

## PRILOGA 2

Za inšpekcijski nadzor in monitoring se uporabljajo naslednje analizne metode:

1. Metoda 1 Določanje vlage
2. Metoda 2 Določanje vlage v rastlinskih in živalskih maščobah in oljih
3. Metoda 3 Določanje vsebnosti surovih beljakovin
4. Metoda 4 Določanje vsebnosti surovih beljakovin, topnih v pepsinu in klorovodikovi kislini
5. Metoda 5 Določanje aktivnosti pepsina
6. Metoda 6 Določanje hlapnih dušikovih baz
7. Metoda 7 Določanje sečnine
8. Metoda 8 Določanje surovih olj in maščob
9. Metoda 9 Določanja surovih vlaknin
10. Metoda 10 Določanje škroba
11. Metoda 11 Določanje surovega pepela
12. Metoda 12 Določanje pepela, netopnega v klorovodikovi kislini
13. Metoda 13 Določanje klora iz kloridov
14. Metoda 14 Določanje kalija
15. Metoda 15 Določanje natrija
16. Metoda 16 Določanje kalcija
17. Metoda 17 Določanje magnezija
18. Metoda 18 Določanje celotnega fosforja
19. Metoda 19 Določanje železa, bakra, mangana in cinka v sledovih
20. Metoda 20 Določanje karbonatov

21. Metoda 21 Določanje laktoze
22. Metoda 22 Določanje sladkorja
23. Metoda 23 Ocena aktivnosti ureaze v izdelkih iz soje
24. Metoda 24 Določanje aminokislin
25. Metoda 25 Določanje triptofana
26. Metoda 26 Določanje vitamina A
27. Metoda 27 Določanje vitamina E
28. Metoda 28 Določanje cink bacitracina
29. Metoda 29 Določanje virginiamicina
30. Metoda 30 Določanje tilozina
31. Metoda 31 Določanje flavofosfolipola z difuzijo na agarnem gojišču
32. Metoda 32 Določanje avoparcina z difuzijo na agarnem gojišču
33. Metoda 33 Določanje natrijevega monenzina z difuzijo na agarnem gojišču
34. Metoda 34 Določanje spiramicina z difuzijo na agarnem gojišču
35. Metoda 35 Določanje halofuginona
36. Metoda 36 Določanje robenidina
37. Metoda 37 Določanje metilbenzokvata
38. Metoda 38 Določanje olakvindoksa
39. Metoda 39 Določanje amprola
40. Metoda 40 Določanje diklaurila
41. Metoda 41 Določanje karbadoksa
42. Metoda 42 Določanje natrijevega lasalocida
43. Metoda 43 Določanje cianovodikove kisline
44. Metoda 44 Določanje vsebnosti prostega in skupnega gosipola
45. Metoda 45 Določanje aflatoksina B<sub>1</sub>
46. Metoda 46 Zahteve za mikroskopsko odkrivanje ali oceno sestavin živalskega izvora v krmi
47. Metoda 47 Metoda vzorčenja za uradni nadzor vrednosti dioksinov (PCCD/PCDF) in določanje dioksinom podobnih PCB-jev v nekaterih vrstah krme in priprava vzorcev in zahteve za analizne metode, uporabljene pri uradnem nadzoru vrednosti dioksinov (PCCD/PCDF) ter določanje dioksinom podobnih PCB-jev v nekaterih vrstah krme

## **METODA 1\***

### **DOLOČANJE VLAGE**

#### **1. Namen in področje uporabe**

Z opisano metodo določamo vsebnost vlage v krmi. Ne pokriva analize mlečnih proizvodov kot posamičnih krmil, analize mineralnih snovi in mešanic, sestavljenih predvsem iz mineralnih snovi, analize živalskih in rastlinskih maščob in olj ali analize oljnih semen in oljnatega sadja, določenega v Uredbi Sveta 136/66/EGS z dne 22. septembra 1966 o vzpostavitvi skupne ureditve trga olj in maščob (UL L št. 127, z dne 30.9. 1966, str. 3025; z vsemi spremembami).

Določanje vsebnosti vlage oljnih semen in oljnatega sadja je opisano v Prilogi III k Uredbi Komisije 1470/68/EGS z dne 23. septembra 1968 o jemanju in zmanjševanju vzorcev in določanju vsebnosti olj, nečistoč in vlage v oljnih semenih (UL L št. 239, z dne 28.9. 1968, str. 2 z vsemi spremembami).

#### **2. Princip**

Vzorec osušimo pri določenih pogojih, ki se spreminjajo glede na naravo krme. Izgubo mase določimo s tehtanjem. Pri trdni krmi z visoko vsebnostjo vlage moramo izvesti predhodno sušenje.

#### **3. Oprema**

3.1 Drobilec iz materiala, ki ne absorbira vlage, ki se lahko čisti, omogoča hitro in enakomerno drobljenje brez pregretja, preprečuje, kolikor je mogoče, stik z zunanjim zrakom in ustreza zahtevam, določenim v 4.1.1 in 4.1.2 (npr. udarni ali vodno hlajeni mikrodrobilci, konusni mlini, počasni drobilniki ali drobilniki na zobata kolesa).

3.2 Analitska tehtnica s točnostjo do 0,5 mg.

3.3 Suhi tehtiči iz nerjaveče kovine ali stekla s pokrovi, ki omogočajo nepredušno zapiranje; delovna površina, ki omogoča razprostrtje vzorca na približno 0,3 g/cm<sup>2</sup>.

3.4 Električno ogrevan izotermičen sušilnik ( $\pm 1^\circ \text{C}$ ), ki je primerno ventiliran in omogoča hitro uravnavanje temperature.<sup>1</sup>

3.5 Nastavljiv električno ogrevan vakuumski sušilnik z vgrajeno oljno črpalko in mehanizmom ali za dovajanje suhega vročega zraka ali sušilnega sredstva (npr. kalcijevega oksida).

3.6 Eksikator z debelo kovinsko ali porcelansko perforirano ploščo, ki vsebuje učinkovito sušilno sredstvo.

#### 4. Postopek

Opomba: Postopke, opisane v tem delu, moramo izvajati takoj po odpiranju posod z vzorci. Analizo moramo izvajati najmanj v dveh vzporednih določitvah.

##### 4.1 Priprava

###### 4.1.1 Krma, razen pod 4.1.2 in 4.1.3

Vzamemo najmanj 50 g vzorca. Po potrebi ga zdrobimo in razdelimo tako, da preprečimo spremembo vsebnosti vlage (glej 6).

###### 4.1.2 Žita in zdrob

Vzamemo najmanj 50 g vzorca. Zdrobimo ga tako, da najmanj 50 % delcev preide skozi sito z odprtini velikosti 0,5 mm in jih bo na situ z okroglimi odprtini velikosti 1 mm preostalo največ 10 %.

###### 4.1.3 Tekoča ali kašasta krma, krma, sestavljena predvsem iz olj in masti

Približno 25 g vzorca natehtamo s točnostjo 10 mg, dodamo primerno količino brezvodnega peska, stehtanega s točnostjo 10 mg in mešamo, da dobimo homogeno maso.

##### 4.2 Sušenje

###### 4.2.1 Krma, razen pod 4.2.2 in 4.2.3

Stehtamo posodo (3.3) s pokrovom s točnostjo 0,5 mg. V stehtano posodo natehtamo 5 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga enakomerno porazdelimo. Posodo brez pokrova postavimo v sušilnik, segret na  $103^\circ \text{C}$ . Da temperatura v sušilniku ne bi padla, moramo posodo postaviti v sušilnik čim hitreje. Sušimo štiri ure od časa, ko je temperatura v peči ponovno  $103^\circ \text{C}$ . Posodo pokrijemo s pokrovom, vzamemo iz peči, ohlajamo 30 do 45 minut v eksikatorju (3.6) in stehtamo s točnostjo 1 mg.

Krmo, sestavljeno predvsem iz olj in masti, sušimo v peči nadaljnjih 30 minut pri  $130^\circ \text{C}$ . Razlika med tehtanjema ne sme presežati 0,1 % vlage.

###### 4.2.2 Žita, moka, zdrob in grobo mleto moka

Stehtamo posodo (3.3) s pokrovom s točnostjo 0,5 mg. V stehtano posodo natehtamo 5 g zdrobljenega vzorca s točnostjo 1 mg in ga enakomerno porazdelimo. Posodo brez pokrova postavimo v sušilnik, segret na  $130^\circ \text{C}$ . Da temperatura v sušilniku ne bi padla, moramo posodo čimprej postaviti v sušilnik. Sušimo dve uri od časa, ko je temperatura v sušilniku ponovno  $130^\circ \text{C}$ . Posodo pokrijemo s pokrovom, vzamemo iz sušilnika, ohlajamo 30 do 45 minut v eksikatorju (3.6) in stehtamo s točnostjo 1 mg.

4.2.3 Krmne mešanice, ki vsebujejo več kot 4 % saharoze ali laktoze: posamična krmila, kot so rožiči, hidrolizirani žitni proizvodi, fermentirana semena, posušena mleto pesa, ribe in raztopine sladkorja; krmne mešanice, ki vsebujejo več kot 25 % mineralnih soli, vključno s kristalno vodo.

Stehtamo tehtič (3.3) s pokrovom s točnostjo 0,5 mg. V stehtan tehtič natehtamo 5 g vzorca s točnostjo 1 mg natančno in ga enakomerno porazdelimo. Tehtič postavimo brez pokrova v vakuumski sušilnik (3.5), segret na  $80^\circ \text{C}$  do  $85^\circ \text{C}$ . Da temperatura v sušilniku ne bi preveč padla, moramo posodo čim hitreje postaviti v sušilnik.

Tlak naj naraste do 100 torov in pri tem tlaku naj se suši štiri ure, na vročem suhem zraku ali s sušilnim sredstvom (okoli 300 g za 20 vzorcev). V takem primeru odklopimo vakuumsko črpalko, ko je dosežen predpisani tlak. Čas sušenja računamo od trenutka, ko je temperatura v peči ponovno  $80\text{--}85^\circ \text{C}$ . Tlak v peči previdno izenačimo z zračnim tlakom. Sušilnik odpremo, tehtič takoj pokrijemo s pokrovom, vzamemo iz peči, pustimo 30 do 45 minut v eksikatorju (3.6), da se ohladi, in stehtamo s točnostjo 1 mg. Sušimo še 30 minut v vakuumskem sušilniku pri  $80^\circ \text{C}$  do  $85^\circ \text{C}$  in ponovno stehtamo. Razlika med dvema tehtanjema ne sme presežati 0,1 % vlažnosti.

---

<sup>1</sup> Za sušenje žita, moke, zdroba in grobo mleto moka mora imeti sušilnik takšno toplotno kapaciteto, da se bo, ko je predhodno nastavljen na  $131^\circ \text{C}$ , vrnil na to temperaturo v manj kot 45 minutah, potem ko je bilo vanj na sušenje hkrati postavljeno največje možno število vzorcev. Ventilacija mora biti takšna, da se, ko se v njej dve uri suši največje možno število vzorcev pšenice, rezultati razlikujejo za manj kot 0,15% od tistih, ki so bili sušeni 4 ure.

#### 4.3 Predhodno sušenje

##### 4.3.1 Krma, razen pod 4.3.2

Trdna krma z visoko vsebnostjo vlage, ki jo je težko drobiti, mora biti predhodno sušena na naslednji način:

V primerno posodo (npr. aluminijast krožnik 20 × 12 cm z robom 0,5 cm) natehtamo 50 g nezdrobljenega vzorca s točnostjo 10 mg natančno (stisnjeno ali zgoščeno krmo po potrebi lahko na grobo razdelimo). V sušilniku sušimo pri temperaturi od 60° C do 70° C, dokler se vsebnost vlage ne zniža na 8 % do 12 %. Vzamemo iz sušilnika, eno uro ohlajamo v laboratoriju v odkriti posodi in stehtamo s točnostjo 10 mg. Takoj zdrobimo, kakor je navedeno v 4.1.1, in osušimo, kakor je navedeno v 4.2.1 ali 4.2.3, glede na vrsto krme.

##### 4.3.2 Žita

Žita z vsebnostjo vlage nad 17 % morajo biti predhodno sušena na naslednji način:

V primerno posodo (npr. aluminijast krožnik 20 × 12 cm z robom 0,5 cm) natehtamo 50 g nezdrobljenega žita s točnostjo 10 mg. Sušimo 5 do 7 minut v sušilniku pri 130° C. Vzamemo iz sušilnika, dve uri ohlajamo v laboratoriju v odkriti posodi in stehtamo s točnostjo 10 mg. Takoj zmeljemo, kakor je navedeno v 4.1.2, in osušimo, kakor je navedeno v 4.2.2.

### 5. Izračun rezultatov

Vsebnost vlage, izražene kot odstotni masni delež v vzorcu, izračunamo z naslednjo formulo:

#### 5.1 Sušenje brez predhodnega sušenja

$$(E - m) \cdot 100 / E$$

pri čemer je:

E = začetna masa preskusnega vzorca v gramih,

m = masa suhega preskusnega vzorca v gramih.

#### 5.2 Sušenje s predhodnim sušenjem

$$[(M' - m)M / M'] + E - M] \cdot 100 / E = (1 - Mm / EM')$$

pri čemer je:

E = začetna masa preskusnega vzorca v gramih,

M = masa preskusnega vzorca po predhodnem sušenju v gramih,

M' = masa preskusnega vzorca po drobljenju ali mletju v gramih,

m = masa suhega preskusnega vzorca v gramih.

#### 5.3 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presežati 0,2 % vlage.

### 6. Opomba

Če se izkaže, da je potrebno drobljenje, in če se izkaže, da se pri tem spremeni vsebnost vlage v proizvodu, moramo rezultate analize sestavin krme korigirati glede na vsebnost vlage v vzorcu v prvotnem stanju.

\* Ta metoda je povzeta Direktive 71/393/EGS.

## METODA 2\*

### DOLOČANJE VLAGE V RASTLINSKIH IN ŽIVALSKIH MAŠČOBAM IN OLJIH

#### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določitev vsebnosti vode in hlapnih snovi v živalskih in rastlinskih maščobah in oljih.

#### 2. Princip

Vzorec osušimo do konstantne mase pri 103 °C. Izguba mase se določi s tehtanjem.

#### 3. Oprema

3.1 Posoda z ravnim dnom iz materiala, odpornega proti koroziji, s premerom 8 do 9 cm in višino približno 3 cm.

3.2 Živosrebrni termometer z ojačeno bučko in podaljškom na zgornjem delu, s skalo od približno 80 °C do najmanj 110 °C in dolžino približno 10 cm.

3.3 Peščena kopel ali električna plošča.

3.4 Eksikator, ki vključuje učinkovito sušilno sredstvo.

3.5 Analitska tehnica.

#### 4. Postopek

Natehtamo približno 20 g homogeniziranega vzorca s točnostjo mg v suho, stehtano posodo (3.1), v kateri je termometer (3.2). Ob nenehnem mešanju s termometrom segrevamo na peščeni kopeli ali na vroči plošči (3.3) tako, da temperatura doseže 90° C v približno 7 minutah.

Temperaturo znižamo in opazujemo pogostost, s katero se mehurčki dvigujejo z dna posode. Temperatura ne sme preseči 105° C. Nadaljujemo z mešanjem in pri tem drgnemo dno posode, dokler mehurčki ne prenehajo izhajati.

Da se zagotovi popolna odstranitev vlage, večkrat segrejemo na 103° C ± 2° C ob ohlajevanju na 93° C med zaporednimi gretji. Nato pustimo, da se vzorec v eksikatorju (3.4) ohladi na sobno temperaturo in stehtamo. Postopek ponavljamo, dokler izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema ni manjša od 2 mg.

Opomba: Povečanje mase vzorca po ponovljenem segrevanju kaže na oksidacijo maščobe. V tem primeru je treba upoštevati rezultat tehtanja, izvedenega neposredno pred začetkom povečevanja mase.

#### 5. Izračun rezultatov

Odstotni masni delež vlage v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

$$(M_1 - M_2) \times 100/M_0$$

kjer je:

M<sub>0</sub> = masa vzorca v gramih;

M<sub>1</sub> = masa posode z vsebino pred segrevanjem v gramih;

M<sub>2</sub> = masa posode z vsebino po segrevanju v gramih.

Rezultate, nižje od 0,05 %, navedemo kot »manj kakor 0,05 %«.

Ponovljivost

Razlika v vlagi med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati 0,05 % absolutne vrednosti.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 73/46/EGS.

### METODA 3\*

#### DOLOČANJE VSEBNOSTI SUROVIH BELJAKOVIN

##### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče določiti vsebnost beljakovin v krmni na podlagi vsebnosti dušika, določenega po Kjeldahlovi metodi.

##### 2. Princip

Vzorec razkrojimo z žveplovo kislino v prisotnosti katalizatorja. Kislo raztopino naalkalimo z raztopino natrijevega hidroksida. Amoniak destiliramo in ga lovimo v odmerjeno količino žveplove kisline, katere presežek titriramo s standardno raztopino natrijevega hidroksida.

##### 3. Reagenti

3.1 Kalijev sulfat.

3.2 Katalizator: Bakrov (II) oksid CuO ali bakrov (II) sulfat pentahidrat, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O

3.3 Cink v zrnih.

3.4 Žveplova (VI) kislina, ρ<sub>20</sub> = 1,84 g/ml.

3.5 Žveplova (VI) kislina c(1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 0,5 mol/l.

3.6 Žveplova (VI) kislina c(1/2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) = 0,1 mol/l.

3.7 Indikator metil rdeče; 300 mg metil rdečega raztopimo v 100 ml etanola, σ = 95-96 % (v/v).

3.8 Raztopina natrijevega hidroksida (lahko tehnični) v = 40 g/100 ml (m/v: 40%).

- 3.9 Raztopina natrijevega hidroksida  $c = 0,25 \text{ mol/l}$ .  
3.10 Raztopina natrijevega hidroksida  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ .  
3.11 Zdrobljen plovec, opran v klorovodikovi kislini in prežaren.  
3.12 Acetanilid (tališče =  $114^\circ \text{ C}$ ,  $\text{N} = 10,36 \%$ )  
3.13 Saharozna (brez dušika).

#### 4. Oprema

Aparatura, primerna za izvajanje razklopa, destilacijo in titracijo po Kjeldahlovi metodi.

#### 5. Postopek

##### 5.1 Razklop

Natehtamo 1 g vzorca s točnostjo 0,001 g in ga prenesemo v bučko aparature za razklop. Dodamo 15 g kalijevega sulfata (3.1), ustrezno količino katalizatorja (3.2) (od 0,3 do 0,4 g bakrovega (II) oksida ali od 0,9 do 1,2 g bakrovega (II) sulfata pentahidrata), 25 ml žveplove (VI) kisline (3.4) in nekaj zrnc plovc (3.11) ter vse skupaj premešamo. Bučko najprej zmerno segrevamo in jo od časa do časa obrnemo, dokler masa ne zogleni in pena ne izgine; nato jo močneje segrevamo do enakomernega vrenja tekočine. Segrevanje je ustrezno, če se kislina, ki vre, kondenzira na stenah bučke. Pazimo, da se stene bučke ne pregrejejo in da se organski delci ne sprimejo nanje. Ko se raztopina zbistri in obarva rahlo zeleno, pustimo, da vre še dve uri, nato pa pustimo, da se ohladi.

##### 5.2 Destilacija

Previdno dodamo toliko vode, da se sulfati povsem raztopijo. Pustimo, da se ohladi, in nato dodamo nekaj zrnc cinka (3.3).

V zbirno bučko naprave za destilacijo odmerimo točno 25 ml žveplove (VI) kisline (3.5) ali (3.6), odvisno od pričakovane vsebnosti dušika. Nato dodamo nekaj kapljic indikatorja metil rdečega (3.7).

Bučko za razklop povežemo s kondenzatorjem aparature za destilacijo in potopimo konec kondenzatorja v tekočino v zbirni bučki vsaj do globine 1 cm (glej opombo 8.3). V bučko za razklop počasi vlijemo 100 ml raztopine natrijevega hidroksida (3.8) tako, da ne pride do izgube amonija (glej opombo 8.1).

Bučko segrevamo do popolne destilacije amonija.

##### 5.3 Titracija

Presežek žveplove kisline v zbirni bučki titriramo do ekvivalentne točke z raztopino natrijevega hidroksida (3.9) ali (3.10), odvisno od koncentracije uporabljene žveplove (VI) kisline.

##### 5.4 Slep preskus

Da reagenti ne vsebujejo dušika, se prepričamo s slepim preskusom (razklop, destilacija in titracija), v katerem namesto vzorca uporabimo 1 g saharoze (3.13).

#### 6. Izračun rezultatov

Vsebnost surovih beljakovin se izračuna z uporabo sledeče formule:

$$\frac{(V_0 - V_1) \cdot c \cdot 0,014 \cdot 100 \cdot 6,25}{m}$$

Pri čemer je

$V_0$  = volumen (ml) NaOH (3.9 ali 3.10), uporabljen pri slepem preskusu.

$V_1$  = volumen (ml) NaOH (3.9 ali 3.10), uporabljen pri titraciji vzorca.

$c$  = koncentracija (mol/l) natrijevega hidroksida (3.9 ali 3.10).

$m$  = masa (g) vzorca.

#### 7. Preverjanje metode

##### 7.1 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

0,2 % absolutne vrednosti za vsebnosti surovih beljakovin pod 20 %;

1,0 % relativno glede na višjo vrednost za vsebnosti surovih beljakovin od 20 % do 40 %;

0,4 % absolutne vrednosti za vsebnosti surovih beljakovin nad 40 %.

##### 7.2 Točnost

Analizo (razklop, destilacija, titracija) izvedemo z 1,5 do 2,0 g acetanilida (3.12) ob navzočnosti 1 g saharoze (3.13); 1 g acetanilida porabi 14,80 ml žveplove kisline (3.5). Izkoristek mora biti najmanj 99%.

## 8. Opombe

8.1 Aparatura je lahko ročna, polavtomatska ali avtomatska. Če je pri aparaturi med razklopom in destilacijo potreben prenos, ga moramo izvesti brez kakršne koli izgube. Če bučka aparature za destilacijo ni opremljena s kapalnim lijakom, dodamo natrijev hidroksid tik pred povezavo bučke s kondenzatorjem, pri čemer tekočino vlivamo počasi ob steni bučke.

8.2 Če se vsebina v bučki strjuje, začnemo znova, vendar uporabimo večjo količino žveplove kisline (3.4), kakor je navedeno zgoraj.

8.3 Pri proizvodih z nizko vsebnostjo dušika lahko volumen žveplove kisline (3.6), ki jo moramo dodati v zbirno bučko, po potrebi zmanjšamo na 10 ali 15 ml in dopolnimo bučko do 25 ml z vodo.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 72/199/EGS.

## METODA 4\*

### DOLOČANJE VSEBNOSTI SUROVIH BELJAKOVIN, TOPNIH V PEPSINU IN KLOOROVODIKOVI KISLINI

#### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje frakcije surovih beljakovin, ki so pod opredeljenimi pogoji topne v pepsinu in klorovodikovi kislini. Uporabna je za vso krmo.

#### 2. Princip

Vzorec segrevamo 48 ur pri 40° C v raztopini pepsinhidroklorida. Suspenzijo filtriramo in določimo vsebnost dušika v filtratu, v skladu z metodo za določanje surovih beljakovin.

#### 3. Reagenti

3.1 Klorovodikova kislina, d: 1,125.

3.2 Klorovodikova kislina 0,075 N.

3.3 Pepsin 2,0 U/mg; aktivnost pepsina je opredeljena v metodi, opisani v delu 4 te priloge, in jo moramo ugotoviti v skladu s to metodo.

3.4 Približno 0,2 % (m/v) sveže pripravljene raztopine pepsina v klorovodikovi kislini (3.2); aktivnost: 400 U/l.

3.5 Emulzija proti penjenju (npr. silikon).

3.6 Vsi reagenti, naštetih pod 3, metode za določanje surovih beljakovin.

#### 4. Oprema

4.1 Vodna kopel ali inkubator, nastavljen na 40° C  $\pm$ 1° C.

4.2 Aparatura za razklop in destilacijo po Kjeldahlovi metodi.

#### 5. Postopek

5.1 Priprava raztopine (glej opombo 7.2)

Natehtamo 2 g vzorca na mg natančno in ga prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko. Dodamo 450 ml raztopine pepsinhidroklorida (3.4), ki smo ga pred tem segreti na 40° C, in stresamo, da preprečimo sprijemanje. Preverimo pH vrednost suspenzije, ki mora biti nižja od 1,7. Bučko postavimo za 48 ur na vodno kopel ali v inkubator (4.1). Po 8, 24 in 32 urah jo pretresemo. Po 48 urah dodamo 15 ml klorovodikove kisline (3.1), ohladimo na 20° C, dopolnimo z vodo do oznake in filtriramo.

5.2 Razklop

250 ml filtrata prenesemo v bučko aparature za destilacijo (4.2). Dodamo reagente, potrebne za razklop, kakor je opisano v drugem stavku 5.1 metode za določanje vsebnosti surovih beljakovin. Premešamo in segrejemo do vrenja. Če nastane pena, dodamo nekaj kapljic emulzije proti penjenju (3.5). Tekočino pustimo močno vreti, dokler ne izpari skoraj vsa voda. Znižamo temperaturo in previdno odstranimo še zadnje sledove vode.

