ml kyseliny chloristé (3.3.1.1), 2,5 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3.2) a zředěvacím roztokem (3.3.12) se doplní po značku a promíchá, čímž se dostane kalibrační křivka o koncentraci vitamínu B₂ 0,08 – 0,16 – 0,24 – 0,4 mg/l. pH kalibračních roztoků se upraví kyselinou fosforečnou (3.3.3) nebo hydroxidem draselným (3.3.2) na hodnotu pH = (3,70 ± 0,05) (poznámka 8.1) a roztoky se nechají v ledničce asi 2 hodiny, aby se vysrážel chloristan draselný.

Takto připravený roztok se nástřikuje postupně na chromatografickou kolonu HPLC (4.3.1) o objemu nástřiku 20 μl .

Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch pík se sestrojí kalibrační graf.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda fluorimetrická

(Obsah vitamínu B₂ (X) v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot F \cdot I_x}{(I_s - I_v) \cdot m}$$

kde I_x je intenzita fluorescence zkoušeného vzorku

I_s intenzita fluorescence zkoušeného vzorku s přidáním standardem

C koncentrace srovnávacího standardního roztoku v $\mu\text{g}/\text{ml}$ (= 2)

F faktor ředění zkoušeného vzorku

m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

6.2 Metoda difúzní plotnová

Obsah vitamínu B₂ v mg/g (Y) se vypočte podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

6.3 Metoda HPLC

Obsah vitamínu B₂ vyjádřený v mg/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace riboflavinu odečtená z kalibračního grafu v mg

m hmotnost zkušebního vzorku v g

F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Chromatografický systém tvorby iontových párů je velmi citlivý na pH, které ovlivňuje disociaci iontového páru. pH roztoku má vliv na retenční čas riboflavinu, se stoupajícím pH roste retenční čas riboflavinu.

8.2 Doporučuje se pracovat při tlumeném světle, protože riboflavin je na světle nestabilní.

8.3 Přídavek 10,0 ml hydroxidu draselného k neutralizaci kyseliny chloristé se musí být v rozmezí 10,0 ± 0,2 ml. Přídavek hydroxidu draselného se předem ověří titrací 100 ml roztoku kyseliny chloristé (3.3.1.1) do hodnoty pH 5,0. V případě, že je spotřeba menší nebo větší než 10 ml, musí se koncentrace hydroxidu draselného upravit tak.

4.11 Stanovení obsahu vitamínu B₁

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no L 083, 30/03/73.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu B₁ (thiaminu, aneurinu) v krmivech a premixech. Mez stanovitelnosti metody je 5 mg/kg (5 ppm).

2. Princip

Vzorek je převeden do roztoku horkou zředěnou kyselinou sírovou a následující enzymatickou hydrolyzou. Po alkalické oxidaci je vzniklý thiochrom extrahován isobutylalkoholem a stanoven fluorimetricky.

3. Chemikálie

3.1 Hydrochlorid thiaminu (C₁₂H₁₇ClN₄OS), standardní substance

3.2 Thiamin, standardní roztok

Příprava: Do odměrné banky na 100 ml se odváží 11,23 mg

standardní substance hydrochloridu thiaminu (3.1), předem vysušeného do konstantní hmotnosti za sníženého tlaku, rozpustí se roztokem kyseliny sírové (3.3), doplní tímžé po rysku (po vytemperování) a promíchá.

Tento roztok uchovaný v chladničce na tmavém místě je stabilní po dobu 1 měsíce.

1 ml standardního roztoku obsahuje 100 µg thiaminu (vitamin B₁)

3.3 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.4 Dithionit sodný, pevný

3.5 Hexakynoželceztan draselný, roztok 200 g/l

3.6 Hydroxid draselný, roztok 250 g/l

3.7 Oxidační směs

Příprava: Smíchá se 48 ml roztoku hydroxidu draselného (3.6) s 2 ml roztoku hexakynoželceztanu draselného (3.5) a promíchá. Tato směs je stálá nejvýše 4 hodiny.

3.8 Isobutylalkohol (poznámka 8.1)

3.9 Octan sodný, roztok $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}) = 2,5 \text{ mol/l}$

3.10 Přípravek multienzymatický obsahující proteázu, fosfatázu a amylázu (EG, Clarase)

3.11 Ethylalkohol (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Fluorimetr vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.2 Odstředivka laboratorní (3 500 ot/min.) s příslušenstvím (centrifugační kyvety obsahu 30 a 50 ml se zábrusem a zátkami)

4.3 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

Do dvou odměrných baněk na 250 ml se odváží naprosto stejná množství zkušebního vzorku obsahující, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu B₁ ve zkušebním vzorku, asi 100 µg vitamínu B₁ (thiaminu), přidá se 125 ml roztoku kyseliny sírové (3.3) a do jedné z baněk přesně 1,0 ml standardního roztoku thiaminu (3.2) jako vnitřní standard. Obsahy baněk se intenzívně protřepávají, umístí se na vroucí vodní lázeň (4.3) a ponechají se tam po dobu 15 minut, přičemž se občas promíchají. Pak se nechají zchladnout asi na 45 °C, do každé z baněk se přidá 20 ml roztoku octanu sodného (3.9), 0,5 g multienzymatického přípravku (3.10) a baňky se ponechají stát po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Potom se přidá do každé z nich opět 20 ml roztoku octanu sodného (3.9), baňky se doplní po rysku vodou, promíchají a filtrují suchým středně hustým filtrem do suchých kádinek, přičemž první podíly (asi 15 ml) filtrátů se nezachycují.

Dále se připraví referenční roztok (A) a roztoky se zkušebním vzorkem (C) a se zkušebním vzorkem a vnitřním standardem (B).

Referenční roztok (A):

Do centrifugační kyvety (4.2) se odpipetuje přesně 5,0 ml filtrátu roztoku s vnitřním standardem a přidá přibližně 10 mg dithionit sodného (3.4). Centrifugační kyveta se ponoří na 15 minut do vroucí vody a pak se nechá vychladnout na laboratorní teplotu.

Roztok zkušebního vzorku s vnitřním standardem (B) a samot-

ného zkušebního vzorku (C): Do jedné centrifugační kyvety (4.2) se odpipetuje přesně 5,0 ml filtrátu roztoku zkušebního vzorku s vnitřním standardem, do druhé centrifugační kyvety (4.2) přesně 5,0 ml filtrátu samotného vzorku.

Do každého z těchto připravených roztoků (A+B+C) v centrifugačních kyvetách (4.2) se přidá 5 ml oxidační směsi (3.7) a po jedné minutě přesně 10,0 ml isobutylalkoholu (3.8). Kyvety se zatáknou a vytřepávají intenzívně po dobu alespoň 5 sekund, nechají asi 1 minutu ustát a odstředí (4.2) tak, aby došlo ke zřetelnému oddělení vrstev. Z každé centrifugační kyvety (4.2) se odpipetuje přesně po 5,0 ml isobutylalkoholové fáze do odměrných baněk na 25 ml, každá se doplní po rysku ethylalkoholem (3.11) a promíchá (extrakty roztoků A, B, C).

Extrakty roztoků B a C se proměří na fluorimetru (4.1) při takové vlnové délce, při které má konkrétní přístroj (4.1) optimální odezvu fluorescence thiochromu, obvykle to bývá při 365 nm. Nulová hodnota se nastaví extraktem referenčního roztoku (A). U extraktů B a C se změří intenzita fluorescence.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vitamínu B₁, vyjádřeného jako thiamin, v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot I_v}{m \cdot (I_s - I_v)}$$

kde I_v je intenzita fluorescence zkušebního vzorku (C)

I_s intenzita fluorescence zkušebního vzorku s přidávkou vnitřního standardu (B)

C množství thiaminu v přidávce vnitřního standardu v µg

m навážka zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu vitamínu B₁:

do 500 mg/kg	10 % relat.
nad 500 mg/kg	5 % relat.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol a isobutylalkohol jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

4.12 Stanovení obsahu vitamínu B₆

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu B₆ v premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Vitamin B₆ je po chemické stránce směs pyridoxinu, pyridoxalu a pyridoxaminu. Protože jako standardní substance je používán hydrochlorid pyridoxinu, což je (3-hydroxy-4,5-bis(hydroxymethyl)-2-methylpyri-

din hydrochlorid, sumárního vzorce $C_8H_{12}ClNO_3$, je celkový obsah vitamínu B_6 vyjadřován jako hydrochlorid pyridoxinu. Vitamin B_6 je značně fotolabilní.

2. Princip

Vitamin B_6 ve všech jeho formách se stanoví na základě stimulačního účinku na růst testovacího mikroorganismu kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 (ATCC 9080) difúzní plotnovou metodou.

3. Chemikálie

3.1 Redestilovaná voda

3.2 Vitamin B_6 , pyridoxin hydrochlorid, standardní substance o známé účinnosti

3.3 Vitamin B_6 , standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 0,01 g standardní substance hydrochloridu pyridoxinu (3.2), rozpustí se v redestilované vodě (3.1), doplní toutéž po rysku a promíchá.

Tento standardní roztok obsahuje 100 µg vitamínu B_6 vyjádřeného jako hydrochlorid pyridoxinu v 1 ml a je stálý nejvýše po dobu jednoho týdne uchovaný v tmavé láhvi při 4 °C.

Při testování se připraví testální koncentrace 0,500; 0,250 a 0,125 µg hydrochloridu pyridoxinu (vitamínu B_6) v 1 ml.

3.4 Hydroxid sodný, roztok (30 g / 200 ml)

3.5 Kyselina sírová, koncentrovaná (184 g/ml)

3.6 Kyselina sírová, roztok (41,80 g) - 0,22 mol/l

3.7 Testovací mikroorganismus - kultura kmene *Saccharomyces carlsbergensis*. Kultura se uchovává na šikmém agarové půdě při teplotě 4 °C a jednou za 14 dní se přeočkovává následně inkubuje 24 hodin při teplotě 30 °C.

3.8 Inokulum

Příprava: 20 ml inokulační půdy (3.9.3) se naočkuje jednou kličkou kultury testovacího mikroorganismu (3.7) z udržovacího agaru a inkubuje se při teplotě 30 °C. Z vyrostlé suspence se pomocí 2 ml inokulační pipety k naočkování 100 ml testovací půdy (3.9.2), která byla předem rozvařena a zchlazená na teplotu 40 °C.

Suspence může uchovávat při teplotě 4 °C, použitelnost je jeden týden od přípravy.

3.9 Základní

3.9.1 Půda udržovací *Saccharomyces* agar, sušená

Příprava: Postupuje se podle návodu výrobce, nebo 9,8 g půdy se nechá botnat 15 minut v 80 ml redestilované vody (3.1) a pak se mírným vařením rozpustí. Při teplotě 60 °C se doplní redestilovanou vodou (3.1) na objem 100 ml, promíchá a rozdělí do zkumavek. Sterilizuje se 15 minut při teplotě 12 °C a po sterilizaci se nechá utuhnout v šikmém poloze. pH po sterilizaci má být 5 až 6.

3.9.2 Půda testovací

Příprava: Postupuje se podle návodu výrobce.

Např. 70 g sušené půdy Sevac pro stanovení vitamínu B_6 se rozpustí v malém množství vařící redestilované vody (3.1), slíje a promíchá s 25 až 30 g rozvařeného agaru, zfiltruje

středně hustým filtrem do odměrné baňky na 1 000 ml, doplní po rysku redestilovanou vodou (3.1) a promíchá. Upraví se pH na 5,5 a obsah se rozdělí po 100 ml do baněk. Sterilizuje se po dobu 10 minut při tlaku 0,05 MPa.

Půda se uchovává při teplotě 4 °C.

3.9.3 Půda inokulační

Příprava: Postupuje se podle návodu výrobce nebo stejně jako u půdy testovací (3.9.2), avšak bez agaru a s přidáním hydrochloridu pyridoxinu, který se přidá v množství 0,06 µg na 1 ml půdy ze standardního roztoku vitamínu B_6 (3.3). pH půdy má být 5,5. Inokulační půda se rozpipetuje po 20 ml do baněk na 200 ml a sterilizuje se po dobu 10 minut při tlaku 0,05 MPa.

Uchovává se při teplotě 4 °C.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plotna skleněná 250 mm × 250 mm

4.2 Rám čtvercový 200 mm × 200 mm

4.3 Baňka odměrná na 100 ml podle Kohlrausche nebo Stiffa

4.4 Korkovrt o průměru $8 \pm 0,1$ mm

4.5 Autokláv

4.6 Vodováha

4.7 Podložka vyrovnávací regulovatelná

4.8 Termostat vhodné konstrukce

4.9 Lázeň vodní s termostatem

4.10 Mikropipeta podle Pasteura

5. Postup (poznámka 8.2)

5.1 Do 250 ml extrakční baňky se odváží 5,000 g zkušebního vzorku (poznámka 8.1) a suspenduje se v 75 ml roztoku kyseliny sírové (3.6). Potom se extrahuje na vodní lázni (4.9) při teplotě 60 °C až 70 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení se doplní redestilovanou vodou (3.1) na přesně 100 ml, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.2 Koncentrace vitamínu B_6 v tomto filtrátu vyluhu je asi 2,5 až 5,0 µg na 1 ml. Vyluh je možno uchovávat při teplotě 4 °C nejvýše po dobu jednoho týdne.

5.3 Ředění roztoku vzorku se provádí redestilovanou vodou (3.1) na testované koncentrace 0,500; 0,250 a 0,125 µg vitamínu B_6 v 1 ml.

5.4 Na dno plotny (4.1) opatřené kovovým rámcem (4.2) a vodorovně (4.6) umístěné se vylíje 75 ml testovací půdy (3.9.2) naočkované kulturou. Po ztuhnutí agarové vrstvy se korkovrtem (4.4) vyhloubí jamky, vzdálené od sebe navzájem 2,5 až 3 cm. Do těchto jamek se mikropipetou (4.10) vnáší jednotlivě testované koncentrace roztoku vzorku a testální koncentrace standardního roztoku vitamínu B_6 v množství asi 0,04 ml, ale ve všech případech naprosto shodně.

5.5 Testální roztoky standardu vitamínu B_6 se plní do tří jamek ve středu plotny, po obou stranách se pak plní naředěné roztoky zkoušeného vzorku (testované koncentrace) odpovídající přibližně koncentracím standardního testovacího roztoku. Plotna (4.1) se inkubuje při teplotě 30 °C po dobu 16 až 18 hodin. Vzniklé zóny se odměří odpichováním ve dvou po sobě kolmých rovinách.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vitamínu B₆ v mg/kg se stanoví podle Přílohy 10, část 7.1.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Navážka zkušební vzorku i objem extrakčního roztoku se volí s ohledem na deklarovaný obsah vitamínu B₆ ve zkušebním vzorku tak, aby výsledná koncentrace vitamínu B₆ ve vyluhu byla v rozmezí 2,5 až 5 µg/ml.

8.2 Vyluhy zkušebního vzorku a kalibrační roztoky standardu se připravují těsně před vlastním stanovením.

4.13 Stanovení obsahu vitamínu C

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu C v premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Vitamin C je po chemické stránce kyselina L-askorbová resp. lakton kyseliny 2-keto-L-gulonové.

2. Princip

Vitamin C se stanoví v prostředí kyseliny metafosforečné a ethylalkoholu polarograficky metodou vnitřního standardu.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina metafosforečná (HPO₃), roztok 30 g/l

3.2 Octan sodný trihydrát, pevný

3.3 Tlumivý roztok octanový o pH = 4,7

Smíchá se roztok octanu sodného o koncentraci 2 mol/l a roztok kyseliny octové o koncentraci 2 mol/l v poměru (1 + 1)

3.4 Kyselina octová, ledová (h = 1,05 g/ml)

3.5 Voda destilovaná, převařená a zchlazená v proudě dusíku

3.6 Želatina, roztok 1 g/100 ml

3.7 Vitamin C (kyselina L-askorbová), standardní substance

3.8 Vitamin C, standardní roztok

Příprava: Odváží se přesně 250,00 mg standardní substance vitamínu C (3.7) do 50 ml odměrné baňky rozpustí ve vodě (3.5), toutéž doplní po rysku a promíchá.

1 ml standardního roztoku obsahuje 5 mg vitamínu C.

3.9 Dusík žárovkatřenský

3.10 Ethylalkohol 96%, aldehyduprostý (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Polarograf vhodné konstrukce s příslušenstvím

5. Postup

5.1 Do dvou kuželových baňek na 200 ml se odváží přesně stejná množství zkušebního vzorku tak, aby navážka vzorku, s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu C ve zkušebním vzorku, obsahovala 5 až 10 mg vitamínu C. Do každé z baňek se odpipetuje přesně 3 ml ethylalkoholu (3.10) a 15 ml kyseliny metafosforečné (3.1). Do jedné z baňek se dále přidá množství standardního roztoku vitamínu C (3.8) odpovídající přesně 50 % předpokládaného obsahu vitamínu C ve vzorku. Do druhé baňky se přidá přesně stejné množství převařené vody (3.5). Oba roztoky se probublavají po 10 minut dusíkem (3.9) za současného protřepávání. Potom se přidá do každé baňky přesně 20 ml tlumivého roztoku (3.3) a obsahy baňek se převedou kvantitativně do odměrných baňek na 100 ml. Baňky se doplní se převařenou vodou (3.5) po rysku a promíchají.

5.2 Obsah každé baňky se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíly filtrátů se nepoužijí. Z každého filtrátu se pipetuje 20 ml do odměrné baňky na 50 ml, přidá se 0,3 ml roztoku želatiny (3.6), doplní se tlumivým roztokem (3.3) po rysku a promíchá.

5.3 Roztoky se převedou do polarografické nádoby (4.1) a de-aeruje se 10 minut dusíkem (3.9).

Při anodicko-katodickém zapojení a vhodné citlivosti se zaznamenají polarografické křivky od -0,4 V proti merkuro-sulfátové elektrodě.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vitamínu C v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot c \cdot h}{(h - h_v) \cdot m}$$

kde h_v je výška vlny zkušebního vzorku v mm

h výška vlny vzorku s přidaným standardem v mm

c koncentrace přidaného standardu v mg

m alikvotní podíl navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto je nutné při jakékoli manipulaci s ním zachovávat bezpečnostní pravidla.

4.14 Stanovení obsahu vitamínu C

Tato metoda je překladem doporučení EU, uvedeným v Official Journal no L 083, 30/03/73.

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě rovnocenné metody stanovení, pro obsahy nižší než 10 000 mg/kg a vyšší než 10 000 mg/kg. Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení vitamínu C (kyseliny askorbové a dehydroaskorbové) v krmných směsích a premixech. Mezi stanovitelností metod je 5 mg/kg (5 ppm).

2. Princip

Vzorek je suspendován a rozpuštěn v kyselině metafosforečné a chloroformu. Kyselina askorbová je ve vodním roztoku převedena na 2,2-dichlorfenol-indifenolem na kyselinu dehydroaskorbovou a dále 4-dinitrofenylhydrazinem na její hydrazonovou formu. Tato je extrahována směsí octanu ethylnatého, ledové kyseliny octové a acetonu. Po přečištění na chromatografické koloně se silikagelem je eluát odpařen do sucha, odparek rozpuštěn v kyselině sírové a roztok měřen spektrofotometricky.

Pro krmiva s obsahem nižším než 10 000 mg/kg musí být hydrazonová forma po eluci z chromatografické kolony izolována pomocí chromatografie na tenké vrstvě (dále jen TLC).

3. Chemikálie

3.1 Kyselina metafosforečná, roztok 100 g/l

Příprava: Do odměrné banky na 2 000 ml se odváží 200 g, předem v třech misce rozetřené, kyseliny metafosforečné, rozpustí se ve vodě, doplní toutéž po rysku a promíchá. Uchovávány při 4 °C na tmavém místě je tento roztok stálý po dobu jednoho měsíce.

3.2 Kyselina L-askorbová (vitamin C), standardní substance

3.3 Kyselina L-askorbová, standardní roztok

Příprava: Do odměrné banky na 100 ml se odváží přesně 50 mg standardní substance kyseliny L-askorbové (3.2), rozpustí v přibližně 20 ml roztoku kyseliny metafosforečné (3.1), doplní po rysku vodou a promíchá.

Přípravuje se vždy čerstvý, těsně před použitím.

1 ml standardního roztoku obsahuje 0,5 mg kyseliny askorbové.

3.4 2,6-Dichlorfenol-indifenol (dále jen DFI), roztok 5 g/l

Přípravuje se vždy čerstvý, těsně před použitím.

3.5 Chloroform

3.6 2,4-Dinitrofenylhydrazin (dále jen DFH), roztok 20 g/l ve zředěné kyselině sírové

Příprava: Do 100 ml odměrné banky se naváží 2 g DFH, rozpustí se ve zředěné kyselině sírové (3.13). Po rozpuštění se doplní zředěnou kyselinou sírovou (3.13) po rysku a promíchá.

Tento roztok uchovaný v chladničce je stálý po dobu 1 týdne.

3.7 Dusík, kyslíkoprostý

3.8 Oxid uhličitý

3.9 Směs octan ethylnatý – ledová kyselina octová – aceton (poznámka 8.1) v poměru (96 + 2 + 2)

3.10 Směs dichlormethan – ledová kyselina octová, v poměru objemů (97 + 3)

3.11 Silikagel o zrnitosti 0,05 až 0,2 mm

3.12 Silikagel o zrnitosti pro TLC (Stahl)

3.13 Kyselina sírová, zředěná

Příprava: Do odměrné banky na 200 ml se odměří 105 ml vody a přidává se koncentrovaná kyselina sírová ($\rho = 1,84$ g/ml) až celkový objem dosáhne po rysku.

3.14 Činidlo eluční pro TLC

Příprava: Smíchá se 75 ml diethyletheru (poznámka 8.1), 25 ml octanu ethylnatého a 4,0 ml ledové kyseliny octové ($\rho = 1,05$ g/ml). Obnovuje se vždy po 2 až 3 chromatografických děleních.

3.15 Filtrační prostředek (fa AND no 121 či jeho ekvivalent)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety o optické délce 10 mm)

4.2 Odstředivka laboratorní (3 500 ot/min.) s příslušenstvím (centrifugační kyvety se zábrusem a zátkou o objemu 40 až 50 ml)

4.3 Odparka vakuová rotační s příslušenstvím (odpařovací banky na 250 ml)

4.4 Trubice chromatografická, skleněná, vnitřní průměr 20 mm, délka 100 mm, opatřená sintrovaným uzávěrem

4.5 Lázeň vodní s termostatem umožňující nastavení na 20 °C

4.6 Zařízení pro TLC se silikagelovou vrstvou (3.12), tlustou 0,5 až 0,6 mm (komerční výrobky jsou nejvhodnější)

Příprava: Vrstva silikagelu se vysuší při teplotě 120 až 130 °C po dobu 2,5 až 3 hod., ochladí v exsikátoru a ponechá tam nejméně 24 hodin před vlastním použitím.

4.7 Sušárna laboratorní pro teploty min. do 130 °C

4.8 Zkumavky se zábrusem a zátkami

4.9 Třepačka laboratorní

5. Postup

Do dvou kuželových baněk se zábrusem, obsahu 250 ml se odváží naprosto shodná množství zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,001 g, obsahující s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu C ve zkoušeném vzorku, přibližně 200 µg vitamínu C.

Do jedné z baněk se přidá přesně 0,4 ml standardního roztoku kyseliny askorbové (3.3), promíchá a mírně protřepe (roztok s vnitřním standardem). Do obou baněk se přidá po 30 ml chloroformu (3.5), přesně po 25 ml roztoku kyseliny metafosforečné (3.1) o teplotě 4 °C a banky se ponechají stát 10 až 15 minut. Potom se přidá do každé z nich přesně 25 ml vody, banky se zazátkují, protřepávají intenzivně na třepačce (4.9) po dobu 10 minut a ponechají stát na vodní lázni (4.5), vytemperované na 20 °C. Obsah baněk se

převédo do centrifugačních kyvet (4.2) a na odstředivce (4.2) se odstředí při 3 500 ot/min tak, aby se chloroformová a vodní fáze zřetelně oddělily. Všechny dále uvedené operace se provádějí současně jak u extraktu samotného zkoušeného vzorku, tak i u extraktu vzorku s vnitřním standardem.

Z vodné fáze, která může být i částečně zakalená, se odpipetuje přesně 40,0 ml do zkumavky (4.8); přidá se 0,5 až 1 ml roztoku DFH (3.4) a promíchá. Vzniklé červené zbarvení by se mělo udržet nejméně 15 minut. Potom se přidá 300 mg filtračního prostředku (3.15), zkumavka se zazátkuje, protřepe a obsah se filtruje suchým skládaným filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát nemusí být vždy zcela čirý.