Ko se raztopina zbistri in postane brezbarvna (ali svetlo zelena, če smo uporabili katalizator, ki vsebuje baker), pustimo, da vre še eno uro. Ohladimo.

5.3 Destilacija in titracija

Nadaljujemo, kakor je določeno v 5.2 in 5.3 metode za določanje surovih beljakovin.

5.4 Slepi preskus

Z enakim postopkom izvedemo slepi preskus, brez vzorca, ki ga analiziramo.

## 6. Izračun rezultatov

Odštejemo volumen žveplove kisline, porabljene pri slepem preskusu, od volumna, ki ga je porabil vzorec. 1 ml žveplove kisline 0,1 N ustreza 1,4 mg dušika.

Količino dušika pomnožimo s faktorjem 6,25. Rezultat izrazimo v odstotnem masnem deležu glede na vzorec.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

- 0,4, v absolutni vrednosti, za vsebnosti pod 20%,
- 2,0%, v relativni vrednosti, za vsebnosti med 20% in 40%,
- 0,8, v absolutni vrednosti, za vsebnosti nad 40%.

## 7. Opombe

7.1 Vrednosti, dobljene po tej metodi, niso neposredno povezane z in vivo prebavljivostjo.

7.2 Proizvode, katerih vsebnost olj in maščob presega 10%, moramo najprej razmastiti, in to z ekstrakcijo s petroletrom (vrelišče od 40 do 60° C).

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 72/199/EGS.

## METODA 5\* DOLOČANJE AKTIVNOSTI PEPSINA

### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča ugotavljanje aktivnosti pepsina, ki se uporablja za določanje surovih beljakovin, topnih v pepsinu in klorovodikovi kislini.

### 2. Princip

Pod opredeljenimi pogoji obdelamo hemoglobin s pepsinom in razredčeno klorovodikovo kislino. Nehidrolizirano frakcijo beljakovine oborimo s triklorocetno kislino. Filtratu dodamo natrijev hidroksid in reagent po Folin-Ciocalteuju. Pri 750 nm izmerimo optično gostoto raztopine in iz umeritvene krivulje odčitamo ustrezno količino tirozina.

Opredelitev: Enota pepsina (E) je opredeljena kot količina encima, ki v pogojih metode na minuto sprosti toliko hidroksiarilnih skupin, da ima njihovo obarvanje z reagentom po Folin-Ciocalteuju za posledico optično gostoto, ki ustreza optični gostoti enega  $\mu$ -mola tirozina pod enakimi pogoji.

### 3. Reagenti

3.1 Klorovodikova kislina 0,2 N.

3.2 Klorovodikova kislina 0,06 N.

3.3 Klorovodikova kislina 0,025 N.

3.4 5-odstotna (m/v) raztopina triklorocetne kisline.

3.5 Raztopina natrijevega hidroksida 0,5 N.

3.6 Reagent po Folin-Ciocalteuju. V 2-litrsko bučko z okroglim dnom in s standardnim brusom prenesemo 100 g natrijevega volframata ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 g natrijevega molibdata ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) in 700 ml vode. Dodamo 50 ml fosforjeve kisline (d: 1,71) in 100 ml koncentrirane klorovodikove kisline (d: 1,19), bučko povežemo s povratnim hladilnikom, segrejemo do vrenja in pustimo, da raztopina 10 ur rahlo vre. Ohladimo, odstranimo povratni hladilnik, dodamo 175 g litijevega sulfata ( $\text{Li}_2\text{SO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ), 50 ml vode in 1 ml broma. Pustimo vreti 15 minut, da odstranimo presežek broma.

Ohladimo, raztopino prelijemo v litrsko merilno bučko, dopolnimo z vodo do oznake, premešamo in filtriramo. Raztopina ne sme biti niti malo zelenkasto obarvana. Pred uporabo razredčimo en volumen reagenta z dvema volumnoma vode.

3.7 Raztopina hemoglobina: Natehtamo količino hemoglobina (približno 2 g beljakovinskega substrata, določenega po Ansonu), ki ustreza 354 mg dušika<sup>1</sup>, in ga prenesemo v 200 mililitrsko bučko s standardnim brusom. Dodamo nekoliko mililitrov klorovodikove kisline (3.2), bučko spojimo z vakuumsko črpalko in stresamo, dokler se hemoglobin popolnoma ne raztopi. Vakuum odstranimo in med stresanjem dodajamo klorovodikovo kislino (3.2) do 100 ml. Pripravimo tik pred uporabo.

<sup>1</sup> Vsebnost dušika se določi po semimikro-Kjeldahlovi metodi (teoretično vsebnost: 17,7% dušika).



3.8 Standardna raztopina tirozina: Raztopimo 181,2 mg tirozina v klorovodikovi kislini (3.1) in z isto kislino dopolnimo do enega litra (osnovna raztopina). 20,0 ml razredčimo do 100 ml s klorovodikovo kislino (3.1). 1 ml te raztopine vsebuje 0,2 μmolov tirozina.

#### 4. Oprema

4.1 Vodna kopel, naravnana z ultratermostatom na 25° C ±0,1° C.

4.2 Spektrofotometer.

4.3 Kronometer, točnost: 1 sekunda.

4.4 pH-meter.

#### 5. Postopek

5.1 Priprava raztopine (glej opombo 7.1)

Raztopimo 150 mg pepsina v 100 ml klorovodikove kisline (3.2). Odpipetiramo 2 ml raztopine v 50 mililitrsko merilno bučko in dopolnimo s klorovodikovo kislino (3.3) do oznake. Vrednost pH, ki jo izmerimo s pH-metrom, mora biti 1,6 ±0,1. Bučko potopimo v vodno kopel (4.1).

5.2 Hidroliza

V epruveto odpipetiramo 5,0 ml raztopine hemoglobina (3.7), na vodni kopeli (4.1) jo segrejemo na 25° C, dodamo 1,0 ml raztopine pepsina, dobljene po navodilih iz 5.1, in s stekleno paličico, odebeljeno na enem koncu, mešamo tekočino tako, da desetkrat potegnemo skozi naprej in nazaj. Epruveto pustimo na vodni kopeli pri 25° C točno 10 minut po tem, ko smo dodali raztopino pepsina (trajanje in temperaturo moramo strogo spremljati). Nato dodamo 10,0 ml raztopine trikloroacetne kisline (3.4), ki smo jo poprej segreti na 25° C, premešamo in filtriramo skozi suh filter.

5.3 Razvijanje barve in merjenje optične gostote

5,0 ml filtrata odpipetiramo v 50 mililitrsko erlenmajerico, dodamo 10,0 ml raztopine natrijevega hidroksida (3.5) in ob nenehnem stresanju še 3,0 ml razredčenega reagenta po Folin-Ciocalteuju (3.6). Po 5 do 10 minutah določimo optično gostoto raztopine s spektrofotometrom pri 750 nm v 1 cm kivetu, proti vodi.

5.4 Slepi preskus

Za vsako določitev izvedemo slepi preskus:

V epruveto odpipetiramo 5,0 ml raztopine hemoglobina (3.7), na vodni kopeli (4.1) jo segrejemo na 25° C, dodamo 10,0 ml raztopine trikloroacetne kisline (3.4), ki smo jo poprej segreti na 25° C, premešamo in nato dodamo 1,0 ml raztopine pepsina, dobljene po navodilih iz 5.1. Premešamo s stekleno paličico in pustimo epruveto na vodni kopeli (4.1) pri 25° C točno 10 minut. Premešamo in filtriramo skozi suh filter. Nadaljujemo po postopku, opisanem v 5.3.

5.5 Umeritvena krivulja

V 50 mililitrski erlenmajerici odmerimo 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 in 5,0 ml standardne raztopine tirozina (3.8), kar ustreza 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 in 1,0 μmolom tirozina. Serijo dopolnimo s primerjalno raztopino, ki ne vsebuje tirozina. Volumne dopolnimo do 5,0 ml s klorovodikovo kislino (3.1). Dodamo 10,0 ml raztopine natrijevega hidroksida (3.5) in ob nenehnem stresanju še 3,0 ml razredčenega reagenta po Folin-Ciocalteuju (3.6). Nato izmerimo optično gostoto, kakor je opisano v zadnjem stavku 5.3. V umeritveno krivuljo vnesemo optične gostote v odvisnosti od količin tirozina.

#### 6. Izračun rezultatov

Z umeritvene krivulje odčitamo količino tirozina (v μmolih), ki ustreza optični gostoti obarvane raztopine, korigirane glede na slepo vrednost.

Aktivnost pepsina, v μmolih, tirozina pri 25° C, na mg in na minuto, izračunamo z naslednjo formulo:

$$\text{Enote na mg (U/mg)} = (0,32 a)/p$$

pri čemer je:

a = količina tirozina (v μmolih), odčitana iz umeritvene krivulje;

p = masa, v mg, količine pepsina, dodanega v 5.2.

#### 7. Opombe

7.1 Pepsina moramo raztopiti toliko, da dobimo pri končnih fotometričnih meritvah optično gostoto 0,35 ±0,035.

7.2 Dve enoti na mg, dobljeni s to metodo, ustrezata:

3,64 Anson milienot/mg (μmolov tirozina/mg minuto pri 35,5° C) ali

36 400 komercialnih enot/g (μmolov tirozina/g v 10 minutah pri 35,5° C).

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 72/199/EGS.

## METODA 6\*

### DOLOČANJE Hlapnih Dušikovih Baz

#### A. MIKRODIFUZIJA

##### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje vsebnosti hlapnih dušikovih baz v krmi, izraženih kot amonijak.

##### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z vodo, raztopino zbistriamo in filtriramo. Hlapne dušikove baze ločimo z mikrodifuzijo z uporabo raztopine kalijevega karbonata, lovimo v raztopino borove kisline in titriramo z žveplovo (VI) kislino.

##### 3. Reagenti

3.1 20 odstotna (m/v) raztopina trikloroocetne kisline.

3.2 Indikator: raztopimo 33 mg bromokrezol zelenega in 65 mg metil rdečega v 100 ml 95-96% (v/v) etanola.

3.3 Raztopina borove kisline: v litrski merilni bučki raztopimo 10 g borove kisline p. a. v 200 ml 95- 96 % (v/v) etanola in 700 ml vode. Dodamo 10 ml indikatorja (3.2). Premešamo in po potrebi spremenimo barvo raztopine v svetlordečo z dodajanjem raztopine natrijevega hidroksida. 1 ml te raztopine ustreza največ 300 µg NH<sub>3</sub>.

3.4 Nasičena raztopina kalijevega karbonata: raztopimo 100 g kalijevega karbonata p. a. v 100 ml vrele vode. Ohladimo, filtriramo.

3.5 Žveplova (VI) kislina 0,02 N.

##### 4. Oprema

4.1 Mešalec: približno 35 do 40 obr./min.

4.2 Steklene ali plastične Conwayeve celice (glej diagram).

4.3 Mikrobirete z označenim merilom 1/100 ml.

##### 5. Postopek

Natehtamo 10 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga s 100 ml vode prenesemo v 200 mililitrsko merilno bučko. V mešalcu mešamo 30 minut. Dodamo 50 ml raztopine trikloroocetne kisline (3.1), dopolnimo z vodo do oznake, dobro pretresemo in filtriramo skozi naguban filter.

S pipeto dodamo 1 ml raztopine borove kisline (3.3) v srednji del Conwayeve celice in 1 ml filtriranega vzorca v zgornji del celice. Delno pokrijemo z namaščenim pokrovom. Hitro kapnemo 1 ml nasičene raztopine kalijevega karbonata (3.4) v zgornji del celice in nepredušno zapremo. Pazljivo obračamo celico v vodoravni ravnini, da se reagenta premešata. Pustimo najmanj štiri ure pri sobni temperaturi ali eno uro pri temperaturi 40 °C.

Z mikrobireto (4.3) titriramo hlapne baze v raztopini borove kisline z žveplovo kislino 0,02 N (3.5).

Opravimo slepi preskus po istem postopku, vendar brez vzorca, ki ga analiziramo.

##### 6. Izračun rezultata

1 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N ustreza 0,34 mg amonija.

Rezultat izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

##### Ponovljivost

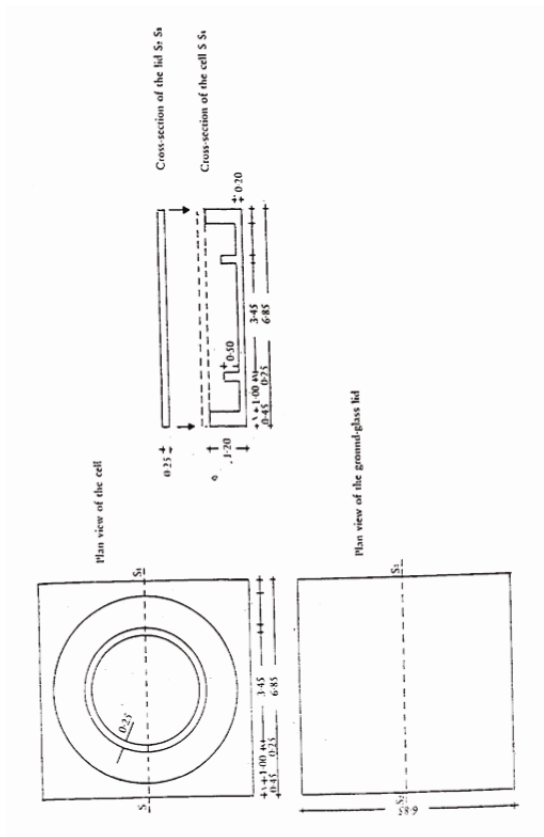
Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

10 % relativne vrednosti, če je vsebnost amonija nižja od 1,0 %;

0,1 % absolutne vrednosti, če je vsebnost amonija 1,0 % ali več.

## 7. Opomba

Če vsebnost amonija v vzorcu presega 0,6 %, razredčimo začetni filtrat.



Napisi ob skici:

Conway cell = Conwayeva celica

Scale 1/1 = Merilo 1/1

Plan view of the cell = Tloris celice

Plan view of the ground-glass lid = Tloris pokrova iz brušenega stekla

Cross-section of the lid S<sub>2</sub> S<sub>3</sub> = Presek pokrova S<sub>2</sub> S<sub>3</sub>

Cross-section of the cell S<sub>1</sub> S<sub>4</sub> = Presek celice S<sub>1</sub> S<sub>4</sub>

## B. Z DESTILACIJO

### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče določiti vsebnost hlapnih dušikovih baz, izraženih kot amonijak, v ribji moki, ki praktično ne vsebuje sečnine. Uporablja se le za vsebnost amonijaka, ki je nižja od 0,25 %.

### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z vodo, raztopino pa zbistriamo in filtriramo. Hlapne dušikove baze odstranimo pri temperaturi vrenja z dodatkom magnezijevega oksida in lovimo v določeno količino žveplove (VI) kisline, katere presežek titriramo z raztopino natrijevega hidroksida.

### 3. Reagenti

3.1 20 odstotna (m/v) raztopina trikloroocetne kisline.

3.2 Magnezijev oksid p. a.

3.3 Emulzija proti penjenju (npr. silikon).

3.4 Žveplova (VI) kislina 0,1 N.

3.5 Raztopina natrijevega hidroksida 0,1 N.

3.6 0,3 odstotna (v/v) raztopina metil rdeče v 95-96 odstotnem (v/v) etanolu.

#### 4. Oprema

4.1 Mešalec: približno 35 do 40 obr./min.

4.2 Aparatura za destilacijo po Kjeldahlu.

#### 5. Postopek

Natehtamo 10 g vzorca s točnostjo 1 mg in s 100 ml vode prenesemo v 200 mililitrsko merilno bučko. V mešalcu mešamo 30 minut. Dodamo 50 ml raztopine trikloroocetne kisline (3.1), dopolnimo z vodo do oznake, dobro pretresemo in filtriramo skozi nagubani filter.

Odpipetiramo, pričakovani vsebnosti hlapnih dušikovih baz, primeren volumen (navadno zadošča 100 ml). Razredčimo na 200 ml, dodamo 2 g magnezijevega oksida (3.2) in nekaj kapljic emulzije proti penjenju (3.3). Raztopina mora biti alkalna na lakmusov papir, če ni, dodamo še malo magnezijevega oksida (3.2). Destiliramo približno 150 ml raztopine v Kjeldahlovi aparaturi in destilat lovimo v erlenmajerico, v kateri je točno določen volumen (25 do 50 ml) žveplove (VI) kisline 0,1 N (3.4). Med destilacijo ne smemo pregreti stranic. Raztopino žveplove kisline pustimo vreti dve minuti, ohladimo in titriramo presežek žveplove kisline z raztopino natrijevega hidroksida 0,1 N (3.5) z uporabo indikatorja metil rdeče (3.6).

Opravimo slepi preskus po istem postopku, vendar brez vzorca, ki ga analiziramo.

#### 6. Izračun rezultata

1 ml  $H_2SO_4$  0,1 N ustreza 1,7 mg amonijaka.

Rezultat izrazimo v odstotnem masnem deležu glede na vzorec.

Ponovljivost

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 % amonijaka.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/393/EGS.

### METODA 7\* DOLOČANJE SEČNINE

#### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo določamo vsebnost sečnine v krmi.

#### 2. Princip

Vzorec suspendiramo v vodi s snovjo za zbistritev. Suspenzijo filtriramo. Dodamo 4-dimetilaminobenzaldehid (4-DMAB) in nato določimo vsebnost sečnine v filtratu z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 420 nm.

#### 3. Reagenti

3.1 Raztopina 4-dimetilaminobenzaldehida: v 100 ml 96 odstotnega etanola raztopimo 1,6 g 4-DMAB p. a. in dodamo 10 ml klorovodikove kisline p. a. (d: 1,19). Reagent lahko hranimo največ dva tedna.

3.2 Raztopina Carrez I: v vodi raztopimo 21,9 g cinkovega acetata  $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$  in 3 g ledoceta ter dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.3 Raztopina Carrez II: v vodi raztopimo 10,6 g kalijevega ferocianida,  $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$  in dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.4 Aktivno oglje p. a., ki ne absorbira sečnine (treba je preveriti).

3.5 0,1-odstotna (m/v) raztopina sečnine p. a.

#### 4. Oprema

4.1 Mešalnik: približno 35 do 40 obr./min.

4.2 Epruvete: 160 × 16 mm z brušenimi zamaški.

4.3 Spektrofotometer.

#### 5. Postopek

5.1 Analiza vzorca

Natehtamo 2 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga skupaj z 1 g aktivnega oglja (3.4) prenesemo v 500-mililitrsko merilno bučko. Dodamo 400 ml vode in 5 ml raztopin Carrez I (3.2) in II (3.3). Mešamo trideset minut v mešalniku. Z vodo dopolnimo do oznake, pretresemo in filtriramo.

5 ml prozornega brezbarvnega filtrata prenesemo v epruvete z brušenimi zamaški, dodamo 5 ml raztopine 4-DMAB (3.1) in premešamo. Epruvete postavimo v kopel z vodo pri 20° C. Po petnajstih minutah izmerimo optično gostoto raztopine vzorca s spektrofotometrom pri 420 nm. Primerjamo z raztopino reagentov iz slepega preskusa.

#### 5.2 Umeritvena krivulja

1, 2, 4, 5 in 10 ml raztopine sečnine (3.5) prenesemo v 100-mililitrske merilne bučke ter jih dopolnimo z vodo do oznake. Od vsake teh raztopin odpipetiramo 5 ml, vsaki dodamo 5 ml raztopine 4-DMAB (3.1), premešamo in izmerimo optično gostoto, kakor je opisano zgoraj s primerjavo s kontrolno raztopino, ki vsebuje 5 ml 4-DMAB in 5 ml vode brez sečnine. Narišemo umeritveno krivuljo.

### 6. Izračun rezultata

Količino sečnine v vzorcu določimo iz umeritvene krivulje.

Rezultat izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

### 7. Opombe

7.1 Če vsebnost sečnine presega 3 %, zmanjšamo vzorec na 1 g ali razredčimo prvotno raztopino, tako da v 500 ml ni več kakor 50 mg sečnine.

7.2 Če je vsebnost sečnine nizka, povečamo vzorec, dokler je filtrat še prozoren in brezbarven.

7.3 Če vzorec vsebuje preproste dušikove spojine, kot so aminokisliline, moramo optično gostoto meriti pri 435 nm.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 8\* DOLOČANJE SUROVIH OLJ IN MAŠČOB

### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda je namenjena določanju vsebnosti surovih olj in maščob v krmi. Ne zajema analize oljnih semen in oljnatih sadežev, opredeljenih v Uredbi Sveta 136/66/EGS z dne 22. septembra 1966.

Uporaba spodaj opisanih postopkov je odvisna od vrste in sestave krme in od namena izvajanja analize.

#### 1.1 Postopek A – Surova olja in maščobe, ki se ekstrahirajo direktno

Ta metoda je uporabna za krmo rastlinskega izvora, razen tiste, ki je zajeta v področju uporabe postopka B.

#### 1.2 Postopek B – Skupna surova olja in maščobe

Ta metoda je uporabna za krmo živalskega izvora in za vse krmne mešanice. Uporabljati se mora za vso krmo, iz katere ni mogoče povsem ekstrahirati olj in maščob brez predhodne hidrolize (npr. gluteni, kvas, krompirjeve beljakovine in izdelki, podrejeni postopkom, kakor so ekstrudiranje, kosmičenje in segrevanje).

#### 1.3 Interpretacija rezultatov

V vseh primerih, kadar je rezultat po postopku B višji od rezultata po postopku A, se mora rezultat, dobljen po postopku B, sprejeti kot prava vrednost.

### 2. Princip

#### 2.1 Postopek A

Vzorec ekstrahiramo s petroletrom. Topilo oddestiliramo, preostanek pa osušimo in stehamo.

#### 2.2 Postopek B

Vzorec med segrevanjem obdelamo s klorovodikovo kislino. Mešanico ohladimo in prefiltriramo. Ostanek speremo in osušimo ter izvedemo določanje v skladu s postopkom A.

### 3. Reagenti

3.1 Petroleter, vrelišče: 40 do 60 °C. Bromovo število mora biti nižje od 1 in ostanek pri izparevanju manjši od 2 mg/100 ml.

3.2 Natrijev sulfat, brezvodni.

3.3 Klorovodikova kislina, c = 3 mol HCl/l

3.4 Filtracijski pripomoček, npr. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

#### 4. Oprema

4.1 Aparatura za ekstrakcijo. Če je opremljena s sifonom (Soxhlet aparat), mora biti hitrost povratnega toka takšna, da nastane približno 10 ciklov na uro; če nima sifona, mora biti hitrost povratnega toka približno 10 ml na minuto.

4.2 Kartuše za ekstrakcijo, ki ne vsebujejo materialov, topnih v petroletru in s poroznostjo, ki je skladna z zahtevami iz 4.1.

4.3 Sušilnik, vakuumski, nastavljen na  $75^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , ali zračni, nastavljen na  $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

#### 5. Postopek

##### 5.1 Postopek A (glej 8.1)

Natehtamo 5 g vzorca s točnostjo 1 mg, prenesemo v kartušo za ekstrakcijo in pokrijemo s čepkom iz vate, ki ne vsebuje maščobe.

Kartušo postavimo v ekstraktor (4.1) in ekstrahiramo šest ur s petroletrom (3.1). Ekstrakt lovimo v suho stehtano bučko, v kateri so delci plovca<sup>1</sup>.

Oddestiliramo topilo. Ostanek osušimo tako, da bučko za uro in pol postavimo v sušilnik (4.3). Pustimo, da se ohladi v eksikatorju in stehtamo. Ponovno sušimo 30 minut do konstantne mase olj in maščob (izguba mase med dvema zaporednima tehtanjema mora biti manjša od 1 mg).

##### 5.2 Postopek B

2,5 g vzorca natehtamo s točnostjo 1 mg (glej 8.2) v 400-mililitrsko čašo ali 300-mililitrsko erlenmajerico in dodamo 100 ml klorovodikove kisline (3.3) ter delce plovca. Čašo pokrijemo z urnim steklom ali erlenmajerico spojimo s povratnim hladilnikom. Pri nizkem plamenu ali na električnem kuhalniku mešanico počasi zavremo in jo pustimo rahlo vreti eno uro. Mešanica se ne sme prijemati sten posode.

Ohladimo in dodamo toliko filtracijskega pripomočka (3.4), kot je potrebno, da se prepreči kakršna koli izguba olja in maščobe med filtriranjem. Filtriramo skozi navlažen, dvojni filtrirni papir, ki ne vsebuje maščobe. Ostanek spiramo s hladno vodo, dokler filtrat ni nevtralen. Prepričamo se, da filtrat ne vsebuje nobenih olj ali masti. Njihova prisotnost pomeni, da moramo vzorec pred hidrolizo ekstrahirati s petroletrom po postopku A.

Dvojni filtrirni papir, na katerem je ostanek, prenesemo na urno steklo in ga uro in pol sušimo v sušilniku (4.3) pri temperaturi  $100^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .

Dvojni filtrirni papir s suhim ostankom prenesemo v kartušo za ekstrahiranje (4.2) in pokrijemo s čepkom iz vate, ki ne vsebuje maščobe. Kartušo vstavimo v ekstraktor (4.1) in nadaljujemo, kakor je navedeno v drugem in tretjem odstavku 5.1.