Do centrifugační kyvety (4.2) se odpipetuje přesně 10,0 ml filtrátu, přidá se přesně 2,0 ml roztoku DFH (3.6) a promíchá. Do kyvety se zavede proud dusíku (3.7) nebo oxidu uhličitého (3.8) za účelem vypuzení kyslíku, kyveta se zazátkuje a ponoří asi na 15 hodin (přes noc) do vodní lázně (4.5), vytemperované na 20 °C. Potom se přidá přesně 3,0 ml vody, opět přesně 20,0 ml směsi (3.9), přibližně 800 mg filtračního prostředku (3.15), centrifugační kyveta se zazátkuje, vytřepává intenzivně po dobu 30 sekund a odstředí (4.2). Přesně 15,0 ml supernatantu se odpipetuje do odpařovací baňky (4.3), baňka se vloží na odparku (4.3) a za sníženého tlaku se obsah odpaří do olejovité konzistence. Tato se pak rozpustí v přesně 2,0 ml směsi (3.9), předehřáté na 50 °C, po ochlazení se přidá přesně 10,0 ml směsi (3.10) a promíchá.

Chromatografická trubice (4.4), umístěná ve vertikální poloze se naplní do výšky 30 mm směsí (3.10), přidá se 5 g silně protřepané suspenze silikagelu (3.11) ve 30 ml směsi (3.10) a po usazení se vrstva stlačí mírným proudem dusíku (3.7) nebo oxidu uhličitého (3.8). Na sloupec se převede dekantací roztok z odpařovací baňky (4.3), která se vypláchne malým množstvím směsi (3.10) a ta se rovněž převede na sloupec. Trubice se doplní směsí (3.10) a dále promývá směsí (3.10) a to 3 až 4 dávkami po 5 ml až již další eluát je bezbarvý. Žlutě zbarvený eluát se nezachycuje (odstraní). Červeně zbarvená zóna ve sloupci se eluuje směsí (3.9), eluát se jímá do odpařovací baňky (4.3) a za sníženého tlaku se odpaří (4.3) do sucha.

5.1 Krmiva s obsahem vitamínu C nad 10 000 mg/kg

5.1.1 Odparek se rozpustí v přesně 4,0 ml zředěné kyseliny sírové (3.13), intenzivně se protřepává tak, aby odparek se dokonale rozpustil a po 20 až 30 minutách se měří na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 509 nm v kyvetách optické délky 10 mm proti samotné zředěné kyselině sírové (3.13).

5.1.2 Vedle toho se provede slepý pokus stejným způsobem jako u vzorku, ale bez jeho přítomnosti.

5.2 Krmiva s obsahem vitamínu C pod 10 000 mg/kg

Tyto dále uvedené operace se provádějí dvojmo. Odparek se rozpustí v přesně 2,0 ml směsi (3.9), promíchá, okamžitě se odpipetuje 0,5 ml a nanese na chromatografickou desku (4.6). Parami elučního činidla (3.14), umístěného ve vývojnici, se nejméně 20 minut působí na chromatografickou vrstvu až je zřetelně oddělena růžově zbarvená hydrazonová vrstva. Pak se chromatografická deska (4.6) nechá volně vysušit, zřetelně oddělí (vymezí) se hranice růžové zóny, vhodným zařízením (špachtlička apod.) se kvantitativně seškrábe příslušná vrstva (prášek) a převede do chromatografické trubice (4.4). Eluuje se postupně 2 ml a dvakrát 1,5 ml směsi (3.9) a eluát se jímá do odpařovací baňky (4.3). Poslední eluát musí být již zcela bezbarvý. Eluát se odpaří na odparce (4.3) za sníženého tlaku do sucha.

Dále se postupuje podle 5.1.1 a 5.1.2

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vitamínu C, vyjádřeného jako kyselina askorbová v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{A_s \cdot C \cdot F}{m \cdot (A_s - A_r)}$$

kde A_s je absorbance roztoku zkoušeného vzorku
 A_r absorbance zkoušeného vzorku s vnitřním standardem
 C množství vnitřního standardu v mg
 m навážka zkušebního vzorku v g
 F faktor dělení

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aceton a diethylether jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

4.15 Stanovení obsahu vitamínu K₃

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitamínu K₃ v premixech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Vitamin K₃ je menadion, po chemické stránce je to 2-methyl-1,4-naftochinon, sumárního vzorce C₁₁H₈O₂.

2. Princip

Vitamin K₃ se stanoví, po odstranění lipofilních látek před extrakcí n-hexanem a chloroformem, extrakcí alkoholickou směsí, polarograficky metodou modelového standardu.

3. Chemikálie

- 3.1 Dusík žárovkárenský
- 3.2 Hexan (poznámka 8.1) nebo
- 3.3 Cyklohexan (poznámka 8.1)
- 3.4 Chloroform předestilovaný
- 3.5 Síran sodný bezvodý, roztok 10 g/l
- 3.6 Písek mořský, praný
- 3.7 Methylalkohol (poznámka 8.2)
- 3.8 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)
- 3.9 Extrakční alkoholová směs

Příprava: Smíchají se 3 objemové díly methylalkoholu (3.7) a 1 díl ethylalkoholu (3.8) a promíchají.

3.10 Chlorid draselný, roztok c(KCl) = 0,5 mol/l

3.11 Chlorid draselný, roztok $c(\text{KCl}) = 0,2 \text{ mol/l}$

3.12 Siřičitan sodný heptahydrát ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), roztok 10 g/l. Připravuje se vždy čerstvý s použitím převařené destilované vody)

3.13 Vitamin K_3 , standardní substance

Menadion – hydrogensiřičitan sodný ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{NaHSO}_3$) pro biochemické účely s deklarovaným obsahem účinné složky

3.14 Mouka sójová, odtučněná

3.15 Triturát vitaminu K_3 , standardní hmota

Připrava: Odtučněná sójová mouka (3.14) se smíchá se standardní substancí vitaminu K_3 (3.13) o deklarovaném obsahu tak, aby 200 mg tohoto triturátu obsahovalo stejné množství vitaminu K_3 jako je deklarováno v 10 g zkoušeného vzorku.

3.16 Modelový vzorek premixu neobsahující vitamin K_3

3.17 Želatina, roztok 5 g/l

Připravuje se vždy čerstvý zahříváním nejvýše na teplotu 60°C .

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Polarograf vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.2 Lázeň vodní a regulovatelnou teplotou

4.3 Vývěva vodní

4.4 Baňka odpařovací vhodného objemu s přestupníkem s vyústěním par směrem dolů

5. Postup

5.1 Do zábrusové kuželové baňky na 200 ml se odváží přesně 10,000 g zkoušeného vzorku. Do druhé zábrusové baňky na 200 ml se odváží 10,000 g modelového vzorku (3.16) a přidá přesně 200 mg triturátu vitaminu K_3 (3.15). Obě navážky vzorku se dále zpracovávají zcela shodně. Lipofilní složky se odstraní následující předběžnou extrakcí.

5.2 K oběma navážkám se přidá po 1 g síranu sodného (3.5), 1 g mořského písku (3.6), 30 ml n-hexanu (3.2) nebo cyklohexanu (3.3) a extrahuje se na vodní lázni (4.2) vyhřáté na teplotu 50°C po dobu 15 minut za současného míchání krouživým pohybem. Po usazení se hexanový extrakt odfiltruje středně hustým filtrem. Filtrát se dále nepoužije. K pevnému podílu v baňce se přidá 25 ml chloroformu (3.4) a po uzavření zátkou se vytřepává po dobu 5 minut. Po usazení se opět filtruje tímto filtrem. Filtr se opatrně vyjme vloží na hodinové sklíčko a nechá se v digestoři volně vysušit. Filtrát se dále nepoužije. Zbytky chloroformu v baňce se odstraní zahříváním baňky na vodní lázni (4.2) teplé 50°C při opatrném od-sávání vývěvou (4.3).

5.3 Po vysušení filtru se opatrně odstříhnou případně zahnědlé okraje, pomocí pinzety se filtr vloží k vysušenému vzorku do původní baňky. Do kuželové baňky se přidá 50 ml extrakční alkoholové směsi (3.9) a nechá se extrahovat po dobu 40 minut za občasného promíchání. Extrakt se filtruje řídkým filtrem do suché odměrné baňky na 100 ml. Zbytek vzorku v baňce se dekantuje dalšími podíly extrakční alkoholové směsi (3.9) a to postupně 20, 10 a 10 ml a dekantát vždy slévá přes filtr do odměrné baňky s původním filtrátem. Nakonec se ještě promyje použitý filtr a stonek nálevky malým podílem extrakční alkoholové směsi (3.9), přidávaným z bezpečnostní pipety (pozor jedl), baňka se doplní touto

směsí po rysku a promíchá. Do odpařovací baňky (4.4) se odpipetuje 40 ml tohoto roztoku, baňka se opatří přestupníkem (4.4), aby kondenzát netékal zpět, přidají se 3 kapky roztoku chloridu draselného (3.10) a na vodní lázni (4.2) se obsah baňky odpaří do sucha při teplotě 60°C . Před odpařením poslední částí se vypouští do baňky dusík (3.1). Odparek se rozpustí v 15 ml roztoku chloridu draselného (3.11), převede do odměrné baňky na 25 ml, doplní roztokem chloridu draselného (3.11) po rysku a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do zábrusové zkumavky se skleněnou zátkou se odpipetuje 10 ml filtrátu a 10 ml roztoku siřičitanu sodného (3.12), asi 7 minut se směs deaeruje dusíkem (3.1), převede do polarografické nádoby (4.1), přidá se asi 5 ml roztoku želatiny (3.17), (přidávky roztoků se musí přidávat přesně nebo alespoň vždy shodně pro vzorek i standard) a opět se deaeruje dusíkem (3.1) po dobu 3 minut. Polarografická křivka se registruje katodicky od 0,6 V při vhodné citlivosti.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vitaminu K_3 v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{h_v \cdot m_s}{h_s}$$

kde h_v je výška vlny zkoušeného vzorku v mm
 h_s výška vlny modelového vzorku s triturátem v mm
 m_s množství vitaminu K_3 v mg/kg podle použité teorie na přípravu triturátu

Výsledkem je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol, n-hexan a cyklohexan jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto je nutno při jakékoli manipulaci s nimi dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Methylalkohol, vedle toho, že je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, je navíc nebezpečným jedem a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné zachovávat zvláštní opatrnost.

4.16 Stanovení obsahu vitaminu K_3

Tato metoda je překladem doporučení EU, uvedeným v Official Journal no L 108, 22/04/74.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vitaminu K_3 (menadionu) v krmivech (krmných směsích) a premixech. Mez stanovitelnosti je 1 mg/kg (1 ppm).

2. Princip

Vzorek je extrahován zředěným ethylalkoholem. Směs je vyčíslena taninem. K extraktu je přidán uhlíčan sodný který uvolní

menadion. Tento je extrahován 1,2-dichloethanem a podle obsahu je menadion buď přímo nebo po odpaření převeden na hydrazon pomocí okyseleného ethylalkoholického roztoku 2,4-dinitrofenolhydrazinu. Hydrazon se převede přebytkem amoniaku na modrozelený barevný komplex, který se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 635 nm.

3. Chemikálie

- 3.1 Ethylalkohol 96% (poznámka 8.1)
- 3.2 Ethylalkohol 40%
- 3.3 Tanin, roztok 100 g/l (připravený z práškového taninu)
- 3.4 1,2-Dichloethan
- 3.5 Uhličitan sodný, roztok 100 g/l (připravený z bezvodé soli)
- 3.6 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($h = 1,17$ g/ml)
- 3.7 Ethylalkohol, absolutní (bezvodý) (poznámka 8.1)
- 3.8 2,4-Dinitrofenylhydrazinové činidlo (dále jen roztok DFH)

Příprava: V 50 ml odměrné baňce se rozpustí 40 mg DFH ve vroucím absolutním ethylalkoholu (3.7), ochladí, přidá 1 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6), doplní absolutním ethylalkoholem (3.7) po rysku a promíchá.

Připravuje se vždy čerstvě.

- 3.9 Amoniak, roztok 25% ($h = 0,91$ g/ml)
- 3.10 Amoniak (3.9) – ethylalkohol (3.7), směs (1 + 1)
- 3.11 Menadion (vitamin K_3), standardní substance
- 3.12 Menadion (vitamin K_3), standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží přesně 20,0 mg standardní substance menadionu (3.11), rozpustí v 1,2-dichloethanu (3.4), doplní jím po rysku a promíchá.

1 ml standardního roztoku obsahuje 0,1 mg menadionu.

- 3.13 Dusík, žárovkárenský

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce s příslušenstvím (kyvety o optické délce 10 mm)
- 4.2 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím (centrifugační kyvety)
- 4.3 Nálevky dělicí na 100 a 250 ml se zábrusem a zátkami
- 4.4 Odparka vakuová, rotační s příslušenstvím (odpařovací baňky na 250 ml)
- 4.5 Lázeň vodní s termostatem
- 4.6 Třepačka laboratorní

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu (Poznámka 8.2)

5.1.1 Ze standardního roztoku menadionu (3.12) se ředěním 1,2-dichloethanem (3.4) připraví kalibrační roztoky o koncentracích 0,0 (srovnávací roztok); 2,0; 4,0; 6,0; 8 a 10,0 μ g menadionu v 1 ml. Připravují se vždy čerstvě.

5.1.2 Do odměrných baňek na 10 ml se odpipetují 2 ml kalibračních roztoků (5.1.1), do každé z baňek se přidá přesně 3 ml roztoku DFH (3.8), každá baňka se zazátkuje korkovou či teflonovou zátkou a zahřívá na vodní lázni (4.5) vytemperované na 70°C po dobu 2 hodin. Po ochlazení se přidá přesně 3 ml směsi amoniak–ethylalkohol (3.10), promíchá, doplní ethylalkoholem (3.7) po rysku a opět promíchá.

Absorbance každého roztoku se měří na spektrofotometru (4.1) v kyvetách o optické délce 10 mm při vlnové délce 635 nm proti srovnávacímu roztoku (viz 5.1.1).

5.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jím odpovídajícím koncentracím se sestaví kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do kuželové baňky na 250 ml se zábrusem: se odváží, podle očekávaného (deklarovaného) obsahu vitamínu K_3 ve zkoušeném vzorku, 0,1 až 5,0 g (koncentráty a premixy) resp. 20 až 30 g (krmné směsi) zkoušeného vzorku s přesností nejméně na 0,001 resp. na 0,01 g. Do baňky se přidá přesně 96,0 ml zředěného ethylalkoholu (3.2), baňka se zazátkuje, umístí na třepačku (4.6) a vytřepává po dobu 15 minut. Potom se přidá přesně 4,0 ml roztoku taninu (3.3), promíchá, extrakt se převede do centrifugační kyvety (4.2) a na odstředivce (4.2) se odstředí při 3 000 až 5 000 ot/min. Ze supernatantu se odpipetuje přesně 20 nebo 40 ml do dělicí nálevky na 250 ml (4.3), pipetou se přidá přesně 50 ml 1,2-dichloethanu (3.4), promíchá a pak se přidá ještě 20 ml roztoku uhličitanu sodného (3.5). Touto směsí se intenzivně vytřepává po dobu nejméně 30 sekund, po rozdělení vrstev se dichloethanová vrstva převede do dělicí nálevky na 100 ml (4.3), přidá se 20 ml vody a znovu vytřepává po dobu nejméně 15 sekund. Dichloethanová vrstva se odpustí do vhodné suché nádoby a zbývající vody ponořením proužku filtračního papíru.

5.2.2 Premixy a koncentráty

Z dichloethanového extraktu, připraveného podle 5.2.1, se odpipetuje takové alikvotní množství do takového objemu, aby s ohledem na očekávaný (deklarovaný) obsah vitamínu K_3 ve zkoušeném vzorku a na jeho odvážené množství, po naředění 1,2-dichloethanem (3.4) a promíchání byla koncentrace vitamínu K_3 v rozmezí od 2 do 10 μ g v 1 ml.

Dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2.3 Krmiva (krmné směsi)

Alikvotní podíl (viz 5.2.2) se odpaří za sníženého tlaku v atmosféře dusíku (3.13) do sucha. Odpařek se ihned rozpustí v takovém množství 1,2-dichloethanu (3.4), aby výsledná koncentrace vitamínu K_3 byla v rozmezí od 2 do 10 μ g v 1 ml.

Dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2.4 Koncentrace vitamínu K_3 (menadionu) se zjistí z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vitamínu K_3 , vyjádřeného jako menadion, v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10 \cdot F \cdot m_1}{m_0}$$

kde m_1 je koncentrace menadionu, vitamínu K_3 zjištěná z kalibračního grafu v μ g/ml

m_0 navážka zkušební vzorku v g
 F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 10 mg/kg	20 % relat.
od 10 do 14 mg/kg	2 mg/kg
od 14 do 100 mg/kg	15 % relat.
od 100 do 150 mg/kg	15 mg/kg
nad 150 mg/kg	10 % relat.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Kalibrační graf se sestavuje při každém stanovení (sérii stanovení).

5.1 Stanovení obsahu manganu, zinku, železa a mědi

Metoda je uvedena v metodických postupech laboratorního zkoušení k příloze č. 9 vyhlášky č. 222/1996 Sb., část 8. Mikroelementy.

5.2 Stanovení obsahu kobaltu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu kobaltu v premixech a krmných směsích.

2. Princip

Vzorek se zpopelní při 550 °C, popel se rozpustí v kyselině chlorovodíkové a obsah kobaltu se stanoví metodou atomové absorpční spektrometrie.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$) koncentrovaná
- 3.2 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 0,45 \text{ mol/l}$
- 3.3 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$
- 3.4 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$
- 3.5 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)
- 3.6 Kyselina dusičná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 1)
- 3.7 Kobalt, kov 99,9 % (Co), $M_r = 58,93$ (např. Fluka No. 60784)

3.7.1 Základní roztok kobaltu

Příloha: Ve vysoké kádince na 800 ml se v minimálním objemu kyseliny dusičné (3.6) rozpustí 0,500 g kovového kobaltu (3.7), po rozpuštění se roztok zahustí k suchu, odpařek se rozpustí ve vodě a převede kvantitativně vodou do odměrné baňky na 500 ml, vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.2) po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 1,0 mg Co.

3.7.2 Pracovní roztok kobaltu: Do odměrné baňky na 250 ml se pipetuje 10,0 ml základního roztoku kobaltu (3.7.1), doplní se kyselinou chlorovodíkovou (3.2) po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,04 mg Co.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Atomový absorpční spektrometr

4.2 Topná deska s regulovatelnou teplotou

4.3 Muflová pec s regulovatelnou teplotou

4.4 Vodní lázeň

4.5 Ultrazvuková lázeň

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibrační křivky

Do sady odměrných baněk na 100 ml se postupně pipetuje 0,0 – 2,0 – 5,0 – 10,0 – 15,0 – 20,0 a 25,0 ml pracovního roztoku kobaltu (3.7.2), doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.2) po značku a promíchá. Takto připravená sada kalibračních roztoků odpovídá koncentraci 0,0 – 0,8 – 2,0 – 4,0 – 6,0 – 8,0 a 10,0 mg Co/l.

Podle typu použitého atomového absorpčního spektrometru (4.1) s příslušně nastavenými parametry se proměří absorbance jednotlivých kalibračních roztoků při vlnové délce doporučených parametrů proti kontrolnímu roztoku. Ze získaných údajů se sestaví kalibrační graf. Při sestavování kalibračního grafu se vyjadřují hodnoty obsahu v mg/l.

Doporučené parametry:

žhavení lampy	5–6 mA
plamen	acetylen-oxid dusný
	acetylen-vzduch
stechiometrie plamene	oxidační plamen

vlnová délka (nm)	šířka štěrbin (nm)	optimální rozsah (mg/l)
240,7	0,1–0,2	2,5–10
304,4	0,1–0,2	30–160
346,6	0,1–0,2	95–380
347,4	0,1–0,2	180–710

5.2 Vlastní stanovení

5.2.1 Organická krmiva

5 až 10 g zkušební vzorku se naváží s přesností 0,001 g do spalovací misky předem vyžháné po dobu 30 minut a v exsikatoru ochlazené.

Spalovací miska se zahřívá na topné desce (4.2) nebo na plynovém kahanu do zuhelnatění vzorku tak, aby se zabránilo vzplanutí vzorku a úniku jednotlivých částic. Potom se spalovací miska se vzorkem vloží do mušlové pece (4.3) předem vyhřáté na 550 °C a vzorek se spaluje po dobu 5 hodin a dále tak dlouho, dokud popel neobsahuje černé uhlíkaté částice.

Může také postupovat tímto způsobem: spalovací miska se vloží do studené mušlové pece (4.3) a teplota se postupně zvyšuje na teplotu 550 °C tak, aby se tato teplota dosáhla během 2 hodin a pak se popel spaluje po dobu 5 hodin. Obsahuje-li po této době popel černé uhlíkaté částice, po vychladnutí se zkropí asi 2 ml vody, vysuší se v sušárně a dále se spaluje 1 hodinu.

K vychladlému popelu se přidá 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), odpaří se na vodní lázni (4.4) k suchu a vysuší 1 hodinu v sušárně. Vychladlý odparek se pomocí 15 ml kyseliny chlorovodíkové (3.4) a horké vody převede do odměrné baňky na 100 ml a rozpouští se na ultrazvukové lázni (4.5) po dobu 30 minut při teplotě cca 50 °C, potom se obsah odměrné baňky vytemperuje, doplní vodou po značku a promíchá. Obsah odměrné baňky se filtruje středně hustým filtrem do podložené suché nádoby, přičemž první podíl filtrátu (asi 10 ml) se nepoužije.

Dále se postupuje podle druhého odstavce čl. 5.1.

5.2.2 Minerální krmiva

Do odměrné baňky na 100 ml se naváží asi 2 g zkušebního vzorku s přesností 0,001 g, stěny se spláchnou vodou (asi 5 ml) a přidá se 80 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a 5 ml kyseliny dusičné (3.5) a rozpouští se na ultrazvukové lázni (4.5) po dobu asi 30 minut při teplotě 50 °C. Po rozpouštění se obsah odměrné baňky vytemperuje na laboratorní teplotu a doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.2) a promíchá. Obsah odměrné baňky se filtruje středně hustým filtrem do podložené suché nádoby, přičemž první podíl filtrátu (asi 10 ml) se nepoužije. Dále se postupuje podle druhého odstavce čl. 5.1.

6. Výpočet

Obsah kobaltu vyjádřený v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1 \cdot F}{m}$$

kde m_1 je koncentrace kobaltu odečtená z kalibrační křivky vyjádřená v mg/l
 m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
 F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena

8. Poznámky

8.1 Kalibrační graf je v horní části zakřiven v důsledku autoabsorpce a některých rušivých vlivů v plameni. Neruší mnohonásobné obsahy Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Si a W. Pro analýzu v plameni acetylen-vzduch se doporučuje extrakce Co z prostředí pH = 2–4 do methylisobutylketonu.

5.3 Stanovení obsahu selenu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 986.15

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení selenu v krmivech.

2. Princip

Ve vzorku se po rozkladu kyselinou dusičnou v uzavřeném systému stanoví obsah selenu metodou atomové absorpční spektrometrie s hydridovou technikou.

5.4 Stanovení obsahu jódu

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody stanovení jódu v premixech – polarografická a titrační jodometrická.

2. Princip

Celkový obsah jódu se stanoví po suché mineralizaci buď oxidací v alkalickém prostředí bromnanem metodou diferenčně pulzní polarografie na visící rtuťové kapkové elektrodě nebo po oxidaci na jodičnan manganistanem draselným a reakcí s jodidem se uvolněný jód stanoví titrací thiosíranem draselným.

3. Chemikálie

3.1 Hydroxid draselný, alkoholický roztok, 10%, vždy čerstvý

3.2 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = cca 0,01 mol/l

3.3 Kyselina sírová, roztok c(H₂SO₄) = cca 0,5 mol/l

3.4 Kyselina sírová, roztok c(H₂SO₄) = cca 0,005 mol/l

3.5 Hydroxid sodný, roztok c(NaOH) = cca 5 mol/l

3.6 Bromová voda, nasycený roztok, ne starší 30 dnů

3.7 Bromnan sodný, roztok: 50 ml hydroxidu sodného (3.5) se smíchá s 50 ml bromové vody (3.6)

3.8 Sifícitan sodný bezvodý, nasycený roztok

3.9 Želatina, 0,25% roztok

3.10 Sifícitan sodný s želatínou: 50 ml roztoku sifícitanu sodného (3.8) se smíchá s 50 ml roztoku želatiny (3.9). Přípravu je se vždy čerstvý.

3.11 Jodid draselný (KI), standard

3.11.1 Základní roztok jódu

Příprava: V odměrné baňce na 1 000 ml se rozpustí ve 750 ml vody 1,3082 g jodidu draselného (3.11), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 1 mg jódu.

3.11.2 Pracovní roztok jódu

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se pipetuje 5,0 ml

základního roztoku jódu (3.11.1), doplní vodou po značku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,05 mg jódu.

- 3.12 Ethylalkohol, 96%
- 3.13 Manganistan draselný, nasycený roztok
- 3.14 Chlorid amonný, roztok 10 g/l
- 3.15 Hydroxid sodný, roztok 40 g/l
- 3.16 Thiostran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,1 \text{ mol/l}$
- 3.17 Thiostran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}) = 0,01 \text{ mol/l}$
- 3.18 Indikátor fenolftalein, ethanolický roztok 0,1%
- 3.19 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$, roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$)
- 3.20 Jodid draselný, krystalický nebo roztok 100 g/l
- 3.21 Škrobový indikátor

Příprava: V 10 ml vody se rozpustí 2,0 g chloridu sodného, 2 g rozpustného škrobu a suspenze se vlije do 80 ml vody a za míchání se ochladí. Uchovává se v chladničce a je stálý po dobu 10 dní.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Polarograf, vhodné konstrukce
- 4.2 Vodní lázeň s teplotní regulací
- 4.3 Muflová pec s regulovatelnou teplotou

5. Postup

5.1 Polarografické stanovení jódu v premixech

5.1.1 Mineralizace

Do platinové misky se naváží 0,5 až 10 g zkušební vzorku (tj. takové množství, aby se množství jódu pohybovalo v rozmezí 0,1 až 0,4 mg) s přesností na 0,001 g, rozmíchá se s 5 až 10 ml čerstvě připraveného alkoholického roztoku hydroxidu draselného (3.1). Množství roztoku hydroxidu draselného musí být takové, aby byl vzorek dokonale smočen a dobře se promíchal. Zkušební vzorek se dokonale vysuší na vodní lázni (4.2) při teplotě 90 až 95 °C (lázeň nesmí vařit) asi 30 minut. Po vysušení vzorku se platinová miska se zkušebním vzorkem umístí do studené muflové pece (4.3) a po zvolna se spaluje při teplotě 300 °C asi 30 minut. Poté se teplota zvýší na 520 °C a spaluje se ještě 1 hodinu.

K vychladlému popelu se přidá 15 až 20 ml horké vody, řádně se promíchá a případné kruty se rozpouští tyčinkou a popel se nechá neiterovat asi 30 minut. Výluh s nespáleným zbytkem se převede kvantitativně do odměrné baňky na 25 ml (objem mineralizátu lze upravit odpařením na vodní lázni při teplotě 90 až 95 °C v platinové misce), po vytemperování na laboratorní teplotu se odměrná baňka doplní vodou po značku a promíchá. Nespálený zbytek se nechá sedimentovat do druhého dne. Pro další postup se použije pouze čistý mineralizát.

5.1.2 Vlastní měření

Do dvou vysokých kádinek na 25 ml se pipetuje takové množství mineralizátu, které obsahuje asi 0,03 až 0,04 mg jódu a do jed-

né kádinky se přidá asi 0,6 až 0,8 ml pracovního roztoku jódu (3.11.2) a objem v obou kádinkách se upraví na 10 ml. Hodnota pH v obou kádinkách se upraví (kontrola pH-metrem nebo na vodný roztok methylové červeně) pomocí roztoku (3.2, 3.3 nebo 3.4) na hodnotu pH 6,3. Objem v obou kádinkách se upraví na stejný objem vodou podle spotřeby neutralizačních roztoků. Objem v obou kádinkách musí být vždy stejný. Pak se přidá do každé kádinky 1 ml roztoku bromnanu sodného (3.7) a míchá se 2 až 3 minuty. Pak se přidá 1 ml roztoku siřičitanu sodného (3.10) a po promíchání se roztok převede do polarografické nádoby.

V takto připraveném roztoku se po 10 minutovém probublávání dusíkem a míchání polarografickým míchadlem stanovuje obsah jódu metodou diferenčně pulzní polarografie na visící rtuťové kapkové elektrodě.

Podmínky metody:

modulační amplituda	50 mV
referenční elektroda	argentchloridová
pomocná	platinová
stabilizace kapky	2 minuty
potenciál	-800 až -1700 mV

Stejným způsobem se proměří slepý pokus.

5.2 Jodometrické stanovení jódu v premixech

5.2.1 Mineralizace zkušební vzorku se provede podle postupu 5.1.1.

Popel se kvantitativně převede horkou vodou do kádinky na 250 ml a povaří se. Výluh se zfiltruje přes středně hustý papírový filtr do 250 ml kádinky a filtr se důkladně promyje horkou vodou. Filtrát se zneutralizuje roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.19) na indikátor fenolftalein (3.18) a potom zalkalizuje roztokem hydroxidu sodného (3.15). K takto upravenému filtrátu se přidá 1 až 2 ml roztoku manganistanu draselného (3.13) (poznámka 8.2) a ještě 0,5 ml navíc. Roztok se vaří po přidání varných kuliček 5 minut. Potom se přidají 2 ml ethylalkoholu (3.12) a digeruje se na vodní lázni až do vysrážení kysličníku manganického. Roztok se zfiltruje do titrační baňky (poznámka 8.3), zbytek na filtru se promyje 3krát 2 ml horkého roztoku chloridu amonného (3.14). Po ochlazení se přidají 2 g jodidu draselného (3.20), 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.19) a titruje se odměrným thiostranem sodného (poznámka 8.4) na škrobový indikátor (poznámka 8.5).

6. Výpočet

6.1 Polarografické stanovení

Obsah jódu vyjádřený v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce

$$X = \frac{C_{STD} \cdot H_X \cdot V \cdot V_{STD}}{(H_S - H_X) \cdot V_P \cdot m}$$

kde H_X je výška polarografického piku zkušební vzorku v mm

H_S výška polarografického piku zkušební vzorku po přidavku standardu v mm

V_{STD} objem přidávaného standardu v ml

C_{STD} koncentrace standardu v mg/l

V_P pipetovaný objem mineralizátu do polarografické nádoby v ml

V konečný objem mineralizátu v ml

m hmotnost zkušební vzorku v g

Výsledek je aritmetický průměr dvou paralelních stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 mg/kg.

6.2. Titrační jodometrické stanovení

Obsah jódu vyjádřený v mg/kg (Y) se vypočítá z množství spotřebovaného odměrného roztoku thiosíranu sodného podle následujících vztahů:

1 ml 0,1 mol/l thiosíranu sodného (3.16) odpovídá 2,77 mg KI nebo

1 ml 0,1 mol/l thiosíranu sodného (3.16) odpovídá 2,50 mg NaI nebo

1 ml 0,1 mol/l thiosíranu sodného (3.16) odpovídá 2,12 mg I.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena

8. Poznámky

8.1 Při očekávaném obsahu jódu do 100 mg/kg se volí navážka vzorku 10 g a přidává se 5 ml roztoku hydroxidu draselného. Při očekávaném obsahu jódu od 100 do 1000 mg/kg se navažuje 5 g vzorku a přidává 10 ml hydroxidu draselného. Při očekávaném obsahu jódu nad 1000 mg/kg se navažuje 1 g vzorku a přidává 10 ml hydroxidu draselného.

Pokud vzorek neobsahuje žádný organický materiál nebo ho obsahuje jen velmi malý podíl.

8.2 Množství manganistanu draselného musí být takové, aby se zoxidoval veškerý jodid draselný na jodičnan. Zbarvení typické pro manganistan draselný musí vydržet minimálně 1,5 minuty, v případě, že se objeví zbarvení typické pro kyslíčník manganický, je potřebné zvýšit množství přidávaného manganistanu draselného.

8.3 Filtrát musí být čistý, zákal svědčí o přítomnosti kyslíčníku manganického, který zvyšuje výsledek stanovení.

8.4 Při obsahu jódu do 100 mg/kg se titruje odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.17), při obsahu nad 100 mg/kg odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.16).

8.5 Roztok škrobu je nutné přidat až těsně před koncem titrace.

6.1 Stanovení obsahu oxidu křemičitého

Metoda je uvedena v metodických postupech laboratorního zkoušení k příloze č. 9 vyhlášky č. 222/1996 Sb., část 7. Makroelementy.

6.2 Stanovení obsahu oxidu hlinitého

Metoda je uvedena v metodických postupech laboratorního zkoušení k příloze č. 9 vyhlášky č. 222/1996 Sb., část 7. Makroelementy.

7.1 Vyhodnocování a výpočet výsledků stanovení doplňkových látek difúzní plotnovou metodou

1. Účel a rozsah

Tato metoda uvádí a specifikuje uznaně závazný způsob pro vyhodnocování a výpočet výsledků při stanovení obsahu doplňkových látek v premixech a krmných směsích plotnovou difúzní metodou.

2. Princip

Průměry inibičních resp. stimulačních zón, vzniklých při stanovení doplňkových látek difúzní plotnovou metodou, se měří pomocí odpichovátka s přesností nejméně na 0,1 mm.

Ze souboru takto získaných hodnot se vypočítá aritmetický průměr pro každou koncentraci zkoušeného vzorku i standardu.

3. Výpočet

Z průměru délek zón odměřených odpichovátkem se vypočítá aritmetický průměr pro každou koncentraci zkoušeného vzorku i standardu tj. průměrné hodnoty.

Z rozdílu součtu vyšší a nižší průměrné hodnoty délky zón zkoušeného vzorku a vyšší i nižší průměrné hodnoty délky zón standardu se vypočítá parametr (V):

$$V = (V_1 + V_2) - (S_4 + S_2)$$

$$\text{při ředění 2 : 1} \quad V = (V_1 + V_2) - (S_4 + S_2)$$

$$\text{při ředění 4 : 1} \quad V = (V_4 + V_1) - (S_4 + S_1)$$

Ze součtu rozdílu vyšší a nižší průměrné hodnoty délky zón zkoušeného vzorku a vyšší i nižší průměrné hodnoty délky zón standardu se vypočítá parametr (W):

$$\text{při ředění 2 : 1} \quad W = (V_4 - V_2) + (S_4 - S_2)$$

$$\text{při ředění 4 : 1} \quad W = (V_4 - V_1) + (S_4 - S_1)$$

Z parametrů V a W se vypočítá účinnost v % (X):

$$\text{a) při ředění 2 : 1} \quad X_1 = \text{anti log } M_1$$

$$\text{kde} \quad M_1 = 2 + \left(0,301 \cdot \frac{V}{W} \right)$$

kde X_1 je účinnost v % při ředění 2 : 1
 V, W parametry vypočtené při ředění 2 : 1

$$\text{b) při ředění 4 : 1} \quad X_2 = \text{anti log } M_2$$

$$\text{kde} \quad M_2 = 2 + \left(0,602 \cdot \frac{V}{W} \right)$$

kde X_2 je účinnost v % při ředění 4 : 1
 V, W parametry vypočtené při ředění 4 : 1

Obsah doplňkové látky (účinnost) v mg/kg X se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{b \cdot X_1}{100}$$

kde b je předpokládaná účinnost v mg/kg
 X_1 aritmetický průměr X_1 a X_2

8.1 Stanovení ethoxychinu

Tato metoda je překladem z LUFA č. 15.2.1

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení ethoxychinu (1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylchinolin) v krmivech.

2. Princip

Ethoxychin je ze vzorku extrahován methylalkoholem a alikvotní podíl extraktu je po zředění vodou reextrahován do petroletheru a ethoxychin je stanoven fluorimetricky.

3. Chemikálie

3.1 Methylalkohol (poznámka 8.1)

3.2 Petrolether, frakce s bodem varu 40 až 60 °C (poznámka 8.1)

3.3 Chlorid sodný (krystalická forma)

3.4 Síran chininu — referenční roztok, 0,1 mg/ml v roztoku kyseliny sírové $c(H_2SO_4) = 0,05 \text{ mol/l}$

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 0,100 g síranu chininu, předem vysušeného při teplotě 120 °C po dobu 3 hodin a ochlazeného v exsikátoru, rozpustí se v 0,05 mol/l roztoku kyseliny sírové, doplní toutéž po rysku a promíchá.

3.5 Ethoxychin, standardní substance

3.6 Ethoxychin, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 100,0 mg standardní substance ethoxychinu (3.5), rozpustí se v petroletheru (3.2), doplní tímtež po rysku a promíchá. 1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 1,0 mg ethoxychinu.

3.7 Ethoxychin, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml základního standardního roztoku ethoxychinu (3.6), doplní petroletherem (3.2) po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku ethoxychinu obsahuje 50 µg ethoxychinu.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrální fluorimetr (spektrofotometr s fluorescenčním zařízením) s příslušenstvím (křemenné kyvety 10 mm)

4.2 Vata skelná

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml pracovního standardního roztoku ethoxychinu (3.7), doplní po rysku petroletherem (3.2) a promíchá (kalibrační roztok A). Z tohoto roztoku se odpipetuje do odměrné baňky na 20 ml přesně 10,0 ml (kalibrační roztok B) a do odměrné baňky na 25 ml se odpipetuje přesně 5,0 ml (kalibrační roztok C), každá z těchto baňek se doplní petroletherem (3.2) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím ethoxychinu, A = 2,5 µg/ml, B = 1,25 µg/ml a C = 0,50 µg/ml.

5.1.2 Spektrální fluorimetr (4.1) s kyvetou naplněnou petroletherem (3.2) se nastaví na nulovou hodnotu a s kyvetou naplněnou referenčním roztokem (3.4) se nastaví na hodnotu 100. Měří se fluorescence kalibračních roztoků (A + B + C), resp. roztoku zkoušeného vzorku při vlnové délce buzení 365 nm a vlnové délce měření 460 nm.

5.1.3 Z naměřených hodnot absorbcí a jim odpovídajícím koncentracím se sestaví kalibrační graf µg ethoxychinu v 1 ml.

5.2 Vlastní provedení

Do kádinky vhodného objemu se odváží přesně 10,0 g jemně mletého zkušebního vzorku, přidá se 50 ml methylalkoholu (3.1), promíchá a ponechá asi 10 minut ustát. Potom se roztok s pevným podílem dekantuje přes skelnou vatu (4.2) a filtrát se jímá do odměrné baňky na 250 ml. Zbytek v kádince se ještě 2krát promyje dekantací 50 ml methylalkoholu (3.1) opět do stejné odměrné baňky, tato se doplní methylalkoholem (3.1) po rysku a promíchá.

Do dělicí nálevky na 250 ml se odpipetuje alikvotní podíl 25 ml extraktu, přidá 100 ml vody a dobře promíchá. Potom se přidá 50 ml petroletheru (3.2) a uzavřená dělicí nálevka se asi 1 minutu mírně protřepává. Po rozdělení fází (poznámka 8.2) se spodní vodná vrstva odpustí do kádinky. Petroletherový extrakt se převede do druhé dělicí nálevky a do první dělicí nálevky se převede vodná vrstva z kádinky. Tato vodná vrstva se znovu extrahuje s 25 ml petroletheru (3.2) a po rozdělení se spodní vodná vrstva odpustí a dále se nepoužije. Ke spojeným petroletherovým extraktům se přidá 50 ml vody a po uzavření se dělicí nálevka lehce protřepe. Po oddělení se spodní vodná vrstva odpustí a dále se nepoužije. Petroletherový extrakt se převede do odměrné baňky na 100 ml, baňka se doplní petroletherem (3.2) po rysku a promíchá. Dále se postupuje podle 5.1.2.

Koncentrace ethoxychinu se zjistí z kalibračního grafu.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah ethoxychinu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{100 \cdot C}{m}$$

kde C je koncentrace ethoxychinu zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

m alikvotní podíl navážky zkušebního vzorku v g (při přesném dodržení postupu = 1)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Methylalkohol a petrolether jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy, methylalkohol je navíc nebezpečným jedem, proto při jakékoli manipulaci s těmito je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Je-li k dispozici materiál bez detekovatelného obsahu ethoxychinu, potom je lépe provést kalibraci s použitím tohoto materiálu.

K tomu se připraví modelové vzorky s obsahy 0 až 250 µg ethoxy-chinu v 1-g vzorku a postupuje se podle 5.2.

Sestrojení kalibračního grafu podle 5.1 se používá zvláště při kontrole technologie a výsledky se pohybují v přesnosti 97 až 98 %. Nad obsah 100 mg/kg se používá tento způsob výhradně.

8.2 Stanovení obsahu BHA, BHT, galátů

Tato metoda je uvedena v Journal of the Association of Official Analytical Chemists (Vol. 66, No. 3, 1983)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení BHA, BHT, galátů v tucích.

Pro účely této metody se používá tato definice:

BHA, BHT, galáty jsou antioxidanty. BHA je chemicky 2, (nebo 3)butyl-4-hydroxyanisol, BHT 2,6-di-terc.butyl-4-methylfenol, dodecylgalát $C_{19}H_{30}O_5$, oktylgalát $C_{15}H_{22}O_5$, propylgalát $C_{10}H_{12}O_5$.

2. Princip

Vzorek se rozpustí v hexanu a BHA, BHT, galáty se extrahují acetonitrilem. Roztok po zakonzentrování se naředí isopropanolem a dává se do vysokoúčinného kapalinového chromatografu (dále jen HPLC) s použitím UV detekce při 280 nm.

9.1 Stanovení kapsatinu v paprice

Tato metoda je překlad z LUFA č. 12.2.1

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu barviva vyjádřeného jako kapsatin, převažujícího barviva papriky.

2. Princip

Kapsatin se stanoví po extrakci vzorku benzenem způsobem podle Benedikta spektrofotometricky.

3. Chemikálie

3.1 Benzen (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr nebo fotokolorimetr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 496 nm s příslušenstvím (kyvety optické délky 10 mm)

4.2 Třepačka vhodné konstrukce

4.3 Sušárna laboratorní pro teploty do 70 °C

4.4 Odstředivka vhodné konstrukce

5. Postup

Malé množství rozemletého zkušebního vzorku (papriky) se suší v tenké vrstvě v sušárně (4.3) při 65 až 70 °C po dobu 2 hodin a na laboratorní teplotu se ochladí v exsikátoru. Z tohoto vysušeného vzorku se odváží asi 0,25 g s přesností nejméně na 0,001 g do kuželové baňky na 100 ml, přidá se přesně 50,0 ml benzenu (3.1) a na třepačce (4.2) se vytřepává 30 minut. Potom se nechá ustát, popř. odstředí (4.4), a po usazení pevného podílu se z čirého extraktu nebo supernatantu se odpipetuje přesně 5,0 ml do odměrné baňky na 50 ml, doplní benzenem (3.1) po rysku a promíchá. Absorbance extraktu se měří na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetě proti benzenu (3.1) při vlnové délce 496 nm (poznámka 8.2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah celkového obsahu barviva, vyjádřeného jako kapsatin v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 20 \cdot C$$

kde C je koncentrace zjištěná z tabulky č.1

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg.

Tabulka č.1

Absorbance (k)	Koncentrace kapsatinu v mg/100 ml	k/C
0,2	0,101	1,98
0,3	0,153	1,96
0,4	0,205	1,95
0,5	0,257	1,95
0,6	0,310	1,94
0,7	0,363	1,93
0,8	0,416	1,92
0,9	0,469	1,92
1,0	0,522	1,92
1,1	0,575	1,92

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Benzen je nebezpečnou hořlavinou I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Modifikací této metody (André) se lze vyhnout měření ve strmé části absorpční křivky (496 nm) a měří se absorbance v isobestickém bodu karotenoidu papriky při vlnové délce 477 nm. Výsledky se pak počítají s ohledem na specifickou absorbanci kapsatinu v benzenu $A_{1\%}^{1\text{cm}} = 1826$ a spektrofotometr se kalibruje podle Basslera navrženým roztokem chloridu kobaltnatého a dvojchromanu draselného:

Ve 100 ml odměrné baňce se rozpustí 1,3500 g hexahydrátu chloridu kobaltnatého ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a 0,0125 g dvojchromanu draselného ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) v 5% kyselině sírové, doplní toutéž po rysku a promíchá. Absorbance tohoto kalibračního roztoku se měří při vlnové délce 477 nm proti 5% kyselině sírové v 10 mm kyve-

tách a má být 0,315 s přesností 0,002. Při vyšších odchylkách se zavádí faktor

$$f = \frac{0,315}{A}$$

kde A je naměřená absorbance kalibračního roztoku

Tímto faktorem se výsledky stanovení násobí. Tato modifikace však vykazuje poněkud vyšší výsledky proti nemodifikované metodě.

9.2 Stanovení obsahu nativních a přidaných karotenoidů

Tato metoda je překlad z LUFA č. 12.3.1

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě metody. Jedna z nich (A) specifikuje podmínky pro stanovení esterů kyseliny apo-karotinové, citranaxantinu a kantaxantinu, druhá (B) specifikuje podmínky pro stanovení karotenů, veškerých xantofylů, luteinu a zeaxantinu.

2. Princip

Metoda A:

Vzorek je fermentován a extrahován chloroformem. V tomto extraktu jsou obsaženy estery kyseliny apo-karotinové, citranaxantin a kantaxantin. Extrakt pro stanovení karotenů, esterů kyseliny apo-karotinové a citranaxantinu je reextrahován do hexanu a dělením na sloupci oxidu hlinitého jsou získány frakce esterů kyseliny apo-karotinové (I) a citranaxantinu (II), v nichž se estery kyseliny apo-karotinové a citranaxantin stanoví spektrofotometricky. Karotenová frakce se nepoužije.

Pro stanovení kantaxantinu v samotných krmivech se chloroformový extrakt zmýdľuje a na sloupci oxidu hlinitého se oddělí od karotenů. Zbývající přítomné karotenoidy jsou odděleny pomocí chromatografie na tenké vrstvě (dále jen „TLC“) a kantaxantin je stanoven spektrofotometricky.

Metoda B:

Vzorek je po zmýdľení extrahován diethyletherem, alikvotní část extraktu je reextrahována do hexanu a na sloupci oxidu hlinitého je rozdělena do dvou frakcí.

Frakce I obsahuje alfa, beta a gama karoteny, které se stanoví přímo spektrofotometricky.

Mezifrakce obsahující částečně estery kyseliny apo-karotinové a částečně i citranaxantin se dále nepoužije.

Frakce II obsahuje kantaxantin, veškeré xantofily, lutein a zeaxantin. V této frakci se nejprve spektrofotometricky změní karoteny a nekorigované xantofily, pak se alikvotní část této frakce extrahuje hexanem a po oddělení s Hyflo-supergelem nebo s Dicalit-magnesiem se stanoví lutein a zeaxantin spektrofotometricky. U celkových xantofylů se provede korekce.

3. Chemikálie

3.1 Pepsin (např. od fy Siegfried, Zofingen, Swiss č. kat. 226780)

3.2 Trypsin, aktivity 1 : 3 000 NF XI (např. od fy Serva, Heidelberg č. kat. 31855)

3.3 Fermentační směs

Příprava: 5 g pepsinu (3.1) a 5 g trypsinu (3.2) se rovnoměrně rozetře v třecí misce a promíchá.

3.4 Amoniak, zředěný (1 + 1)

3.5 Kyselina chlorovodíková 37% zředěná (1 + 1)

3.6 Chloroform

3.7 Síran sodný, vyžháný

3.8 n-Hexan (poznámka 8.1)

3.9 Oxid hlinitý 12% deaktivovaný

Příprava: Oxid hlinitý neutrální (aktivity I) se vyžhává při 750 °C asi 2 až 3 hod., ochladí v exsikátoru. Před použitím se protřepe s 12 % vody a převede do uzavřené nádoby.

3.10 Diethylether (3.22) 2 % v hexanu (3.8) (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odpipetuje 20 ml diethyletheru (3.22), doplní n-hexanem (3.8) po rysku a promíchá.

3.11 Diethylether 5 % v hexanu (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odpipetuje 50 ml diethyletheru (3.22), doplní n-hexanem (3.8) po rysku a promíchá.

3.12 Diethylether 10 % v hexanu (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odpipetuje 100 ml diethyletheru (3.22), doplní n-hexanem (3.8) po rysku a promíchá.

3.13 Chloroform (3.4) – aceton (3.30), směs (1 + 1)

3.14 Cyklohexan (poznámka 8.1)

3.15 Deska pro chromatografii na tenké vrstvě (TLC) s vrstvou síkagelu 60 F254, síla vrstvy 0,25 mm

3.16 Citranaxantin (pro kvalitativní použití jako okrajový standard pro TLC)

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odváží 500 mg 10 % koncentráty citranaxantinu (komerční výrobek), přidají se 2 ml zředěného amoniaku (3.4), na špičku nože fermentační směsi (3.3), baňka se promíchá a umístí na 10 minut na vodní lázeň (4.4) vytemperovanou na 50 °C. Po ochlazení se přidá 25 ml chloroformu (3.6), baňka se uzavře, vloží na třepačku (4.2) a vytřepává se po dobu 30 minut. Pak se doplní chloroformem (3.6) po rysku, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky a první podíl filtrátu se nezachycuje. Z filtrátu se odpipetuje 5 ml do odměrné baňky na 50 ml, doplní chloroformem (3.6) po rysku a promíchá.