#### 6. Izražanje rezultatov

Maso ostanka izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

#### 7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki jih isti analitik izvede na istem vzorcu, ne sme presegati:

- 0,2 % v absolutni vrednosti, za vsebnosti surovih olj in masti pod 5 %,
- 4,0 % glede na višji rezultat, za vsebnosti med 5 do 10 %,
- 0,4 % v absolutni vrednosti, za vsebnosti nad 10 %.

#### 8. Opombe

8.1 Pri izdelkih z visoko vsebnostjo olj in maščob, ki jih je težko zdrobiti ali so neprimerni za pripravo homogenega zmanjšane preskusnega vzorca, uporabimo naslednji postopek.

Natehtamo 20 g vzorca s točnostjo 1 miligram in ga zmešamo z 10 g ali več brezvodnega natrijevega sulfata (3.2). Ekstrahiramo s petroletrom (3.1), kakor je navedeno v 5.1. Dobljeni ekstrakt s petroletrom dopolnimo do 500 ml (3.1) in premešamo. 50 ml raztopine prenesemo v majhno, suho, stehtano bučko, v kateri so delci plovca<sup>1</sup>. Oddestiliramo topilo, osušimo in nadaljujemo, kakor je določeno v zadnjem odstavku 5.1.

Iz ostanka po ekstrakciji v kartuši odstranimo topilo, zdrobimo ostanek do velikosti delcev 1 mm, vrnemo v kartušo za ekstrakcijo (ne dodamo natrijevega sulfata) in nadaljujemo, kakor je določeno v drugem in tretjem odstavku 5.1.

Vsebnost olj in maščob kot odstotni masni delež glede na vzorec izračunamo po naslednji formuli:

$$(10a + b) \times 5$$

pri čemer je:

a = masa ostanka po prvi ekstrakciji (aliquotni del ekstrakta) v gramih,

b = masa ostanka po drugi ekstrakciji v gramih.

<sup>1</sup> Če je treba olje ali maščobe pozneje še dodatno preskušati zaradi kakovosti, delce plovca zamenjamo s steklenimi kroglicami.

8.2 Pri izdelkih z nizko vsebnostjo olj in maščob se lahko preskusni vzorec poveča na 5 g.

8.3 Hrano za hišne živali, ki vsebuje veliko vode, je treba včasih pred hidrolizo in ekstrakcijo po postopku B zmešati z brezvodnim natrijevim sulfatom.

8.4 V 5.2 je za spiranje ostanka po filtraciji morda učinkoviteje uporabiti toplo vodo namesto hladne.

8.5 Pri nekateri krmi bo morda treba podaljšati čas sušenja na več kot uro in pol. Odvečnemu sušenju se je treba izogibati, saj lahko vodi do nizkih rezultatov. Uporabi se lahko tudi mikrovalovna pečica.

8.6 Če je vsebnost surovih olj/maščob višja od 15 %, se pred hidrolizo pri postopku A priporoča predhodna ekstrakcija in pri postopku B ponovna ekstrakcija. Do določene mere je to odvisno od vrste krme ter vrste olj in maščob v krmi.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 98/64/ES.

## **METODA 9\***

### **DOLOČANJE SUROVIH VLAKNIN**

#### **1. Namen in področje uporabe**

Ta metoda omogoča določitev vsebnosti nemaščobnih organskih snovi v krmi, ki so netopne v kislih in alkalnih medijih in dogovorno poimenovane surove vlaknine.

#### **2. Princip**

Vzorec, ki ga po potrebi razmastimo, obdelamo najprej z vrelo raztopino žveplove kisline in nato s kalijevim hidroksidom določenih koncentracij. Ostanek ločimo s filtracijo skozi filter iz sintranega stekla, ga speremo, osušimo, stehtamo in upepelimo v temperaturnem območju od 475 do 500° C. Izguba mase pri upepeljevanju ustreza vsebnosti surovih vlaknin v preskusnem vzorcu.

#### **3. Reagenti**

3.1 Žveplova kislina,  $c = 0,13 \text{ mol/l}$ .

3.2 Snov proti penjenju (npr. n-oktanol).

3.3 Filtrirni pripomoček (celit 545 ali enakovreden), ki ga segrevamo štiri ure pri 500° C (8.6).

3.4 Aceton.

3.5 Petroleter z vreliščem od 40 do 60° C.

3.6 Klorovodikova kislina,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ .

3.7 Raztopina kalijevega hidroksida,  $c = 0,23 \text{ mol/l}$ .

#### **4. Oprema**

4.1 Grelna enota za obdelavo z žveplovo kislino ali raztopino kalijevega hidroksida, ki je opremljena z nosilcem za filtrirni lonček (4.2) ter z odtočno cevjo s pipo za odtok tekočine in vakuum, po možnosti s stisnjenim zrakom. Pred vsakdanjo uporabo pet minut predhodno grejemo enoto z vrelo vodo.

4.2 Steklen filtrirni lonček s taljeno filtrirno ploščo iz sintranega stekla, z velikostjo por od 40 do 90 $\mu\text{m}$ . Pred prvo uporabo ga nekaj minut grejemo na 500° C in ga ohladimo (8.6).

4.3 Cilinder volumna najmanj 270 ml s povratnim hladilnikom, ki je primeren za vrenje.

4.4 Sušilnik s termostatom.

4.5 Žarilna peč s termostatom.

4.6 Ekstrakcijska enota, sestavljena iz nosilca za filtrirni žarilni lonček (4.2) in z odvodno cevko s pipo za vakuum in odtok tekočine.

4.7 Spoji za sestavitev grelne enote (4.1), žarilnega lončka (4.2) in cilindra (4.3) ter za povezavo enote za hladno ekstrakcijo (4.6) in lončka.

#### **5. Postopek**

S točnostjo 0,001 g natehtamo 1 g pripravljenega vzorca in ga prenesemo v lonček (4.2) (glej opombe 8.1, 8.2 in 8.3) ter dodamo 1 g filtrirnega pripomočka (3.3).

Sestavimo grelno enoto (4.1) in filtrirni lonček (4.2), nato pritrdimo cilinder (4.3) na lonček. V sestavljeni cilinder in lonček vlijemo 150 ml vrele žveplove kisline (3.1) ter po potrebi dodamo nekaj kapljic aktivne snovi proti penjenju (3.2).

Tekočino v  $5 \pm 2$  min segrejemo do vrelišča in pustimo močno vreti točno 30 minut.

Odpremo pipo na odtočni cevki (4.1) in pod vakuumom filtriramo žveplovo kislino skozi filtrirni lonček, ostanek pa speremo s tremi zaporednimi 30-mililitrskimi porcijami vrele vode, pri čemer zagotovimo, da je ostanek po vsakem spiranju filtriran do suhega.

Zapremo odtočno pipo ter v sestavljeni valj in lonček vlijemo 150 ml vrele raztopine kalijevega hidroksida (3.7), po potrebi pa dodamo nekaj kapljic aktivne snovi proti penjenju (3.2). Tekočino v  $5 \pm 2$  min segrejemo do vrelišča in pustimo močno vreti točno 30 minut. Nato filtriramo in postopek pranja ponovimo kakor pri koraku z žveplovo kislino.

Po spiranju in sušenju lonček z vsebino vred ločimo in ga priključimo na enoto za hladno ekstrakcijo (4.6). V vakuumu ostanek speremo s tremi zaporednimi 25-mililitrskimi porcijami acetona (3.4) in poskrbimo, da je ostanek po vsakem spiranju filtriran do suhega.

Lonček osušimo do stalne mase v sušilniku pri  $130^{\circ}\text{C}$ . Po vsakem sušenju ga ohladimo v eksikatorju in ga hitro stehamo. Lonček postavimo v žarilno peč in vsebino najmanj 30 minut upepeljemo do stalne mase pri  $475$  do  $500^{\circ}\text{C}$ .

Po vsakem segrevanju ga pred tehtanjem najprej ohladimo v peči, nato pa še v eksikatorju.

Izvajamo slepi preskus brez vzorca: izguba mase pri upepeljevanju ne sme presegati 4 mg.

## 6. Izračun rezultatov

Odstotni masni delež surovih vlaknin v vzorcu je izražen z naslednjim:

$$(b-c) \times 100/a$$

pri čemer je:

a = masa vzorca, v gramih;

b = izguba mase po upepeljevanju pri določitvi, v gramih;

c = izguba mase po upepeljevanju pri slepem preskusu, v gramih.

## 7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

– 0,3 v absolutni vrednosti, za vsebnosti surovih vlaknin pod 10%,

– 3% razmeroma, glede na višji rezultat, za vsebnosti surovih vlaknin, ki so enake ali višje od 10%.

## 8. Opombe

8.1 Krmo, ki vsebuje več kakor 10% surovih maščob, moramo pred analizo razmastiti s petroletrom (3.5). Filtrirni lonček (4.2) z vsebino priključimo na enoto za hladno ekstrakcijo (4.6) ter v vakuumu speremo ostanek s tremi zaporednimi 30-mililitrskimi porcijami petroletra, pri čemer pazimo, da je ostanek suh. Lonček z vsebino priključimo na grelno enoto (4.1) in nadaljujemo postopek, opisan v 5.

8.2 Krmo, vsebujočo maščobe, ki jih ni mogoče odstraniti neposredno s petroletrom (3.5), je treba razmastiti, kakor je prikazano v 8.1, in jih znova razmastiti po vrenju s kislino.

Po vrenju s kislino in poznejšem spiranju lonček z vsebino priključimo na enoto za hladno ekstrakcijo (4.6) in trikrat speremo s po 30 ml acetona, nato pa še trikrat s po 30 ml petroletra. V vakuumu filtriramo do suhega in nadaljujemo analizo iz 5, začevši z obdelavo s kalijevim hidroksidom.

8.3 Če krma vsebuje več kakor 5% karbonatov, izraženih kakor kalcijev karbonat, lonček z natehtanim vzorcem (4.2) priključimo na grelno enoto (4.1). Vzorec nato trikrat speremo s 30 ml klorovodikove kisline (3.6). Po vsakem dodajanju naj vzorec pred filtracijo stoji približno eno minuto. Enkrat speremo s 30 ml vode in nato nadaljujemo, kakor je opisano v 5.

8.4 Če uporabljamo napravo v obliki stojala (več lončkov, priključenih na isto grelno enoto), v isti seriji ne smemo izvesti dveh posameznih določitev istega vzorca.

8.5 Če je po vrenju težko filtrirati kisle in alkalne raztopine, prek odtočne cevi grelne enote uporabimo stisnjeni zrak in nato nadaljujemo filtracijo.

8.6 Temperatura pri upepeljevanju naj ne presega  $500^{\circ}\text{C}$ , saj tako podaljšamo obstojnost steklenih filtrirnih lončkov. Treba je paziti, da med grelnimi in hladilnimi cikli ni prevelikih toplotnih šokov.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 73/46/EGS.



## METODA 10\*

### DOLOČANJE ŠKROBA

#### POLARIMETRIČNA METODA

#### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določitev vsebnosti škroba in visokomolekularnih produktov degradacije škroba v krmi za preverjanje skladnosti s pravilnikom, ki ureja kakovost, označevanje in pakiranje krme v prometu, za preverjanje skladnosti z Direktivo Komisije 86/174/EGS z dne 9. aprila 1986 o določitvi metode računanja energijskih vrednosti krmnih mešanic za perutnino (UL L št. 130 z dne 16.05. 1986, str. 53, z vsemi spremembami; v nadaljnjem besedilu: Direktiva 86/174/EGS) in Direktivo Sveta 96/25/ES z dne 29. aprila 1996 o obtoku posamičnih krmil, ki spreminja direktive 70/524/EGS, 74/63/EGS, 82/471/EGS in 93/74/EGS in razveljavlja Direktivo 77/101/EGS (UL L št. 125 z dne 23.05. 1996, str. 35, z vsemi spremembami).

#### 2. Princip

Metoda vključuje dve določitvi. Pri prvi se vroč vzorec obdela z razredčeno klorovodikovo kislino. Po zbistritvi in filtriranju se izmeri optična rotacija raztopine s polarimetrijo.

Pri drugi se vzorec ekstrahira s 40 % etanolom. Po nakisanju filtrata s klorovodikovo kislino, se po zbistritvi in filtriranju izmeri optična rotacija tako kot pri prvem določanju.

Razlika med dvema meritvama, pomnožena z znanim faktorjem, poda vsebnost škroba v vzorcu.

#### 3. Reagenti

3.1 25 % (m/m) klorovodikova kislina, d: 1,126 g/ml.

3.2 1,128 % (m/v) klorovodikova kislina

Koncentracijo moramo preveriti s titracijo, z uporabo 0,1 mol/liter raztopine natrijevega hidroksida, v prisotnosti 0,1 % (m/v) metil rdečega v 94 % (v/v) etanolu. 10 ml = 30.94ml NaOH 0.1 mol/liter.

3.3 Carrez I raztopina: raztopimo 21,9 g cinkovega acetata  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  in 3g led-očetne kisline v vodi. Dopolnimo do 100 ml z vodo.

3.4 Carrez II raztopina: raztopimo 10,6 g kalijevega ferocianida  $[K_4(Fe(CN)_6) \cdot 3H_2O]$  v vodi. Dopolnimo do 100 ml z vodo.

3.5 40 % (v/v) etanola, d: 0,948 g/ml pri 20° C.

#### 4. Oprema

4.1 250 ml erlenmajerica s standardnim brušenim vratom in povratnim hladilnikom

4.2 Polarimeter ali saharometer.

#### 5. Postopek

5.1 Priprava vzorca

Vzorec drobimo, do velikosti delcev, ki popolnoma preidejo skozi 0,5 mm sito z okroglimi odprtinami.

5.2 Določanje celotne optične rotacije (P ali S) (glej pripombo 7.1)

Natehnamo 2,5 g zdrobljenega vzorca s točnostjo do mg in ga prenesemo v 100 ml merilno bučko. Dodamo 25ml klorovodikove kisline (3.2), pretresemo, da dobimo enakomerno porazdelitev preskusnega vzorca in dodamo nadaljnjih 25ml klorovodikove kisline (3.2). Bučko potopimo v vrelo vodno kopel in prve tri minute močno in enakomerno stresamo, da preprečimo nastanek aglomeratov. Količina vode v vodni kopeli mora biti tolikšna, da kopel ostane na točki vrelišča, ko vanjo potopimo bučko. Bučke med stresanjem ne smemo vzeti iz kopeli. Po točno 15 minutah jo odstranimo iz kopeli, dodamo 30 ml hladne vode in jo takoj ohladimo na 20° C.

Dodamo 5 ml Carrez I (3.3) raztopine in stresamo eno minuto. Nato dodamo 5 ml raztopine Carrez II (3.4) in ponovno stresamo eno minuto. Dopolnimo z vodo do oznake, premešamo in filtriramo. Če filtrat ni popolnoma bister (kar je redko), ponovimo določanje z uporabo večje količine Carrez raztopin I in II, na primer 10 ml.

Optično rotacijo raztopine izmerimo s polarimetrom ali saharometrom v 200 mm epruveti.

5.3 Določanje optične rotacije (P' ali S') snovi, ki so topne v 40 % etanolu.

Natehnamo 5g vzorca s točnostjo do mg, prenesemo v 100 ml merilno bučko in dodamo približno 80 ml etanola (3.5) (glej opombo 7.2). Bučko pustimo stati 1 uro na sobni temperaturi; v tem času šestkrat močno pretresemo, da se preskusni vzorec temeljito premeša z etanolom. Dopolnimo do oznake z etanolom (3.5), premešamo in filtriramo. Odpipetiramo 50 ml filtrata (= 2,5 g vzorca) v 250 ml erlenmajerico, dodamo 2,1 ml klorovodikove kisline (3.1) in močno pretresemo. Erlenmajerico spojimo s povratnim hladilnikom in jo potopimo v vrelo vodno kopel. Po točno 15 minutah odstranimo erlenmajerico iz kopeli, prenesemo vsebino v 100 ml merilno bučko, speremo z malo hladne vode in ohladimo na 20° C. Zbistrimo z uporabo Carrez raztopin I (3.3.) in II (3.4), dopolnimo do oznake z vodo, premešamo, filtriramo in izmerimo optično rotacijo, kot je navedeno v drugem in tretjem odstavku 5.2.

## 6. Izračun rezultatov

Vsebnost škroba (%) izračunamo na naslednji način:

6.1. Meritve s polarimetrom

$$\text{Vsebnost škroba (\%)} = \frac{2000 (P-P')}{[\alpha]_D^{20}}$$

P = celotna optična rotacija, v kotnih stopinjah

P' = optična rotacija, v kotnih stopinjah, snovi, ki so topne v 40 % (V/V) etanolu

$[\alpha]_D^{20}$  = specifična optična rotacija čistega škroba. Dogovorno sprejete numerične vrednosti za faktor so naslednje

- + 185.9°: rižev škrob
- + 185.4°: krompirjev škrob
- + 184.6°: koruzni škrob
- + 182.7°: pšenični škrob
- + 181.5°: ječmenov škrob
- + 181.3°: ovseni škrob
- + 184.0°: druge vrste škroba in škrobnih mešanic v krmnih mešanicah

6.2 Meritve s saharometrom

$$\text{Vsebnost škroba (\%)} = 2000 / [\alpha]_D^{20} \times [(2N \times 0,665) \times (S-S') / 100] - [26,6 N \times (S-S') / [\alpha]_D^{20}]$$

S = celotna optična rotacija, v saharometrijskih stopinjah

S' = optična rotacija v saharometrijskih stopinjah snovi, ki so topne v 40 % (V/V) etanolu

N = masa (g) saharoze v 100 ml vode, ki daje optično rotacijo 100 saharometrijskih stopinj, kadar se meri z uporabo 200 mm epruvete

16,29 g za francoske saharometre

26,00 g za nemške saharometre

20,00 g za mešane saharometre.

$[\alpha]_D^{20}$  = specifična optična rotacija čistega škroba (6.1)

6.3. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 0,4 absolutne vrednosti za vsebnost škroba, ki je nižja od 40 % in 1,1 % relativne vrednosti, za vsebnost škroba, ki je enaka ali višja od 40 %.

## 7. Pripombe

7.1 Če vzorec vsebuje več kot 6 % karbonatov, izračunanih v obliki kalcijevega karbonata, jih moramo pred določitvijo celotne optične rotacije razkrojiti z obdelavo s primerno točno količino razredčene žveplove (VI) kisline.

7.2 V primeru proizvodov, ki imajo visoko vsebnost laktoze, kot je serum mleka v prahu ali posneto mleko v prahu, po dodatku 80 ml etanola (3.5) izvajamo naslednje. Na bučko namestimo povratni hladilnik in jo za 30 minut potopimo v vodno kopel pri 50° C. Nato pustimo, da se ohladi in nadaljujemo z analizo, kot je navedeno v 5.3.

7.3 Za naslednja posamična krmila, v primeru, če so prisotne v znatni količini v krmu, je poznano, da povzročijo motnje pri določanju vsebnosti škroba s pomočjo polarimetrične metode, zaradi česar se lahko pojavijo nepravilni rezultati:

- proizvodi iz (sladkorne) pese, kot je pulpa, melasa iz sladkorne pese, melasirana pulpa, usedlina pri destilaciji, pesni sladkor,
- pulpa citrusov,
- laneno seme; laneno seme z nižjo vrednostjo maščobe (ekspeler); ekstrahirano laneno seme,
- seme oljne repice; oljna repica z nižjo vrednostjo maščobe (ekspeler), ekstrakt oljne repice; luske oljne repice,
- sončnično seme; ekstrahirano sončnično seme, sončnično seme, delno oluščeno, ekstrahirano,
- kopro, z nižjo vrednostjo maščobe (ekspeler); ekstrahirana kopra,
- krompirjeva pulpa,
- dehidrirani kvas,
- proizvodi, bogati z inulinom (npr. čips in zdrob topinamburja),
- ocvirki.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 72/199/EGS.

## METODA 11\*

### DOLOČANJE SUROVEGA PEPELA

#### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo določamo vsebnost surovega pepela v krmi.

#### 2. Princip

Vzorec upepelimo pri 550° C; preostanek stehtamo.

#### 3. Reagenti

20-odstotna (m/v) raztopina amonijevega nitrata.

#### 4. Oprema

4.1 Grelna plošča.

4.2 Električna žarilna peč s termostatom.

4.3 Žarilni lončki za upepeljevanje iz platine ali iz zlitine platine in zlata (10 % Pt, 90 % Au), pravokotni (60 × 40 × 25 mm) ali okrogli (premer: od 60 do 75 mm, višina: od 20 do 25 mm).

#### 5. Postopek

Natehtamo približno 5 g vzorca s točnostjo 1 mg (2,5 g pri proizvodih, ki nabreknejo) in ga prenesemo v žarilni lonček, ki smo ga predhodno prežarili in stehtali. Lonček postavimo na grelno ploščo in postopoma segrevamo, da snov zogljeni. Potem ga postavimo v žarilno peč s temperaturo 550° C ±5° C. Na tej temperaturi ga pustimo toliko časa, da dobimo bel, svetlosiv ali rdečkast pepel, ki ne vsebuje ogljikovih delcev. Lonček postavimo v eksikator, ohladimo in takoj stehtamo.

#### 6. Izračun rezultata

Maso preostanka izračunamo tako, da odštejemo maso lončka.

Rezultat izrazimo kot odstotni masni delež glede na vzorec.

#### 7. Opombe

7.1 Snovi, ki jih je težko upepeliti, moramo najprej najmanj tri ure upepeljevati, nato jih ohladimo in dodamo nekaj kapljic 20-odstotne raztopine amonijevega nitrata (pazljivo, da se pepel ne razprši ali da ne nastanejo grude). Po sušenju v sušilniku nadaljujemo z žarenjem. Postopek po potrebi ponovimo, dokler upepelitev ni popolna.

7.2 V primeru snovi, odpornih proti obdelavi, opisani v 7.1, postopamo, kakor sledi: upepeljujemo tri ure, nato pepel prenesemo v toplo vodo in filtriramo skozi majhen filter brez pepela. Filter in njegovo vsebino upepelimo v istem lončku. Filtrat prenesemo v ohlajen lonček, uparimo do suhega, upepelimo in stehtamo.

7.3 V primeru olj in maščob točno natehtamo približno 25 g vzorca v lonček primerne velikosti. Upepelimo tako, da zažgemo snov s trakom iz filtrirnega papirja brez pepela. Po sežigu navlažimo s čim manj vode. Osušimo in upepelimo, kakor je opisano v 5.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 12\*

### DOLOČANJE PEPELA, NETOPNEGA V KLOROVODIKOVI KISLINI

#### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo določamo vsebnost mineralnih snovi, netopnih v klorovodikovi kislini v krmi. Uporabljata se lahko dve metodi, glede na naravo vzorca.

1.1 Metoda A: uporablja se za naravno organsko krmo in za večino krmnih mešanic;

1.2 Metoda B: uporablja se za mineralne in za krmne mešanice, ki vsebujejo več kakor 1 % snovi, ki niso topne v klorovodikovi kislini, določenih po metodi A.

#### 2. Princip

2.1 Metoda A: vzorec upepelimo, pepel raztopimo v vreli klorovodikovi kislini, netopni preostanek filtriramo in stehtamo.

2.2 Metoda B: vzorec obdelamo s klorovodikovo kislino. Raztopino filtriramo, preostanek upepelimo in tako dobljeni pepel obdelamo v skladu z metodo A.

### 3. Reagenti

- 3.1 Klorovodikova kislina 3 N.
- 3.2 20-odstotna (m/v) raztopina trikloroocetne kisline.
- 3.3 1-odstotna (m/v) raztopina trikloroocetne kisline.

### 4. Oprema

- 4.1 Grelna plošča.
- 4.2 Električna žarilna peč s termostatom.
- 4.3 Žarilni lončki za upepeljevanje iz platine ali iz zlitine platine in zlata (10 % Pt, 90 % Au), pravokotni (60 x 40 x 25 mm) ali okrogli (premer: 60 do 75 mm, višina: od 20 do 25 mm).

### 5. Postopek

#### 5.1 Metoda A:

Vzorec upepelimo po metodi za določanje surovega pepela. Lahko uporabimo tudi pepel, ki smo ga dobili pri tej analizi. Pepel prenesemo v 250 do 400 mililitrsko čašo s 75 ml klorovodikove kisline 3 N (3.1). Počasi segrejemo do vrenja in pustimo rahlo vreti petnajst minut. Toplo raztopino filtriramo skozi filtrirni papir brez pepela in preostanek spiramo s toplo vodo do prenehanja kisle reakcije. Filter s preostankom in pepelom osušimo v tariranem žarilnem lončku pri temperaturi, ki ni nižja od 550° C in ne višja od 700° C. Ohladimo v eksikatorju in sthamo.

#### 5.2 Metoda B

Natehtamo 5 g vzorca s točnostjo na najbližji mg in ga prenesemo v 250 do 400 mililitrsko čašo. Dodamo 25 ml vode in nato 25 ml klorovodikove kisline 3 N (3.1), premešamo in počakamo, da se reakcija umiri. Dodamo še 50 ml klorovodikove kisline 3 N (3.1). Počakamo, da preneha sproščanje plinov, nato postavimo čašo v kopel z vrelo vodo in pustimo trideset minut ali več, da hidrolizira ves morebitno prisotni škrob.