Tento roztok obsahuje 100 µg citranaxantinu v 1 ml.

3.17 Kantaxantin (pro kvalitativní použití jako okrajový standard pro TLC)

Příprava: shodná s 3.16 – navážka z 10 % koncentráty kantaxantinu.

1 ml roztoku obsahuje 100 µg kantaxantinu.

3.18 Ethylalkohol bezvodý (poznámka 8.1)

3.19 Hydroxid draselný, roztok 50 g/100 ml

3.20 Petrolether, frakce o bodu varu 40–60 °C (poznámka 8.1)

3.21 Hydrochinon pevný

3.22 Diethylether peroxidů prostý (poznámka 8.1)

3.23 Voda destilovaná, nasycená diethyletherem

Příprava: Asi 200 ml diethyletheru (3.22) se v dělicí nálevce vytřepává po dobu asi 2 minut se 700 ml destilované vody a spodní fáze se použije k analýze.

3.24 Oxid hořečnatý pro chromatografii (např. Serva)

3.25 Hyflo-super-gel nebo Dicalit

3.26 Aceton 10 % v hexanu (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 100 ml acetonu (3.30), doplní po rysku n-hexanem (3.8) a promíchá.

3.27 Aceton 20 % v hexanu (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 200 ml acetonu (3.30), doplní po rysku n-hexanem (3.8) a promíchá.

3.28 Aceton 30 % v hexanu (poznámka 8.1)

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 300 ml acetonu (3.30), doplní po rysku n-hexanem (3.8) a promíchá.

3.29 Vyvřecí směs dichlormethan-hexan-diethylether (4 + 4 + 2)

3.30 Aceton (poznámka 8.1)

3.31 Ethylalkohol-benzen, směs (1 + 1) (poznámka 8.1)

3.32 Dusík

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr registrační s příslušenstvím (kyvety o optické délce 10 mm)

4.2 Třepačka vhodné konstrukce

4.3 Odparka rotační

4.4 Lázeň vodní s termostatem

4.5 Trubice chromatografická, délka 300 mm, průměr 20 mm, s vytaženou špičkou, fritou a vypouštěcím kohoutem

4.6 Kelímek filtrační o pórizitě 4 (S_4)

4.7 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.8 Odstředivka laboratorní

4.9 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.10 Vata obvažová

4.11 Baňky odpařovací s kulatým dnem a zábrusem, obsahu 1 000, 250 a 100 ml a se zařízením pro přívod plynu

4.13 Mikrodávkováč

4.14 Lžička malá a úzká

5. Postup

5.1 Metoda A – stanovení esterů kyseliny apo-karotinové, citranaxantinu a kantaxantinu

Do odpařovací baňky (4.12) na 1 000 ml se odváží takové množstvíkušební vzorku, aby s ohledem na deklarovaný obsah obsahovalo asi 25 až 300 µg esterů kyseliny apo-karotinové, citranaxantinu nebo kantaxantinu, přidá se 100 ml vody, na špičku nože fermentační směsi (3.3) a 3 ml zředěného amoniaku (3.4). Po promíchání se baňka umístí na odparku (4.3) a ponechá při mírných otáčkách ve vodní lázni (4.4) vytemperované na 50 °C po dobu 30 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu se přidává zředěná kyselina chlorovodíková (3.5), až směs dosáhne pH = 3 (pH papírek). Dále se přidá přesně 200 ml chlortformu (3.6) (V_1), baňka se zazátkuje a po dobu 30 minut se vytřepává na třepačce (4.2). Část této směsi se pak odstředí na odstředivce (4.8), vodní fáze se opatrně odsaje a dále nepoužije, chloroformová fáze (aliquotní podíl) se filtruje středně hustým filtrem, naplněným síranem sodným (3.7) do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.1.1 Pro stanovení esterů kyseliny apo-karotinové a citranaxantinu se odpipetuje přesný alikvotní podíl filtrátu chloroformového extraktu, který obsahuje asi 6 až 50 µg karotenoidů (V_2) (např. 25 ml) do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, tato se umístí na odparku (4.3) a pod přívodem dusíku (3.32) se obsah odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 5,0 ml n-hexanu (3.8).

Chromatografický sloupec se připraví tak, že chromatografická trubice (4.5) se umístí ve vertikální poloze, na výpustní uzávěr se vloží smotek vaty (4.10), trubice se naplní n-hexanem (3.8) a do ní se převede takové množství deaktivovaného oxidu hlinitého (3.9), aby sedimentovalo ve výšce asi 80 mm. Hexan se pak odpustí až k vrcholu sloupce oxidu hlinitého.

Na takto připravený sloupec se převede celý hexanový extrakt vzorku, přičemž baňka, ve které byl extrakt, se nejméně 4krát vypláchne po 10 ml n-hexanu (3.8) a výplach se vždy převede rovněž na sloupec. Ze spodu vytékající kapalina (hexan) se dále pro stanovení nepoužije. Potom se na sloupec převede asi 5krát po 10 ml 2% diethyletheru v hexanu (3.10), průtok se jímá do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, čímž se citranaxantin a kantaxantin v horní části sloupce pomalu rozdělují, zatímco estery kyseliny apo-karotinové postupují sloupcem dolů. Nyní se na sloupec převede 5krát po 10 ml 5% diethyletheru v hexanu (3.11). Protože estery kyseliny apo-karotinové musí být kvantitativně eluovány, k čemuž 50 ml 5% diethyletheru v hexanu někdy nestačuje, je nutno postup eluce vizuálně kontrolovat. V případě, že eluce esterů kyseliny apo-karotinové není u konce, přidávkou po 10 ml 5% diethyletheru v hexanu (3.11) se opakuje až se tak stane. Průtok se jímá do stále stejné baňky (Frakce I), obsahující kvantitativně estery kyseliny apo-karotinové.

Potom se pod sloupec postaví další odpařovací baňka (4.12) na 250 ml, na sloupec se převádí 5krát po 10 ml 10% diethyletheru v hexanu (3.12) a jímá se citranaxantin (Frakce II).

Frakce I se na odparce (4.3) a vodní lázni (4.4), vytemperované na 50 °C pod přívodem dusíku (3.32) odpaří do sucha a odparek se ihned rozpustí v přesně 0,5 ml chlortformu (3.6) (V_3), přidá se přesně 50,0 ml cyklohexanu (3.14) (V_4). Při navázce vzorku obsahující 25 až 100 µg esterů kyseliny apo-karotinové se přidá jen 10,0 ml (V_4). Po rozpuštění a promíchání se měří na spektrofotometru (4.1) od 600 do 400 nm v 10 mm kyvetách proti cyklohexanu (3.14) jako slepému pokusu.

Maximum absorpance má být u 446 nm.

5.1.2 Frakce II se rovněž za stejného postupu a podmínek jako Frakce I (viz 5.1.1) odpaří do sucha, odparek se rozpustí v přesně 0,5 ml chlortformu (3.6) (V_3), přidá se přesně 50,0 ml hexanu (3.8) (V_4). Při navázce vzorku obsahující 25 až 100 µg citranaxantinu se přidá jen 10,0 ml (V_4). Po rozpuštění a promíchání se měří koncentrace citranaxantinu na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetách od 600 do 400 nm proti hexanu (3.8) jako slepému pokusu.

5.1.3 Pro stanovení kantaxantinu se odebere přesný alikvotní podíl filtrátu získaného podle 5.1, který obsahuje asi 6 až 50 µg kantaxantinu (V_2) (např. 25 ml) do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, tato se umístí na odparku (4.3) a obsah se pod přívodem dusíku (3.32) odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 60 ml ethylalkoholu (3.18), přidá se 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3.19), 10 ml petroletheru (3.20), na špičku nože hydrochinonu (3.21) a po promíchání se zahřívá pod zpětným chladičem (4.9) na vodní lázni (4.4) při teplotě 70 až 80 °C po dobu 30 minut. Obsah baňky se po vychladnutí převede do dělicí nálevky, baňka se vypláchne 100 ml diethyletheru (3.22) a výplach se převádí rovněž do téže dělicí nálevky. Směs se opatrně promíchá s diethyletherovou fází, přičemž před vlastní extrakcí je nutno dělicí nálevku několikrát odvzdušnit. Když již nevzniká přetlak dělicí nálevkou se silně protřepe. Po úplném oddělení fází se spodní vodná fáze odpustí do druhé dělicí nálevky a znovu se přidá do ní 100 ml diethyletheru (3.22), extrakce se opakuje, jak výše uvedeno a pak ještě jednou. Vodní fáze se potom odpustí a dále se nepoužije.

Diethyletherové fáze se spojí a nejméně 3krát promyjí vždy po 100 ml vody do neutrální reakce (pH papírek). Potom se diethyletherový extrakt převede do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, tato se umístí na odparku (4.3) a obsah se odpaří za přívodu dusíku (3.32) při teplotě 30 °C do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 0,5 ml *n*-hexanu (3.8).

Chromatografický sloupec se připraví stejně, jak je uvedeno v 5.1.1, na sloupec se převede celý hexanový extrakt vzorku, přičemž baňka, ve které byl rozpuštěn odparek, se 4krát vypláchne po 10 ml *n*-hexanu (3.8) a výplach se vždy převede na sloupec. Ze spodu vytékající kapalina (hexan) se dále pro stanovení nepoužije. Potom se na sloupec převede 5krát po 10 ml směsi chloroform-aceton (3.13) a eluát se jímá do odpařovací baňky (4.2) na 250 ml. Tato frakce obsahuje veškerý kantaxantin s malým podílem esterů kyseliny apo-karotinové a citranaxantinu. Odpařovací baňka s chloroform-acetonovým extraktem se umístí na odparku (4.3) a obsah se pod přívodem dusíku (3.32) odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v přesně 2,0 ml chloroformu (3.6) (V_3). Při obsahu 6 až 30 µg kantaxantinu v navážce se přidá pouze 1,0 ml chloroformu (V_3). Roztok V_3 má obsahovat 30 až 100 g kantaxantinu. Z tohoto roztoku se rychle (ztráty odpařením) nanese mikrodávkačem (4.13) přesně 0,5 ml (V_4) na desku TLC (3.15), nebo aby se zamezilo ztrátám při odpařování je možno odparek rozpustit vždy v 1 ml chloroformu a celé množství převést na desku, přičemž baňku ještě vícekrát vypláchnout malým množstvím chloroformu a všechno převést na desku. Na této desce (3.15) se nanese po 0,02 ml citranaxantinového (3.16) a kantaxantinového (3.17) extraktu, jako okrajové standardy a vývějecí směsí (3.29).

Okrajový standard citranaxantinu tvoří dvě zóny cis-citranaxantinu (oranžovou) nad silně rudě zbarvenou zónou trans-citranaxantinu.

Kantaxantin jako okrajový standard ukazuje pod citranaxantinovou zónou slabě žlutou cis-kantaxantinovou a přímo pod ní silně červeně zbarvenou trans-kantaxantinovou zónu.

Zmýdlením vzniká třetí růžová zóna, která leží přes červenou zónu trans-axantinu. Tři kantaxantové zóny se dohromady seškrábou do malé odpařovací baňky (4.12) a rozpustí se 3krát po 10 ml (event. i více – vizuální kontrola) směsí chloroform-aceton (3.13). Eluát se na odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) při teplotě 50 °C pod přívodem dusíku (3.31) odpaří do sucha, rychle se rozpustí v přesně 0,5 ml chloroformu (3.6), přidá se přesně 10 ml popř. 5,0 ml cyklohexanu (3.14) (V_5) a měří se na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetách od 600 do 400 nm proti cyklohexanu (3.14) jako slepému roztoku.

Maximální absorbance má být při vlnové délce 470 nm.

Do zmýdelňovací baňky (4.12) na 250 ml se odváží takové množství zkušební vzorku, který obsahuje s ohledem na očekávaný obsah ve zkoušeném vzorku 200 až 400 µg obsahu celkových xantofylů. Při obsahu celkových xantofylů ve vzorku 1 až 5 mg/kg se navažuje tak, aby množství xantofylů v navážce bylo asi 30 až 150 µg. K navážce vzorku se přidá 60 ml ethylalkoholu (3.18), 10 ml roztoku hydroxidu draselného (3.19), 10 ml petroletheru (3.20) s přísadkou na špičku nože hydrochinonu (3.21) a zmýdňuje se pod zpětným chladičem (4.9) na vodní lázni (4.4) vytemperované na 70–80 °C pod duskem (3.31) a za občasných zamíchání 30 minut. Po ochlazení pod tekoucí vodou se zmýdlená směs převede pomocí 100 ml vody do dělicí nálevky na 500 ml, přidá se přesně 250 ml diethyletheru (3.22), opatrně promíchává po dobu 5 minut a potom silně protřepe. Objem této směsi se odměří (V). Po oddělení fází se odpipetuje přesně 100 ml čiré diethyletherové fáze (V_{AID}), převede do další dělicí nálevky na 500 ml vodou nasycenou diethyletherem (3.23) a touto se opatrně promývá až do negativní reakce na alkálie (pH papírek). Mezitím se nechá původní uzavřená dělicí nálevka stát do úplného oddělení vodné fáze a změní se objemy jak vodné (V_w), tak i zbývající diethyletherové (V_{RD}) fáze. Nakonec se zjistí objem odebraného alikvotního podílu diethyletherové fáze (V_{AID}) a zbývající objem této fáze (V_{RD}), což se má rovnat celkovému objemu diethyletherové fáze (V_{OD}). Potom musí platit:

$$V = V_D + V_w$$

Alikvotní podíl diethyletherové fáze vymytý do negativní reakce se smísí s 50,0 ml petroletheru (3.20) a asi po 5 minutách se oddělí v dělicí nálevce zbytky oddělené vody. Tento extrakt se převede do odpařovací baňky (4.12) na 250 ml, na rotační odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) vytemperované na 50 °C se pod atmosférou dusíku (3.31) odpaří do sucha. Jsou-li v baňce ještě zřetelné zbytky vody přidá se malé množství směsi ethylalkohol-benzen (3.32) a znovu se odpaří. Odparek se rozpustí v přesně 0,5 ml *n*-hexanu (3.8).

Chromatografický sloupec se připraví tak, že se do chromatografické trubice (4.4), umístěné ve vertikální poloze, vloží k výtoku z trubice smotek vaty (4.10), při uzavření kohoutu se trubice zcela naplní *n*-hexanem (3.8) a vsype se oxid hlinitý (3.9) tak, aby sloupec po sedimentaci byl do výšky 80 mm. Pak se *n*-hexan vypustí až po vrch sloupce, přičemž vytekly hexan se pro další stanovení dále nepoužije.

Na takto připravený sloupec se převede 5,0 ml hexanového extraktu vzorku, pod sloupec se podstaví odpařovací baňka (4.12) na 250 ml a eluují se karoteny (Frakce I).

Potom se pod sloupem vymění odpařovací baňka za kuželovou baňku na 300 ml a na sloupec se dává 5krát po 10 ml 2% diethyletheru v hexanu (3.10), tím se oddělí zbývající podíly citranaxantinu a kantaxantinu. Podíly neúplně zmýdleného esteru kyseliny apokarotinové se eluují dávkami 5krát po 10 ml 5% diethyletheru v hexanu (3.11). Dále se eluují podíly citranaxantinu dávkami 5krát po 10 ml 10% diethyletheru v hexanu (3.12). Jakmile klesne poslední dávka tohoto k povrchu sloupce, tento podíl eluátu se k dalšímu stanovení nepoužije, pod sloupec se podstaví další odpařovací baňka (4.12) na 250 ml a na sloupec se dává 5krát po 10 ml směsi chloroform-aceton (3.13) a pak asi 3krát po 10 ml ethylalkoholu (3.18). Po protečení celého objemu kapaliny se baňka umístí na rotační odparce (4.3) a na vodní lázni (4.4), vytemperované na 50 °C pod přívodem dusíku (3.31) se obsah odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 50 ml ethylalkoholu (3.18) (V_{AII}) (Frakce II).

5.2.1 Hexanový eluát Frakce I se na rotační odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) vytemperované na 50 °C a pod přívodem dusíku (3.31) odpaří do sucha. Odparek se rozpustí buď v přesně 50 ml (či jiném

obsahu n-hexanu (3.8) (V_4) a měří na spektrofotometru (4.1) v 10 mm kyvetě od 600 do 400 nm proti n-hexanu (3.8) jako slepému roztoku.

Maximum absorbance má být při 450 nm (alfa a beta karoten).

5.2.2 Frakce II rozpuštěná v přesně 50 ml popř. 20 ml ethylalkoholu (3.18) se měří na spektrofotometru (4.1) od 600 do 400 nm v 10 mm kyvetě proti ethylalkoholu jako slepému roztoku.

Maximum absorbance má být při 450 nm (nekorigované xantofyly).

5.2.3 Z frakce II rozpuštěné v 50 (20) ml ethylalkoholu (3.18) (V_{AK}) se odepipetuje přesně 25 popř. 10 ml do odpařovací baňky (4.12) na 100 ml, odpaří se na odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) při 50 °C pod přívodem dusíku (3.31) do sucha. Odparek se rozpustí v 5 ml n-hexanu (32.8) (V_{MGO}).

Ke 20 g oxidu hořečnatého (3.23) se přidá 10 g Hyflo-superge-lu (3.25) a dobře se promíchá s hexanem (3.8). Tato suspenze se převede do chromatografické trubice (4.5), umístěné ve vertikální poloze, na jejíž dno bylo vloženo malé množství mořského písku (4.11). Po usazení se hexan odpustí až k povrchu sedimentu. Vytéká kapalina se pro stanovení dále nepoužije.

Na tento sloupec se převede hexanový extrakt vzorku (V_{MGO}), pod sloupec se podstaví kuželová baňka na 300 ml a otevře vý-pustní kohout. Po vypuštění hexanového extraktu až k povrchu sloupce se sloupec promyje postupně dávkami 3krát po 10 ml n-hexanu (3.8), 15 ml 10% acetonu v hexanu (3.26), 15 ml 20% acetonu v hexanu (3.27) a 30 až 40 ml 30% acetonu v hexanu (3.28). Promývání sloupce se přeruší, když od vrcholu sloupce jsou vizuálně zřetelné zóny v pořadí zeaxantin, lutein a kantaxan-tin. Proteklá kapalina se dále pro stanovení nepoužije.

Potom se sloupec od shora připouštěným dusíkem (3.31) při otevřeném kohoutu trubice zcela vysuší. Na vrchu sloupce se zbytkové zbarvené zóny malou lžičkou (4.14) či vhodným nástrojem odstraní a dále nepoužijí. Pak se pomocí tlaku dusíku (3.31), přiváděného do spodní trubice vytlačí sloupec, ale jen tak daleko až lze lžičkou (4.14) odebrat část sloupce obsahujícího zeaxantin a tato část se přenesení do kádinky na 100 ml. Dále se obdobným způsobem vytlačí část sloupce obsahující lutein do další kádinky na 100 ml. Obsah každé z kádinek se smísí s malým množstvím ethylalkoholu (3.18), promíchá, převede na filtrační kelímek (4.6) usazený v zařízení pro filtraci za sníženého tlaku (4.7) do něhož je vlo-žena odpařovací baňka na 100 ml a obsah každé z kádinek se fil-truje za mírně sníženého tlaku, promývá ethylalkoholem (3.18) až již vytéká čirý a bezbarvý promývací roztok. K tomu je zpravidla potřeba 30 až 40 ml.

Oba ethylalkoholové eluáty se odpaří na rotační odparce (4.3) a vodní lázni (4.4) 50 °C teplé pod přívodem dusíku (3.31) do su-cha. Každý odparek se rozpustí v přesně 25 ml popř. 10 ml ethylal-koholu (3.18) (V_A) a měří se na spektrofotometru (4.1) od 600 do 400 nm v 10 mm kyvetě proti ethylalkoholu (3.18) jako slepému roztoku.

Maximální absorbance má být při 445 nm pro lutein a 450 nm pro zeaxantin.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Obsah esteru kyseliny apo-karotinové vyjádřený jako ester kyseliny beta-apo-8-karotinové v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^4 \cdot A \cdot V_1 \cdot (V_3 + V_4)}{2540 \cdot V_2 \cdot m}$$

kde A je absorbance cyklohexanového extraktu vzorku (viz 5.1.1) při vlnové délce 446 nm (v maximu)
 V_1 objem chloroformu přidaného k navážce vzorku v ml (200 ml)
 V_2 objem odepipetovaného alikvotního podílu chloroformového extraktu v ml (přesně podle postupu 25 ml)
 V_3 objem chloroformu v němž byl rozpuštěn odparek v ml (0,5 ml)
 V_4 přídavek cyklohexanu k rozpuštěnému odparku v ml (50 nebo 10 ml)
 2540 absorpční koeficient esteru kyseliny apo-karotinové navážka zkušebního vzorku v g

6.2 Obsah citranaxantinu v mg/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{10^4 \cdot A \cdot V_1 \cdot (V_3 + V_4)}{2745 \cdot V_2 \cdot m}$$

kde A je absorbance hexanového extraktu vzorku při vlnové délce 468 nm (v maximu)
 V_1 viz ad 6.1
 V_2 viz ad 6.1
 V_3 viz ad 6.1
 V_4 přídavek hexanu k rozpuštění odparku v ml (50 nebo 10 ml)
 2745 absorpční koeficient citranaxantinu
 m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.3 Obsah kantaxantinu v mg/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{10^4 \cdot A \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot (V_5 + V_6)}{2000 \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot m}$$

kde A je absorbance cyklohexanového extraktu vzorku (5.1.3) při vlnové délce 470 nm (v maximu)
 V_1 viz ad 6.1
 V_2 viz ad 6.1
 V_3 objem chloroformu k rozpuštění odparku v ml
 V_4 objem přenesený na TLC desku v ml (2 nebo 1)
 2000 absorpční koeficient citranaxantinu
 V_5 objem k V přidaného cyklohexanu v ml (10 nebo 5 ml)
 m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.4 Obsah alfa, beta a gama karotenu v mg/kg (W) se vypočítá podle vzorce:

$$W = \frac{10^4 \cdot A \cdot V_H \cdot V_{GD}}{2500 \cdot V_{AID} \cdot m}$$

kde A je absorbance hexanového extraktu vzorku (5.2.1) při vlnové délce 450 nm (v maximu)
 V_H objem hexanu, ve kterém byl rozpuštěn odparek po chromatografickém dělení v ml (50 či jiný objem)
 V_{GD} celkový objem diethyletherové fáze po zmýdelnění v ml (po úplném oddělení)
 V_{AID} alikvotní podíl diethyletherové fáze po zmýdelnění převedeného do dělicí nálevky v ml (100)
 2500 absorpční koeficient karotenů
 m navážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.5 Celkový obsah xantofylů v mg/kg (N) se vypočítá podle vzorce:

$$N = \frac{10^4 \cdot A \cdot V_{GD} \cdot V_{AK}}{2500 \cdot V_{AID} \cdot m} - Z \cdot 0,65 \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde A je absorbance ethanolického extraktu vzorku (5.2.2) při vlnové délce 450 nm (v maximu)

V_{GD} viz ad 6.4
 V_{AID} viz ad 6.4
 V_{AK} objem ethylalkoholu k rozpuštění frakce II v ml (50 nebo 20)
 2500 absorpční koeficient xantofylů
 m навážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)
 Z obsah kantaxantinu v mg/kg (viz ad 6.3)

6.6 Obsah luteinu v mg/kg (L) se vypočítá podle vzorce:

$$L = \frac{10^4 \cdot A \cdot V_A \cdot V_{AK} \cdot V_{GD}}{2560 \cdot V_{MGO} \cdot V_{AID} \cdot m}$$

kde A je absorbance ethanolického extraktu vzorku (5.2.3) při vlnové délce 445 nm (v maximu)

V_A objem ethylalkoholu na rozpuštění odparku po chromatografickém dělení v ml (25 nebo 10)
 V_{AK} viz ad 6.5
 V_{GD} viz ad 6.4
 V_{AID} viz ad 6.4
 V_{MGO} objem alikvotního podílu z frakce II v ml (25 nebo 10)
 2560 absorpční koeficient luteinu
 m навážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

6.7 Obsah zeaxantinu v mg/kg (C) se vypočítá podle vzorce:

$$C = \frac{10^4 \cdot A \cdot V_A \cdot V_{AK} \cdot V_{GD}}{2350 \cdot V_{MGO} \cdot V_{AID} \cdot m}$$

kde A je absorbance ethanolického extraktu vzorku (5.2.3) při vlnové délce 450 nm (v maximu)

2350 absorpční koeficient zeaxantinu
 V_A jako v 6.6
 V_{AK} viz ad 6.5 VGD viz ad 6.4
 V_{AID} viz ad 6.4
 m навážka zkušebního vzorku v g (viz ad 6.1)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností na 0,1 mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Hexan, diethylether, cyklohexan, ethylalkohol, petrolether, aceton a jejich vzájemné směsi jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Podle první části vzorce se vypočítá celkový obsah xantofylů (nekorigovaný), od něhož se musí odečíst stanovený obsah kantaxantinu, který se vynásobí faktorem 0,65. Tento faktor zohledňuje vztah absorbance kantaxantinu v cyklohexanu při 470 nm k absorbanci v ethylalkoholu při 450 nm.

10.1 Stanovení obsahu kyseliny mravenčí

Tato metoda je uvedena v Methodenbuch- Chemische Untersuchung LUFA (Landwirtschaftlicher Untersuchungs und Forschungs Anstalten) č. 18.4

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny mravenčí v silážích.

2. Princip

Kyselina mravenčí se stanovuje metodou podle Fuchse. Těkavé kyseliny, vydestilované ze vzorku se podrobí reakci s manganistanem draselným. Kyselina mravenčí je jako jedinná oxidována v neutrálním nebo slabě alkalickém prostředí. Rušivé složky jako aldehydy a aceton, které také přechází do destilátu, jsou odstraněny odpařením neutralizovaného roztoku před titrací manganistanem.

10.2 Stanovení obsahu kyslíčnicku siřičitého

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 987.04

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyslíčnicku siřičitého v krmivech.

2. Princip

Kyslíčnick siřičitý se uvolní po okyselení vzorku krmiva proudem dusíku a jímá se do roztoku elektrolytu. Obsah kyslíčnicku siřičitého se stanoví metodou diferenční pulzní polarografie.

10.3 Stanovení obsahu formaldehydu

Tato metoda je uvedena v publikaci Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL 1977

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení formaldehydu v krmivech.

2. Princip

Ze vzorku se po okyselení kyselinou fosforečnou izoluje formaldehyd destilací s vodní parou a formaldehyd se v destilátu stanoví po reakci s kyselinou chromotropovou fotometricky při 570 nm.

11.1 Stanovení obsahu sacharinu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 980.18

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení sacharinu v krmivech.

2. Princip

Sacharin se extrahuje z vodného roztoku krmiva, po přečištění na koloně s Celitem 545, chloroformem. Chloroform se odpaří za laboratorní teploty a zbytek po odpaření se zředí roztokem hydroxidu sodného a obsah sacharinu se stanoví metodou diferenční pulzní polarografie.

12.1 Stanovení obsahu bakterií kmene *Enterococcus (Streptococcus)*

Tato metoda je uvedena v Methode der Bayerischen Landesanstalt für Ernährung MSf - V 4 - 95.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení počtu zárodků streptokoků skupiny D v koncentrátech, premixech, minerálních krmivech a krmných směsích.

2. Princip

Stanovení obsahu bakterií kmene *Streptococcus* je prováděno na selektivních živných půdách podle Slanetzé a Bartleye. Jako re-

ferenční půda se při stanovení používá další selektivní půda (např. KF agar) nebo u koncentrátů vhodná neselektivní půda. Naočkované půdy misky jsou kultivovány při 37 °C ± 1 °C a růst a počty kolonií jsou vyhodnocovány po dvou a čtyřdenní kultivaci.

12.1 Stanovení obsahu bakterií kmene *Bacillus*

Tato metoda je uvedena v Bio Systems, postup 205-08.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení počtu zárodků bakterií kmene *Bacillus* v krmivech.

2. Princip

Vzorek se homogenizuje ve sterilním zředovacím roztoku, ze kterého se připraví další potřebná ředění. Stanovení počtu zárodků bakterií kmene *Bacillus* se provádí anaerobní kultivací na krevním agaru při 37 °C. Počty kolonií, charakteristické pro dané mikroorganismy, se odečítají po 18–24 hodinách.

Příloha č. 11 k vyhlášce č. 222/1996 Sb.

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů fyzikálního zkoušení krmiv

Název postupu

- 1 Stanovení odrolu lisovaných krmiv
- 2 Stanovení zrnitosti
- 3 Stanovení feromagnetických příměsí
- 4 Stanovení délky a průměru granulí

1. Stanovení odrolu lisovaných krmiv

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení odrolu u granulovaných krmiv. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Odrol se stanoví jako sypký podíl po oddělení granulí na předepsaném sítu, vázkově.

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Přístroj prosévací horizontální, vhodné konstrukce, s přímočarým pohybem a regulací počtu kmitů a času, opatřený sadou sít o délce rámu 430 mm, šířce 150 mm a výšce 20 mm.

3.2 Úředně ověřená síta s drátěnou a plechovou přepážkou, se čtvercovými otvory

průměr granulí v mm	délka strany otvorů v mm
2,1 až 3,5	2,0 (drátěná přepážka)
3,6 až 6,5	3,15 (plechová přepážka)
6,6 až 10,0	6,3 (plechová přepážka)
nad 10,0	8,0 (plechová přepážka)

4. Postup

Odváží se 600 až 700 g konečného vzorku s přesností nejméně na 0,1 g na síto, odpovídající průměru granulí zkoušeného vzorku. Po upevnění síta do prosévacího přístroje se vzorek prosévá po dobu 2 minut při 120 kmitech/min.

Propad sítem se kvantitativně převede na vhodnou podložku a zváží se s přesností nejméně na 0,1 g.

5. Výpočet a vyjádření výsledků

Odrol v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot m_1}{m}$$

kde m_1 je hmotnost propadu v g
 m hmotnost zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

6. Opakovatelnost

Zatím není stanovena.

2. Stanovení zrnitosti.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení zrnitosti sypkých krmiv. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Zrnitost se stanoví jako hmotnostní podíly částic různých velikostí prosévací zkouškou konečného vzorku na předepsaných sítích, vážkově.

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Sada sítí

Nejčastěji používaná síta jsou síta o průměru 200 mm, s kruhovými otvory nebo s drátěnou tkaninou se čtvercovými oky, s délkou strany 2,8 mm, 2,0 mm, 1,0 mm, 0,5 mm a 0,2 mm. Síta musí být úředně ověřena.

3.2 Prosévadlo mechanické, vhodné konstrukce (např. typ AP 2).

4. Postup

Odváží se 100,0 g konečného vzorku na horní síto prosévadla (poznámka 7.1), na které byla předem naskládána potřebná síta v pořadí od síta s největšími otvory (nahore) k sítům s menšími otvory (dolů) a prosévá se 120 sekund při 120 ot/min. Podíly na jednotlivých sítích nebo propad sítím s nejmenšími otvory se kvantitativně přesypou na vhodné podložky a zváží s přesností nejméně na 0,1 g.

5. Výpočet a vyjádření výsledků

Podíl na příslušném síti (propad sítím) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot m_1}{m}$$

kde m_1 je hmotnost podílu vzorku na příslušném síti (propadu příslušným sítím) v g
 m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení (poznámka 8.2), které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností do hodnoty 20 g/kg na celé jednotky g/kg a nad hodnotu 20 g/kg na desítky g/kg.

6. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena

7. Poznámky

7.1 Pokud jsou v krmivu přítomna celá zrna obilovin nebo jiné abnormálně velké částice, je nutno odebrat ke zkoušení celý, nedělitelný laboratorní vzorek. V tomto případě se souběžné stanovení neprovádí.

3. Stanovení ferromagnetických příměsí

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení ferromagnetických příměsí. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Ferromagnetické příměsi se stanoví na základě svých magnetických vlastností, separací ze vzorku krmiva magnetem, vážkově.

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Síto s kruhovým rámem a délkou strany ok 0,2 mm (úředně ověřené)

3.2 Prosévadlo mechanické, vhodné konstrukce (např. typ AP 2)

3.3 Magnet permanentní

3.4 Fólie z plastické hmoty, vhodného rozměru + skleněná podložka

3.5 Měřítka s přesností nejméně na 0,2 mm

4. Pracovní postup

Odváží se 100,0 g konečného vzorku (poznámka 7.1) na síto (2.1) a prosévá se buď na prosévačce (2.2) asi 120 sekund při 120 ot/min., nebo ručně, za předpokladu, že síto je opatřeno víkem i dnem. Ruční prosévání se provádí kruhovým pohybem po dobu rovněž 120 sekund. Zbytek na síti se nasype na skleněnou podložku, rozhrne do vrstvy výšky asi 10 mm.

Pak se vezme magnet (2.3), obalí se fólií z plastické hmoty (2.4) a ve velmi blízké vzdálenosti od vrstvy vzorku se projíždí magnetem (2.3) nad vrstvou vzorku, a to postupně nad celou její plochou, v obou na sebe kolmých směrech. Při projíždění se magnetem (2.3) lehce pootáčí. V prostoru připravené odvažovačky, zcela suché a zvážené s přesností na 0,1 g, se z magnetu opatrně sejme fólie z plastické hmoty (2.4) tak, aby příměsí z magnetu (2.3) se vysypaly kvantitativně do odvažovačky. Tato se pak zváží s výše uvedenou přesností (poznámka 7.2).

5. Výpočet

Obsah ferromagnetických příměsí v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_2 - m_1)}{m_0}$$

kde m_0 je hmotnost vzorku v g
 m_1 hmotnost prázdné odvažovačky
 m_2 hmotnost odvažovačky s příměsí v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

6. Opakovatelnost

Zatím není stanovena

7. Poznámky

7.1 U lisovaných směsí se vzorek nejdříve podrtí na částice velikosti max. 2,0 mm.

7.2 Je-li požadavek na rozměr těchto příměsí, alespoň největších, změř se největší částice (délka, šířka) měřítkem a zjistí se, zda jsou přítomny částice větší než 1,0 mm.

4. Stanovení délky a průměru granulí

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení délky a průměru granulovaných krmiv. Metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv a premixů.

2. Princip

Průměr a délka granulí se zjistí jako průměr měření určitého počtu granulí, které se ve svém průměru výrazně neliší (nejde o směs granulí vyrobených na matricích různých průměrů).

3. Přístroje a pomůcky

3.1 Posuvné měřítko s přesností měření na 0,1 mm

4. Postup

Ze vzorku se vybere 100 vzhledově neporušených granulí (bez zlomků), které mají tvar válečku a výrazně se neliší ve svém průměru a z těchto se vybere náhodně 20 granulí pro vlastní měření. U vybraných granulí se posuvným měřítkem změř jejich průměr a délka.

5. Výpočet a vyjádření výsledků

Velikost granulí, tj. průměr a délka v mm (X , X_D) se vypočítá jako aritmetický průměr ze součtu naměřených hodnot podle vzorce:

$$X(X_D) = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{n}$$

kde $X_1, X_2, X_3 \dots X_N$ jsou jednotlivé hodnoty průměru nebo
délkyměřených granulí v mm
n je počet měření průměru nebo délky
(obvykle 20)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mm.

6. Opakovatelnost

Zatím není stanovena.

Příloha č. 12 k vyhlášce č. 222/1996 Sb.

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů smyslové zkoušení krmiv

Název postupu

- 1 Posuzování barvy, struktury a konzistence
- 2 Posuzování pachu

1. Posuzování barvy, struktury a konzistence

Barva, struktura a konzistence se posuzuje výhradně za dobrého denního světla v konečném vzorku krmiva. Vzorek se rozprostře na bílé podložce (např. filtrační papír), přitlačí do kompaktní vr-

stvy a prohlíží buď pouhým okem nebo pomocí lupy. Posuzují se zejména odchylky od barvy typické pro dané krmivo. U krmných směsí se posuzuje barva s přihlédnutím k zastoupení obsažených surovin.

U struktury a konzistence se posuzuje zejména neporušení původního stavu a kvalita opracování jednotlivých surovin (ostré slupky, kosti, celá zrna, slepené hrudky aj.), u lisovaných směsí se posuzuje, zda granule jsou stejné barvy a průměru.

2. Posuzování pachu

U celých semen (obiloviny, luštěniny aj.) se pach posuzuje v celém zrně a v jádře (po rozebrání). U ostatních krmiv, doplňkových látek a premixů se pach posuzuje v původním stavu konečného vzorku, který v případě potřeby může být ještě hrubě podrcen v třecí misce. Posuzuje se druh a intenzita pachu v původním stavu a po slabém zahřátí (nejlépe na sušárně) v kádince, přikryté hodi-
novým sklení.

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů speciálního zkoušení krmiv

Název postupu

- 1 Mikroskopie krmiv
- 2 Stanovení škůdců v obilovinách, luštěninách a olejninách
- 3 Stanovení škůdců v krmných směsích
- 4 Stanovení sněžitosti pšenice
- 5 Stanovení druhové čistoty, nečistot a škodlivých nečistot u obilovin, luštěnin a olejnin

1. Mikroskopie krmiv

Slouží k identifikaci jednotlivých druhů krmiv a k určení přítomnosti semen a plodů, uvedených jako nežádoucí látky v příloze č. 3 vyhl. MZ ČR č. 194./1996 Sb., kterou se provádí zákon o krmivech.

Provádí se z konečného vzorku, jemně rozetřeného v třecí misce. Krmiva s vyšším obsahem tuku se před další úpravou musí odtučnit. Do kádinky 400 ml dáme asi 5 g rozetřeného vzorku, přidáme 15 ml 5% H_2SO_4 a 150 ml destilované vody. Za stálého míchání zvolna vaříme 7 minut. Pak doplníme destilovanou vodou po okraj kádinky a necháme ustát. Asi po 60 minutách opatrně slijeme kapalinu nad sedlinou. Přidáme 210 ml 5% KOH a doplníme destilovanou vodou na původní objem. Vaříme opět 7 minut za občasného promíchání. Po ukončení varu doplníme destilovanou vodou a necháme asi 60 minut ustát. Dekantaci provedeme 3krát. U živočišných mouček vaříme pouze s 5 ml 5% KOH + 150 ml destilované vody 2–5 minut. Vzorek je připraven k mikroskopickému vyšetření (poznámka 1). Nejvhodnější zvětšení je 200 až 300krát.

Poznámka 1

Buněčné struktury se posuzují podle vlastních preparátů, připravených z jednotlivých druhů krmiv, připravených pro tyto účely tak, aby nebyly znečištěny jinými krmivy.

Doporučená literatura:

HERRMANN, R. prof. Dr., SCHMITT, L. prof. Dr. ing.:
Methodenbuch, Band XI – Atlas für die Mikroskopie von Nahrungsgrundstoffen und Futtermitteln, vyd. J. Neumann-Neudamm, Berlin, Basel, Wien, 1975.

2. Stanovení škůdců v obilovinách, luštěninách a olejninách.

1. Podstata zkoušky

Živí škůdci se zjišťují po prosátí vzorku v propadu, popř. v podílu na síti buď pouhým okem, popř. pomocí lupy nebo stereoskopickým mikroskopem.

2. Přístroje a pomůcky

- 2.1 Síta s drátěnými tkaninami se čtvercovými oky s délkou strany oka 1 mm, popř. 2,8 mm
- 2.2 Petriho misky průměru nejméně 80 mm
- 2.3 Pinseta měkká
- 2.4 Lupa, zvětšující 6krát a 10krát nebo stereoskopický mikroskop (zvětšení 10krát a více)
- 2.5 Mechanické prosévadlo vhodné konstrukce
- 2.6 Mikroskop (zvětšení 80krát a více)
- 2.7 Podložní a krycí sklíčka
- 2.8 Podložka s mezikružními k odečítání počtu škůdců

3. Chemikálie

- 3.1 Etanol denaturovaný 1-% benzínem
- 3.2 Konzervační tekutina s obsahem chlorhydrátu ($C_2H_3Cl_3O_2 + CCl_3CHO$)

4. Postup

4.1 Ke zjištění skladištních škůdců se konečný vzorek proseje sítím (2.1) o průměru či délce strany nejméně 30 cm, s kruhovými nebo čtvercovými otvory o průměru či délce strany oka 2,2 mm až 2,5 mm (popř. podle druhu výrobku i s menšími otvory síta).

Vzorek se vysype na síto (2.1) po částech; každá část se prosévá kruhovým pohybem asi 1 minutu a z každého dílčího propadu se stanoví počet živých brouků a určí se jejich druh. Jednotlivé druhy se počítají odděleně. K mrtvým broukům se nepřihlíží. Při prosévání se brouci někdy zdají zdánlivě mrtví. Jejich životnost se zjišťuje tak, že se počítá za 15 až 20 sekund po prosetí anebo se na brouky, kteří neprojevují známky života několikrát dýchne. Je-li teplota zrna nižší než 10 °C, ohřívá se získaný propad obsahující brouky po 10 až 20 minut při teplotě 20 až 30 °C. Potom se brouci, kteří projevují známky života připočtou k živým broukům. Zjištěný celkový počet živých brouků ze zkoušeného vzorku se přepočte na 1 kg zrna. Propad se použije také ke stanovení roztočů (podle odstavce 4.5).

4.2 Při zjišťování pilousů se stanoví stupeň napadení podle počtu živých brouků přepočtem ze zkušebního vzorku na 1 kg zrna podle tab. 1. Při III. stupni (silné napadení) se musí v rozboru uvést i počet živých pilousů v 1 kg zrna (viz tab. 1).

Tab. 1

Stupeň napadení	Počet živých pilousů na 1 kg
I. výskyt	nejvýše 2 brouci
II. napadení	3 až 5 brouků
III. silné napadení	nad 5 brouků

4.3 Při zjišťování ostatních brouků např.:

lesák skladištní (*Oryzaephilus surinamensis* L.),
lesák moučný (*Laemophloeus ferrugineus* Steph.),
potemník skladištní (*Tribolium confusum* Jacq.),
potemník moučný (*Tenebrio molitor* L.),
kornatec skladištní (*Tenebrioides mauritanicus* L.),
červotoč spízní – chlebový (*Stegeobium paniceum* L.),
vrtavec zhoubný (*Ptinus fur* L.),
korovník obilní (*Rhizopeltha dominica* F.).

popřípadě celé řady dalších druhů, v praxi známé pod názvy písivky, maločlenci, trojatici apod. se neuvádí stupeň napadení, ale jen zjištěný druh a počet živých brouků na 1 kg zrna (semen).

4.4 Při zjišťování napadení zrna (semen) housenkami např.:

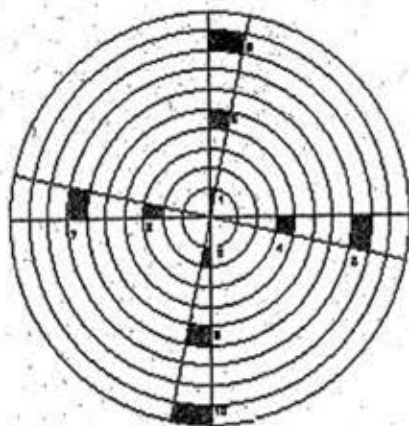
zavíječe moučného (*Anagasta kuehniella* Scott),
zavíječe skladištního (*Ephesia elutella* Hübner),
zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella* Hübner),
mola obilního (*Tinea granella* L.),
makadlovky obilné (*Sitotroga cerealella* Olivier) aj.

se rozprostře konečný vzorek na stůl, pokrytý hladkým, tmavým, nejlépe černým papírem, do nízké vrstvy a důkladně se prohlédne. Při zjišťování živých housenek se nepřihlíží k jejich druhu, ale jejich celkový počet se přepočte na 1 kg zrna (semen). Zjistí-li se ve vzorku pouze zámoťky molů (smotky), uvede se toto zjištění v rozboru.

4.5 Stupeň napadení zrna (semen) roztoči se stanoví jednak podle množství roztočů ve vzorku a jednak podle pachu zrna nebo semen. Zrna nebo semena silně napadená škodlivými roztoči mají charakteristický pach. Ke stanovení množství roztočů se rovnoměrně rozprostře propad sítem, získaný při stanovení škůdců (zjišťování roztočů a pilousů je současně), do nízké vrstvy na Petriho misce (2.2) o průměru nejméně 10 cm a ihned se provede stanovení. Petriho miska (2.2) musí být podložena černým papírem.

Pouhým okem nebo lupou (2.4) 6 až 10krát zvětšující je nutno odhadnout, zda pohyblivých stadií roztočů je méně nebo více než 50. V prvním případě se počítají roztoči jednotlivě, ve druhém případě se nahradí černý podkladový papír podložkou (2.8), odpovídající vnějším průměrem průměru Petriho misky, na které se provádí součet. Na této podložce je 10 mezikruží, mezi nimiž je vyznačeno 10 černých políček, tvořících 1/30 obsahu všech mezikruží (viz obr. 1).

obr. 1



Součet roztočů, jejichž počet je větší než 50 a mnohdy nezjistitelně velký, se provádí na těchto černých políčkách a konečný součet všech roztočů, nacházejících se na černých políčkách, se násobí třiceti; tím se vypočítá celkový počet roztočů v propadu vzorku. Roztoče nutno v tomto případě zjišťovat pouze lupou (2.4) alespoň 10krát zvětšující anebo pod mikroskopem, popř. binokulární lupou.

Je-li propadu příliš mnoho, takže se na Petriho misku (2.2) rovnoměrně nedá rozprostřít, je možno použít jen určitou část propadu a výsledek přepočítat na celkové množství propadu. Po zjištění počtu škodlivých roztočů ve vzorku se stanoví stupeň napadení podle tab. 2, přičemž k výskytu dravých roztočů do 500 kusů na 1 kg se nepřihlíží.

Zjistí-li se charakteristický pach po roztočích při nižším výskytu jedinců než 50 na 1 kg, zařadí se dodávka do III. stupně.

Výsledek se uvádí počtem škůdců na 1 kg a to v celých číslech.

Tab. 2

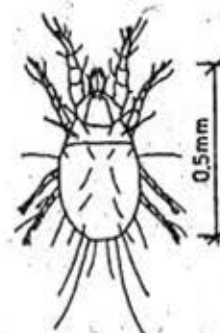
Stupeň napadení	Znaky	
	počet škodlivých roztočů do 50 na 1 kg	zrno bez pachu
I. výskyt	počet škodlivých roztočů nad 50 na 1 kg	zrno bez pachu
II. napadení	počet škodlivých roztočů nad 50 na 1 kg	zrno bez pachu
III. silné napadení	počet škodlivých roztočů nad 50 na 1 kg	zrno s charakteristickým pachem po roztočích

Rozeznávání roztočů – viz obr. 2a), 2b), 2c).

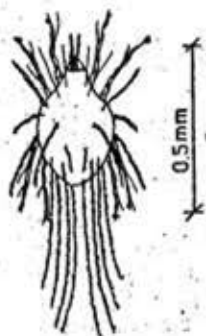
Obr. 2a) – roztoč moučný (*Acarus siro* L.)

Obr. 2b) – roztoč ničivý (*Glycyphagus destructor* Schr.)

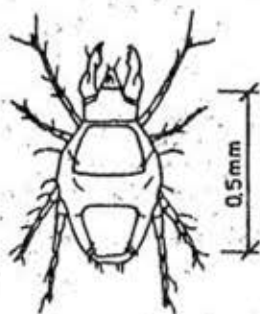
Obr. 2c) – roztoč dravý (*Cheyletus eruditus* Schr.)



Obr. 2a)



Obr. 2b)



Obr. 2c)

3. Stanovení škůdců v krmných směsích

1. Podstata zkoušky

Živí škůdci se zjišťují po prosátí vzorku v propadu, popř. v podílu na síti buď pouhým okem, popř. pomocí lupy nebo stereoskopickým mikroskopem

2. Přístroje a pomůcky

- 2.1 Síta s drátěnými tkaninami se čtvercovými oky s délkou strany oka 1 mm, popř. 2,8 mm
- 2.2 Petriho misky průměru nejméně 80 mm
- 2.3 Pinseta měkká
- 2.4 Lupa, zvětšující 6krát a 10krát nebo stereoskopický mikroskop (zvětšení 10krát a více)
- 2.5 Mechanické prosévací vhodné konstrukce
- 2.6 Mikroskop (zvětšení 80krát a více)
- 2.7 Podložní a krycí sklíčka

3. Chemikálie

- 3.1 Etanol denaturovaný 1 % benzínem
- 3.2 Konzervační tekutina s obsahem chlorhydrátu ($C_2H_3Cl_3O_2 + CCl_3CHO$)

4. Postup zkoušky

4.1 Obecně

Při rozbalení konečného vzorku je třeba věnovat pozornost typickému sladkoštiplavému, nasládlému dusivému pachy; typickému po roztočích. Při vysypání vzorku je nutno dbát na to, že např. roztoči a celá řada ostatních škůdců (brouci) se obvykle hromadí pod uzávěrem obalu. Při silnějším napadení, hlavně brouky, je možno zjistit jejich přítomnost při rozbalení vzorku.

Při podezření na přítomnost větších škůdců (housenky molů, které vytvářejí typické zámotky, nebo některé větší druhy brouků) se vysype postupně vzorek na tmavou podložku a pinsetou (2.3) se vybírají housenky a zámotky. Jinak lze vzorek přeseít 2,8 mm sítím (2.1), na kterém tyto zámotky zůstanou. Prosévá se ručně. U lisovaných směsí je nutno se nejdříve přesvědčit, zda nejsou jednotlivé granule vyhlodány, popř. zda uvnitř neobsahují larvy.