Še toplo filtriramo skozi filter brez pepela in filter speremo s 50 ml tople vode (glej opombo 7). Filter, ki vsebuje preostanek, prenesemo v žarilni lonček, osušimo in upepelimo pri temperaturi, ki ni nižja od 550° C in ne višja od 700° C. Pepel prenesemo v 250 do 400 mililitrsko čašo z uporabo 75 ml klorovodikove kisline 3 N (3.1); nadaljujemo, kakor je opisano v drugem pododstavku 5.1.

### 6. Izračun rezultatov

Maso preostanka izračunamo tako, da odštejemo taro. Rezultat izrazimo v odstotnem masnem deležu glede na vzorec.

### 7. Opomba

Če pri filtriranju nastopijo težave, analizo ponovimo in pri tem 50 ml klorovodikove kisline 3 N (3.1) nadomestimo s 50 ml 20-odstotne trikloroocetne kisline (3.2), filter pa spiramo s toplo raztopino 1-odstotne trikloroocetne kisline (3.3).

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 13\* DOLOČANJE KLORA IZ KLORIDOV

### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo je mogoče določiti količino klora iz kloridov, topnih v vodi, ki jih dogovorno izrazimo kot natrijev klorid. Uporablja se za vso krmo.

### 2. Princip

Kloride raztopimo v vodi. Če proizvod vsebuje organske snovi, ga zbistriamo. Raztopino rahlo nakisamo z dušikovo kislino in kloride oborimo v obliki srebrovega klorida z raztopino srebrovega nitrata. Presežek srebrovega nitrata titriramo z raztopino amonijevega tiocianata po Volhardovi metodi.

### 3. Reagenti

- 3.1 Raztopina amonijevega tiocianata 0,1 N.
- 3.2 Raztopina srebrovega nitrata 0,1 N.
- 3.3 Nasičena raztopina amonij-železovega (III) sulfata.
- 3.4 Dušikova kislina, d: 1,38.
- 3.5 Dietileter p. a.

3.6 Aceton p. a.

3.7 Raztopina Carrez I: 21,9 g cinkovega acetata  $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$  in 3 g ledoceta raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.8 Raztopina Carrez II: 10,6 g kalijevega ferocianida  $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$  raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.9 Aktivno oglje p. a., ki ne vsebuje kloridov in jih ne absorbira.

#### 4. Oprema

Mešalnik: približno 35 do 40 obr./min.

#### 5. Postopek

##### 5.1 Priprava raztopine

Ovisno od narave vzorca pripravimo raztopino, kakor je navedeno v 5.1.1, 5.1.2 ali 5.1.3.

Hkrati opravimo slepi preskus brez vzorca, ki ga analiziramo.

##### 5.1.1 Vzorci brez organskih snovi

S točnostjo 1 mg natehtamo ne več kakor 10 g vzorca, ki vsebuje največ 3 g klora v obliki kloridov. S 400 ml vode ga prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko pri približno 20° C. Trideset minut mešamo v mešalniku, dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

##### 5.1.2 Vzorci, ki vsebujejo organske snovi, razen proizvodov, navedenih v 5.1.3

Natehtamo približno 5 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga skupaj z 1 g aktivnega oglja prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko. Dodamo 400 ml vode s temperaturo približno 20° C in 5 ml raztopine Carrez I (3.7), premešamo in dodamo 5 ml raztopine Carrez II (3.8). Trideset minut mešamo v mešalniku, dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

##### 5.1.3 Kuhana krma, lanene pogače in moka, proizvodi, ki vsebujejo veliko lanene moke, in drugi proizvodi, ki vsebujejo veliko lepila ali koloidnih snovi (na primer dekstriniran škrob)

Pripravimo raztopino, kakor je opisano v 5.1.2, vendar ne filtriramo. Dekantiramo (po potrebi centrifugiramo) in 100 ml bistre tekočine prenesemo v 200 mililitrsko merilno bučko. Dodamo aceton (3.6) in z njim dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

##### 5.2 Titracija

S pipeto prenesemo v erlenmajerico od 25 ml do 100 ml filtrata (glede na pričakovano vsebnost klora), ki smo ga dobili, kakor je opisano v 5.1.1, 5.1.2 ali 5.1.3. Alikvot ne sme vsebovati več kakor 150 mg klora (Cl). Po potrebi z vodo razredčimo na najmanj 50 ml, dodamo 5 ml dušikove kisline (3.4), 20 ml nasičene raztopine amonij-železovega (III) sulfata (3.3) in dve kapljici raztopine amonijevega tiocianata (3.1), ki ga dodamo iz birete, napolnjene do oznake nič. Z bireto dodamo raztopino srebrovega nitrata (3.2), tako da dobimo 5 ml prebitka. Dodamo 5 ml dietiletra (3.5) in dobro pretresemo, da oborina koagulira.

Presežek srebrovega nitrata titriramo z raztopino amonijevega tiocianata (3.1), dokler ne dobimo rdečkastorjavega odtenka, ki je obstojen eno minuto.

#### 6. Izračun rezultata

Količina klora (W), izražena kot natrijev klorid, ki je v titriranem volumnu, se izračuna z naslednjo formulo:

$$W = 5,845 (V_1 - V_2) \text{ mg}$$

pri čemer je:

$V_1$  = ml dodane raztopine srebrovega nitrata  $C = 0,1 \text{ N}$ ,

$V_2$  = ml za titracijo uporabljene raztopine amonijevega tiocianata  $0,1 \text{ N}$ .

Če je bil pri slepem preskusu porabljen srebrov nitrat  $0,1 \text{ N}$ , to vrednost odštejemo od volumna ( $V_1 - V_2$ ).

#### 7. Opombe

7.1 Titracijo lahko izvedemo tudi potenciometrično;

7.2 Proizvode, ki vsebujejo veliko olj in maščob, najprej razmastimo z dietiletrom ali s petroletrom;

7.3 Ribjo hrano je mogoče titrirati po Mohrovi metodi.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 14\*

### DOLOČANJE KALIJA

#### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo določamo vsebnost kalija v krmi.

#### 2. Princip

Vzorec upepelimo in pepel raztopimo v klorovodikovi kislini. Vsebnost kalija v raztopini določimo s plamensko fotometrijo v prisotnosti cezijevega klorida in aluminijevega nitrata. Dodatek teh snovi v veliki meri odstrani interference motečih elementov.

#### 3. Reagenti

3.1 Klorovodikova kislina p. a., d: 1,12.

3.2 Cezijev klorid p. a.

3.3 Aluminijev nitrat  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ , navaden.

3.4 Kalijev klorid p. a., brezvoden.

3.5 Nosilec: v vodi raztopimo 50 g cezijevega klorida (3.2) in 250 g aluminijevega nitrata (3.3), dopolnimo z vodo do enega litra in premešamo. Hranimo v plastenkah.

3.6 Standardna raztopina kalija: v vodi raztopimo 1,907 g kalijevega klorida (3.4), dodamo 5 ml klorovodikove kisline (3.1), dopolnimo z vodo do enega litra in premešamo. Hranimo v plastenkah. 1 ml te raztopine vsebuje 1,00 mg kalija.

#### 4. Oprema

4.1 Žarilni lončki iz platine, kremenca ali porcelana, po potrebi s pokrovi.

4.2 Električna žarilna peč s termostatom.

4.3 Plamenski fotometer.

#### 5. Postopek

##### 5.1 Analiza vzorca

Praviloma natehtamo 10 g vzorca s točnostjo 10 mg v žarilni lonček in tri ure upepeljujemo pri 450° C. Po ohladitvi pepel kvantitativno prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko z 250 do 300 ml vode in nato dodamo 50 ml klorovodikove kisline (3.1). Ko preneha izhajati ogljikov dioksid, raztopino segrejemo in pustimo dve uri na temperaturi 90° C. Medtem jo občasno premešamo. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo z vodo do oznake, pretresemo in filtriramo. V 100 mililitrsko merilno bučko prenesemo alikvotni del filtrata, ki vsebuje največ 1,0 mg kalija, dodamo 10,0 ml nosilca (3.5), dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. V primeru večjih količin kalija raztopino, ki jo analiziramo, pred dodatkom nosilca primerno razredčimo.

Spodnja tabela je navedena kakor vodilo za približno 10 g vzorca.

Pričakovana vsebnost kalija v vzorcu (% K)	Faktor razredčitve	Alikvot v ml raztopine
do 0,1	-	50
0,1 do 0,5	-	10
0,5 do 1,0	-	5
1,0 do 5,0	1 : 10	10
5,0 do 10,0	1 : 10	5
10,0 do 20,0	1 : 20	5

S plamensko fotometrijo merimo pri valovni dolžini 768 nm. Rezultat izračunamo iz umeritvene krivulje.

##### 5.2 Umeritvena krivulja

10 ml standardne raztopine (3.6) prenesemo v 250 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. V 100 mililitrsko merilno bučko odpipetiramo 5, 10, 15, 20 in 25 ml te raztopine, kar ustreza 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 in 1,0 mg kalija. Vsaki seriji dodamo bučko za slepi preskus brez standardne raztopine. V vsako bučko dodamo 10 ml nosilca (3.5), dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Izmerimo, kakor je navedeno v 5.1. Umeritvena krivulja je do koncentracije kalija 1 mg na 100 ml raztopine navadno linearna.

#### 6. Izračun rezultata

Rezultat izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

## 7. Opombe

Za odstranitev interferenc motečih elementov ni treba vedno dodati nosilca (3.5).

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 15\* DOLOČANJE NATRIJA

### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje vsebnosti natrija v krmi.

### 2. Princip

Vzorec upepelimo in raztopimo pepel v klorovodikovi kislini. Vsebnost natrija v raztopini določimo s plamensko fotometrijo v prisotnosti cezijevega klorida in aluminijevega nitrata. Dodatek teh snovi v veliki meri odstrani interference motečih elementov.

### 3. Reagenti

3.1 Klorovodikova kislina p. a., d: 1,12.

3.2 Cezijev klorid p. a.

3.3 Aluminijev nitrat Al (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> x 9 H<sub>2</sub>O, navaden.

3.4 Natrijev klorid p. a., brezvoden.

3.5 Nosilec: v vodi raztopimo 50 g cezijevega klorida (3.2) in 250 g aluminijevega nitrata (3.3), z vodo dopolnimo do enega litra in premešamo. Hranimo v plastenkah.

3.6 Standardna raztopina natrija: v vodi raztopimo 2,542 g natrijevega klorida (3.4), dodamo 5 ml klorovodikove kisline (3.1), dopolnimo z vodo do enega litra in premešamo. Hranimo v plastenkah. 1 ml te raztopine vsebuje 1,00 mg natrija.

### 4. Oprema

4.1 Žarilni lončki iz platine, kremena ali porcelana, po potrebi s pokrovi.

4.2 Električna žarilna peč s termostatom.

4.3 Plamenski fotometer.

### 5. Postopek

#### 5.1 Analiza vzorca

Praviloma natehtamo 10 g vzorca s točnostjo 10 mg, prenesemo v žarilni lonček (4.2) in tri ure upepeljemo pri 450° C. Pazimo, da se ne pregreje (vžig). Po ohladitvi pepel kvantitativno prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko z 250 do 300 ml vode in nato dodamo 50 ml klorovodikove kisline (3.1). Ko preneha izhajanje ogljikovega dioksida, raztopino segrejemo in pustimo dve uri na temperaturi 90° C. Medtem jo občasno premešamo. Ohladimo na sobno temperaturo, dopolnimo z vodo do oznake, pretresemo in filtriramo. V 100 mililitrsko merilno bučko prenesemo alikvot filtrata, ki vsebuje največ 1,0 mg natrija, dodamo 10,0 ml nosilca (3.5), dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. V primeru večjih količin natrija raztopino, ki jo analiziramo, pred dodatkom nosilca primerno razredčimo.

Spodnja tabela je navedena kakor vodilo za približno 10 g vzorca.

Pričakovana vsebnost natrija v vzorcu (% Na)	Faktor razredčitve	Alikvot v ml raztopine
do 0,1	-	50
0,1 do 0,5	-	10
0,5 do 1,0	-	5
1,0 do 5,0	1 : 10	10
5,0 do 10,0	1 : 10	5
10,0 do 20,0	1 : 20	5

S plamensko fotometrijo merimo pri valovni dolžini 589 nm. Rezultat izračunamo iz umeritvene krivulje.

## 5.2 Umeritvena krivulja

10 ml standardne raztopine (3.6) prenesemo v 250 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. V 100 mililitrsko merilno bučko odpipetiramo 5, 10, 15, 20 in 25 ml te raztopine, kar ustreza 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 in 1,0 mg natrija. Vsaki seriji dodamo bučko s slepim preskusom brez standardne raztopine. V vsako bučko dodamo 10 ml nosilca (3.5), dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Izmerimo, kakor je navedeno v 5.1. Umeritvena krivulja je do koncentracije natrija do 1 mg na 100 ml raztopine navadno linearna.

## 6. Izračun rezultata

Rezultat izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

## 7. Opombe

7.1 Pri proizvodih, ki vsebujejo več kakor 4 % natrija, je priporočljivo, da snov upepeljemo dve uri v lončku s pokrovom. Po ohladitvi dodamo vodo, suspendiramo pepel s platinasto žico, osušimo in ponovno dve uri upepeljemo v pokritem lončku.

7.2 Če vzorec vsebuje samo mineralne snovi, raztapljamo brez predhodne upepelitve.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

# METODA 16\*

## DOLOČANJE KALCIJA

### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo določamo skupno vsebnost kalcija v krmi.

### 2. Princip

Kalcij upepelimo, pepel obdelamo s klorovodikovo kislino in kalcij oborimo kot kalcijev oksalat. Oborino raztopimo v žveplovi (VI) kislini in nastalo oksalno kislino titriramo z raztopino kalijevega permanganata.

### 3. Reagenti

- 3.1 Klorovodikova kislina p. a., d: 1,14
- 3.2 Dušikova (V) kislina p. a., d: 1,40
- 3.3 Žveplova (VI) kislina p. a., d: 1,13
- 3.4 Amoniak p. a., d: 0,98
- 3.5 Hladna nasičena raztopina amonijevega oksalata p. a.
- 3.6 30-odstotna (m/v) raztopina citronske kisline p. a.
- 3.7 5-odstotna (m/v) raztopina amonijevega klorida p. a.
- 3.8 0,04-odstotna (m/v) raztopina bromokrezol zelenega
- 3.9 Raztopina kalijevega premanganata 0,1 N

### 4. Oprema

- 4.1 Električna žarilna peč s kroženjem zraka in termostatom.
- 4.2 Žarilni lončki iz platine, kremenca ali porcelana.
- 4.3 Stekljeni filtrirni lončki, poroznosti G<sub>4</sub>.

### 5. Postopek

Natehtamo približno 5 g vzorca (ali več, če je potrebno) s točnostjo 1 mg, upepelimo pri 550° C in pepel prenesemo v 250 mililitrsko čašo.

Dodamo 40 ml klorovodikove kisline (3.1), 60 ml vode in nekaj kapljic dušikove kisline (3.2). Segrejemo do vrenja in pustimo vreti trideset minut. Ohladimo in raztopino prelijemo v 250 mililitrsko merilno bučko. Speremo z vodo, dopolnimo z vodo do oznake, premešamo in filtriramo.

V 250 mililitrsko čašo odpipetiramo alikvot, ki glede na pričakovano vsebnost kalcija vsebuje 10 do 40 mg kalcija. Dodamo 1 ml raztopine citronske kisline (3.6) in 5 ml raztopine amonijevega klorida (3.7).

Z vodo dopolnimo do približno 100 ml. Segrejemo do vrenja, dodamo osem do deset kapljic raztopine bromokrezol zelenega (3.8) in 30 ml tople raztopine amonijevega oksalata (3.5). Če nastane oborina, jo raztopimo z dodatkom nekaj kapljic klorovodikove kisline (3.1).



Med neprestanim mešanjem zelo počasi nevtraliziramo z amoniakom (3.4), dokler ne dosežemo pH 4,4 do 4,6 (ko indikator spremeni barvo). Čašo za trideset minut postavimo v kopel z vrelo vodo, da se nastala oborina sesede. Čašo vzamemo iz kopeli. Pustimo stati eno uro, nato filtriramo skozi filtrirni lonček G<sub>4</sub>.

Čašo in lonček spiramo z vodo do popolne odstranitve prebitka amonijevega oksalata (če ni klorida v izpiralni vodi pomeni, da je oborina dovolj dobro sprana).

Oborino na filtru speremo s 50 ml tople žveplove (VI) kisline (3.3). Lonček speremo s toplo vodo in filtrat razredčimo z vodo do približno 100 ml. Segrejemo na 70-80° C in po kapljicah titriramo z raztopino kalijevega permanganata (3.9), do rožnate barve, ki je obstojna eno minuto.

## 6. Izračun rezultata

1 ml kalijevega permanganata 0,1 N ustreza 2,004 mg kalcija. Dobljeni rezultat izrazimo v masnem deležu glede na vzorec.

## 7. Opombe

7.1 Pri zelo nizkih vsebnostih kalcija postopamo, kakor sledi: oborino kalcijevega oksalata filtriramo skozi filtrirni papir, ki ne vsebuje pepela. Po spiranju osušimo filter in ga upepelimo pri 550 °C v platinastem lončku. Ostanek raztopimo z nekaj kapljicami žveplove (VI) kisline (3.3), izparimo do suhega, ponovno upepelimo pri 550 °C in stehamo. Če je  $W$  masa dobljenega kalcijevega sulfata, je vsebnost kalcija v alikvotu vzorca enaka  $= W \times 0,2944$ .

7.2 Če je vzorec sestavljen izključno iz mineralnih snovi, ga raztopimo v klorovodikovi kislini, ne da bi ga predhodno upepelili. V primeru proizvodov, kot je kalcij-aluminijev fosfat, ki je težko topen v kislini, pred raztapljanjem talimo z alkalnim postopkom tako: vzorec, ki ga bomo analizirali, dobro premešamo v platinskem lončku s petkratno količino mešanice, sestavljene iz enakih delov kalijevega karbonata in natrijevega karbonata. Pazljivo segrevamo, dokler mešanica ni popolnoma raztaljena. Ohladimo in raztopimo v klorovodikovi kislini.

7.3 Če vzorec vsebuje veliko magnezija, kalcijev oksalat ponovno oborimo.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 17\*

### DOLOČANJE MAGNEZIJA

#### – z atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo

## 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določitev količine magnezija v krmih. Posebej je primerna za določanje vsebnosti magnezija, nižjih od 5 %.

## 2. Princip

Vzorec upepelimo in raztopimo v razredčeni klorovodikovi kislini. Če ne vsebuje organskih snovi, ga direktno raztopimo v razredčeni klorovodikovi kislini. Raztopino razredčimo in določimo vsebnost magnezija z atomsko absorpcijsko spektrofotometrijo pri 285,2 nm s primerjavo s standardnimi raztopinami.

## 3. Reagenti

3.1 Klorovodikova kislina p. a. d: 1,16.

3.2 Koncentrirana klorovodikova kislina p. a. d: 1,19.

3.3 Magnezijev trak ali žica oziroma magnezijev sulfat heptahidrat, osušen na sobni temperaturi.

3.4 2,5 odstotna (m/v) raztopina stroncijeve soli (klorid ali nitrat) stroncij (= 76,08 g SrCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O p. a. ali 60,38 g Sr(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> p. a.).

3.5 Standardna raztopina magnezija: s točnostjo mg natehtamo 1 g magnezija (3.3), kateremu je bila predhodno previdno odstranjena oksidna plast, ali ustrežna količina (10,143 g) magnezijevega sulfata heptahidrata (3.3). Prenesemo ga v 1000 mililitrsko merilno bučko, dodamo 80 ml klorovodikove kisline (3.1), pustimo, da se raztopi, in dopolnimo z vodo do 1000 ml. 1 ml te raztopine vsebuje 1,000 mg magnezija.

## 4. Oprema

4.1 Platinski, kremenasti ali porcelanski žarilni lonček.

4.2 Termostatsko regulirana električna žarilna peč.

4.3 Atomski absorpcijski spektrofotometer.

## 5. Postopek

### 5.1 Priprava vzorčne raztopine

#### 5.1.1 Krma, sestavljena izključno iz mineralnih snovi

S točnostjo na 1 mg natehtamo 5 g vzorca v 500 mililitrsko merilno bučko z 250 do 300 ml vode. Dodamo 40 ml klorovodikove kisline (3.1), zavremo in tekočino pustimo rahlo vreti 30 minut. Pustimo, da se ohladi, dopolnimo z vodo do oznake, premešamo in filtriramo v suho čašo skozi suh naguban filter. Prvih 30 ml filtrata zavržemo. Če vzorec vsebuje silicijev dioksid, dodamo 5 g vzorca z zadostno količino (15-30 ml) klorovodikove kisline (3.2), izparimo do suhega na vodni kopeli in postavimo za eno uro v sušilnik pri 105° C. Nadaljujemo, kakor je opisano v tretjem stavku 5.1.2.

#### 5.1.2 Krma, sestavljena pretežno iz mineralnih snovi

S točnostjo na 1 mg natehtamo 5 g vzorca v lonček in žarimo pri 550° C v žarilni peči tako dolgo, da pepel ne vsebuje ogljikovih delcev, ter nato ohladimo. Da odstranimo silicijev dioksid, pepelu dodamo zadostno količino (15-30 ml) klorovodikove kisline (3.2), izparimo do suhega na vodni kopeli in prenesemo za eno uro v sušilnik pri 105° C. Ostanke dodamo 10 ml klorovodikove kisline (3.1) in z uporabo tople vode prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko. Pustimo, da se ohladi, in dopolnimo z vodo do oznake. Premešamo in filtriramo v suho čašo skozi suh naguban filter. Prvih 30 ml filtrata zavržemo.

#### 5.1.3 Krma, sestavljena pretežno iz organskih snovi

S točnostjo 1 mg natehtamo 5 g vzorca v lonček in žarimo pri 550° C v žarilni peči tako dolgo, da pepel ne vsebuje ogljikovih delcev. Da dobimo netopen silicijev dioksid, pepelu dodamo 5 ml klorovodikove kisline (3.2), izparimo do suhega na vodni kopeli in nato eno uro sušimo v sušilniku pri 105° C. Pepelu dodamo 5 ml klorovodikove kisline (3.1), s toplo vodo prenesemo v 250 mililitrsko merilno bučko, segrejemo do vrenja, pustimo ohladiti in dopolnimo z vodo do oznake. Premešamo in skozi suh naguban filter filtriramo v suho čašo. Prvih 30 ml filtrata zavržemo.

### 5.2 Merjenje z atomsko absorpcijo

Z razredčenjem standardne raztopine (3.5) z vodo pripravimo najmanj 5 referenčnih raztopin z naraščajočimi koncentracijami, ki ustrezajo optimalnemu merilnemu območju spektrofotometra. Vsaki raztopini dodamo 10 ml raztopine stroncijeve soli (3.4) in dopolnimo z vodo do 100 ml. Z vodo razredčimo alikvot filtrata, dobljenega v 5.1.1, 5.1.2 ali 5.1.3, tako, da dobimo koncentracija magnezija znotraj meja koncentracije referenčnih raztopin. Koncentracija klorovodikove kisline v tej raztopini ne sme preseči 0,4 N. Dodamo 10 ml raztopine stroncijeve soli (3.4) in dopolnimo z vodo do 100 ml. Absorpcijo določane raztopine in referenčnih raztopin merimo pri 285,2 nm.

## 6. Izračun rezultatov

Količino magnezija v vzorcu izračunamo glede na referenčne raztopine. Rezultat izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati 5 % relativne vrednosti.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 73/46/EGS.

## METODA 18\*

### DOLOČANJE CELOTNEGA FOSFORJA FOTOMETRIČNA METODA

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče določati vsebnost celotnega fosforja v krmi. Posebno primerna je za analizo proizvodov z nizko vsebnostjo fosforja. V nekaterih primerih (pri proizvodih, ki vsebujejo veliko fosforja) se lahko uporabi gravimetrična metoda.

#### 2. Princip

Vzorec mineraliziramo s suhim sežigom (pri organski krmi) ali z raztapljanjem s kislino (pri mineralnih mešanica in tekoči krmi) ter ga prenesemo v raztopino kisline. Raztopini dodamo molibdovanadatni reagent. Optično gostoto rumene raztopine, ki pri tem nastane, merimo s spektrofotometrom pri 430 nm.

#### 3. Reagenti

3.1 Kalcijev karbonat p. a.

3.2 Klorovodikova kislina p. a., d: 1,1 (približno 6 M).

3.3 Dušikova (V) kislina p. a., d: 1,045.

3.4 Dušikova (V) kislina p. a., d: od 1,38 do 1,42.

3.5 Žveplova (VI) kislina p. a., d: 1,84.

3.6 Molibdovanadatni reagent: V litrski merilni bučki zmešamo 200 ml raztopine amonijevega heptamolibdata (3.6.1), 200 ml raztopine amonijevega monovanadata (3.6.2) in 134 ml dušikove (V) kisline (3.4). Z vodo dopolnimo do oznake.