4.2 Sypké směsi

100 g konečného vzorku se proseje sítím (2.1) o délce strany oka 1 mm a pátrá se v propadu i v podílu na síti po škůdcích. Některé druhy se stávají zpočátku mrtvými, proto je nutné pátrání po krátké době opakovat. Pinsetou (2.3) se tyto škůdci vybírají a vhažují do kádinky s etanolem (3.1).

4.3 Lisované směsi

Po vizuálním přezkoušení se prosévá 100 g konečného vzorku na mechanickém prosévacím 120 sekund sítím 1 mm (2.1) a v propadu se pátrá po škůdcích jako ve vzorku sypké směsi. Zjištění dvou jedinců téhož druhu škůdců ve vzorku se považuje za výskyt. Totéž platí v případě zjištěných housenek nebo zámotků. Toto stanovení je shodné pro směsi sypké a lisované.

4.4 Zjišťování roztočů

Typický pach po roztočích prokazuje přítomnost více než 2. stupně napadení. Přítomnost roztočů se zjišťuje v propadu konečného vzorku sítím o průměru oka 1 mm (2.1) tak, že se vysype na Petriho misku (2.2), kde se urovná do tenkých vrstev. Naplněné misky se opatrně nahřejí na teplotu 20 až 30 °C a pomocí lupy (2.4) zvětšující 10krát nebo stereoskopickým mikroskopem (2.4) se zjišťuje přítomnost roztočů (pohyb). Po ověření zjištěných nálezů se propad vysype na víčka Petriho misky (2.2), urovná a přikryje dnem této misky (2.2) a po více než 1 hodině, jsou-li tyto misky uchovány při výše uvedené teplotě, zjistí se v případě přítomnosti roztočů typické cestičky, patrné pouhým okem. Stanovení se provádí čtyřikrát; nejvyšší a nejnižší hodnota nálezu se neuvažuje. Součet dvou zbývajících stanovení se přepočítá na 1 kg směsi.

Zjištění roztočů ve 100 g vzorku v počtu do 200 jedinců odpovídá výskytu 1. stupně. Zjištění méně než 3 jedinců se nepokládá za výskyt. Nález dravých roztočů zjištěný výsledek neovlivňuje.

Pro určení druhů roztočů je nutno zhotovit mikroskopické preparáty přenesením malého množství směsi s roztoči do lupy vhodné konzervační tekutiny (3.2) na podložní sklíčka (2.7).

Preparát se pozoruje pod mikroskopem (2.6) při zvětšení 80násobným a vyšším.

4. Stanovení snětivosti pšenice

Za snětivou se považuje pšenice, která obsahuje zrna napadená snětí, snětivé kuličky, případně vykazuje pach po sněti.

Konečný vzorek se vysype na světlou podložku a smyslově se posuzuje zamazání zrn spórami snětí, výskyt snětivých kuliček a pach po sněti. Jestliže vzorek vykazuje kterýkoliv z uvedených znaků, označí se pšenice za snětivou.

5. Stanovení druhové čistoty, nečistot a škodlivých nečistot u obilovin, luštěnin a olejnin

1. Podstata zkoušky

Mechanicky a ručně nebo jenom ručně se oddělí z neupraveného vzorku nečistoty, škodlivé nečistoty a zrna jiných druhů kulturních plodin.

Pro účely této metody se rozumí:

Druhá čistota — procentický podíl hmotnosti zrn, zbavených nečistot, z celkové hmotnosti zkušebního vzorku (mimo zrna, která patří do nečistot).

Nečistoty — nepoužitelné nebo nežádoucí složky zkušebního vzorku např.:

- části stébel, lodyh, stonků, listů, klasů, klásků, lat, lichoklasů, oklasků, okolíků, plev, slupek, lusků, tobolek, úborů, makovic, štětín, osin, částice dřeva, papíru, umělých hmot apod.,
- semena plevelů,
- zelená nebo nevyzrálá zrna nebo zrna v mléčné zralosti obilovin, luštěnin a olejnin,
- zrna se zcela porušeným endospermem zapařením, zuhelnatěním, ztrouchnivěním (endosperm je drobný) nebo zrna bez endospermu — (vyžraná, zaschlá) nebo zrna hluchá,
- anorganické nečistoty (zemina, kaménky, prach, kovové nebo skleněné částice aj.),
- propad sítem s kruhovými otvory o průměru 2 mm u obilovin a kukuřice
- zrna zjevně smyslově posouditelná jako plísňivá
- škodlivé nečistoty

Škodlivé nečistoty — jedovatá a zdraví škodlivá semena plevelů, zejména koukol polní (*Agrostemma githago* L.), hlaváček letní (*Adonis aestivalis* L.), černýš rolní (*Melampyrum arvense* L.), kokrhel (*Rhinanthus* L.), světlý stoklasa (*Bromus secalinus* L.), jilek mámivý (*Lolium temulentum* L.), skočec obecný (*Ricinus* L.), světle (zejména *Galium mollugo* L., *Galium verum* L., *Galium cruciata* L., *Galium vernum scop.* a *Galium aparine*), dále rozmnožovací cibulky planě rostoucích česneků — česnek kulovitý (*Allium rotundum* L.), česnek kulatohlavý (*Allium sphaerocephalum* L.), česnek polní (*Allium vineale* L.), dále námel, zrna napadená háďátkem pšeničným (*Tylenchus tritici* Bauer), chlamydospóry snětí mazlavé (rod *Tilletia*), hlízky — sklerocie bílé hniloby (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib.) San.et.Tod.

2. Zkušební pomůcky

2.1 Prosévací přístroj s upínací plochou a třmeny pro jedno síto se dnem a víkem o vnějších rozměrech (mimo víko) 170 × 450 × 50 mm s přípustnou odchylkou ± 10 mm. Pohyb upínací desky a síta musí být přímočarý s vratným pohybem a amplitudou 25 mm ± 5 mm a frekvencí 310 kmitů za minutu ± 10 kmitů.

2.2 Oddělovací přepážka (třídící síto) je o rozměrech 150 × 430 mm s přípustnou odchylkou u obou rozměrů ± 0,4 mm.

Doporučený materiál je plech z korozivzdorné oceli nebo tvrzené mosazi o tloušťce 0,8 až 1,2 mm. Vzdálenost rovnoběžných stran (tečen) otvorů od podélných stran oddělovací přepážky je 6 mm (přípustná odchylka ± 0,2 mm), od kratších stran 10 mm (přípustná odchylka ± 0,2 mm). Vzdálenost mezi otvory v řadách a mezi řadami je rovnoměrná po celé ploše oddělovací přepážky.

Oddělovací přepážka má kruhové otvory o průměru 2 mm s přípustnou odchylkou ± 0,06 mm, s počtem otvorů v řadě 17 a počtem řad 104. Uspořádání otvorů mezi řadami je v podélných řadách střídavé.

Luby (rámeček) třídícího síta musí být z hliníku nebo tvrdého dřeva s povrchovou úpravou.

3. Postup zkoušky

3.1 Hmotnost navážky zkušebního vzorku

Materiál	navážka
kukuřice, bob koňský	200 g
pšenice, žito, ječmen, čirok, soja, slunečnice, tritikale, oves nahý, hrách, lupina sladká, peluška jarní, vikev jarní	100 g
oves setý, pohanka obecná, světlíče barvířská	50 g
proso, mohár, čumíza, konopí, krambe, lesknice	25 g
lněné semeno, řepka	10 g
mák	2 g

3.2 Vlastní zkouška

Děličem vzorků se z upraveného konečného vzorku vydělí část, ze které se naváží zkušební vzorky s přesností na 0,1 g.

Je-li pro stanovení nečistot určeno užití síťového třídění (propad sítem 2 mm), prosévá se zkušební vzorek mechanicky prosévacím přístrojem (2.1) po dobu 2 minut. Potom se ze zbytku na síti oddělují nečistoty a samostatně zrna jiných druhů kulturních plodin.

Pokud není stanoveno pro třídění užití síta, vybírají se z celého zkušebního vzorku nečistoty a samostatně zrna jiných druhů kulturních plodin. Oddělené podíly nečistot a kulturních plodin se váží.

Po odvážení nečistot se z celé hmotnosti vybírají jednotlivé druhy škodlivých nečistot, a to každý druh odděleně. Po oddělení jednotlivých druhů škodlivých nečistot se podíly zvaží.

Z celkového obsahu nečistot se uvádí zvlášť obsah škodlivých nečistot celkem, z toho jednotlivých druhů.

4. Výpočet

4.1 Druhá čistota v % (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{m_0 - (m_1 + m_2)}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
 m_1 hmotnost nečistot celkem v g
 m_2 hmotnost jiných druhů kulturních plodin v g

4.2 Obsah nečistot v % (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
 m_1 hmotnost nečistot celkem v g

4.3 Obsah škodlivých nečistot v % (Z) se vypočte podle vzorce:

$$Z = \frac{m_1 + m_2 + m_3 + m_x}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
 m_1 až m_x hmotnost jednotlivých druhů škodlivých nečistot v g

4.4 Obsah jednotlivých druhů škodlivých nečistot (Q) v % se vypočte podle vzorce:

$$Q = \frac{m_1}{m_0} \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
 m_1 hmotnost jednoho druhu škodlivých nečistot v g

Výsledky se zaokrouhlují a uvádějí na jedno desetinné místo.

METODIKA

ověření přesnosti míchacích zařízení pro premixy,
kompletní a doplňková krmiva

1.00 Úvod do problematiky a princip metody

V rámci České republiky většina používaných a veškeré nově vyráběné míchací zařízení pro výrobu premixů nebo kompletních a doplňkových krmiv s použitím premixů nemají ověřenou přesnost míchání. Zákon č. 91/1996 Sb. definuje v § 7 odst. 3.b) požadavky na pracovní přesnost míchacích zařízení, která je dána schopností zamíchat látku dávkovanou do výrobní šarže v poměru:

- a) u míchacích zařízení pro premixy v poměru 1 : 100 000 tzn. na 1 tunu hmotnosti šarže 10 g látky
- b) u míchacích zařízení pro kompletní a doplňková krmiva s použitím premixů v poměru 1 : 10 000, tzn. na 1 tunu hmotnosti šarže 100 g látky.

Udaná hmotnost dávkované látky je vyjádřena ve 100 % čistotě. Zamíchanost látky je posuzována na základě její homogenity po ukončení předepsané doby míchání výrobcem zařízení.

2.00 Materiál a metoda

2.10 Sledovaná látka

Na základě výsledků ověření metod zkoušení přesnosti míchacího zařízení je stanoveno pro účely ověření přesnosti míchání užívat následující látky:

— **dimetridazol** — po chemické stránce se jedná o 1,2-dimethyl-5-nitro-imidazol — sumární vzorec $C_7H_8N_4O_2$. Jedná se o krystalickou látku s rovnoměrnou velikostí krystalů, jejíž mez stanovitelnosti pro metodu HPLC je 7,4 mg/kg a mez detekce je 3,6 mg/kg.

— **lasalocid** — jedná se o ionophorní antibiotikum, po chemické stránce je to sodná sůl 6-[7R-[5S-ethyl-5-(5R-ethyltetrahydro-5-hydroxy-6S-methyl-2H-pyran-2R-yl)tetrahydro-3S-methyl-2S-furanyl]-4S-hydroxy-3R,5S-dimethyl-6-6-oxonon-yl]-2-hydroxy-3-methylbenzoové kyseliny. Látka se vyskytuje v jemných krystalech. Mez stanovitelnosti pro metodu HPLC je 1,05 mg/kg a mez detekce je 0,6 mg/kg.

- 2.20 S ohledem na jednotnost při vyhodnocování míchacích zařízení se doporučuje výhradně používat jako nosiče pšeničné mouky krmné nebo velmi jemně mletého či jemně mletého vápence. Množství použitého nosiče musí odpovídat naplnění míchacího zařízení nejméně nad dvě třetiny objemu a nesmí překročit mez plnění stanovenou výrobcem.

2.30 Příprava látek

Jednu z uvedených látek, kterou použijeme k ověření nejprve upravíme třením v třecí misce a po té odvážíme zadanou hmotnost pro ověření. Navážku látky volíme podle deklarované její čistoty např. je-li deklarován dimetridazol v čistotě 86 %, odvážíme pro míchací zařízení pro premixy 11,63 g látky na tunu nebo pro míchací zařízení u kompletních a doplňkových krmiv 116,3 g na tunu předpokládané hmotnosti náplně míchacích zařízení. Odváženou látku rozmícháme ve 2 až 3 kg nosiče, který budeme používat. Nosič odvažujeme s přesností na 0,1 kg. Takto upravenou látku, pokud je připravena do zásoby balíme do neprodyšného obalu, který uzavřeme.

2.40 Příprava nosiče

Z uvedených nosičů odvážíme předpokládanou hmotnost pro naplnění nejméně 2/3 míchacího zařízení s přesností ± 1 % z navážky nosiče. Poměr hmotnosti navážené látky a nosiče u premixových míchacích zařízení musí být 1 : 100 000 a u míchacích zařízení pro kompletní a doplňková krmiva 1 : 10 000.

- 2.50 Odvážený nosič a látku napustíme do míchacího zařízení tak, aby celá hmotnost látky byla umístěna do míchacího prostoru. U vertikálních míchacích zařízení se doporučuje dávkovat látku za klidu míchacího zařízení. Dávkování látky se uskutečňuje vždy po naplnění nosičem nikoliv naopak. Před napouštěním nosiče musí být míchací zařízení, pokud bylo používáno vyčištěno (zbaveno zbytků krmiv).

- 2.60 Doba míchání je dodržována podle technického předpisu výrobce míchacího zařízení. Po ukončení doby míchání se přistupuje k odběru dílčích vzorků.

2.70 Způsob odběru dílčích vzorků

Odběr dílčích vzorků se uskutečňuje buď za chodu míchacího zařízení při jeho vyprazdňování nebo při zastavení míchacího zařízení z jeho vnitřního prostoru. Minimálně se odebírá při jakémkoliv způsobu nejméně 10 dílčích vzorků.

2.71 Odběr dílčích vzorků při vyprazdňování míchacího zařízení

Pokud jsou vzorky odebírány automatickým vzorkova-

cím zařízením nebo vzorkovací krabicí vhodnou pro odběr dílčího vzorku z celého průřezu toku materiálu, stanovíme frekvenci odběru tak, aby byly rovnoměrně odebrány vzorky v celém průběhu vyprazdňování.

2.72 Odběr dílčích vzorků z prostoru míchacího zařízení

Provádíme pomocí vertikálního dvouplášťového vzorkovače o vhodné délce odpovídající výšce vzorkovaného materiálu.

2.73 Za dílčí vzorek považujeme:

- jednorázové protažení vzorkovací krabicí tokem materiálu,
- jeden vpich vertikálního dvouplášťového vzorkovače,
- jednorázové naplnění vzorkovací nádoby automatického vzorkovače.

2.74 Dílčí vzorky balíme do neprodyšných obalů a označujeme pořadovými čísly, které odpovídají pořadí odběru dílčích vzorků.

2.75 Dílčí vzorky doporučené do laboratoře upravujeme dělením a mletím bezprostředně před jejich přípravou pro stanovení příslušné látky a to samostatně pro každé paralelní stanovení. U každého dílčího vzorku provádíme nejméně dvě paralelní stanovení látky a u jednoho dílčího vzorku náhodně vybraného provedeme 4 paralelní stanovení za účelem stanovení f-testu tabelovaného.

2.80 Metody zkoušení

Pro účely ověření přesnosti míchání se používá výhradně ověřených metod stanovení dimetridazolu a lasalocidu uvedených v této metodice. Obsah látky se vyjadřuje podle udaného vzorce.

2.81 Metoda stanovení dimetridazolu pomocí HPLC v kompletních a doplňkových krmívech a premixech

2.81.1.0. Definice

Dimetridazol se používá jako chemoterapeutikum. Po chemické stránce se jedná o 1,2-dimethyl-5-nitroimidazol (sumárního vzorce $C_5H_7N_3O_2$, $M_r = 141,1$). Stanoví se po extrakci ze vzorku směsným rozpouštědlem methanol-voda (v premixech doplňkových látek) a přečištěním extraktu metodou SPE (v krmných směsích), metodou RP-HPLC na C_{18} s UV detekcí při vlnové délce 309 nm.

2.81.2.0. Chemikálie a zkušební pomůcky

2.81.2.1. Extrakční roztok, methanol + voda (900 + 100, V + V)

2.81.2.2. Eluční roztok, voda + acetonitril (700 + 300, V + V)

2.81.2.3. Dimetridazol (DMT), základní látka

2.81.2.3.1. Dimetridazol, základní roztok:

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží asi 100 mg dimetridazolu (2.81.2.3.), rozpustí v asi 180 ml extrakčního roztoku (2.81.2.1.) na ultrazvukové lázni a po rozpuštění a vytemperování na laboratorní teplotu se doplní vodou po značku a promíchá (1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,5 mg DMT).

2.81.2.4. Kolona SPE, Alumina B Cartridges, např. Sep-Pak, Waters Ca.No. WAT020505

2.81.3.0. Pracovní postup

2.81.3.1. Extrakce a separace na pevné fázi

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušební vzorku (nejméně 2 g, nejvíce 20 g), aby po extrakci a následném ředění byla koncentrace dimetridazolu 10 až 25 mg/l (pro premixy doplňkových látek 2 g, pro krmné směsi 15 g). Pak se přidá přesně 100,0 ml extrakční směsi (2.81.2.1.) a kónická baňka se uzavře zátkou se zábrusem. Obsah se promíchá a extrahuje na laboratorní třepačce po dobu 60 minut. Po té se obsah baňky nechá ustát a extrakt se filtruje přes suchý skládaný papírový filtr do suché nádoby. Prvních 5 ml filtrátu se nepoužije. Je-li třeba, extrakt se naředí na požadovanou koncentraci extrakčním roztokem (2.81.2.1.) podle tabulky 1.

Při analýze krmných směsí se odstraní balastní látky extrakcí na pevné fázi. Patrona alumina B (2.81.2.4.) se připojí k polyethylenové injekční stříkačce o objemu 5 ml, do které se odlije asi 3 ml extraktu získaného podle prvního odstavce čl. 2.81.3.1. a na kolonu se nanese asi 1 ml extraktu a kolona se nechá 20 sekund kondicionovat. Pak se extrakt pomalu protlačí připojenou patronou. První podíl extraktu (0,1 ml) se nezachycuje a další podíl se použije k nástřiku na chromatografickou kolonu.

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se vlastní extrakt (2.81.3.1.) filtruje přes membránový filtr 0,45 mm nebo se odstředí na laboratorní odstředivce při 3 000 ot/min. Na chromatografickou kolonu se nastříkává objem 10 µl extraktu.

Tabulka 1. Ředění premixů doplňkových látek

Obsah [mg/kg]	Řednění	Způsob ředění [mg/kg]
do 1 500	2,5	10/25
od 1 500 do 7 500	12,5	2/25
od 7 500 do 15 000	25	1/25
od 15 000 do 30 000	50	0,5/25
více jak 30 000	100	1/50

2.81.3.2 Vlastní stanovení – metodou HPLC

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona: C_{18} – reverzní fáze, NovaPak 4 µm, 150 × 3,9 mm (Waters)

Eluční roztok: Voda-acetonitril (700×300, V+V)

Průtok: 0,75 ml/min.

Teplota: okolí

UV-detektor – 309 nm

AUFS: 1,000

Objem nástřiku: 10 µl

RetTime: asi 2,4 min. (pro uvedenou kolonu)

RunTime: 5 minut (pro uvedenou kolonu)

Recovery: 0,99

2.81.3.3. Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se postupně pipetuje 1,0 – 1,5 – 2,0 a 2,5 ml základního roztoku DMT (2.81.2.3.1.), odměrné baňky se doplní extrakční směsí (2.81.2.1.) po značku a promíchají. Získá se sada pracovních roztoků o koncentraci 10 – 15 – 20 a 25 mg/l DMT.

Pracovní roztoky dimetridazolu se po ekvilibraci kolony nastříkují na chromatografickou kolonu (10 µl) a ze získaných průměrných ploch jim odpovídajícím píčkům se sestrojí kalibrační křivka.

2.81.4.0. Výpočet

Obsah dimetridazolu (X) v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot R}{m_s \cdot R_s}$$

kde c je koncentrace dimetridazolu odečtená z kalibrační křivky v mg/l
V objem extraktu v ml
R ředění
R_s recovery
m_s hmotnost zkušebního vzorku v g

Literatura:

- 1) Pye Unicam HPLC Applications, Number One, Analysis of Drugs in Animal Feedstuff.
- 2) VDLUFA (Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten), Methodenbuch Band III, 2. Erg. 1988, kapitola 14.19.1.
- 3) Analytical Methods Committee (Royal Society of Chemistry)/EEC Committee of Experts: Determination of Ronidazol in Animal Feeds by High-performance Liquid Chromatography. — Analyst 108, 1521–1524, 1983.

2.82 Metoda stanovení lasalocidu pomocí HPLC v kompletních a doplňkových krmivech a premixech

2.82.1.0. Definice

Lasalocid je inophorní antibiotikum (antikokcidikum), po chemické stránce sodná sůl 6-[7R-[5S-ethyl-5-(5R-ethyltetrahydro-5-hydroxy-6S-methyl-2H-pyran-2R-yl)tetrahydro-3S-methyl-2S-furanyl]-4S-hydroxy-3R,5S-dimethyl-6-oxonon-yl]-2-hydroxy-3-methylbenzoové kyseliny a je produkována Streptomyces lasaliensis; rozpustný v organických rozpouštědlech, LD₅₀ (mg/kg; 40 i.v.)

2.82.2.0. Chemikálie a zkušební pomůcky

2.82.2.1. Octan sodný trihydrát, CH₃COONa · 3 H₂O, M_r = 136,08

2.82.2.2. Kyselina octová, ρ = 1,05 g · cm⁻³, HPLC grade

2.82.2.3. Methanol, HPLC grade

2.82.2.4. Kyselina fosforečná, H₃PO₄ 85%, ρ = 1,71 g · cm⁻³

2.82.2.5. Pufr octanový: 6,804 octanu sodného (2.82.2.1.) se rozpustí v 900 ml vody a kyselinou octovou (2.82.2.2.) se upraví pH pod pH-metrem na hodnotu 4,5 a následně se upraví pH kyselinou fosforečnou (2.82.2.4.) na hodnotu pH 4,0, roztok se převede kvantitativně vodou do odměrné baňky na 1 000 ml, doplní vodou po značku a promíchá.

2.82.2.6. Mobilní fáze: V odměrné baňce na 1 000 ml se smíchá 220,0 ml pufru (2.82.2.5.) a přidá se po značku methanol (2.82.2.3.) (780 ml), vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní methanolem po značku a promíchá.

2.82.2.7. Lasalocid A, natriumsalz, C₃₄H₅₃O₈Na, M_r = 612,78, Riedel-deHaen, VETANAL, Cat. No-46371, čistota min. 98 %.

2.82.2.8. Základní roztok lasalocidu: Do odměrné baňky na 250 ml se naváží 0,05102 g standardní substance lasalocidu (2.82.2.7.), doplní methanolem po značku a promíchá (1 ml obsahuje 0,2 mg lasalocidu).

2.82.3.0. Pracovní postup

Při zpracování vzorku se vyhneme přehřátí vzorku během jeho homogenizace. Vzorek se homogenizuje na částice o velikosti 1,0 mm a menší. V případě, že se vzorek upravuje mletím, dbá se, aby nedocházelo k jeho přehřátí a kontaminaci z mlýnku. Homogenizace a úprava vzorku se provádí těsně před jeho extrakcí a dalším zpracováním, aby se zabránilo ztrátám lasalocidu. Vzorky a extrakty lasalocidu se nevystavují přímému slunečnímu světlu.

2.82.3.1. Extrakce

Do kónické baňky na 250 ml se zábrusem se naváží takové množství zkušebního vzorku, aby obsahoval asi 1 mg lasalocidu s přesností na 0,001 g (5 g pro premixy doplňkových látek, 15 g pro krmné směsi). Zkušební vzorek se přelije 100,0 ml methanolu (2.82.2.3.), baňka se uzavře zátkou a třepe se na laboratorní třepačce 30 minut. Po té se filtruje suchým skládaným filtrem do suché nádoby, přičemž prvních 5 ml se nepoužije.

2.82.3.1.1. Krmné směsi

Do varné baňky s kulatým dnem na 100 ml se pipetuje 10,0 ml extraktu, na rotačním vakuovém odpařovačce se odpaří obsah varné baňky k suchu při teplotě 55 °C a odparek se zalije 20 ml mobilní fáze (2.82.2.6.). Obsah baňky se promíchá a vytemperuje na laboratorní teplotu. Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (0,45 μm) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 2 minut při 3 500 ot/min. V případě stanovení nízkých obsahů lasalocidu se pipetuje až 50,0 ml a konečný objem se může snížit až na 10,0 ml mobilní fáze (2.82.2.6.).

2.82.3.1.2. Premixy doplňkových látek

Podle deklarovaného obsahu lasalocidu se extrakt získaný podle čl. 2.82.3.1. naředí mobilní fází (2.82.2.6.) na výslednou koncentraci 20 mg/l podle tabulky 1.

Tabulka 1. Ředění premixů doplňkových látek

Obsah [mg/kg]	Řednění	Způsob ředění [mg/kg]
do 1 000	2,5	10/25
od 1 000 do 5 000	12,5	2/25
od 5 000 do 10 000	25	1/25
od 10 000 do 20 000	50	0,5/25
od 20 000 do 40 000	100	0,5/50
více jak 40 000		na koncentraci 20 mg/l

Před nástřikem na chromatografickou kolonu se roztok filtruje přes membránový filtr (0,45 μm) nebo se odstředí na laboratorní odstředivce po dobu 2 minut při 3 500 ot/min.

2.82.3.2. Vlastní stanovení — metodou HPLC

Vlastní měření, jak kalibračních roztoků tak i extraktů zkušebních vzorků, se provádí za následujících separačních podmínek chromatografického systému:

Kolona: C₁₈ – reverzní fáze, NovaPak C₁₈, 4 µm, 150 × 3,9 mm (Waters)

Eluční roztok: viz 2.82.2.6 metody

Průtok: 1 ml/min.

Teplota: okolí

FF-detektor: EX: 320 nm EM: 419 nm

Objem nástřiku: 5 µl

RetTime: 7,4 min. (pro uvedenou kolonu)

RunTime: 14,0 minut (pro uvedenou kolonu)

2.82.4.0. Kalibrace

Do sady odměrných baněk na 50 ml se pipetuje 0,25 – 0,5 – 1,0 – 2,0 a 5,0 ml základního roztoku lasalocidu (2.82.2.8.), doplní mobilní fází (2.82.2.6.) po značku a promíchá. Takto naředěné pracovní roztoky odpovídají koncentraci 1,0 – 2,0 – 4,0 – 8,0 a 20,0 mg/l. Na chromatografickou kolonu se nanáší 5 µl pracovního roztoku. Z průměrných hodnot jim odpovídajících ploch píků se sestaví kalibrační křivka.

2.82.5.0. Výpočet

Obsah lasalocidu (X) vyjádřený v mg/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{c \cdot V \cdot R}{m_s}$$

kde c je koncentrace lasalocidu odečtená z kalibrační křivky v mg/l

V objem extraktu v ml

R ředění, resp. zakoncentrování

m_s hmotnost zkušebního vzorku v g

3.00 Vyhodnocení výsledků ověření

Jednotlivé výsledky paralelních stanovení (vždy dvě paralelní stanovení pro dílčí vzorek) použijeme k statistickému zpracování. U náhodně vybraného dílčího vzorku použijeme odděleně 4 paralelní stanovení k testu metody tj. k stanovení f-testu tabelovaného.

Výsledek ověření je posuzován jako homogenita partie.

Pro test homogenity vzorkované partie se odebere n_j dílčích vzorků a z každého z nich se vydělí dva zkušební vzorky, které se samostatně upraví a tím se získá n_j zkušebních vzorků. Z výsledků zkoušek x₁, x₂, x₃ až x_n se stanoví výraz:

$$C = \frac{1}{n_j - 1} \left[\sum_{i=1}^{n_j} x_i^2 - \frac{1}{n_j} \left(\sum_{i=1}^{n_j} x_i \right)^2 \right]$$

Materiál v jednotkách se považuje za homogenní pouze tehdy, když platí:

$$\frac{C}{\delta C^2} \leq F_{0,10} \quad (f_{0,10} = n_j, f_2 = n_c - 1)$$

kde F_{0,10} (f₁, f₂) jsou uvedeny v tabulkách.

Míchací zařízení se považuje za přesně míchající, pokud je prokázána homogenita sledované látky.

O z n á m e n í

**o odrůdách rostlin, které byly registrovány podle § 11 zákona č. 92/1996 Sb.
v období od 1. července 1996 do 14. března 1997**

Ve sloupcích jsou uvedeny následující údaje:

- 1 – identifikační číslo odrůdy
- 2 – žadatel (číslo, pod kterým jsou jméno a adresa žadatele uvedeny v seznamu na konci oznámení)
- 3 – zmocněný zástupce (číslo, pod kterým jsou jméno a adresa zmocněného zástupce uvedeny v seznamu na konci oznámení)
- 4 – název odrůdy
- 5 – označení odrůdy v řízení o registraci
- 6 – datum nabytí právní moci rozhodnutí v řízení o registraci

1	2	3	4	5	6
---	---	---	---	---	---

POLNÍ PLODINY

JEČMEN OZIMÝ

Hordeum vulgare L. sensu lato

HRV2828	0031	0271	Agrilo	LP 852354	26.02.1997
HRV2810	0292	0636	Babylone	CEBECO 88212	26.02.1997

JEČMEN JARNÍ

Hordeum vulgare L. sensu lato

HRV2916	0528	0223	Scarlett	3880 i	21.03.1997
HRV2921	0202		Tolar	HE-6037	21.03.1997

OVES

Avena sativa L.

AVS3050	0077	0451	Jumbo	NORD 78038	10.03.1997
---------	------	------	-------	------------	------------

PŠENICE OZIMÁ

Triticum aestivum L. emend. Fiori et Paol.

TTA2392	0172		Saskia	SG-S 352	26.09.1996
---------	------	--	--------	----------	------------

TRITIKALE OZIMÉ

XTriticosecale Wittm.

XTS2844	0385	0160	Disco	LAD 490	10.03.1997
---------	------	------	-------	---------	------------

ŽITO OZIMÉ

Secale cereale L.

SCC2815	0172		Selgo	SG-K 65	10.03.1997
---------	------	--	-------	---------	------------

KUKURICE*Zea mays L.*

ZEA3240	0428	0268	Antares	CGS-1100	21.03.1997
ZEA3108	0069	0645	Bojar	KX 3134	21.03.1997
ZEA3198	0329	0657	Carbest	MLC 2100	21.03.1997
ZEA3209	0196	Ceklad 235	CE-5193	21.03.1997	
ZEA3211	0196		Centis 350	CE-7192	21.03.1997
ZEA3164	0006	0493	Clarica	X 0902 H, 3893	21.03.1997
ZEA3165	0006	0493	Clarisia	X 1115, 3769	21.03.1997
ZEA3102	0069	0645	Compact (Syn.: Impact)	KX 2105	21.03.1997
ZEA3109	0069	0645	Dumas	KX 3135	21.03.1997
ZEA3148	0046	0196	Electra	SUM 9207 ST	21.03.1997
ZEA3228	0330	0258	Grundis	PAU-1A7	21.03.1997
ZEA3104	0069	0645	Icône	KX 2337	21.03.1997
ZEA3192	0447	0268	Magellan	NX-311	21.03.1997
ZEA3181	0177	0202	Maria	TA-20328	21.03.1997
ZEA3169	0006	0493	Marietta	X 1D11, 3907	21.03.1997
ZEA3171	0006	0493	Monessa	X 0852 G, 3905	21.03.1997
ZEA3091	0507	0258	Saldor	LG 22.34	21.03.1997
ZEA3214	0016	0282	Sesnord	Sesnord	21.03.1997
ZEA3173	0006	0493	Tirabella	X 1D31	21.03.1997
ZEA3174	0091	0172	Titus	Titus	21.03.1997
ZEA3106	0069	0645	KWS 200 (Syn.: Achat)	KX 2131	26.03.1997

POHANKA*Fagopyrum esculentum Moench.*

FGE3081	0615	0158	Jana	Jana	26.03.1997
---------	------	------	------	------	------------

FESTULOLIUM*Festulolium*

GHY2521	0201		Korina	HŽ-10 DK	10.03.1997
---------	------	--	--------	----------	------------

JÍLEK MNOHOKVĚTÝ ITALSKÝ*Lolium multiflorum Lam. ssp. italicum (A.B.R.) Volkart*

LLI2816	0201		Lubina	HŽ-3	26.03.1997
LLI2811	0147		Prolog	VV-1/89	26.03.1997

JÍLEK VYTRVALÝ*Lolium perenne L.*

LLP2453	0292	0636	Avenue	EEG 358	10.03.1997
LLP2535	0306	0160	Leon	Leon	21.03.1997

KOSTŘAVA ČERVENÁ*Festuca rubra L.*

FSR2556	0497	0171	Barlotte	Barlotte	10.03.1997
FSR2788	0292	0636	Center	Center	10.03.1997
FSR2450	0292	0636	Darwin	ERG 1141	10.03.1997
FSR2454	0292	0636	Herald	ERU 774	10.03.1997
FSR2455	0292	0636	Samanta	ERUT 786	10.03.1997
FSR2536	0306	0160	Olivia	Olivia	21.03.1997
FSR2537	0306	0160	Rufilla	Rifilla	21.03.1997

KOSTŘAVA OVČÍ*Festuca ovina L. sensu lato*

FSO2789	0292	0636	Valda	Valda	10.03.1997
FSO2529	0306	0160	Pintor	Pintor	21.03.1997

LIPNICE LUČNÍ*Poa pratensis L.*

PAP2557	0497	0171	Bartitia	Bartitia	10.03.1997
PAP2791	0292	0636	Julia	Julia	10.03.1997
PAP2456	0292	0636	Miracle	Ceb Pp 141	10.03.1997
PAP2558	0306	0160	Nimbus	Nimbus	21.03.1997

BOB*Vicia faba L.*

VCF2912	0031	0271	Aribo	Aribo	27.02.1997
VCF2515	0172		Merkur	SG-C 270	27.02.1997

HRÁCH*Pisum sativum L.*

PSS2940	0077	0223	Grana	2.1.1945	27.02.1997
— peluška:					
PSS3086	0025	0464	Livioletta	Livioletta	27.02.1997

JETEL PLAZIVÝ*Trifolium repens L.*

TFR2559	0497	0171	Barbian	Barbian	10.03.1997
TFR2560	0497	0171	Menna	Menna	10.03.1997

ŠTÍROVNÍK JEDNOLETÝ*Lotus orithopodioides L.*

LOT2942	0511		Junák	TB-8	10.03.1997
---------	------	--	-------	------	------------

LEN*Linum usitatissimum L.*

- olejný:

LNU3080	0556	0222	Atalante	Atalante	21.03.1997
---------	------	------	----------	----------	------------

- p ř a d n ý:

LNU3178	0557	0222	Raisa	VDB-171	21.03.1997
LNU3185	0557	0222	Viola	VDB-9301	21.03.1997

LNIČKA*Camelina sativa (L.) Crantz*

CMS3087	0025	0464	Lindo	Lindo	10.03.1997
---------	------	------	-------	-------	------------

ŘEPKA JARNÍ*Brassica napus L. var. napus*

BRN3110	0006	0493	Patriot	NS 0704	10.03.1997
---------	------	------	---------	---------	------------

ŘEPKA OZIMÁ*Brassica napus L. var. napus*

BRN2799	0697	0268	Apex	DIEN 90/7	10.03.1997
BRN2797	0329	0463	Bristol	MLCH 010	10.03.1997
BRN2808	0158	Oáza	OP-56	10.03.1997	
BRN2800	0697	0268	Rufus	EG 93/4	10.03.1997
BRN2779	0030	0451	Valesca	GSCH 427/23	10.03.1997
BRN2798	0024	0463	Zorro	NPZ 012	10.03.1997

SLUNEČNICE*Helianthus annuus L.*

HLA2956	0006	0493	Ameril	XF 425	10.03.1997
HLA3232	0330	0258	Angela	90-3	10.03.1997

HLA1682	0492	0258	LG 5410	L-HA 242/02	10.03.1997
HLA3216	0613	0271	Mastin	Mastin	10.03.1997
HLA3217	0006	0493	Natil	XF 315	10.03.1997
HLA1684	0434	0160	U-55 E (Syn.: Bambo)	U-55 E	10.03.1997

BRAMBOR

Solanum tuberosum L.

SLT3242	0294	0496	Bolesta	Bolesta	10.03.1997
SLT3199	0310	0151	Dali	Dali	10.03.1997
SLT2794	0311	0158	Felsina	Brunia 8037125	10.03.1997
SLT2947	0607	0151	Minerva	Minerva	10.03.1997
SLT3238	0311	0158	Morene	Morene	10.03.1997
SLT2883	0294	0496	Nikita	Nikita	10.03.1997
SLT3244	0294	0496	Producent	Producent	10.03.1997
SLT2884	0294	0496	Raja	Raja	10.03.1997
SLT3222	0311	0158	Remarka	Remarka	10.03.1997
SLT3202	0310	0151	Symfonia	Symfonia	10.03.1997
SLT3223	0216		Veronika	VE	249/510.03.1997

CUKROVKA

Beta vulgaris L. var. altissima Döll

BTA2221	0316	0500	Agrios	MK 871	27.02.1997
BTA3160	0016	0282	Eureka	S 1315	27.02.1997
BTA2965	0046	0180	Fox	STRU 1204	27.02.1997
BTA3193	0110	0482	Madeira	M 9306	27.02.1997
BTA3189	0016	0282	Melina	S 1323	27.02.1997
BTA3147	0279	0717	Orion	Orion	27.02.1997
BTA3235	0068	0498	Triumph	DEL 334 CZ	27.02.1997
BTA3195	0110	0482	Vegas	M 9328	27.02.1997

KAPUSTA KRMNÁ

Brassica oleracea L. convar. acephala (DC.) Alef. var. medullosa Thell. + var. viridis L.

BRM3394	0171		Zina	SE-507	26.03.1997
---------	------	--	------	--------	------------

ŘEPA KRMNÁ

Beta vulgaris L. var. crassa Mansf.

BTC3190	0016	0282	Bolero	Bolero	27.02.1997
---------	------	------	--------	--------	------------

BTC3154	0335	0499	Jamon	Jamon	27.02.1997
BTC3191	0016	0282	Kendo	SVB 127	27.02.1997

ZELENINY

BROKOLICE

Brassica oleracea L. convar. botrytis var. cymosa Duch.

BRY3540	0682	0140	Cezar	Cezar	25.01.1997
BRY3577	0299	0193	Flash	RS 901021	25.01.1997
BRY3617	0048	0473	Lord	Lord	25.01.1997

CELER

Apium graveolens L.

APG3578	0691	0136	Admiral	AX 94	25.01.1997
APG3579	0299	0193	Mentor	83-30	25.01.1997
APG3559	0112	0476	Snowwhite	Snowwhite	01.02.1997

CIBULE

Allium cepa L.

ALC3580	0299	0193	Alba Regina	RS 86 145	26.02.1997
ALC3659	0112	0476	Aragon	Aragon	26.02.1997
ALC3262	0064	0510	Ocean	Ocean	21.12.1996
ALC3247	0064	0510	Amigo	Amigo	21.12.1996
ALC3560	0278	0183	Corona	BGS 36	26.02.1997
ALC3093	0301	0268	Hilton	SG 1036	26.02.1997
ALC3501	0320	0231	Legio	Legio	26.02.1997
ALC3502	0320	0231	Macho	Macho	26.02.1997
ALC3503	0320	0231	Marco	Marco	26.02.1997
ALC3092	0301	0268	Sonesta	SG 1035	26.02.1997
ALC3693	0301	0268	Sturon	Sturon	26.02.1997

ČESNEK

Allium sativum L.

ALS3306	0239		Benátčan	SM-BV- VF	26.02.1997
---------	------	--	----------	-----------	------------

FAZOL

Phaseolus vulgaris L.

– keříčkový:

PHV3064	0048	0473	Asset	TBX 410	21.03.1997
---------	------	------	-------	---------	------------

PHV3065	0048	0473	Flo	TBX 412	21.03.1997
PHV0866	0298	0476	Maxidor	Maxidor	21.03.1997

FENYKL SLADKÝ

Foeniculum vulgare P. Mill. var. dulce

FNV3128	0552	0158	Precoce di Bologna	Precoce di Bologna	25.01.1997
---------	------	------	--------------------	--------------------	------------

HRÁCH

Pisum sativum L. (partim)

— dřeňový (*P. sativum L. convar. medullare Alef. emend. C.O. Lehm.*):

PSS3744	0058	0140	Ambassador	WAV F 505	01.02.1997
PSS3066	0048	0473	Combi Dual	TPX 453	01.02.1997
PSS3581	0299	0193	Marifon	82 RS 2254	01.02.1997
PSS3745	0058	0140	Premium	WAV 789	01.02.1997
PSS3067	0048	0473	Tristar	TPX 450	01.02.1997

— cukrový (*P. sativum L. convar. axiphium Alef. emend. C.O. Lehm.*):

PSS3531	0056	0510	Ambrosia	Ambrosia	01.02.1997
---------	------	------	----------	----------	------------

KADERÁVEK

Brassica oleracea L. var. acephala

BRL3545	0140		Kapral	NS 0794	25.01.1997
---------	------	--	--------	---------	------------

KAPUSTA HLÁVKOVÁ

Brassica oleracea L. convar. capitata var. sabauda L.

BRS3504	0320	0231	Primavoy	Primavoy	26.02.1997
BRS3505	0320	0231	Tarvoy	Tarvoy	26.02.1997

KAPUSTA RŮŽIČKOVÁ

Brassica oleracea L. convar. oleracea var. gemmifera DC.

BRG2643	0299	0193	Amoroso	RS 90111	01.02.1997
BRG3506	0320	0231	Content	Content	01.02.1997

KEDLUBEN

Brassica oleracea L. convar. acephala var. gongylodes (L.)

BRD3330	0140	Kartago	NS 0194	21.12.1996	
BRD3558	0278	0183	Kossak	Bejo 1577	21.12.1996
BRD3557	0278	0183	Korale	Bejo 1576	21.12.1996

KVĚTÁK*Brassica oleracea L. convar. botrytis var. botrytis L.*

BRB3436	0140		Agora	NS 12/95	01.02.1997
BRB1988	0315	0510	Carera	Carera	01.02.1997
BRB3561	0112	0476	Dominant	Dominant	01.02.1997
BRB3370	0313	0186	Elan	Elan	01.02.1997
BRB2775	0301	0268	Falcano	SG-4057	01.02.1997
BRB3584	0347	0136	Gipsy	CL 89	01.02.1997
BRB3618	0301	0268	Linero	SG 4006	01.02.1997
BRB3541	0682	0140	Rober	Rober	01.02.1997

MRKEV*Daucus carota L.*

DCC3585	0299	0193	Aloro	RS 882009	21.03.1997
DCC2994	0301	0268	Anglia	SG 778	21.03.1997
DCC3562	0112	0476	Bergamo	Bergamo	21.03.1997
DCC2761	0048	0473	Cartago	TCX 420	21.03.1997
DCC3297	0289	0558	Flakko	Flakko	21.03.1997
DCC3586	0347	0136	Junior	Junior	21.03.1997
DCC3546	0140		Korina	NS 0294	21.03.1997
DCC2567	0048	0473	Luxor	Luxor	21.03.1997
DCC3371	0313	0186	Magno	Magno	21.03.1997
DCC3507	0320	0231	Nanda	Nanda	21.03.1997
DCC3508	0320	0231	Nansen	Nansen	21.03.1997
DCC3563	0112	0476	Nasha	Nasha	21.03.1997
DCC3298	0289	0558	Parano	Parano	21.03.1997
DCC2762	0048	0473	Sultan	TCX 421	21.03.1997
DCC3299	0289	0558	Torini	Torini	21.03.1997
DCC3608	0649	0231	Turbo	Tezier S.A.	21.03.1997
DCC3587	0347	0136	Valor	Valor	21.03.1997

OKURKA*Cucumis sativus L.*

- nakládačka:

CCS3513	0320	0231	Tornado	NIZ 50-113	01.02.1997
---------	------	------	---------	------------	------------

— salátová:

CCS3332	0278	0183	Kalunga	Kalunga	21.12.1996
CCS3333	0505	0183	Lothar	Lothar	21.12.1996
CCS3329	0505	0183	Pontia	Pontia	21.12.1996
CCS3511	0320	0231	Radmila	Hana	21.12.1996
CCS3512	0320	0231	Serit	Serit	21.12.1996

PAPRIKA

Capsicum annuum L.

CPA3622	0475		Chronos	OL-203Rx308R	25.01.1997
CPA3334	0505	0183	Eagle	Eagle	25.01.1997
CPA3032	0475		Fantazia	OL-226RxOL CAR	25.01.1997
CPA3372	0196		Linda	CE-Fkn/95	25.01.1997
CPA3335	0505	0183	Luteus	Luteus	25.01.1997
CPA3072	0048	0473	Ranger	THX 495	25.01.1997
CPA3336	0505	0183	Sitia	Sitia	25.01.1997
CPA3619	0164	0256	Slovakia	KS 723	01.02.1997
CPA3031	0703		Věra	Le-813	01.02.1997

PETRŽEL

Petroselinum crispum (Mill.) Nym. ex A.W. Hill

— kořenová:

PTC3514	0140		Alba	NS 0594	27.02.1997
---------	------	--	------	---------	------------

— naťová:

PTC3548	0140		Astra	NS 0694	21.12.1996
---------	------	--	-------	---------	------------

PÓR

Allium porrum L.

ALP3549	0140		Albos	NS 1094	21.03.1997
ALP3588	0299	0193	Kilima	Kilima	21.03.1997
ALP3564	0278	0183	Laura	Bejo 1174	21.03.1997
ALP3660	0112	0476	Lavi	Lavi	21.03.1997
ALP3515	0320	0231	Pancho	Pancho	21.03.1997
ALP3516	0320	0231	Poriwin	Poriwin	21.03.1997
ALP3517	0320	0231	Porvite	NIZ 33-30	21.03.1997
ALP3859	0112	0476	Siegfried 2	Siegfried 2	21.03.1997
ALP3550	0140		Tango	NS 1194	21.03.1997
ALP3589	0299	0193	Varna	Varna	21.03.1997

RAJČE*Lycopersicon lycopersicum (L.) Karsten ex Farw.*

- keříčkové:

LYC3073	0048	0473	Brigade	TTX 460	21.12.1996
LYC3074	0048	0473	Centurion	TTX 461	21.12.1996
LYC3439	0239		Eskort	SM-133	21.12.1996
LYC3442	0239		Klára	SM-24	21.12.1996
LYC3437	0239		Meridor	SM-125	21.12.1996
LYC2898	0239		Minigold	SM-ŽD	21.12.1996
LYC3438	0239		Semamol	SM-127	21.12.1996
LYC3441	0239		Triton	SM-204	21.12.1996
LYC3440	0239		Věra	SM-2000	21.12.1996

- tyčkové:

LYC3609	0649	0231	Alambra	Alambra	22.12.1996
LYC3680	0301	0268	Delfine	F 244	22.12.1996
LYC3041	0056	0510	Iris	SMQ 157/93	22.12.1996
LYC3610	0649	0231	Paola	Paola	22.12.1996
LYC3444	0239		Tipo	SM-CxCoun	22.12.1996
LYC3446	0239		Toro	SM-CxTor	22.12.1996

ŘEDKEV*Raphanus sativus L. var. niger (Mill.) S. Kerner*

RPN3250	0718	0473	Okura Cross	Okura Cross	25.01.1997
---------	------	------	-------------	-------------	------------

ŘEDKVIČKA*Raphanus sativus L. var. radicola Pers.*

RPS1989	0315	0510	Desire	Desire	21.12.1996
RPS3342	0320	0231	Marabelle	Marabelle	21.12.1996
RPS3590	0299	0193	Novired	Novired	21.12.1996
RPS3373	0313	0186	Rondeel	Rondeel	21.12.1996
RPS3338	0505	0183	Tarzan	Tarzan	21.12.1996

ŘEPA SALÁTOVÁ*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris var. conditiva Alef.*

BTO3591	0299	0193	Nero	Detroit 5	26.02.1997
BTO3518	0320	0231	Tardel	Tardel	26.02.1997

SALÁT HLÁVKOVÝ*Lactuca sativa L.*

- hlávkový:

LCS1991	0315	0510	Barry	Barry	21.12.1996
LCS3353	0239		Deon	SM-TL	21.12.1996
LCS3354	0239		Faraon	SM-TP	21.12.1996
LCS3352	0239		Maraton	SM-TH	21.12.1996
LCS3343	0320	0231	Milly	Milly	21.12.1996
LCS3648	0301	0268	Mirian	L 8602	21.12.1996
LCS3520	0320	0231	Nancy	Nancy	21.12.1996
LCS3340	0505	0183	Stéphanie	Stéphanie	21.12.1996
LCS3344	0320	0231	Sunny	Sunny	21.12.1996
- ledový:					
LCS3339	0505	0183	Amulet	Saladin-Amulet	21.12.1996
LCS3551	0140		Tarzan	NS 0494	21.12.1996
- k řezu:					
LCS3519	0320	0231	Frisby	Frisby	21.12.1996

ŠPENÁT*Spinacia oleracea L.*

SPO3552	0058	0140	Ass	Ass	21.12.1996
SPO3345	0320	0231	Triptiek	Triptiek	21.12.1996

ZELÍ PEKINGSKÉ*Brassica pekinensis (Lour.) Rupr.*

BRP3527	0320	0231	Kasumi	Kasumi	26.03.1997
BRP3528	0320	0231	Kingdom 65	Kingdom 65	26.03.1997

OVOCNÉ DRUHY**ANGREŠT***Ribes uva-crispa L.*

RIU1453	0231		Chryso	LS-3/37	27.02.1997
RIU0626	0703		Kompakta	LE-59-8-38	27.02.1997
RIU1454	0231		Viking	LS-5/3	27.02.1997

HRUŠEŇ*Pyrus L.*

PYR0902	0231		Bohemica	TE-05316	01.02.1997
---------	------	--	----------	----------	------------

PYR0787	0231	Dicolor	TE-12-48-53	01.02.1997
PYR0888	0231	Jana	TE-H-169/73	01.02.1997

JABLOŇ

Malus Mill.