3.6.1 Raztopina amonijevega heptamolibdata: v vroči vodi raztopimo 100 g amonijevega heptamolibdata p. a.  $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ . Dodamo 10 ml amonijaka (d: 0,91) in z vodo dopolnimo do 1 litra.

3.6.2 Raztopina amonijevega monovanadata: v 400 ml vroče vode raztopimo 2,35 g amonijevega monovanadata p. a.  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ . Med neprestanim mešanjem počasi dodamo 20 ml razredčene dušikove (V) kisline (7 ml  $\text{HNO}_3$  (3.4) + 13 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.7 Standardna raztopina 1 mg fosforja na 1 ml: v vodi raztopimo 4,387 g kalijevega dihidrogen fosfata p. a.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Z vodo dopolnimo do 1 litra.

#### 4. Oprema

4.1 Žarilni lončki iz kremenca ali porcelana.

4.2 Električna žarilna peč s termostatom, nastavljenim na 550° C.

4.3 250 mililitrska Kjeldahlova bučka.

4.4 Merilne bučke in precizne pipete.

4.5 Spektrofotometer.

4.6 Epruvete s premerom približno 16 mm, z brušenimi zamaški 14,5 mm; prostornina: od 25 do 30 ml.

#### 5. Postopek

##### 5.1 Priprava raztopine

Glede na naravo vzorca pripravimo raztopino, kakor je navedeno v 5.1.1 ali 5.1.2.

##### 5.1.1 Standardni postopek

Natehtamo 1 g ali več vzorca s točnostjo 1 mg. Vzorec prenesemo v Kjeldahlovo bučko, dodamo 20 ml žveplave (V) kisline (3.5), pretresemo, da se vzorec popolnoma prepoji s kislino in da se ne prijema stranic bučke, segrejemo in pustimo vreti 10 minut. Nekoliko ohladimo, dodamo 2 ml dušikove (V) kisline (3.4), pazljivo segrejemo, nekoliko ohladimo, dodamo še nekaj dušikove (V) kisline (3.4) in ponovno segrejemo do vrenja. Postopek ponavljamo toliko časa, da dobimo brezbarvno raztopino. Ohladimo, dodamo nekaj vode, odlijemo tekočino v 500 mililitrsko merilno bučko in Kjeldahlovo bučko speremo z vročo vodo. Ohladimo, z vodo dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

##### 5.1.2 Vzorci, ki vsebujejo organske snovi in ne vsebujejo kalcijevih in magnezijevih dihidrogen fosfatov

V žarilni lonček natehtamo približno 2,5 g vzorca s točnostjo 1 mg. Dodamo 1 g kalcijevega karbonata (3.1) in mešamo, da se snovi popolnoma premešata. Žarimo v pečici pri 550° C  $\pm 5^\circ$  C, da dobimo bel ali siv pepel (majhna količina oglja ni problematična). Pepel prenesemo v 250 mililitrsko čašo. Dodamo 20 ml vode in dodajamo klorovodikovo kislino (3.2) do prenehanja izhajanja mehurčkov. Dodamo še 10 ml klorovodikove kisline (3.2). Čašo postavimo na peščeno kopel in izparevamo do suhega, da dobimo netopen  $\text{SiO}_2$ . Preostanek raztopimo v 10 ml dušikove (V) kisline (3.3) in na peščeni kopeli pustimo vreti 5 minut, da raztopina ne izpari. Tekočino prelijemo v 500 mililitrsko merilno bučko in čašo nekolikokrat speremo z vročo vodo. Ohladimo, z vodo dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

##### 5.2 Razvijanje barve in merjenje optične gostote

Alikvot filtrata iz 5.1.1 ali 5.1.2 razredčimo tako, da dobimo koncentracijo fosforja do 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . 10 ml te raztopine odpipetiramo v epruveto (4.6) in dodamo 10 ml molibdovanadatnega reagenta (3.6). Premešamo in pustimo stati najmanj 10 minut pri 20 °C. Izmerimo optično gostoto s spektrofotometrom pri 430 nm proti raztopini, ki vsebuje 10 ml molibdovanadatnega reagenta (3.6) v 10 ml vode.

##### 5.3 Umeritvena krivulja

Iz standardne raztopine (3.7) pripravimo raztopine, ki vsebujejo 5, 10, 20, 30 in 40  $\mu\text{g}$  fosforja na 1 ml. V 10 ml vsake izmed teh raztopin dodamo 10 ml molibdovanadatnega reagenta (3.6), premešamo in pustimo stati najmanj 10 minut pri 20 °C. Izmerimo optično gostoto, kakor je navedeno v 5.2.

Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da v diagram vnesemo izmerjene optične gostote proti ustreznim količinam fosforja. Za koncentracije med 0 in 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  bo krivulja linearna.

#### 6. Izračun rezultatov

Množino fosforja v preskusnem vzorcu določimo iz umeritvene krivulje.

Rezultat izrazimo kot odstotni masni delež glede na vzorec.

Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

3% relativne vrednosti, če je vsebnost fosforja nižja od 5 %;

0,15 % absolutne vrednosti, če je vsebnost fosforja 5 % ali več.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/393/EGS.

## METODA 19\*

### DOLOČANJE ŽELEZA, BAKRA, MANGANA IN CINKA V SLEDIVIH

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče določiti vsebnost železa, bakra, mangana in cinka v sledivih v krmi. Spodnje meje določanja so:

železo (Fe): 20 mg/kg

baker (Cu): 10 mg/kg

mangan (Mn): 20 mg/kg

cink (Zn): 20 mg/kg

#### 2. Princip

Po razkroju morebitnih organskih snovi vzorec raztopimo v klorovodikovi kislini. Po primernem razredčenju določimo železo, baker, mangan in cink z atomsko absorpcijsko spektrometrijo.

#### 3. Reagenti

Uvodne opombe

Za pripravo reagentov in raztopin za analizo uporabimo vodo brez kationov, kar dosežemo z dvojnimi destiliranjem vode v destilatorju iz borosilikatnega ali kremenovega stekla ali z dvojno ionsko izmenjavo.

Reagenti morajo biti najmanj analitske čistote (p.a.). Odsotnost elementa, ki ga določamo, preverjamo s slepim preskusom. Po potrebi moramo reagente dodatno prečistiti.

Namesto spodaj opisanih običajnih raztopin lahko uporabimo komercialne standardne raztopine, če so zajamčene in so bile pred uporabo preverjene.

3.1 Klorovodikova kislina p.a. (d: 1,19).

3.2 Klorovodikova kislina p.a. (6 N).

3.3 Klorovodikova kislina p.a. (0,5 N).

3.4 38 do 40 odstotna (v/v) klorovodikova kislina z vsebnostjo železa manj kot 1 mg Fe/liter in z manj kot 10 mg (v obliki sulfata)/liter ostanka po izparevanju.

3.5 Žveplova (VI) kislina p.a. (d: 1,84).

3.6 Vodikov peroksid p.a. (približno 100 volumnov kisika (30 % po masi)).

3.7 Standardna raztopina železa (1 000 µg Fe/ml), pripravljena: v 200 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2) raztopimo 1 g železne žice p.a., dodamo 16 ml vodikovega peroksida (3.6) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.7.1 Standardna delovna raztopina železa (100 µg Fe/ml), pripravljena tako, da razredčimo standardno raztopino (3.7) z vodo 1 + 9.

3.8 Standardna raztopina bakra (1 000 µg Cu/ml), pripravljena: v 25 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2) raztopimo 1 g bakra v prahu (p.a.), dodamo 5 ml vodikovega peroksida (3.6) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.8.1 Standardna delovna raztopina bakra (10 µg Cu/ml), pripravljena tako, da razredčimo standardno raztopino (3.8) z vodo 1 + 9, nato pa to raztopino ponovno razredčimo z vodo 1 + 9.

3.9 Standardna raztopina mangana (1 000 µg Mn/ml), pripravljena: v 25 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2) raztopimo 1 g mangana v prahu (p.a.) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.9.1 Standardna delovna raztopina mangana (10 µg Mn/ml), pripravljena tako, da razredčimo standardno raztopino (3.9) z vodo 1 + 9, nato pa to raztopino ponovno razredčimo z vodo 1 + 9.

3.10 Standardna raztopina cinka (1 000 µg Zn/ml), pripravljena: v 25 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2) raztopimo 1 g cinka v foliji ali granulah (p.a.) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.10.1 Standardna delovna raztopina cinka (10 µg Zn/ml), pripravljena tako, da razredčimo standardno raztopino (3.10) z vodo 1 + 9, nato pa to raztopino ponovno razredčimo z vodo 1 + 9.

3.11 Raztopina lantanovega klorida, pripravljena: v 150 ml vode raztopimo 12 g lantanovega oksida, dodamo 100 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

#### 4. Oprema

4.1 Žarilna peč z regulacijo temperature in rekorderjem.

4.2 Stekljeni deli morajo biti iz odpornega borosilikata in priporočljivo je, da uporabljamo opremo, ki je namenjena izključno določanju elementov v sledivih.

4.3 Žarilni lonček iz platine in (možno) iz kremenca.

4.4 Atomski absorpcijski spektrofotometer, ki ustreza zahtevam metode glede občutljivosti in natančnosti zahtevanega območja.

## 5. Postopek

### 5.1 Vzorci, ki vsebujejo organske snovi

#### 5.1.1 Upepeljevanje in priprava raztopine za analizo\*

(i) Natehtamo 5 do 10 g vzorca s točnostjo 0,2 mg in ga prenesemo v žarilni lonček iz kremenca ali platine (4.3) (glej opombo (b)), osušimo v sušilniku pri 105° C in ga nato postavimo v hladno žarilno peč (4.1). Peč zapremo (glej opombo (c)) in približno 90 minut postopoma višamo temperaturo na 450 do 475° C. To temperaturo ohranjamo 4 do 16 ur (npr. čez noč), da odstranimo zoglenele snovi, nato pa peč odpremo in ohladimo (glej opombo (d)).

Lonček izperemo s skupno okoli 5 ml klorovodikove kisline (3.1) in to počasi in previdno prelijemo v čašo (lahko pride do burne reakcije zaradi nastanka CO<sub>2</sub>). Po kapljicah dodajamo klorovodikovo kislino (3.1) in mešamo, dokler izhajanje mehurčkov ne preneha. Izparevamo do suhega in pri tem občasno premešamo s stekleno palčko.

Nato dodamo preostanku 15 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2) in nato približno 120 ml vode. Premešamo s stekleno palčko, ki jo pustimo v čaši, čašo pa pokrijemo z urnim steklom. Počasi segrejemo do vrenja in pustimo vreti do popolnega raztapljanja pepela. Filtriramo skozi filter, ki ne vsebuje pepela, v 250 mililitrsko merilno bučko. Čašo in filter speremo s 5 ml vroče 6 N klorovodikove kisline (3.2) in dvakrat z vrelo vodo. Merilno bučko napolnimo z vodo do oznake (koncentracija HCl okoli 0,5 N).

(ii) Če je preostanek na filtru videti črn (ogljik), ga ponovno postavimo v peč in ponovno upepelimo pri 450 do 475° C. Ta upepelitev, ki zahteva le nekaj ur (okoli tri do pet ur), je dokončana, ko je pepel videti bel ali skoraj bel. Preostanek raztopimo v 2 ml klorovodikove kisline (3.1), izparimo do suhega in dodamo 5 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2). Segrejemo, filtriramo raztopino v merilno bučko in dopolnimo z vodo do oznake (koncentracija HCl okoli 0,5 N).

Opombe:

(a) Pri določanju elementov v sledovih je pomembno, da smo pozorni na nevarnost kontaminacije, predvsem s cinkom, bakrom in železom. Zato oprema, ki se uporablja pri pripravi vzorcev, ne sme vsebovati teh kovin.

Da bi zmanjšali splošno tveganje kontaminacije, delamo v brezprašnem prostoru s čisto opremo in dobro oprano stekleno posodo. Določanje cinka je posebej občutljivo na več vrst kontaminacije, npr. s stekleno posodo, reagenti, prahom, itd.

(b) Maso vzorca, ki ga bomo upepelili, izračunamo iz približne vsebnosti elementov v sledovih v krmi glede na občutljivost uporabljenega spektrofotometra. Pri krmi, ki vsebuje malo prvin v sledovih, bi lahko začeli z vzorcem, težkim 10 do 20 g in razredčenjem končne raztopine le do 100 ml.

(c) Upepeljevanje izvajamo v zaprti peči brez dovajanja zraka ali kisika.

(d) Temperatura na pirometru ne sme preseči 475° C.

#### 5.1.2 Določanje s spektrofotometrijo

##### 5.1.2.1 Priprava raztopin za umeritev

Za vsakega izmed elementov, ki ga bomo določali, pripravimo iz standardnih delovnih raztopin, navedenih v točkah 3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 in 3.10.1, serijo raztopin za umeritev, od katerih ima vsaka koncentracijo HCl okoli 0,5 N in (pri železu, manganu in cinku) koncentracijo lantanovega klorida, ki ustreza 0,1 % La (m/v). Izbrane koncentracije elementov v sledovih se morajo nahajati v območju občutljivosti uporabljenega spektrofotometra. V tabelah spodaj so kot primer navedene sestave tipičnih območij raztopin za umeritev, odvisnih od vrste in občutljivosti spektrofotometra, ki ga uporabljamo, zato bo morda treba izbrati drugačne koncentracije.

#### Železo

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
ml standardne delovne raztopine (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe)+ ml 6 N HCl (3.2)	0	0,5	1	2	3	4	5
	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml raztopine lantanovega klorida (3.11) in do 100 ml dopolnimo z vodo.

\* Zelena krma (sveža ali posušena) lahko vsebuje velike količine rastlinskega kremenca, ki lahko zadržuje elemente v sledih in ga je treba odstraniti. Pri vzorcih takšne krme je treba uporabljati naslednji modificirani postopek.

Postopek iz točke 5.1.1 pod (i) izvajamo do filtracije. Filtrirni papir, ki vsebuje netopne ostanke, dvakrat speremo z vrelo vodo in ga postavimo v platinast žarilni lonček (4.3). Sežigamo v žarilni peči (4.1) pri temperaturi pod 550° C, dokler vse ogljikove snovi popolnoma ne izginejo. Ohladimo, dodamo nekaj kapljic vode in nato 10 do 15 ml fluorovodikove kisline (3.4) in izparevamo do suhega pri temperaturi približno 150° C. Če je v ostanku še kaj kremenca, ga ponovno raztopimo v nekaj mililitrih fluorovodikove kisline (3.4) in izparevamo, dokler ni suh. Dodamo nekaj kapljic žveplove (VI) kisline (3.5) in segrevamo do prenehanja izhajanja belih par. Ko smo dodali 5 ml 6 N klorovodikove kisline (3.2) in približno 30 ml vode, segrejemo, filtriramo raztopino v 250 mililitrsko merilno bučko in dopolnimo z vodo do oznake (koncentracija HCl približno 0,5 N). Nato nadaljujemo določanje po točki 5.1.3.

### Baker

$\mu\text{g Cu/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml standardne delovne raztopine (3.8.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Cu}$ ) + ml 6 N HCl (3.2)	0 8	1 8	2 8	4 8	6 8	8 8	10 8
Do 100 ml dopolnimo z vodo.							

### Mangan

$\mu\text{g Mn/ml}$	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
ml standardne delovne raztopine (3.9.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Mn}$ ) + ml 6 N HCl (3.2)	0 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7	10 7
+ 10 ml raztopine lantanovega klorida (3.11) in do 100 ml dopolnimo z vodo.							

### Cink

$\mu\text{g Zn/ml}$	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
ml standardne delovne raztopine (3.10.1) (1 ml = 10 $\mu\text{g Zn}$ ) + ml 6 N HCl (3.2)	0 7	0,5 7	1 7	2 7	4 7	6 7	8 7
+ 10 ml raztopine lantanovega klorida (3.11) in do 100 ml dopolnimo z vodo.							

#### 5.1.2.2 Priprava raztopine za analizo

Za določanje bakra lahko raztopino, pripravljeno po točki 5.1.1, običajno uporabimo direktno. Če je treba koncentracijo prilagoditi območju umeritve, odpipetiramo ustrezen alikvot v 100 mililitrsko merilno bučko in jo dopolnimo do oznake z 0,5 N klorovodikovo kislino (3.3).

Za določanje železa, mangana in cinka odpipetiramo ustrezen alikvot raztopine, pripravljene po točki 5.1.1, v 100 mililitrsko merilno bučko, dodamo 10 ml raztopine lantanovega klorida (3.11) in do oznake dopolnimo z 0,5 N klorovodikovo kislino (3.3) (glej tudi točko 8 »Opomba«).

#### 5.1.2.3 Slepí preskus

Slepí preskus vključuje vse predpisane korake postopka, le da izpustimo vzorec.

Umeritvena raztopina »0« se ne sme uporabljati kot slepa.

#### 5.1.2.4 Merjenje atomske absorpcije

Atomsko absorpcijo umeritvenih raztopin in raztopine, ki jo bomo analizirali, izmerimo z uporabo oksidnega plamena zrak-acetilen pri naslednjih valovnih dolžinah:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Vsako merjenje izvedemo štirikrat.

#### 5.2 Mineralna krma

Če vzorec ne vsebuje organskih snovi, je predhodno upepeljevanje nepotrebno. Nadaljujemo drugi odstavek točke 5.1.1 pod (i). Izparevanje s klorovodikovo kislino lahko izpustimo.

### 6. Izračun rezultatov

Iz umeritvene krivulje izračunamo koncentracije elementov v sledovih v analizirani raztopini in izrazimo rezultat v miligramih elementov v sledovih na kilogram vzorca (ppm).

## 7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določevanj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presegati:

- 5 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti elementov v sledovih do 50 mg/kg;
- 10 % od višjega rezultata za vsebnosti elementov v sledovih od 50 do 100 mg/kg;
- 10 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti elementov v sledovih od 100 do 200 mg/kg;
- 5 % od višjega rezultata za vsebnosti elementov v sledovih nad 200 mg/kg.

## 8. Opomba

Prisotnost večjih količin fosfatov lahko vpliva na določitev železa, mangana in cinka. Tako interferenco moramo korigirati z dodatkom raztopine lantanovega klorida (3.11). Če pa je razmerje mase v vzorcu  $((Ca + Mg)/P) \times 2$ , lahko opustimo dodatek raztopine lantanovega klorida (3.11) raztopinam za analizo in umeritev.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 78/633/EGS.

## METODA 20\* DOLOČANJE KARBONATOV

### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo je pri večini krme mogoče določiti količino karbonatov, ki jih dogovorno izrazimo kot kalcijev karbonat. V nekaterih primerih (na primer v železovem karbonatu) moramo uporabiti posebno metodo.

### 2. Princip

Karbonate razkrojimo s klorovodikovo kislino; sproščeni ogljikov dioksid vodimo v bireto in nastalo prostornino primerjamo s prostornino, ki se pod istimi pogoji sprosti iz znane količine kalcijevega karbonata p. a.

### 3. Reagenti

- 3.1 Klorovodikova kislina, d: 1,10.
- 3.2 Kalcijev karbonat, p. a.
- 3.3 Žveplova (VI) kislina, približno 0,1 N, obarvana z metil rdečim.

### 4. Oprema

Scheibler-Dietrichova aparatura (glej sliko) ali ustrezna druga aparatura.

### 5. Postopek

Glede na vsebnost karbonata v vzorcu natehtamo del vzorca, kakor je navedeno spodaj:

0,5 g pri proizvodih, ki vsebujejo od 50 do 100 % karbonatov, izraženih kot kalcijev karbonat;

1 g pri proizvodih, ki vsebujejo od 40 do 50 % karbonatov, izraženih kot kalcijev karbonat;

2 do 3 g pri drugih proizvodih.

Natehtani del vzorca prenesemo v posebno bučko (4) aparature, kjer se nahaja majhna epruveta iz nezdroljivega materiala, ki vsebuje 10 ml klorovodikove kisline (3.1), in povežemo bučko z aparaturo. Obrnemo trojni petelinček (5) tako, da je bireta (1) odprta navzven. S pomično cevjo (2), napolnjeno z obarvano žveplovo (VI) kislino (3.3) in povezano z bireto (1), dovedemo nivo tekočine na oznako nič. Petelinček (5) obrnemo tako, da povežemo cev in bireto (1) in (3) ter preverimo, da je nivo na oznaki nič.

Z nagibanjem bučke (4) počasi spuščamo klorovodikovo kislino (3.1) prek vzorca. Tlak izenačimo tako, da spuščamo cev (2). Bučko (4) stresamo, dokler popolnoma ne preneha izločanje ogljikovega dioksida.

Tlak izenačimo tako, da izenačimo nivoja tekočin v cevi in bireti (1) in (2). Čez nekaj minut, ko se volumen plina ustali, odčitamo rezultat.

Pri enakih pogojih izvedemo kontrolni preskus z 0,5 g kalcijevega karbonata (3.2).

### 6. Izračun rezultata

Vsebnost karbonatov v gramih, izraženih kot kalcijev karbonat, izračunamo z naslednjo enačbo:

$$(V \times 100)/(T \times 2W)$$

pri čemer je:

V = ml CO<sub>2</sub> iz vzorca.

T = ml CO<sub>2</sub> iz 0,5 g CaCO<sub>3</sub> p. a.

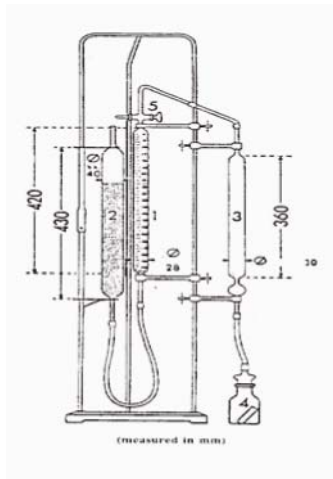
W = masa vzorca v gramih.

## 7. Opombe

7.1 Če je masa vzorca večja od 2 g, najprej v bučko (4) nalijemo 15 ml destilirane vode in pred začetkom preskusa premešamo. Enako količino vode uporabimo za kontrolni preskus.

7.2 Če se volumen aparature, ki jo uporabljamo, razlikuje od volumna Scheibler-Dietrichove aparature, moramo ustrezno prilagoditi količine vzorca kontrolne snovi ter temu primerno prilagoditi izračun rezultata.

### Scheibler-Dietrichova aparatura za določanje CO<sub>2</sub>



Razmerje 1 : 8

(measured in mm) = (merjeno v mm)

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 21\* DOLOČANJE LAKTOZE

### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo določamo vsebnost laktoze v krmi, ki vsebuje več kakor 0,5 % laktoze.

### 2. Princip

Sladkorje raztopimo v vodi. Raztopino fermentiramo s kvasovko vrste *Saccharomyces cerevisiae*, ki ne vpliva na laktozo. Po zbitritvi in filtriranju vsebnost laktoze v filtratu določimo po Luff-Schoorlovi metodi.

### 3. Reagenti

3.1 Suspenzija *Saccharomyces cerevisiae*: suspendiramo 25 g svežih kvasovk v 100 ml vode. Suspenzijo lahko hranimo v hladilniku največ en teden.

3.2 Raztopina Carrez I: 21,9 g cinkovega acetata  $Zn(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$  in 3 g ledoceta raztopimo v vodi in dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.3 Raztopina Carrez II: v vodi raztopimo 10,6 g kalijevega ferocianida  $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$  in dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.4 Luff-Schoorlov reagent:

Med previdnim mešanjem v raztopino natrijevega karbonata (3.4.3) vlivamo raztopino citronske kisline (3.4.2). Dodamo raztopino bakrovega sulfata (3.4.1) in dopolnimo z vodo do 1 litra. Pustimo stati čez noč in nato filtriramo. Preverimo normalnost tako pripravljenega reagenta (Cu 0,1 N;  $Na_2CO_3$  2N). pH raztopine mora biti približno 9,4.

3.4.1 Raztopina bakrovega sulfata: v 100 ml vode raztopimo 25 g bakrovega sulfata p. a.  $CuSO_4 \times 5H_2O$ , ki ne vsebuje železa.

3.4.2 Raztopina citronske kisline: v 50 ml vode raztopimo 50 g citronske kisline p. a.  $C_6H_8O_7 \times H_2O$ .

3.4.3 Raztopina natrijevega karbonata: v približno 300 ml tople vode raztopimo 143,8 g brezvodnega natrijevega karbonata p. a. Pustimo, da se ohladi.

3.5 Zdrobljen plovec, prekuhan v klorovodikovi kislini, spran z vodo in osušen.



3.6 30-odstotna (m/v) raztopina natrijevega jodida.

3.7 Žveplova (VI) kislina 6 N.

3.8 Raztopina natrijevega tiosulfata 0,1 N.

3.9 Raztopina škroba: suspenzijo 5 g topnega škroba v 30 ml vode vlijemo v liter vrele vode. Pustimo vreti tri minute, ohladimo in po potrebi dodamo 10 mg živosrebrega jodida kot konzervans.

#### 4. Oprema

Vodna kopel s termostatom, nastavljenim na 38-40° C.

#### 5. Postopek

Natehnamo 1 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga prenesemo v 100 mililitrsko merilno bučko. Dodamo 25 do 30 ml vode. Bučko za trideset minut postavimo v vrelo vodno kopel, nato ohladimo na približno 35° C. Dodamo 5 ml suspenzije kvasovk (3.1) in premešamo. Bučko pustimo dve uri v vodni kopeli, pri temperaturi 38-40° C. Ohladimo na približno 20° C.

Dodamo 2,5 ml raztopine Carrez I (3.2) in mešamo trideset sekund, nato dodamo 2,5 ml raztopine Carrez II (3.3) in ponovno mešamo trideset sekund. Dopolnimo z vodo do 100 ml, premešamo in filtriramo. Odpipetiramo del filtrata, ki ne presega 25 ml, in če je le mogoče, vsebuje od 40 do 80 mg laktoze, ter ga prenesemo v 300 mililitrsko erlenmajerico. Če je potrebno dopolnimo z vodo do 25 ml.

Pri enakih pogojih izvedemo slepi preskus s 5 ml suspenzije kvasovk (3.1).

Vsebnost laktoze določimo po metodi Luff-Schoorl, kakor sledi: dodamo točno 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (3.4) in dve zrnji plovca (3.5). Med ročnim mešanjem segrevamo nad prostim plamenom srednje višine tako, da tekočina zavre v približno dveh minutah. Erlenmajerico takoj postavimo na žično mrežico, prevlečeno z azbestom, ki ima odprtino premera 6 cm, pod katero je prižgan plamen. Plamen naravnamo tako, da segrevamo le dno erlenmajerice. Na erlenmajerico namestimo povratni hladilnik. Pustimo vreti natanko deset minut. Takoj ohladimo v mrzli vodi in po približno petih minutah titriramo, kakor sledi:

Dodamo 10 ml raztopine kalijevega jodida (3.6) in takoj zatem (previdno, ker se lahko močno peni) 25 ml žveplove (VI) kisline 6 N (3.7). Titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata 0,1 N (3.8) do svetlorumene barve, dodamo indikator škrob (3.9) in končamo titracijo.

Enako titracijo izvedemo brez vrenja s točno izmerjeno mešanico 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (3.4) in 25 ml vode, potem ko smo ji dodali 10 ml raztopine kalijevega jodida (3.6) in 25 ml žveplove (VI) kisline 6 N (3.7).

#### 6. Izračun rezultata

Iz priloženih tabel določimo količino laktoze v mg, ki ustreza razliki med rezultatoma dveh titracij, izraženi v ml natrijevega tiosulfata 0,1 N.

Rezultat izrazimo kot odstotni masni delež brezvodne laktoze v vzorcu.

#### 7. Opomba

Pri proizvodih, ki vsebujejo nad 40 % fermentirnega sladkorja, uporabimo več kakor 5 ml suspenzije kvasovk (3.1).

**Tabela vrednosti za 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta**

ml Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> 0,1 N, dve minuti gretja, deset minut vrenja

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N	Glukoza, fruktoza, invertni sladkorji C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Laktoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N
ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika	ml
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N	Glukoza, fruktoza, invertni sladkorji C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Laktoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N
ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	razlika	ml
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2	/	88,0	/	94,6	/	23

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 22\* DOLOČANJE SLADKORJA

### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo določamo količine reducirajočih sladkorjev in skupnih sladkorjev po inverziji, izraženih kot glukoza, ali kjer je to primerno, kot saharoza s faktorjem preračunavanja 0,95. Uporabna je za krmne mešanice. Za drugo krmo se uporabljajo posebne metode. Če je potrebno, laktozo izmerimo ločeno in jo upoštevamo pri izračunu rezultata.

### 2. Princip

Sladkorje ekstrahiramo z razredčenim etanolom in raztopino zbistriamo z raztopinama Carrez I in II. Po odstranitvi etanola določimo količine pred inverzijo in po njej po Luff-Schoorlovi metodi.

### 3. Reagenti

3.1 40 % (v/v) etanol, d: 0,948 pri 20° C, nevtraliziran proti fenolftaleinu.

3.2 Raztopina Carrez I: v vodi raztopimo 21,9 g cinkovega acetata Zn (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O in 3 g ledoceta ter dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.3 Raztopina Carrez II: v vodi raztopimo 10,6 g kalijevega ferocianida K<sub>4</sub> Fe (CN)<sub>6</sub> x 3H<sub>2</sub>O in dopolnimo z vodo do 100 ml.

3.4 0,1-odstotna (m/v) raztopina metiloranža.

3.5 Klorovodikova kislina 4 N.

3.6 Klorovodikova kislina 0,1 N.

3.7 Raztopina natrijevega hidroksida 0,1 N.

3.8 Luff-Schoorlov reagent:

V raztopino natrijevega karbonata (3.8.3) vlijemo raztopino citronske kisline (3.8.2) in medtem previdno mešamo. Dodamo raztopino bakrovega sulfata (3.8.1) in z vodo dopolnimo do 1 litra. Pustimo čez noč in nato filtriramo. Preverimo normalnost tako dobljenega reagenta (Cu 0,1 N; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2N). pH raztopine mora biti približno 9,4.

3.8.1 Raztopina bakrovega sulfata: v 100 ml vode raztopimo 25 g bakrovega sulfata p. a. CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, ki ne vsebuje železa.

3.8.2 Raztopina citronske kisline: v 50 ml vode raztopimo 50 g citronske kisline p. a. C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> x H<sub>2</sub>O.

3.8.3 Raztopina natrijevega karbonata: v približno 300 ml tople vode raztopimo 143,8 g brezvodnega natrijevega karbonata p. a. Pustimo, da se ohladi.

3.9 Raztopina natrijevega tiosulfata 0,1 N.

3.10 Raztopina škroba:

V liter vrele vode vlijemo suspenzijo 5 g topnega škroba v 30 ml vode. Vremo tri minute, ohladimo in po potrebi dodamo 10 mg živosrebrovega jodida kot konzervans.

3.11 Žveplova (VI) kislina 6 N.

3.12 30-odstotna (m/v) raztopina kalijevega jodida.

3.13 Zdrobljen plovec, prevret v klorovodikovi kislini, opran z vodo in osušen.

3.14 3-metilbutan-1-ol.

#### 4. Oprema

Mešalnik: približno 35 do 40 obr./min.

#### 5. Postopek

##### 5.1 Ekstrakcija vzorca

Natehtamo 2,5 g vzorca s točnostjo 1 mg in ga prenesemo v 250 mililitrsko merilno bučko. Dodamo 200 ml etanola (3.1) in v mešalniku mešamo eno uro. Nato dodamo 5 ml raztopine Carrez I (3.2) in mešamo eno minuto. Dodamo še 5 ml raztopine Carrez II (3.3) in ponovno mešamo eno minuto. Z etanolom (3.1) dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo. 200 ml filtrata uparimo približno do polovice, da odstranimo skoraj ves etanol. Ostanek po izparevanju s toplo vodo kvantitativno prenesemo v 200 mililitrsko merilno bučko, ohladimo, dopolnimo z vodo do oznake, premešamo in po potrebi filtriramo. To raztopino bomo uporabili za določanje količine reducirajočih sladkorjev, po inverziji pa skupnih sladkorjev.

##### 5.2 Določanje reducirajočih sladkorjev

Odpipetiramo največ 25 ml raztopine, ki vsebuje manj kakor 60 mg reducirajočih sladkorjev, izraženih kot glukoza. Po potrebi dopolnimo z destilirano vodo do 25 ml raztopine in določimo vsebnost reducirajočih sladkorjev po Luff-Schoorlovi metodi. Rezultat izrazimo kot odstotni masni delež glukoze v vzorcu.

##### 5.3 Določanje skupnih sladkorjev po inverziji

S pipeto prenesemo 50 ml raztopine v 100 mililitrsko merilno bučko. Dodamo nekaj kapljic raztopine metiloranža (3.4) in nato, previdno in ob neprestanem mešanju, dodajamo klorovodikovo kislino 4 N (3.5), dokler tekočina ne postane močno rdeča. Dodamo 15 ml klorovodikove kisline 0,1 N (3.6), potopimo bučko v skoraj vrelo vodno kopel in jo v njej pustimo trideset minut. Hitro ohladimo na približno 20° C in dodamo 15 ml raztopine natrijevega hidroksida 0,1 N (3.7). Dopolnimo z vodo do 100 ml in premešamo. Odpipetiramo največ 25 ml raztopine, ki vsebuje manj kakor 60 mg reducirajočih sladkorjev, izraženih kot glukoza. Po potrebi dopolnimo z destilirano vodo do 25 ml in določimo količino reducirajočih sladkorjev po Luff-Schoorlovi metodi. Rezultat izrazimo kot odstotni masni delež glukoze, ali če je to primerno, saharoze tako, da pomnožimo s faktorjem 0,95.

##### 5.4 Titracija po Luff-Schoorlovi metodi

S pipeto prenesemo 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (3.8) v 300 mililitrsko erlenmajerico; dodamo točno 25 ml zbistrene raztopine sladkorja. Dodamo 2 zrna plovca (3.13) in med ročnim mešanjem segrevamo nad prostim plamenom srednje višine tako, da raztopina zavre v približno dveh minutah. Erlenmajerico takoj postavimo na žično mrežico, prevlečeno z azbestom, ki ima odprtino s premerom 6 cm, pod katero je prižgan plamen. Plamen naravnamo tako, da segrevamo le dno erlenmajerice. Na erlenmajerico namestimo povratni hladilnik in pustimo vreti točno deset minut. Takoj ohladimo v mrzli vodi in čez približno pet minut titriramo, kakor sledi:

Dodamo 10 ml raztopine kalijevega jodida (3.12) in takoj nato (previdno, ker se lahko močno peni) dodamo 25 ml žveplove kisline 6 N (3.11). Titriramo z raztopino natrijevega tiosulfata 0,1 N (3.9) do svetlorumene barve, dodamo indikator škrob (3.10) in končamo titracijo.

Enako titracijo izvedemo na točno izmerjeni mešanici 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta (3.8) in 25 ml vode, potem ko smo dodali 10 ml raztopine kalijevega jodida (3.12) in 25 ml žveplove (VI) kisline 6 N (3.11), brez vrenja.

#### 6. Izračun rezultata

Z uporabo tabele določimo količino glukoze v mg, ki ustreza razliki med vrednostima obeh titracij, izraženi v mg natrijevega tiosulfata 0,1 N.

Izrazimo rezultat v masnih deležih glede na vzorec.

#### 7. Posebni postopki

7.1 Pri krmih, ki vsebuje veliko melase, in drugi krmih, ki ni zelo homogena, natehtamo 20 g vzorca in ga s 500 ml vode prenesemo v litrsko merilno bučko. Eno uro mešamo v mešalniku. Zbistrimo z uporabo reagentov Carrez I (3.2) in II (3.3), kakor je opisano v 5.1, vendar uporabimo štirikratno količino vsakega reagenta. Bučko dopolnimo z 80-odstotnim etanolom (v/v).

Premešamo in filtriramo. Etanol odstranimo, kakor je opisano v 5.1. Če ni dekstriniranega škroba, z destilirano vodo dopolnimo do oznake.

7.2 V primeru melas in posamičnih krmil, ki vsebuje veliko sladkorja in je skoraj brez škroba (rožiči, posušene pesni rezanci itd.), natehtamo 5 g, prenesemo v 250 mililitrsko merilno bučko, dodamo 200 ml destilirane vode in eno uro mešamo v mešalniku, po potrebi tudi več. Zbistrimo z uporabo reagentov Carrez I (3.2) in II (3.3), kakor je opisano v 5.1. S hladno vodo dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo. Da bi določili količino skupnih sladkorjev, nadaljujemo, kakor je opisano v 5.3.

## 8. Opombe

8.1 Za preprečevanje penjenja je priporočljivo, da pred vrenjem z Luff-Schoorlovim reagentom dodamo (ne glede na volumen) približno 1 ml 3-metilbutan-l-ol (3.14).

8.2 Razlika v vsebnosti skupnih sladkorjev po inverziji, izraženih kot glukoza, in vsebnosti reducirajočih sladkorjev, izraženih kot glukoza, pomnožena z 0,95, da vsebnost saharoze v odstotnih masnih deležih.

8.3 Za določanje vsebnosti reducirajočih sladkorjev, razen laktoze, lahko uporabimo dve metodi:

8.3.1 Za približen izračun vsebnosti laktoze, določene z drugo analizo metodo, pomnožimo z 0,675 in dobljeni rezultat odštejemo od vsebnosti reducirajočih sladkorjev.

8.3.2 Za točen izračun reducirajočih sladkorjev, razen laktoze, moramo za zadnji dve končni določitvi uporabiti isti vzorec. Eno od analiz izvedemo na delu raztopine, ki jo dobimo, kakor je opisano v 5.1, drugo pa na delu raztopine, ki jo dobimo pri določanju laktoze z metodo, določeno za ta namen (po fermentiranju drugih vrst sladkorja in zbistritvi).

V obeh primerih se količina sladkorja določi z Luff-Schoorlovo metodo in izračuna v mg glukoze. Eno od vrednosti odštejemo od druge in razliko izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

Primer

Za vsako od določanj oba uporabljena volumna ustrezata 250 mg vzorca.

V prvem primeru porabimo 17 ml raztopine natrijevega tiosulfata 0,1 N, kar ustreza 44,2 mg glukoze; v drugem pa 11 ml, kar ustreza 27,6 mg glukoze.

Razlika je 16,6 mg glukoze.

Količina reducirajočih sladkorjev (razen laktoze), izračunana kot glukoza, je torej:

$$4 \times 16,6 / 10 = 6,64 \%$$

**Tabela vrednosti za 25 ml Luff-Schoorlovega reagenta**

ml Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub> 0,1 N, dve minuti gretja, deset minut vrenja

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N	Glukoza, fruktoza, invertni sladkorji C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>		Laktoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Maltoza C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub>		Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,1 N
	ml	mg	razlika	mg	razlika	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2	/	88,0	/	94,6	/	23

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

**METODA 23\***  
**OCENA AKTIVNOSTI UREAZE V IZDELKIH IZ SOJE**

### 1. Namen in področje uporabe

Z opisanim preskusom ocenimo aktivnost ureaze v izdelkih iz soje in pokažemo, ali so bili takšni proizvodi dovolj dolgo kuhani.

### 2. Princip

Aktivnost ureaze ocenjujemo s količino amoniakovega dušika, ki se sprosti iz 1 g izdelka na minuto pri 30° C iz raztopine sečnine.

### 3. Reagenti

3.1 Klorovodikova kislina 0,1 N.

3.2 Raztopina natrijevega hidroksida 0,1 N.

3.3 Adsorbirno sredstvo iz fosfata 0,05 M, ki v 1000 ml vsebuje 4,45 g dinatrijevega fosfata ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ) in 3,40 g monokalijevega fosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).

3.4. Sveže pripravljeno adsorbirno sredstvo iz sečnine, ki vsebuje 30,0 g sečnine na 1000 ml adsorbirnega sredstva (3.3); pH 6,9-7,0.

### 4. Oprema

4.1 Aparat za potenciometrično titracijo ali zelo občutljiv pH-meter (0,02 pH) z magnetnim mešalnikom.

4.2 Vodna kopel s termostatom, nastavljenim na točno 30° C.

4.3 Epruvete z brušenimi zamaški, 150 × 18 mm.

### 5. Postopek

Približno 10 g vzorca zdrobimo (npr. v kavnem mlinčku) tako, da delci preidejo skozi sito z odprtini 0,2 mm. Natehnamo 0,2 g zdrobljenega vzorca s točnostjo 1 mg, prenesemo v epruveto z brušenim zamaškom in dodamo 10 ml adsorbirnega sredstva iz sečnine (3.4). Takoj zamašimo in dobro pretresemo. Epruveto postavimo v vodno kopel pri točno 30° C in jih v njej pustimo točno trideset minut. Hitro dodamo 10 ml 0,1 N klorovodikove kisline (3.1), hitro ohladimo na 20° C in kvantitativno prenesemo vsebino epruvete v posodo za titracijo z dvakratnim spiranjem s po 5 ml vode. S stekleno elektrodo (4.1) nemudoma in hitro elektrometrično titriramo do pH 4,7 z raztopino natrijevega hidroksida 0,1 N (3.2).

Opravimo slepi preskus, kakor sledi:

V epruveto z brušenim zamaškom hitro prenesemo 0,2 g vzorca, natehtanega s točnostjo 1 mg, dodamo 10 ml klorovodikove kisline 0,1 N (3.1) in nato 10 ml adsorbirnega sredstva iz sečnine (3.4). Nemudoma ohladimo epruveto v ledeno mrzli vodi in pustimo trideset minut. Pod zgoraj navedenimi pogoji prenesemo vsebino epruvete v posodo za titracijo z uporabo raztopine natrijevega hidroksida 0,1 N (3.2) do pH 4,7.

### 6. Izračun

Aktivnost ureaze izračunamo z naslednjo formulo:

$$\text{mg N pri } 30^\circ \text{ C / g min} = (1,4 (b - a)) / 30 E$$

pri čemer je:

a = ml raztopine natrijevega hidroksida 0,1 N, ki ga je porabil vzorec,

b = ml raztopine natrijevega hidroksida 0,1 N, ki ga je porabil slepi preskus,

E = masa vzorca v gramih.

### 7. Opomba

7.1 Ta metoda je primerna za aktivnost ureaze do 1 mg N/g/min pri 30° C. Za aktivnejše proizvode lahko velikost vzorca zmanjšamo na 50 mg.

7.2 Proizvode, ki vsebujejo več kakor 10 % surovih maščobnih snovi, moramo najprej hladno razmastiti.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 24\*

### DOLOČANJE AMINOKISLIN

#### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda se uporablja za določanje prostih (sintetičnih in naravnih) in skupnih (vezanih s peptidi in prostih) aminokislin v krmi z uporabo analizatorja aminokislin. Uporabna je za naslednje aminokislino: cist(e)in, metionin, lizin, treonin, alanin, arginin, asparaginsko kislino, glutaminsko kislino, glicin, histidin, izoleucin, leucin, fenilalanin, prolin, serin, tirozin in valin.

Metoda ne loči med solmi aminokislin in ne razlikuje aminokislin oblik D in L. Metoda ne velja za določanje triptofana ali hidroksi-analogov aminokislin.

#### 2. Princip

##### 2.1 Proste aminokislino

Proste aminokislino ekstrahiramo z razredčeno klorovodikovo kislino. Soekstrahirane dušikove makromolekule oborimo s sulfosalicilno kislino in odstranimo s filtriranjem. Vrednost pH prefiltrirane raztopine naravnamo na 2,20. Aminokislino ločimo z ionsko izmenjevalno kromatografijo in določimo z reakcijo z ninhidrinom fotometrično z detekcijo pri 570 nm.

##### 2.2 Skupne aminokislino

Postopek izberemo glede na preiskovane aminokislino. Cist(e)in in metionin moramo pred hidrolizo oksidirati v cisteinsko kislino oziroma metionin-sulfonat. Tirozin moramo določiti v hidrolizatih neoksidiranih vzorcev. Vse druge aminokislino, navedene v odstavku 1, lahko določimo v oksidiranem ali neoksidiranem vzorcu.

Oksidacijo izvedemo pri temperaturi 0 °C z mešanico kisline in fenola. Presežek oksidacijskega reagenta razgradimo z natrijevim disulfidom. Oksidiran ali neoksidiran vzorec 23 ur hidroliziramo s klorovodikovo kislino ( $c = 6 \text{ mol/l}$ ). Vrednost pH hidrolizata naravnamo na 2,20. Aminokislino ločimo z ionsko izmenjevalno kromatografijo in določimo z reakcijo z ninhidrinom fotometrično z detekcijo pri 570 nm (440 nm za prolin).

#### 3. Reagenti

Uporabljati moramo dvojno destilirano vodo ali vodo enakovredne kakovosti (prevodnost  $< 10 \mu\text{S}$ ).

3.1 Vodikov peroksid,  $w = 30 \%$ .

3.2 Mravljična kislina,  $w = 98-100 \%$ .

3.3 Fenol.

3.4 Natrijev disulfid.

3.5 Natrijev hidroksid.

3.6 5-sulfosalicilna kislina dihidrat.

3.7 Klorovodikova kislina, gostota približno 1,18 g/ml.

3.8 Trinatrijev citrat dihidrat.

3.9 2,2'-tiodietanol (tiodiglikol).

3.10 Natrijev klorid.

3.11 Ninhidrin.

3.12 Petroleter, vrelišče 40-60° C.

3.13 Norleucin ali druga spojina, primerna za uporabo kot interni standard.

3.14 Dušik ( $< 10 \text{ ppm}$  kisika).

3.15 1-oktanol.

3.16 Aminokislino.

3.16.1 Standardne substance, navedene v odstavku 1. Čiste spojine, ki ne vsebujejo kristalne vode. Pred uporabo jih teden dni sušimo v vakuumu nad  $\text{P}_2\text{O}_5$  ali  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

3.16.2 Cisteinska kislina.

3.16.3 Metionin-sulfon.

3.17 Raztopina natrijevega hidroksida,  $c = 7,5 \text{ mol/l}$ :

V vodi raztopimo 300 g NaOH (3.5) in dopolnimo do 1 litra.

3.18 Raztopina natrijevega hidroksida,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :

V vodi raztopimo 40 g NaOH (3.5) in dopolnimo do 1 litra.

3.19 Raztopina mravljične kisline in fenola:

Zmešamo 889 g mravljične kisline (3.2) s 111 g vode in dodamo 4,73 g fenola (3.3).

3.20 Mešanica za hidrolizo,  $c = 6 \text{ mol HCl/l}$ , ki vsebuje 1 g fenola/l:

V 492 ml HCl (3.7) dodamo 1 g fenola (3.3) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.21 Mešanica za ekstrakcijo,  $c = 0,1$  mol HCl/l, ki vsebuje 2 % tiodiglikola:

8,2 ml HCl (3.7) razredčimo s približno 900 ml vode, dodamo 20 ml tiodiglikola (3.9) in dopolnimo z vodo do 1 litra (ne smemo mešati 3.7 in 3.9 direktno).

3.22 5-sulfosalicilna kislina,  $\beta = 6$  %:

V vodi raztopimo 60 g 5-sulfosalicilne kisline (3.6) in dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.23 Mešanica za oksidacijo (permrvljična kislina-fenol):

V majhni čaši zmešamo 0,5 ml vodikovega peroksida (3.1) s 4,5 ml raztopine mravljične kisline in fenola (3.19). Inkubiramo 1 uro pri temperaturi 20-30° C, da se ustvari permrvljična kislina, nato pa jo, preden jo dodamo vzorcu, (15 min) hladimo v ledeno mrzli vodni kopeli.

Opozorilo: Mešanica ne sme priti v stik s kožo in pri delu moramo uporabljati zaščitne rokavice.

3.24 Citratni pufer,  $c = 0,2$  mol  $\text{Na}^+/1$ , pH 2,20:

V približno 800 ml vode raztopimo 19,61 g natrijevega citrata (3.8), 5 ml tiodiglikola (3.9), 1 g fenola (3.3) in 16,50 ml HCl (3.7). Vrednost pH raztopine naravnamo na 2,20. Dopolnimo z vodo do 1 litra.

3.25 Pufri za eluiranje, pripravljene v skladu s pogoji za uporabljeni analizator (4.9).

3.26 Reagent ninhidrin, pripravljen v skladu s pogoji za uporabljeni analizator (4.9).

3.27 Standardne raztopine aminokislin. Te raztopine hranimo pri temperaturi pod 5° C.

3.27.1 Osnovne standardne raztopine aminokislin (3.16.1).  $c = 2,5$   $\mu\text{mol/ml}$  vsake v klorovodikovi kislini. Lahko komercialne.

3.27.2. Osnovne standardne raztopine cisteinske kisline in metioninsulfona,  $c = 1,25$   $\mu\text{mol/ml}$ .

V litrski merilni bučki raztopimo 0,2115 g cisteinske kisline (3.16.2) in 0,2265 g metionin-sulfona (3.16.3) v citratnem pufru (3.24) in dopolnimo s citratnim pufrom do oznake. Hranimo pri temperaturi pod 5° C največ 12 mesecev. Ta raztopina se ne uporablja, če osnovna standardna raztopina (3.27.1) vsebuje cisteinsko kislino in metioninsulfon.

3.27.3 Osnovna standardna raztopina internega standarda, npr. norleucin,  $c = 20$   $\mu\text{mol/ml}$ .

V merilni bučki raztopimo 0,6560 g norleucina (3.13) v citratnem pufru (3.24) in dopolnimo s citratnim pufrom do 250 ml. Hranimo pri temperaturi pod 5° C največ 6 mesecev.

3.27.4 Standardne raztopine aminokislin za umeritev za uporabo s hidrolizati,  $c = 5$  nmol/50 $\mu\text{l}$  cisteinske kisline in metioninsulfona in  $c = 10$  nmol/50 $\mu\text{l}$  drugih aminokislin.

V 100 mililitrski čaši raztopimo 2,2 g natrijevega klorida (3.10) v 30 ml citratnega pufru (3.24). Dodamo 4,00 ml osnovne standardne raztopine aminokislin (3.27.1), 4,00 ml osnovne standardne raztopine cisteinske kisline in metioninsulfona (3.27.2) in 0,50 ml osnovne standardne raztopine internega standarda (3.27.3), če ga uporabimo. Z natrijevim hidroksidom (3.18) naravnamo vrednost pH na 2,20.