MAL1383	0231	Dione	TE-16664	01.02.1997
MAL1350	0231	Dulcit	TE-24286	01.02.1997
MAL2782	0231	Liberty	Liberty	01.02.1997
MAL1298	0578	Lotos	ÚEB-1720/3	01.02.1997
MAL1518	0578	Otava	ÚEB-1679/4	01.02.1997
MAL1520	0578	Rubinola	ÚEB-1822/1	01.02.1997
MAL1686	0578	Svatava	ÚEB-2059/7	01.02.1997
MAL1687	0578	Topaz	ÚEB-2355/2	01.02.1997
MAL0716	0231	Zuzana	HL-III-25-34	01.02.1997
MAL0904	0231	Delicia	TE-19222	27.02.1997
MAL0898	0231	Klára	HL-VIII-18/49	27.02.1997

JAHODNÍK

Fragaria L.

FRA1841	0263	0231	Andrea	BO-9-8-81	01.02.1997
---------	------	------	--------	-----------	------------

OKRASNÉ DRUHY

ASTRA ČÍNSKÁ

Callistephus chinensis (L.) Nees

0231	Anna	LY-JE-90	21.12.1996
------	------	----------	------------

JÍŘINKA

Dahlia Cav.

0568	Argo	HA-16/89	21.12.1996
0568	Canopus	HA-237/89	21.12.1996
0568	Dunaj	HA-149/92	21.12.1996
0568	Mládí	HA-227/89	21.12.1996
0568	Praha	HA-17/90	21.12.1996
0568	Úsvit	HA-254/89	21.12.1996
0568	Vega	HA-357/89	21.12.1996

MEČÍK*Gladiolus L.*

0568

Clio

HA-511/88

21.12.1996

0568

Lyra

HA-548/87

21.12.1996

LILIE*Lilium L.*

0568

Bohemia Čup

HA-I-244

21.12.1996

PELARGONIE PÁSKATÁ*Pelargonium-Zonale-Hybridae*

0242

Jarka

VÚOZ-55/1

21.12.1996

0242

Mirka

VÚOZ-220/1

21.12.1996

JMÉNA A ADRESY ŽADATELŮ A ZMOCNĚNÝCH ZÁSTUPCŮ

Kód:	Jméno:	Adresa:
0006	Pioneer Hi-Bred Intl.Inc.	6800 Pioneer Parkway, Box 316, Johnston, Iowa 50131, USA
0016	S.E.S. EUROPE N.V./S.A.	Industriepark 15, B-3300 Tienen, Belgie
0024	Norddeutsche Pflanzenzucht,	Hohenlieth, 24363 Holtsee, SRN Hans-Georg Lembke KG
0025	Deutsche Saatveredelung Lippstadt- Bremen GmbH zu Lippstadt	Postfach 1407, 59524 Lippstadt, SRN
0030	P.H. Petersen Saatzucht	Postfach 6, Post Langballig, 24976 Lundsgaard, SRN
0031	F. von Lochow-Petkus GmbH.	Postfach 1197, 29296 Bergen, SRN
0046	Fr. Strube Saatzucht KG	Postfach 13 53, 38358 Schöningen, SRN
0048	Asgrow GmbH	Luushardtstrasse 6, 76646 Bruchsal, SRN
0056	Saatzucht Quedlinburg GmbH	Postfach 13, 06472 Quedlinburg, SRN
0058	Van Waveren-Pflanzenzucht GmbH	Postfach 130, 37122 Rosdorf, SRN
0064	Agri-VanderHave GmbH	Postfach 1121, 35301 Grünberg (Hessen),SRN
0068	Delitzsch Pflanzenzucht GmbH	Postfach 1294, 29297 Bergen, SRN
0069	KWS Kleinwanzlebener Saatzucht AG	Grimsehlstr. 31, 37574 Einbeck, SRN
0077	NORDSAAT Saatzuchtgesellschaft mbH,	Hauptstrasse 1, 38895 Böhnshausen, SRN
0091	Südwestdeutsche Saatzucht, Dr. H.R.Späth	Im Rheinfeld 5, 76437 Rastatt, SRN
0110	Danisco Seed /Maribo/	P.O. Box 29, DK- 4960 Holeby, Dánsko
0112	Daenhfeldt A/S	Postbox 185, DK- 5100 Odense C, Dánsko
0136	BOHEMIASEED, spol. s r. o.	Jankovcova 18, 170 37 Praha 7
0140	MORAVOSEED, spol. s r. o.	692 01 Mikulov — Mušov
0147	Oseva UNI, a.s.	Na Bílé 1231, 565 14 Choceň
0151	MEDIPO AGRAS H.B., spol. s r. o.	Dobrovenského 2366, 580 01 Havlíčkův Brod
0158	OSEVA PRO, spol. s r. o.	Jankovcova 18, 170 37 Praha 7
0160	OSEVA AGRO Brno, a.s.	Přizová 8-10, 657 92 Brno
0164	SEMEX, Šlechtitel.-výzkumný podnik, š.p.	Výhonská 13, 835 08 Bratislava, Slovensko
0171	AGROGEN, spol. s r. o.	Zahradní 1a, 664 41 Troubsko
0172	SELGEN a.s.	Jankovcova 18, 170 37 Praha 7
0177	ZEAINVENT a.s.	Trstínská 1, 917 52 Trnava, Slovensko
0180	STRUBE-DIECKMANN ČR, spol. s r. o.	Ve Starém Lobečku 9, 278 01 Kralupy nad Vltavou
0183	BEJO BOHEMIA s.r.o.	Podůlský 49, 533 44 Staré Zdánice
0186	Ing. Ferdinand Hoffmann, CSc., Služby pro zemědělství	Stochovská 4, 161 00 Praha 6
0193	Ing. Milan Říha	Nuselská 42, 140 00 Praha 4
0196	CEZEA — šlechtitelská stanice, a.s.	696 14 Čejč

0201	Slechtitelská stanice Hladké Životice s.r.o.	742 47 Hladké Životice
0202	Plant Select s.r.o.	Hrubčice, 798 21 Bedihošť
0216	VESA Velhartice a.s.	341 83 Velhartice
0222	AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby s.r.o., Šumperk	Zemědělská 16, 787 01 Šumperk-Temenice
0223	MORSTAR, a.s.	Havlíčková 2787, 767 41 Kroměříž
023	Sempra Praha, a. s.	U topfren 2, 170 41 Praha 7
0239	SEMO s.r.o.	Smržice 414, 798 17 Smržice
0242	Výzkumný ústav okrasného zahradnictví Průhonice	252 43 Průhonice u Prahy
0256	SEVA-FLORA s.r.o.	Mikulovská 366, 691 42 Valtice
0258	AGRISERVIS, spol. s r. o.	P.O.Box 191, 760 01 Zlín
0263	Výzkumný ústav ovocných a okrasných dřevin	Červenej armády 53, 972 01 Bojnice, Slovensko
0268	Hillesbög NK Semčice — spol. s r. o.	Semčice 137, 294 46 Semčice
0271	SELEKTA a.s.	Jankovcova 18, 170 37 Praha 7
0278	BEJO Zaden BV	P.O.Box 50, 1749 ZH Warmenhuizen, Nizozemsko
0279	D.J. Van der Have B.V.	P.O.Box 1, 4420AA Kapelle, Nizozemsko
0282	AROS-OSIVA s.r.o.	Kubišova 8/1265, 182 00 Praha 8
0289	Nunhems Zaden B. V.	P.O.Box 4005, 5250 AA Haelen, Nizozemsko
0292	Cebeco Zaden B.V.	P.O.Box 10000, 5250 GA Vlijmen, Nizozemsko
0294	Agrico Holland	P.O.Box 70, 8300 AB Emmeloord, Nizozemsko
0298	POP Vriend B.V.	P.O.Box 5, 1619 ZG Andijk, Nizozemsko
0299	Royal Sluis BV	P.O.Box 22, 1600 AA Enkhuizen, Nizozemsko
0301	Sluis & Groot	P.O.Box 26, 1600 AA Enkhuizen, Nizozemsko
0306	Zelder B.V.	P.O. Box 26, 6590 AA Gennep, Nizozemsko
0310	De Z.P.C.	P.O.Box 385, 8901 BD Leeuwarden, Nizozemsko
0311	Hettema Zonen Kweekbedrijf B.V.	P.O.Box 99, 8300 AB Emmeloord, Nizozemsko
0313	Rijk Zwaan BV	2678 ZG De Lier, Nizozemsko
0315	Leen de Mos Groentezaden	Postbus 54, 2690 AB's-Gravenzande, Nizozemsko
0316	Kuhn & Co.International B.V.	Post Box 99, 5250 AB Vlijmen, Nizozemsko
0320	Nickerson Zwaan B.V.	Postbus 19, 2990 AA Barendrecht, Nizozemsko
0329	Semences Cargill	Croix de Paradies, B.P. 21, 40305 Peyrehorade, Francie
0330	Coop de Pau Semences	Ave. Gaston Phoebus, 64230 Lescar, Francie
0335	Ets Florimond Desprez, Veuve et Fils	B.P. 41, 59242 Cappelle-en-Pévèle, Francie
0347	Clause Semences	24, boulevard Pierre Brossolette, 91221 Brétigny-sur-Orge Cédex, Francie
0373	Nickerson Seeds Ltd.	Rothwell, Lincoln LN7 6DT, Velká Británie

0385	DANKO Hodovňa Roslin Sp. z.o.o.	Choryn, 64-005 Racot, Polsko
0428	CIBA GEIGY AG, Seeddivision	CH-4002 Basel, Švýcarsko
0434	Gabonatermesztési Kutató Intézet	P.O.B. 391, H-6701 Szeged, Maďarsko
0447	Hilleshög AB	Box 302, S - 26 123 Landskrona, Švédsko
0451	Ing. Vladimír Schiller Ruská 2, 612 00 Brno	
0463	Svaz pěstitelů a zpracovatelů olejnin Praha	Jankovcova 18, 170 37 Praha 7
0464	NOVUM SEEDS s.r.o.	Jankovcova 18, 170 00 Praha 7
0473	REPROSAM, spol. s r. o.	Revoluční 13, 110 00 Praha 1
0475	LIBERA, Ing. Jifina Teclová	Vrbka 35, Krásné Pole, 725 26 Ostrava
0476	AGROTRANS Pardubice s.r.o.	Rokytno 134, 533 22 Býšť
0482	Ing. Josef Vaňát	Pohoff 184, 518 01 Dobruška
0492	Limagrain Genetics, Grandes Cultures SA	B.P. 2 - Z.A. Les Pains, 49320 Les Alleuds, Francie
0493	Pioneer Saaten GmbH, spol. s r. o., organizační složka	Jana Opletala 1279, 690 02 Břeclav
0496	Agrico Holland - organiz. jednotka	Jankovcova 18, 170 37 Praha 7
0497	BARENBRUG Holland B.V.	P.O.Box 4, 6678 ZG Oosterhout, Nizozemsko
0498	Ing. Josef Vrabec	Kotorská 1578/36, 140 00 Praha 4
0499	Francotcheque Agricole spol. s r. o.	Sadová 242, 294 41 Dobruška
0500	SAATBAU LINZ ČR s.r.o.	Zdětín 31, 294 71 Benátky nad Jizerou
0505	Enza Zaden BV	Postbox 7, 1600 AA Enkhuizen, Nizozemsko
0507	Limagrain Semences	B.P. 1, 63720 Chappes, Francie
0510	Ing. Karel Skřivánek	Pražská 895, 289 12 Sadská
0511	Výzkumný ústav pícninářský Troubsko, spol. s r. o.	Zahradní 1, 664 41 Troubsko
0528	Saatzucht J. Breun GdbR	Amselweg 1, 91074 Herzogenaurach, SRN
0549	Nordösterreichische Saatbaugenossenschaft	Meires 25, 3841 Windigsteig, Rakousko
0552	SATIVA - Soc. Coop.	Via Madonna Dello Schioppo No. 415, 47023 Cesena, Itálie
0556	Union des Coopératives Agricoles de Semences de Lile-de-France	Place de la Gare, 478490 Méré, Francie
0557	VAN DE BILT - MAISADOUR e.e.s.v.	Postbus 16, 4540 AA Sluiskil, Nizozemsko
0558	Firma PASIČ	Dolní Životice 175, 747 56 Opava
0568	Bohemia Bulbs, Šlechtitelská stanice	538 03 Heřmanův Městec
0578	Ústav experimentální botaniky AV ČR	Na Karlovce 1, 160 00 Praha 6 - Dejvice
0607	DEN HARTIGH BV	P.O.Box 3, 8300 AA Emmeloord, Nizozemsko
0613	MYCOGEN CORPORATION, International Division	Z. I. du Haut Ossau, BP 42, 64121 Serres-Castet, Francie
0615	Kamjanec-podolskij selskogospodarskij institut	Ševčenka 13, 281900 Kamjanec, Chmelnická oblast, Ukrajina

0636	Cebeco Seeds s. r. o.	Podedvorská 755/5, 198 00 Praha 14
0645	Ing. Jaroslava Sácká	Dyjákovičky 92, 671 23 Chvalovice
0649	Tezier S.A.	Rue Louis Saillant — B.P.83, 26802 Portes-les-Valence Cedex, Francie
0657	Ing. Peter Kováčik	Pod Fialkou 2734/8, 150 00 Praha 5 — Smíchov
0682	Przedsiębiorstwo Nasiennictwa Ogrodniczego i Szkółkarstwa	ul. Zeromskiego 3, 05-850 Ożarów Mazowiecki, Polsko
0691	agro-TIP Handels- u. Consultingges. mbH	Am Toberbusch 7, 21255 Tost lt, SRN
0697	Hilleslöh GmbH	Postfach 3264, 32076 Bad Salzungen, SRN
0703	Mendlova zemědělská a lesnická univerzita	Zemědělská 1, 613 00 Brno
0717	Ing. Markéta Majorová	Boženy Němcové 752, 584 01 Ledec nad Sázavou
0718	SAKATA, Sakata Seed Europe B.V.	Kruisemuntweg 27, 1435 DD Rijsenhout, Nizozemsko

Ministerstvo zemědělství ČR
Vrchní ředitel sekce zemědělské
Ing. František Havří, v. r.

Zásady regulace trhu jatečného skotu v roce 1997

V souladu s § 5 odst. 1 písm. b) a c) zákona č. 472/1992 Sb. o Státním fondu tržní regulace v zemědělství (dále jen „Fond“), ve znění zákona č. 10/93 Sb. a zákona č. 242/95 Sb. a v návaznosti na čl. 7, odst. 2, písm. b) Statutu Fondu, schváleného usnesením vlády ČR č. 128/96, vydává Rada Fondu tyto zásady regulace trhu jatečného skotu v roce 1997 (dále jen „Zásady“):

1. Regulace trhu jatečného skotu řeší nadprodukcí jatečného skotu formou subvencovaného vývozu jatečných zvířat, hovězího masa a vybraných masných výrobků.
2. O subvenci se mohou ucházet subjekty, které budou mít k datu uzávěrky příjmu přihlášek do výběrového řízení pro subvencovaný vývoz:
 - vypořádány veškeré závazky vůči zemědělským producentům tak, že tyto závazky nejsou starší než 30 dnů,
 - vyrovnány závazky, vyplývající z daňové soustavy, dle lhůty jejich splatnosti,
 - vyrovnány splatné závazky vůči Fondu národního majetku, Pozemkovému fondu, Státnímu fondu tržní regulace v zemědělství, Podpůrnému a garančnímu rolnickému a lesnickému fondu.

Splnění těchto požadavků bude účastník regulace trhu dokladovat formou čestného prohlášení svého statutárního orgánu.

3. Podmínky pro poskytnutí subvencí na vývoz jatečného skotu:

- a) Subvence bude poskytnuta na vývoz výše uvedených výrobků v přepočtu na nejvýše 10 000 tun živé hmotnosti jatečného skotu.
- b) Termín ukončení vývozu je stanoven na 31. července 1997.

- c) Do regulace trhu budou zařazeny následující kategorie jatečného skotu: jateční býci tř. A1, jatečné jalovice tř. A1 a jatečné krávy tř. A1. Průměrná nákupní hmotnost se u jatečných býků stanovuje nejméně na 480 kg, u jatečných jalovic nejméně na 420 kg a u jatečných krav nejméně na 450 kg, přičemž srážka na nakrmenost může činit nejvýše 10 %.

- d) Podmínkou pro poskytnutí subvence je skutečnost, že vývozce do 21 dnů ode dne nákupu vyplatí chovatelům minimální (garantované) ceny v dodací paritě fco chovatel takto:

– za jatečné býky jakostní tř. A1 ve výši	35,00 Kč/kg živé hmotnosti
– za jatečné jalovice jakostní třídy A1 ve výši	32,50 Kč/kg živé hmotnosti
– za jatečné krávy jakostní třídy A1 ve výši	26,00 Kč/kg živé hmotnosti.

- e) Přebytky jatečného skotu budou řešeny, v návaznosti na § 2, odst. 2, písm. d) zákona č. 472/92 Sb. ve znění pozdějších předpisů, i formou subvencovaného vývozu hovězího masa a vybraných masných výrobků a to v objemu, který představuje množství jatečných zvířat zpracovaných na tyto výrobky.

- f) V případě subvencovaného vývozu uskutečněného v masě se hmotnost kompenzovaných hovězích čtvrtí bude přepočítávat na živou hmotnost jatečného skotu koeficientem takto:

– kompenzované hovězí čtvrtě z býků a jalovic zchlazené	1,92
– kompenzované hovězí čtvrtě z býků a jalovic zmrazené	1,96
– kompenzované hovězí čtvrtě z krav zchlazené	2,05
– kompenzované hovězí čtvrtě z krav zmrazené	2,09.

- g) V případě subvencovaného vývozu vybraných masných výrobků se stanovuje přepočítávací koeficient na živou hmotnost jatečného skotu takto:

– hovězí maso bez kosti z býků v kartonech zmrazené	2,60
– hovězí maso bez kosti z jalovic a krav v kartonech zmrazené	2,77
– hovězí konzervy ve vlastní šťávě	2,63.

- h) Subvence bude poskytnuta na základě smlouvy uzavřené mezi Fondem a vývozcem za předpokladu, že vývozce předloží Fondu:
 - doklad o nákupu živých jatečných zvířat s uvedením kategorie, počtu kusů a celkové hmotnosti v kg;
 - výpis z bankovního účtu, kterým bude doloženo, že do 21 dnů ode dne nákupu byla chovateli vyplacena nejméně minimální (garantovaná) cena. Podmínka vyplacení nejméně minimální (garantované) ceny je platná rovněž pro příslušné množství jatečných zvířat jako suroviny pro hovězí maso a vybrané masné výrobky, které byly vyvezeny;
 - celní doklad svědčící o tom, že zboží v uvedeném sortimentu a množství bylo vyvezeno (JCD).

4. Rozhodujícím kritériem pro výběr účastníka regulace, který bude pověřen subvencovaným vývozem, je návrh čerpání finančních prostředků v přepočtu na 1 kg živé nákupní hmotnosti.
5. Pokud celkové množství jatečného skotu v součtu závazných přihlášek na subvencovaný vývoz převyší množství schválené Radou Fondu, budou jednotlivé požadavky poměrným způsobem na úroveň tohoto množství zkráceny.
6. Dodávky do Slovenské republiky v rámci celní unie nejsou – pro účely regulace trhu formou subvencovaného vývozu – považovány za vývoz.

Ing. Josef Lux

místopředseda vlády ČR, ministr zemědělství a předseda Rady Fondu

Doplňěk č. 1

zásad výběrového řízení právnických a fyzických osob pro intervenční nákupy, vývoz nebo prodej výrobků zařazených do regulace trhu

Bod 4. se zrušuje.

Body 5. až 11. se mění na body 4. až 10.

Ustanovení bodu 4. (dříve 5.), písm. b), g) a h) se mění následovně:

- Bod 4. b) platný výpis z obchodního rejstříku a v případě dodatečného požadavku výkonného aparátu SFTR následně i úředně ověřený aktuální seznam společníků nebo úředně ověřený aktuální seznam většinových akcionářů společnosti, případně další potřebné doklady.
- Bod 4. g) čestné prohlášení, že k datu uzávěrky výběrového řízení nemá subjekt závazky vůči zemědělským dodavatelům starší 30 dnů, nebo má tyto závazky vyrovnány tak, jak určují platné zásady regulace trhu příslušné komodity, schválené pro dané období Radou SFTR.
- Bod 4. h) čestné prohlášení o vyrovnání závazků vůči státu (daně, Fond národního majetku, Pozemkový fond, SFTR, PGRLF atd.) splatných k datu uzávěrky výběrového řízení.

Jako bod 11. se nově vkládá následující ustanovení:

V případě zjištění, že vybraný subjekt nesplnil podmínky, vyplývající z příslušných ustanovení těchto zásad, nebo že neplní podmínky, určené zásadami regulace trhu příslušné komodity, které jsou platné pro období, kdy došlo k jejich porušení, bude vůči němu postupováno v souladu s příslušnými opatřeními smluvních sankcí. Zároveň bude do doby splnění smluvních sankcí vyřazen z regulace trhu. Pokud se podaří prokázat spojování podniků ve smyslu § 8, odst. (1), písm. a) a b) a § 8, odst. (2), písm. a) a b) zákona č. 63/1991 Sb. ve znění pozdějších předpisů, nebude žádný z takto spojených subjektů, který se zúčastňuje regulačních opatření SFTR, do doby uhrazení uplatněných smluvních sankcí nadále do regulace trhu zařazován.

Ing. Josef Lux
místopředseda vlády ČR
ministr zemědělství a předseda Rady SFTR

V Praze dne 18. 4. 1997

OZNÁMENÍ

Ministerstvo zemědělství České republiky, odbor vodního hospodářství
v souladu se Zásadami organizace a řízení technické normalizace ve vodním hospodářství
v působnosti Ministerstva zemědělství ČR (č.j.: 516/95-430)
oznamuje
schválení a vydání odvětvových technických norem vodního hospodářství:

- TNV 75 01 44 Terminologie pozemkových úprav
- TNV 75 25 02 Úpravy potoků
Norma nahradí ČSN 73 68 23
- TNV 75 41 02 Pedologický průzkum pro meliorační opatření na zemědělských půdách
Základní ustanovení
- TNV 75 41 12 Hydrogeologický průzkum pro meliorace a zemědělské užívání krajiny
Norma nahradí ON 73 69 22
- TNV 75 49 22 Údržba odvodňovacích zařízení
Norma nahradí ON 73 69 30
- TNV 75 49 31 Provozní řády závlah
Norma nahradí ON 73 69 58
- TNV 75 49 33 Údržba závlahových zařízení
Norma nahradí ON 73 69 55
- TNV 75 49 34 Provoz a údržba závlahových čerpacích stanic
Norma nahradí ON 73 69 57
- TNV 75 52 91 Vodárenské filtrační píský
- TNV 75 59 40 Mikroskopické posuzování separační účinnosti vodárenské technologie
- TNV 75 66 11 Stanovení oxigenační kapacity aeračního zařízení. Stanovení v čisté vodě
- TNV 75 66 13 Navrhování aeračních systémů čistění odpadních vod. Pneumatická aerace
- TNV 75 66 14 Navrhování aeračních systémů čistění odpadních vod. Mechanická aerace
- TNV 75 77 41 Mikrometoda stanovení toxicity a trofického potenciálu řasovým testem.

Tisk a distribuci TNV zabezpečuje Hydroprojekt, a. s., Odvětvové normalizační středisko, Tábořská 31, 140 43 Praha 4.

Ministerstvo zemědělství ČR
ředitel odboru vodního hospodářství
Ing. Jan Plechatý, v. r.