Kvantitativno prenesemo v 50 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo s citratnim pufrom do oznake in premešamo.

Hranimo pri temperaturi pod 5° C največ 3 mesece.

Glejte tudi opombe v 9.1.

3.27.5 Standardna raztopina aminokislin za umeritev za uporabo s hidrolizati, pripravljena skladno s 5.3.3.1, in za uporabo z ekstrakti (5.2). Raztopino za umeritev pripravimo skladno s 3.27.4, vendar brez natrijevega klorida.

Hranimo pri temperaturi pod 5° C največ 3 mesece.

#### 4. Oprema

4.1 100 mililitrska ali 250 mililitrska bučka z okroglim dnom, opremljena s povratnim hladilnikom.

4.2 100 mililitrska posoda iz borosilikatnega stekla s pokrovom z navojem in gumijasto/teflonsko podlogo (npr. Duran, Schott) za uporabo v sušilniku.

4.3 Sušilnik z intenzivnim prepihanjem in termostatom s točnostjo, ki presega  $\pm 2^\circ$  C.

4.4 pH meter (tri decimalna mesta).

4.5 Membranski filter (0,2 $\mu\text{m}$ ).

4.6 Centrifuga.

4.7 Rotacijski vakuumski uparjalnik.

4.8 Mehanski stresalnik ali magnetno mešalo.

4.9 Analizator aminokislin ali oprema HPLC z ionsko izmenjevalno kolono, napravo za ninhidrin, postkolonsko derivatizacijo in fotometričnim detektorjem.

Kolono napolnimo s sulfonirano polistirensko smolo, sposobno medsebojnega ločenja aminokislin in ločevanja le-teh od drugih ninhidrinsko pozitivnih snovi. Pretok na liniji pufru in na liniji z ninhidrinom zagotavljajo črpalke s stabilnostjo pretoka  $\pm 0,5\%$  v času, ki zajema tako tok standarda za umeritev kot tudi tok analiziranega vzorca.

Pri nekaterih analizatorjih aminokislin lahko uporabimo postopke hidrolize, pri katerih ima hidrolizat koncentracijo natrija  $c = 0,8$  mol/l in vsebuje vso pri oksidaciji preostalo mravljično kislino. Drugi analizatorji ne ločujejo zadovoljivo določenih aminokislin, če vsebuje hidrolizat presežek mravljične kisline in/ali visoke koncentracije natrijevih ionov. V takem primeru se po hidrolizi in pred naravnanjem pH volumen kisline zmanjša z uparevanjem na približno 5 ml. Uparevanje izvedemo pod vakuumom pri največ 40° C.

## 5. Postopek

### 5.1 Priprava vzorca

Vzorec zdrobimo tako, da preide skozi 0,5 milimetrsko sito. Vzorce z visoko vsebnostjo vlage moramo pred drobljenjem sušiti na zraku pri temperaturi, ki ne presega 50° C, ali pa jih posušimo z zmrzovanjem. Vzorce z visoko vsebnostjo maščob pred drobljenjem ekstrahiramo s petroletrom (3.12).

### 5.2 Določanje prostih aminokislin v krmi in premiksih

Ustrezno količino (1-5 g) pripravljenega vzorca (5.1) natehtamo s točnostjo 0,2 mg, prenesemo v erlenmajerico in dodamo 100,0 ml mešanice za ekstrakcijo (3.21). Mešanico 60 minut stresamo z mehanskim stresalnikom ali magnetnim mešalom (4.8). Počakamo, da se sediment obori in s pipeto prenesemo 10,0 ml bistre raztopine nad oborino v 100 mililitrsko čašo.

Med mešanjem dodamo 5,0 ml raztopine sulfosalicilne kisline (3.22), nato še 5 minut mešamo z magnetnim mešalom. Filtriramo ali centrifugiramo raztopino, da odstranimo morebitne ostanke oborine. 10,0 ml tako dobljene raztopine prenesemo v 100 mililitrsko čašo in naravnamo vrednost pH na 2,20 s pomočjo raztopine natrijevega hidroksida (3.18). S pomočjo citratnega pufru (3.24) prenesemo raztopino v ustrezno veliko merilno bučko in s pufrsko raztopino dopolnimo do oznake (3.24).

Če uporabljamo interni standard, dodamo 1,00 ml internega standarda (3.27.3) na vsakih 100 ml končne raztopine, nato pa do oznake dopolnimo s pufrsko raztopino (3.24).

Nadaljujemo kromatografijo v skladu s 5.4.

Če ekstraktov ne analiziramo istega dne, jih hranimo pri temperaturi pod 5 °C.

### 5.3 Določanje skupnih aminokislin

#### 5.3.1 Oksidacija

S točnostjo 0,2 mg natehtamo od 0,1 do 1g pripravljenega vzorca (5.1) v:

- 100 mililitrsko bučko z okroglim dnom (4.1) za odprto hidrolizo (5.3.2.3) ali,
- 250 mililitrsko bučko z okroglim dnom (4.1), če se zahteva nizka koncentracija natrija (5.3.3.1), ali
- 100 mililitrsko posodo, opremljeno z zamaškom na navoj (4.2), (za zaprto hidrolizo 5.3.2.4).

Natehtani del vzorca naj vsebuje približno 10 mg dušika, vsebnost vlage pa naj ne bo višja od 100 mg.

Bučko/steklenico postavimo v ledeno vodno kopel in jo ohladimo na 0° C, dodamo 5 ml mešanice za oksidacijo (3.23) ter premešamo s stekleno spatulo z ukrivljenim koncem. Bučko/steklenico skupaj s spatulo neprodušno zapremo s trakom, ledeno vodno kopel, v kateri je zaprta posoda, postavimo v hladilnik s temperaturo 0° C in pustimo stati 16 ur. Po 16 urah jo vzamemo iz hladilnika in razkrojimo presežek reagenta za oksidacijo z dodatkom 0,84 g natrijevega disulfita (3.4).

Nadaljujemo 5.3.2.1.

#### 5.3.2 Hidroliza

##### 5.3.2.1 Hidroliza oksidiranih vzorcev

Oksidiranemu vzorcu, pripravljenemu skladno s 5.3.1, dodamo 25 ml mešanice za hidrolizo (3.20), pri čemer pazimo, da speremo vse ostanke vzorca s stene posode in s spatule. Odvisno od uporabljenega postopka hidrolize nadaljujemo 5.3.2.3 ali 5.3.2.4.

##### 5.3.2.2 Hidroliza neoksidiranih vzorcev

V 100 ali 250 mililitrsko bučko z okroglim dnom (4.1) ali v 100 mililitrsko posodo s pokrovom z navojem (4.2) natehtamo od 0,1 do 1 g pripravljenega vzorca (5.1) s točnostjo 0,2 mg. Natehtani del vzorca naj vsebuje približno 10 mg dušika. Previdno dodamo 25 ml mešanice za hidrolizo (3.20) in jo primešamo vzorcu. Nadaljujemo postopek skladno s 5.3.2.3 ali 5.3.2.4.

##### 5.3.2.3 Odprta hidroliza

Mešanici v bučki (pripravljene v skladu s 5.3.2.1 ali 5.3.2.2) dodamo 3 steklene kroglice in pod povratnim hladilnikom pustimo vreti 23 ur, tako da se stalno razvijajo mehurčki. Po končani hidrolizi speremo hladilnik s 5 ml citratnega pufru (3.24). Ločimo bučko in jo ohladimo v ledeni vodni kopeli. Nadaljujemo skladno s 5.3.3.

##### 5.3.2.4 Zaprta hidroliza

Posodo z mešanico, pripravljeno skladno s 5.3.2.1 ali 5.3.2.2, prenesemo v sušilnik (4.3) s temperaturo 110° C. Med prvo uro, da bi preprečili nastanek tlaka (zaradi razvijanja plinastih substanc) in da bi preprečili eksplozijo, položimo pokrov z navojem na vrh posode. Posode ne zapremo s pokrovom. Po eni uri zapremo posodo s pokrovom in pustimo v sušilniku (4.3) 23 ur. Po končani hidrolizi odstranimo posodo iz sušilnika, previdno odvijemo pokrov in posodo postavimo v ledeno kopel. Pustimo, da se ohladi.

Odvisno od postopka naravnavanja vrednosti pH (5.3.3) s citratnim pufrom kvantitativno prenesemo vsebino iz posode v 250 mililitrsko čašo ali 250 mililitrsko bučko z okroglim dnom (3.24).

Nadaljujemo skladno s 5.3.3.

#### 5.3.3 Naravnavanje vrednosti pH

pH vrednost naravnamo v skladu s 5.3.3.1 ali 5.3.3.2, odvisno od odpornosti aminoanalizatorja (4.9) na natrij.

##### 5.3.3.1 Za kromatografske sisteme (4.9), ki zahtevajo nizko koncentracijo natrija:

Če uporabljamo analizatorje aminokislin, ki zahtevajo nizko koncentracijo natrija (če moramo zmanjšati volumen kisline), je priporočljivo, da uporabimo osnovno raztopino internega standarda (3.27.3).



V tem primeru dodamo hidrolizatu pred uparevanjem 2,00 ml osnovne raztopine internega standarda (3.27.3).

Hidrolizatu, dobljenem skladno s 5.3.2.3 ali 5.3.2.4, dodamo 2 kapljici 1-oktanol (3.15).

Z rotacijskim uparjalnikom (4.7) pod vakuumom pri 40° C zmanjšamo volumen na 5-10 ml. Če se volumen po naključju zmanjša pod 5 ml, moramo hidrolizat zavreči in analizo ponoviti.

Z raztopino natrijevega hidroksida (3.18) naravnamo pH na 2,20 in nadaljujemo 5.3.4.

5.3.3.2 Za vse druge analizatorje aminokislin (4.9)

Hidrolizat, dobljen skladno s 5.3.2.3 ali 5.3.2.4 delno nevtraliziramo tako, da med mešanjem previdno dodamo 17 ml raztopine natrijevega hidroksida (3.17). Temperatura mora biti pri tem postopku nižja od 40° C.

pH vrednost naravnamo na 2,20 pri sobni temperaturi z raztopino natrijevega hidroksida (3.17) in nato z raztopino natrijevega hidroksida (3.18). Nadaljujemo 5.3.4.

5.3.4 Raztopina vzorca za kromatografijo

Hidrolizat, ki smo mu naravnali pH (5.3.3.1 ali 5.3.3.2), kvantitativno prenesemo s citratnim pufrom (3.24) v 200 mililitrsko merilno bučko in jo s pufrom (3.24) dopolnimo do oznake.

Če internega standarda še nismo uporabili, dodamo 2,00 ml internega standarda (3.27.3) in s citratnim pufrom (3.24) dopolnimo do oznake. Temeljito premešamo.

Nadaljujemo kromatografijo (5.4).

Če vzorčnih raztopin ne analiziramo istega dne, jih hranimo pri temperaturi pod 5° C.

5.4 Kromatografija

Pred kromatografiranjem ekstrakt (5.2) ali hidrolizat (5.3.4) segrejemo na sobno temperaturo. Mešanico pretresemo in filtriramo ustrezno množino skozi 0,2 µm membranski filter (4.5). Dobljeno bistro raztopino podvržemo ionsko izmenjevalni kromatografiji v analizatorju aminokislin (4.9).

Vbrizganje lahko izvedemo ročno ali avtomatsko. Pomembno je, da tako za analizo standardov kot tudi za analizo vzorcev dodamo v kolono enako količino raztopine ±0,5 %, razen če uporabimo interni standard, ter da je razmerje natrij:aminokislina v raztopini standarda in raztopini vzorca čim bolj podobno.

Na splošno je pogostost izvedbe umeritve odvisna od stabilnosti ninhidrinskega reagenta in analiznega sistema. Standard ali vzorec razredčimo s citratnim pufrom (3.24), da dobimo površino vrha standarda velikosti 30-200 % površine vrha aminokislin iz vzorca.

Kromatografija aminokislin se glede na uporabljeno vrsto analizatorja in umetne smole malenkostno razlikuje. Izbrani sistem mora biti zmožen ločiti aminokislina med seboj in od drugih ninhidrinsko pozitivnih snovi. V delovnem območju se mora kromatografski sistem linearno odzivati na spremembe množin aminokislin, dodanih v kolono.

Pri kromatografiranju se pri analizi ekvimolarne raztopine (aminokislin, ki se določajo) uporablja spodaj navedeno razmerje bazna črta: višina vrha. Ta ekvimolarna raztopina mora vsebovati najmanj 30 % največje količine vsake aminokislina, ki jo je mogoče točno izmeriti s sistemom analizatorja aminokislin (4.9).

Za ločevanje treonin-serina razmerje bazna črta:višina vrha nižje od dveh prekrivajočih se aminokislin na kromatogramu ne sme presegati 2:10 (če določamo samo cist(e)in, metionin, treonin in lizin, bo nezadostno ločevanje od pripadajočih vrhov škodljivo vplivalo na določanje). Za vse druge aminokislina mora biti ločevanje boljše kot 1:10.

Sistem mora zagotoviti, da se lizin loči od »lizinskih artefaktov« in ornitina.

## 6. Izračun rezultatov

Površine vrhov vzorca in vrhov standarda izmerimo za vsako aminokislino posebej, nato pa izračunamo množino v g aminokislina na kg vzorca.

$(A \times E \times MW \times F) / (B \times W \times 1000) = \text{g aminokislina na kg vzorca}$

Če smo uporabili interni standard, pomnožimo z: D/C

A = površina vrha, hidrolizat ali ekstrakt

B = površina vrha, standardna raztopina za umeritev

C = površina vrha, interni standard v hidrolizatu ali ekstraktu

D = površina vrha, interni standard, standardna raztopina za umeritev

MW = molekulska masa aminokislina, ki jo določamo

E = koncentracija standarda v µmol/ml

W = masa vzorca (g) (korigirana glede na začetno maso, če smo sušili ali razmastili)

F = ml celotnega hidrolizata (5.3.4) ali mililitri izračunanega celotnega razredčenja volumna ekstrakta (6.1).

Cistin in cistein določimo skupaj kot cisteinsko kislino v hidrolizatih oksidirane vzorca, vendar ga izračunamo kot cistin ( $C_6H_{12}N_2O_4S_2$ , MW 240,30 z uporabo molske mase 120,15 (= 0,5 x 240,30).

Metionin določimo kot metionin-sulfon v hidrolizatu oksidirane vzorca, vendar ga izračunamo kot metionin z uporabo molske mase metionina: 149,21.

Dodani prosti metionin določimo po ekstrakciji kot metionin, za izračun uporabimo isto molsko maso.

6.1 Celotni volumen razredčitve ekstraktov (F) za določanje prostih aminokislin (5.2) izračunamo:

$F = 100 \text{ ml} \times ((10 \text{ ml} + 5 \text{ ml}) / 10 \text{ ml}) \times (V_{\text{ml}} / 10 \text{ ml})$

V = volumen končnega ekstrakta

## 7. Ovrednotenje metode

Metoda je bila preskušena v medlaboratorijski primerjavi, ki je bila izvedena leta 1990 na mednarodni ravni, in sicer s štirimi različnimi vrstami krme (krmna mešanica za prašiče, mešanica za piščance, beljakovinski koncentrat, premiks). Rezultati po odstranitvi ubežnikov, ki prikazujejo srednje vrednosti in standardni odmik, so prikazani v spodnji tabeli:

### Srednje vrednosti v g/kg

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Krmna mešanica za prašiče	6,94 n=15	3,01 n=17	3,27 n=17	9,55 n=13
Krmna mešanica za piščance	9,31 n=16	3,92 n=18	5,08 n=18	13,93 n=16
Beljakovinski koncentrat	22,32 n=16	5,06 n=17	12,01 n=17	47,74 n=15
Premiks	58,42 n=16	/	90,21 n=16	98,03 n=16

n = število sodelujočih laboratorijev

### 7.1 Ponovljivost

Ponovljivost, izražena kot »standardni odmik znotraj laboratorija« iz zgoraj navedene medlaboratorijske primerjave, je v spodnjih tabelah:

### Standardni odmik znotraj laboratorija (S<sub>r</sub>) v g/kg

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Krmna mešanica za prašiče	0,13 n=15	0,10 n=17	0,11 n=17	0,26 n=13
Krmna mešanica za piščance	0,20 n=16	0,11 n=18	0,16 n=18	0,28 n=16
Beljakovinski koncentrat	0,48 n=16	0,13 n=17	0,27 n=17	0,99 n=15
Premiks	1,30 n=16	/	2,19 n=16	2,06 n=16

n = število sodelujočih laboratorijev

### Koeficient variacije (%) za standardni odmik znotraj laboratorija (S<sub>r</sub>)

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Krmna mešanica za prašiče	1,9 n=15	3,3 n=17	3,4 n=17	2,8 n=13
Krmna mešanica za piščance	2,1 n=16	2,8 n=18	3,1 n=18	2,1 n=16
Beljakovinski koncentrat	2,7 n=16	2,6 n=17	2,2 n=17	2,4 n=15
Premiks	2,2 n=16	/	2,4 n=16	2,1 n=16

n = število sodelujočih laboratorijev

## 7.2 Obnovljivost

Rezultati za standardni odmik med laboratoriji pri zgoraj navedeni medlaboratorijski primerjavi so v spodnji tabeli:

### Standardni odmik med laboratoriji ( $S_R$ ) v g/kg

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Krmna mešanica za prašiče	0,28 n=15	0,30 n=17	0,23 n=17	0,30 n=13
Krmna mešanica za piščance	0,48 n=16	0,34 n=18	0,55 n=18	0,75 n=16
Beljakovinski koncentrat	0,85 n=16	0,62 n=17	1,57 n=17	1,24 n=15
Premiks	2,49 n=16	/	6,20 n=16	6,62 n=16

n = število sodelujočih laboratorijev

### Koeficient variacije (%) za standardni odmik med laboratoriji ( $S_R$ )

Referenčni material	Aminokislina			
	Treonin	Cist(e)in	Metionin	Lizin
Krmna mešanica za prašiče	4,1 n=15	9,9 n=17	7,0 n=17	3,2 n=13
Krmna mešanica za piščance	5,2 n=16	8,8 n=18	10,9 n=18	5,4 n=16
Beljakovinski koncentrat	3,8 n=16	12,3 n=17	13,0 n=17	3,0 n=15
Premiks	4,3 n=16	/	6,9 n=16	6,7 n=16

n = število sodelujočih laboratorijev

## 8. Uporaba referenčnih materialov

Pravilno uporabo metode preverjamo z izvajanjem vzporednih meritev certificiranih referenčnih materialov, če so na voljo. Priporočljivo je umerjanje s certificirano raztopino aminokislina za umerjanje.

## 9. Opombe

9.1 Zaradi razlik med analizatorji aminokislin upoštevamo končne koncentracije raztopin za umerjanje standardnih aminokislin (glej 3.27.4 in 3.27.5) in hidrolizata (glej 5.3.4) kot vodila.

Za vse aminokislina moramo preveriti območje linearnega odziva opreme.

Standardno raztopino razredčimo s citratnim pufrom, da dobimo površine vrhov na sredini območja.

9.2 Če za analizo hidrolizatov uporabljamo opremo za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti, moramo eksperimentalne pogoje optimizirati v skladu s priporočili proizvajalca.

9.3 Pri uporabi metode za krmo, ki vsebuje več kot 1 % klorida (koncentrat, mineralna krma, dopolnilna krma), se lahko pojavi pre nizka vrednost vsebnosti metionina in je zato potrebna posebna obdelava.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 98/64/ES.

## METODA 25\*

### DOLOČANJE TRIPTOFANA

#### 1. Namen in področje uporabe

Metoda se uporablja za določanje celotnega in prostega triptofana v krmi in ne razlikuje med oblikama D- in L-.

#### 2. Princip

Za določanje celotnega triptofana vzorec hidroliziramo pod alkalnimi pogoji z nasičeno raztopino barijevega hidroksida in segrevamo do 100 °C 20 ur. Po hidrolizi dodamo notranji standard.

Za določanje prostega triptofana vzorec ekstrahiramo pod rahlo kislimi pogoji v prisotnosti notranjega standarda.

Triptofan in notranji standard v hidrolizatu ali v ekstraktu določimo s HPLC s fluorescenčno detekcijo.

#### 3. Reagenti

3.1. Uporabljati moramo dvakrat destilirano vodo ali vodo enake kakovosti (prevodnost < 10 µS/cm)

3.2. Standardna snov: triptofan (čistoča/vsebnost ≥ 99 %), osušena v vakumu nad fosforjevim pentoksidom

3.3. Notranji standard: α-metil-triptofan (čistoča/vsebnost ≥ 99 %), posušen v vakumu nad fosforjevim pentoksidom

3.4. Barijev hidroksid oktahidrat (paziti je treba, da Ba(OH)<sub>2</sub> x 8 H<sub>2</sub>O ni pretirano izpostavljen zraku, da se ne bi tvoril BaCO<sub>3</sub>, ki bi lahko motil določanje) (glej opažanja 9.3)

3.5. Natrijev hidroksid

3.6. Orto-fosforjeva kislina, w = 85 %

3.7. Klorovodikova kislina, p<sub>20</sub> = 1,19 g/ml

3.8. Metanol, za HPLC

3.9. Petroleter, vrelišče 40 – 60 °C

3.10. Raztopina natrijevega hidroksida, c = 1 mol/l:

Raztopimo 40,0 g NaOH (3.5) v vodi in dopolnimo do 1 l z vodo (3.1).

3.11. Klorovodikova kislina, c = 6 mol/l:

492 ml HCl (3.7) dopolnimo do 1 l z vodo (3.1).

3.12. Klorovodikova kislina, c = 1 mol/l:

82 ml HCl (3.7) dopolnimo do 1 l z vodo (3.1).

3.13. Klorovodikova kislina, c = 0,1 mol/l:

8,2 ml HCl (3.7) dopolnimo do 1 l z vodo (3.1).

3.14 Orto-fosforjeva kislina, c = 0,5 mol/l:

34 ml orto-fosforne kisline (3.6) dopolnimo do 1 l z vodo (3.1).

3.15 Koncentrirana raztopina triptofana (3.2), c = 2,50 µmol/ml:

V 500 ml merilni bučki raztopimo 0,2553 g triptofana (3.2) v klorovodikovi kislini (3.13) in dopolnimo do oznake s klorovodikovo kislino (3.13). Hranimo pri – 18° C največ štiri tedne.

3.16. Koncentrirana raztopina notranjega standarda, c = 2,50 µmol/ml:

V 500 ml merilni bučki raztopimo 0,2728 g α-metil-triptofana (3.3) v klorovodikovi kislini (3.13) in dopolnimo do oznake s klorovodikovo kislino (3.13). Hranimo pri – 18° C največ štiri tedne.

3.17. Standardna raztopina triptofana in notranjega standarda za umeritev :

Vzamemo 2,00 ml koncentrirane raztopine triptofana (3.15) in 2,00 ml koncentrirane ( α-metil-triptofan) raztopine notranjega standarda (3.16). Razredčimo z vodo (3.1) in metanolom (3.8) na približno enaka volumna in na približno enako koncentracijo metanola (10 – 30 %) kot pri končnem hidrolizatu.

To raztopino moramo sveže pripraviti pred uporabo.

Med pripravo jo zaščitimo pred direktno sončno svetlobo.

3.18. Ocetna kislina

3.19. 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanol (3.19)

3.20. Etanolamin > 98 %

3.21. Raztopina 1 g 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanola (3.19) v 100 ml metanola (3.8)

3.22. Mobilna faza za HPLC: 3,000 g očetne kisline (3.18) in 900 ml vode (3.1) + 50,0 ml raztopine (3.21) 1,1,1-trikloro-2-metil-2-propanola (3.19) v metanolu (3.8) (1g/100 ml). Naravnomo pH na 5,00 z uporabo etanolamina (3.20). Dopolnimo do 1 000 ml z vodo (3.1)

#### 4. Oprema

- 4.1 HPLC oprema s spektrofluorimetričnim detektorjem
- 4.2. Kolona za tekočinsko kromatografijo, 125 mm x 4 mm C<sub>18</sub>, 3µm polnitev ali enakovredna
- 4.3. pH-meter
- 4.4. Bučka iz polipropilena, vsebine 125 ml, s širokim vratom in zamaškom z navojem
- 4.5. Membranski filter, 0,45 µm
- 4.6. Avtoklav, 100 (± 2) ° C, 1,4 (± 0,1) bara
- 4.7. Mehanski stresalnik ali magnetno mešalo
- 4.8. Vorteks mešalnik

#### 5. Postopek

##### 5.1. Priprava vzorca

Vzorec zdrobimo, tako da preide skozi 1 mm sito. Vzorce z visoko vlago moramo pred drobljenjem osušiti ali na zraku ali pri temperaturi, ki ne presega 50 ° C ali pa osušiti z zmrzovanjem. Vzorce z visoko vsebnostjo maščobe je treba pred drobljenjem ekstrahirati s petroletom (3.9).

##### 5.2. Določanje prostega triptofana (ekstrakt)

Natehtamo s točnostjo 1mg primerno množino (1 – 5 g) pripravljenega vzorca (5.1) v erlenmajerico. Dodamo 100,0 ml klorovodikove kisline, c = 0,1 mol/l (3.13) in 5,00 ml koncentrirane raztopine notranjega standarda (3.16). Stresamo ali mešamo 60 minut z mehanskim stresalnikom ali magnetnim mešalom (4.7). Pustimo, da se usedlina usede na dno in odpipetiramo 10,0 ml raztopine nad usedlino v čašo. Dodamo 5 ml orto-fosforjeve kisline, c = 0,5 mol/l (3.14). Naravnamo pH na 3,0 z raztopino natrijevega hidroksida, c = 1,0 mol/l (3.10). Dodamo dovolj metanola (3.8), da dobimo v končnem volumnu koncentracijo metanola med 10 in 30 %. Prenesemo v merilno bučko primerne prostornine in razredčimo z vodo na volumen, ki je potreben za kromatografijo (približno enaki volumni kot pri standardni raztopini za umeritev (3.17)). Pred vbizganjem na HPLC kolono nekoliko ml raztopine prefiltriramo skozi 0,45 µm membranski filter (4.5). Nadaljujemo s kromatografijo v skladu z odstavkom 5.4.

Standardno raztopino in ekstrakte zaščitimo pred direktno sončno svetlobo. Če ni možno analizirati ekstraktov istega dne, jih lahko hranimo pri 5 ° C največ tri dni.

##### 5.3. Določanje celotnega triptofana (hidrolizat).

Natehtamo s točnostjo 0,2 mg od 0,1 do 1 g pripravljenega vzorca (5.1) v bučko iz polipropilena (4.4). Natehtani del vzorca bi moral imeti vsebnost dušika približno 10 mg. Dodamo 8,4 mg barijevega hidroksida oktahidrata (3.4) in 10 ml vode. Mešamo na vorteks mešalniku (4.8) ali z magnetnim mešalom (4.7) S teflonom prevlečeni magnet pustimo v mešanici. Stene posode speremo s 4 ml vode. Zapremo z vijačnim pokrovom in na rahlo zapremo bučko. Prenesemo v avtoklav (4.6) z vrelo vodo in pustimo v pari 30 – 60 minut. Zapremo avtoklav in avtoklaviramo pri 110 (± 2) ° C 20 ur.

Preden odpremo avtoklav, zmanjšamo temperaturo nekoliko pod 100 ° C. Da preprečimo kristalizacijo Ba(OH)<sub>2</sub> x 8 H<sub>2</sub>O, dodamo topli mešanici 30 ml vode, ki ima sobno temperaturo. Rahlo pretresemo ali mešamo. Dodamo 2,00 ml koncentrirane raztopine notranjega standarda (α-metil-triptofana) (3.16). Posode hladimo na vodni/ledeni kopeli 15 minut.

Nato dodamo 5 ml orto fosforjeve kisline, c = 0,5 mol/l (3.14). Posodo zadržimo v hladilni kopeli in nevtraliziramo s HCl, c = 6 mol/l (3.11) med mešanjem ter s HCl, c = 1 mol/l (3.12) naravnamo pH na 3,0. Dodamo dovolj metanola, da dobimo v končnem volumnu koncentracijo metanola med 10 in 30 % . Prenesemo v merilno bučko primerne prostornine in razredčimo z vodo do volumna, potrebnega za kromatografijo (na primer 100 ml). Dodatek metanola ne sme povzročiti obarjanja.

Pred vbizganjem na HPLC kolono prefiltriramo nekoliko ml raztopine skozi 0,45 µm membranski filter (4.5). Nadaljujemo s kromatografijo v skladu z odstavkom 5.4.

Standardno raztopino in hidrolizate zaščitimo pred direktno sončno svetlobo. Če ne moremo analizirati hidrolizatov istega dne, jih lahko hranimo pri 5 ° C največ tri dni.

##### 5.4. Določanje s HPLC

Navedeni pogoji za izokratsko eluiranje so ponujeni kot vodilo; lahko se uporabijo tudi drugi pogoji, če dajo enakovredne rezultate (glej tudi opažanja 9.1 in 9.2).

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.2.):	125 mm x 4 mm C <sub>18</sub> , polnitev 3 µm ali enakovredna
Temperatura kolone:	sobna temperatura
Mobilna faza (3.22):	3,00 g očetne kisline (3.18) + 900 ml vode (3.1) + 50,0 ml raztopine (3.21) 1,1,1,-trikloro-2- metil-2-propanola (3.19) v metanolu (3.8) (1g/100ml). Naravnamo pH na 5,00 z uporabo etanolamina (3.20). Dopolnimo do 1000 ml z vodo (3.1)
Hitrost pretoka:	1ml/min
Celoten čas poteka:	približno 34 minut
Detekcija valovnih dolžin:	vzbujanje 280 nm, emisija 356 nm
Volumen vbizgaja	20 µl

## 6. Izračun rezultatov

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

A = površina vrha notranjega standarda, standardna raztopina za umeritev (3.17)

B = površina vrha triptofana, ekstrakt (5.2) ali hidrolizat (5.3)

C = volumen, v ml (2 ml), koncentrirane raztopine triptofana (3.15), dodan raztopini za umeritev (3.17)

D = koncentracija, v  $\mu\text{mol/ml}$  (= 2,50), koncentrirane raztopine triptofana (3.15), dodane raztopini za umeritev (3.17)

E = volumen, v ml, koncentrirane raztopine notranjega standarda (3.16), dodan pri ekstrakciji (5.2) (= 5,00 ml) ali hidrolizatu (5.3) (= 2,00ml)

F = površina vrha notranjega standarda, ekstrakt (5.2) ali hidrolizat (5.3)

G = površina vrha triptofana, standardna raztopina za umeritev (3.17)

H = volumen, v ml (2 ml), koncentrirane raztopine notranjega standarda (3.16), dodan standardni raztopini za umeritev (3.17)

W = masa vzorca, v g, (korigirana na prvotno maso, če je posušen, in/ali razmaščen)

MW = molekulska masa triptofana (= 204, 23)

## 7. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 15 % glede na najvišji rezultat.

## 8. Rezultati medlaboratorijske študije

Organizirana je bila medlaboratorijska študija Skupnosti (četrti medsebojna primerjava), v kateri so tri vzorce analizirali v do 12 laboratorijih, da bi certificirali metodo glede hidrolize. Vsak vzorec je bil analiziran s 5 –kratno ponovitvijo. Rezultati so podani v naslednji tabeli:

	Vzorec 1 Krma za prašiče	Vzorec 2 Krma za prašiče z dodatkom L-triptofana	Vzorec 3 Krmni koncentrat za prašiče
L	12	12	12
n	50	55	50
srednja vr.[g/kg]	2,42	3,40	4,22
$s_r$ [g/kg]	0,05	0,05	0,08
r [g/kg]	0,14	0,14	0,22
$CV_r$ [%]	1,9	1,6	1,9
$s_R$ [g/kg]	0,15	0,20	0,09
R [g/kg]	0,42	0,56	0,25
$CV_R$ [%]	6,3	6,0	2,2

L: število laboratorijev, ki so dostavili rezultate

n: število posameznih rezultatov, po odstranitvi ubežnikov (določenih s Cochran, Dixon testom za ubežnike)

$s_r$ : standardni odmik ponovljivosti

$s_R$ : standardni odmik obnovljivosti

r: ponovljivost

R: obnovljivost

$CV_r$ : koeficient variacije ponovljivosti, %

$CV_R$ : koeficient variacije obnovljivosti, %

Organizirana je bila še ena medlaboratorijska študija Skupnosti (tretja medsebojna primerjava), v kateri so analizirali dva vzorca v do 13 laboratorijih, da bi certificirali metodo glede na ekstrakcijo prostega triptofana. Vsak vzorec je bil analiziran s 5 kratno ponovitvijo. Rezultati so podani v naslednji tabeli:

	Vzorec 4 Mešanica pšenice in soje	Vzorec 5 Mešanica pšenice in soje (= vzorec 4) z dodanim triptofanom (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
srednja vr.[g/kg]	0,391	0,931
$s_r$ [g/kg]	0,005	0,012
$r$ [g/kg]	0,014	0,034
$CV_r$ [%]	1,34	1,34
$s_R$ [g/kg]	0,018	0,048
$R$ [g/kg]	0,050	0,134
$CV_R$ [%]	4,71	5,11

L: število laboratorijev, ki so dostavili rezultate

n: število posameznih rezultatov, dobljenih po odstranitvi ubežnikov določenih s Cochran, Dixon testom za ubežnike)

$s_r$ : standardni odmik ponovljivosti

$s_R$ : standardni odmik obnovljivosti

r: ponovljivost

R: obnovljivost

$CV_r$ : koeficient variacije ponovljivosti, %

$CV_R$ : koeficient variacije obnovljivosti, %

Organizirana je bila še ena medlaboratorijska študija Skupnosti, v kateri so analizirali štiri vzorce v do sedmih laboratorijih s ciljem certificiranja triptofana glede hidrolize. Rezultati so podani v spodnji tabeli. Vsak vzorec je bil analiziran s petkratno ponovitvijo.

	Vzorec 1 Krmna mešanica za prašiče (CRM 117)	Vzorec 2 Ribja moka z nizko vsebnostjo maščobe (CRM 118)	Vzorec 3 Sojina moka (CRM 119)	Vzorec 4 Posneto mleko v prahu (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
srednja vr.[g/kg]	2,064	8,801	6,882	5,236
$s_r$ [g/kg]	0,021	0,101	0,089	0,040
$r$ [g/kg]	0,059	0,283	0,249	0,112
$CV_r$ [%]	1,04	1,15	1,30	0,76
$s_R$ [g/kg]	0,031	0,413	0,283	0,221
$R$ [g/kg]	0,087	1,156	0,792	0,619
$CV_R$ [%]	1,48	4,69	4,11	4,22

L: število laboratorijev, ki so dostavili rezultate

n: število posameznih rezultatov, dobljenih po odstranitvi ubežnikov (določenih s Cochran, Dixon testom za ubežnike)

$s_r$ : standardni ododmik ponovljivosti

$s_R$ : standardni odmik obnovljivosti

r: ponovljivost

R: obnovljivost

$CV_r$ : koeficient variacije ponovljivosti, %

$CV_R$ : koeficient variacije obnovljivosti, %

## 9. Opazanja

9.1. Naslednji posebni kromatografski pogoji lahko izboljšajo ločenje triptofana in  $\alpha$ -metil-triptofana.

Izokratsko eluiranje, ki mu sledi stopenjsko čiščenje kolone:

Kolona za tekočinsko kromatografijo:	125 mm x 4 mm C <sub>18</sub> , polnitev 5 $\mu$ m ali enakovredna
Temperatura kolone:	32° C
Mobilna faza:	A: 0,01 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Metanol, 95 + 5 (V + V) B: Metanol
Program stopenj	0 min 100 % A 0 % B 15 min 100 % A 0 % B 17 min 60 % A 40 % B 19 min 60 % A 40 % B 21 min 100 % A 0 % B 33 min 100 % A 0 % B
Hitrost pretoka:	1,2 ml/min
Celoten čas poteka:	približno 33 minut

9.2 Kromatografija se bo spreminjala v skladu z vrsto HPLC in uporabljenim materialom za polnitev kolone. Izbrani sistem mora omogočiti ločevanje bazne linije triptofana in notranjega standarda, poleg tega je pomembno, da se produkti razgradnje dobro ločijo od triptofana in notranjega standarda. Izvesti je treba postopek s hidrolizatom brez notranjega standarda z namenom, da se preveri bazna linija standarda glede na nečistoče. Pomembno je, da je čas izvedbe dovolj dolg, da se eluirajo produkti razgradnje, sicer lahko zapozneli vrhovi eluiranja motijo nadaljnje kromatografiranje.

V delovnem območju se mora kromatografski sistem odzivati linearno. Linearni odziv je treba izmeriti s konstantno (običajno) koncentracijo notranjega standarda in različnimi koncentracijami triptofana. Zelo važno je, da je so velikosti vrhov tako triptofana kot tudi notranjega standarda v linearnem območju HPLC/fluorescenčnega sistema. Če so vrhovi triptofana in/ali notranjega standarda prenizki ali previsoki, je treba analizo ponoviti z drugačno količino vzorca in/ali s spremenjenim končnim volumnom.

### 9.3 Barijev hidroksid

S staranjem postane barijev hidroksid težje topen. Posledica tega je motna raztopina za HPLC določitev, kar lahko povzroči nizke rezultate za triptofan.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 2000/45/ES.

## METODA 26\* DOLOČANJE VITAMINA A

### 1. Namen in področje uporabe

Metoda se uporablja za določanje vitamina A (retinola) v krmi in premiksih. Vitamin A vključuje celoten trans-retinil alkohol in njegove cis izomere, ki se določijo s to metodo. Vsebnost vitamina A je izražena v mednarodnih enotah (IE) na kg. Ena IE ustreza aktivnosti 0,300  $\mu$ g celotnega trans-vitamin A alkohola ali 0,344  $\mu$ g acetata celotnega trans-vitamina A ali 0,550  $\mu$ g palmitata celotnega trans-vitamina A.

Meja določanja je 2000 IE vitamina A/kg.

### 2. Princip

Vzorec hidroliziramo z raztopino etanolnega kalijevega hidroksida, vitamin A ekstrahiramo v petroleter. Topilo odstranimo z uparovanjem, ostanek raztopimo v metanolu in po potrebi razredčimo do zahtevane koncentracije. Vsebnost vitamina A določimo s plinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC) z uporabo UV ali fluorescenčnega detektorja. Kromatografske parametre izberemo tako, da se celoten trans-vitamin A alkohol in njegovi izomeri ne ločijo.

### 3. Reagenti

3.1. Etanol,  $\sigma = 96 \%$

3.2. Petroleter, vrelišče 40° do 60° C

3.3. Metanol

3.4. Raztopina kalijevega hidroksida,  $\beta = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$

3.5. Raztopina natrijevega askorbata,  $\beta = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$  (glej. opazanja 7.7)

3.6. Natrijev sulfid, Na<sub>2</sub>S · x H<sub>2</sub>O (x = 7-9)



- 3.6.1. Raztopina natrijevega sulfida,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$  v glicerolu,  $\beta = 120 \text{ g/l}$  (za  $x = 9$ ) (glej opažanja 7.8)
- 3.7. Raztopina fenolftaleina,  $\beta = 2 \text{ g/100 ml}$  v etanolu (3.1)
- 3.8. 2-propanol
- 3.9. Mobilna faza za HPLC: mešanica metanola (3.3) in vode, npr. 980 + 20 (v + v). Točno razmerje bo določeno glede na značilnosti uporabljene kolone.
- 3.10. Dušik, brez kisika
- 3.11. Acetat celotnega trans-vitamina A, posebne čistosti, certificirane aktivnosti, npr.  $2,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
- 3.11.1. Osnovna raztopina acetata celotnega trans-vitamina A: s točnostjo 0,1 mg natehtamo 50 mg acetata vitamina A (3.11) v 100 ml merilno bučko. Raztopimo v 2-propanolu (3.8) in dopolnimo do oznake z istim topilom. Nominalna koncentracija te raztopine je 1 400 enot IE vitamina A na ml. Točno vsebnost moramo določiti v skladu s 5.6.3.1.
- 3.12. Palmitat celotnega trans-vitamina A, posebne čistosti, certificirane aktivnosti, npr.  $1,80 \times 10^6 \text{ IE/g}$
- 3.12.1. Osnovna raztopina palmitata celotnega trans-vitamina A: s točnostjo 0,1 mg natehtamo 80 mg palmitata vitamina A (3.12) v 100 ml merilno bučko. Raztopimo v 2-propanolu (3.8) in dopolnimo do oznake z istim topilom. Nominalna koncentracija te raztopine je 1 400 enot IE vitamina A na ml. Točno vsebnost moramo določiti v skladu s 5.6.3.2.
- 3.13. 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (glej opažanja 7.5)

#### 4. Oprema

- 4.1 Rotacijski vakuumski uparjalnik
- 4.2. Temna steklovina
- 4.2.1. Bučke z ravnim dnom ali erlenmajerice, 500 ml, z brusom
- 4.2.2. Merilne bučke z zamaški iz brušenega stekla, z ozkim vratom, 10, 25, 100 in 500 ml
- 4.2.3. Liji ločniki, konusni, 1 000 ml, z zamaški iz brušenega stekla
- 4.2.4. Hruškaste bučke, 250 ml, z brusi
- 4.3 Allihnov kondenzator, dolžina obroča 300 mm, s spojem iz brušenega stekla, z nastavkom za dovodno cev plina
- 4.4. Naguban filtrirni papir za ločenje faz, premera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)
- 4.5. Oprema za kromatografijo HPLC s sistemom vbrizgavanja
- 4.5.1. Kolona za tekočinsko kromatografijo, 250 mm x 4 mm  $C_{18}$ , 5 ali 10  $\mu\text{m}$  polnitev, ali enakovredna (kriterij za zmogljivost: samo en vrh za vse izomere retinola pod pogoji kromatografije HPLC)
- 4.5.2. UV ali fluorescenčni detektor, s spremenljivo nastavitvijo valovne dolžine
- 4.6. Spektrofotometer z 10 mm kremenovimi kivetami
- 4.7. Vodna kopel z magnetnim mešalnikom
- 4.8. Aparatura za ekstrakcijo (glej sliko 1), sestavljena iz:
- 4.8.1. Steklenega valja s kapaciteto 1 litra, opremljenega z vratom iz brušenega stekla in zamaškom
- 4.8.2. Vložka iz brušenega stekla, opremljenega s stransko ročico in nastavljivo cevjo, ki gre skozi središče. Nastavljiva cev mora imeti spodnji del v obliki črke U in vbrizg na nasprotnem koncu, tako da vrhnja plast tekočine v valju lahko preide v lij ločnik.

#### 5. Postopek

Opomba: Vitamin A je občutljiv na (UV) svetlobo in oksidacijo. Vse operacije moramo izvajati v odsotnosti svetlobe (z uporabo temne steklovine ali steklene posode, zaščitene z aluminijevo folijo) in kisika (spiranje z dušikom). Med ekstrakcijo je treba zrak nad tekočino zamenjati z dušikom (previsokemu tlaku se izognemo z občasnim popuščanjem zamaška).

##### 5.1. Priprava vzorca

Vzorec zdrobimo tako, da preide skozi 1 mm sito in pri tem pazimo, da se ne razvije toplota. Drobljenje moramo izvesti tik pred tehtanjem in saponifikacijo; v nasprotnem primeru lahko nastanejo izgube vitamina A.

##### 5.2. Saponifikacija

Ovisno od vsebnosti vitamina A natehtamo s točnostjo 0,01 g, 2 g do 25 g vzorca v 500 ml bučko z ravnim dnom ali erlenmajerico (4.2.1). Nato postopoma dodajamo med obračanjem 130 ml etanola (3.1), približno 100 mg BHT (3.13), 2 ml raztopine natrijevega askorbata (3.5) in 2 ml raztopine natrijevega sulfida (3.6). Kondenzator (4.3) spojimo z bučko in potopimo bučko v vodno kopel z magnetnim mešalnikom (4.7). Segrejemo do vrenja in pustimo pod povratnim hladilnikom pet minut. Nato skozi kondenzator dodamo 25 ml raztopine kalijevega hidroksida (3.4) in pustimo pod povratnim hladilnikom nadaljnjih 25 minut, z mešanjem pod rahlim pretokom dušika. Nato kondenzator speremo s približno 20 ml vode in ohladimo vsebino bučke na sobno temperaturo.

##### 5.3. Ekstrakcija

Z dekantiranjem prenesemo saponifikacijsko raztopino kvantitativno v 1 000 ml lij ločnik (4.2.3) ali v aparaturo za ekstrakcijo (4.8) tako, da jo speremo s skupno 250 ml vode. Nato bučko za saponifikacijo speremo s 25 ml etanola (3.1) in nato s 100 ml petroletra (3.2) ter raztopine za izpiranje prenesemo v lij ločnik ali v aparaturo za ekstrakcijo. Razmerje vode in etanola v združenih raztopinah bi moralo znašati 2:1. Močno stresamo dve minuti in nato pustimo dve minuti, da se umiri.

### 5.3.1. Ekstrakcija z lijem ločnikom (4.2.3)

Ko so plasti ločene (glej opombo 7.3), prenesemo plast petroletra v drug lij ločnik (4.2.3). Ekstrakcijo ponovimo dvakrat s 100 ml petroletra (3.2) in dvakrat s 50 ml petroletra (3.2).

Dvakrat speremo združene ekstrakte v liju ločniku med rahlim obračanjem (da preprečimo nastanek emulzij) s 100 ml porcijami vode in nato s ponavljajočim se stresanjem še z nadaljnimi 100 ml porcijami vode, dokler voda ne postane brezbarvna na dodatek raztopine fenoltaleina (3.7) (navadno zadostuje štirikratno izpiranje). Filtriramo sprani ekstrakt skozi suh naguban filter za fazno ločevanje (4.4), da odstranimo suspendirano vodo, v 500 ml merilno bučko (4.2.2). Lij ločnik in filter speremo s 50 ml petroletra (3.2), dopolnimo do oznake s petroletrom (3.2) in dobro premešamo.

### 5.3.2. Ekstrakcija z uporabo aparature za ekstrakcijo

Ko so se plasti ločile (glej opombo 7.3), zamenjamo zamašek steklenega valja (4.8.1) z vložkom iz brušenega stekla (4.8.2) in namestimo spodnji del nastavljive cevi v obliki črke U tik nad raven vmesnika. S tlakom, ki ga tvori dušik v stranski ročici, zgornjo plast petroletra prenesemo v 1 000 ml lij ločnik (4.2.3). Dodamo 100 ml petroletra (3.2) v stekleni valj, zamašimo in dobro pretresemo. Počakamo, da se plasti ločijo, in prenesemo zgornjo plast v lij ločnik tako kot prej. Ponovimo postopek ekstrakcije z novimi 100 ml petroletra (3.2), nato dvakrat s 50 ml porcijami petroletra (3.2) in dodamo plasti petroletra v lij ločnik.

Združene ekstrakte petroletra speremo, kot je opisano pod 5.3.1 in nadaljujemo, kot je tam opisano.

## 5.4. Priprava raztopine vzorca za HPLC

Odpipetiramo alikvot raztopine petroletra (iz 5.3.1 ali 5.3.2) v 250 ml hruškasto bučko (4.2.4). Topilo uparimo skoraj do suhega v rotacijskem uparjalniku (4.1) pri znižanem tlaku in temperaturi kopeli, ki ne presega 40° C. Znova vzpostavimo atmosferski tlak z dovajanjem dušika (3.10) in bučko odstranimo iz rotacijskega uparjalnika. Preostalo topilo odstranimo v toku dušika (3.10) in ostanek takoj raztopimo v znanem volumnu (10-100 ml) metanola (3.3) (koncentracija vitamina A mora biti v območju od 5 IE/ml do 30 IE/ml).

## 5.5 Določanje s HPLC

Vitamin A ločimo na C<sub>18</sub> koloni z reverzno fazo (4.5.1) in koncentracijo izmerimo z UV detektorjem (325 nm) ali fluorescenčnim detektorjem (vzbujanje: 325 nm, emisija: 475 nm) (4.5.2).

Vbrizgamo alikvot (npr. 20 µl) metanolne raztopine, dobljene v skladu s 5.4, in eluiramo z mobilno fazo (3.9). Izračunamo srednjo vrednost višine (površine) vrhov za več vbrizgov iste raztopine vzorca in srednje vrednosti višin (površin) vrhov za več vbrizgov raztopin za umerjanje (5.6.2).

### Pogoji za HPLC

Navedeni pogoji so ponujeni kot vodilo; lahko se uporabijo tudi drugi pogoji, če dajo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.5.1):	250 mm x 4 mm C <sub>18</sub> , polnitev 5 ali 10 µm ali enakovredna
Mobilna faza (3.9):	Mešanica metanola (3.3) in vode, npr. 980 + 20 (v + v)
Hitrost pretoka:	1-2 ml/min
Detektor (4.5.2):	UV detektor (325 nm) ali fluorescenčni detektor vzbujanje: 325 nm/emisija 475 nm)

## 5.6. Umeritev

### 5.6.1. Priprava delovnih standardnih raztopin

Odpipetiramo 20 ml osnovne raztopine acetata vitamina A (3.11.1) ali 20 ml osnovne raztopine palmitata vitamina A (3.12.1) v 500 ml bučko z ravnim dnom ali erlenmajerico (4.2.1) in hidroliziramo, kot je opisano pod 5.2, vendar brez dodatka BHT. Nato ekstrahiramo s petroletrom (3.2) v skladu s 5.3 in dopolnimo do 500 ml s petroletrom (3.2). 100 ml tega ekstrakta uparimo v rotacijskem uparjalniku (glej 5.4) skoraj do suhega, odstranimo preostalo topilo v toku dušika (3.10) in ponovno raztopimo ostanek v 10,0 ml metanola (3.3). Nominalna koncentracija te raztopine je 560 enot IE vitamina A na ml. Točno vsebnost moramo določiti v skladu s 5.6.3.3. Standardno delovno raztopino moramo sveže pripraviti pred uporabo.

Odpipetiramo 2,0 ml te delovne standardne raztopine v 20 ml merilno bučko, dopolnimo do oznake z metanolom (3.3) in premešamo. Nominalna koncentracija te razredčene delovne standardne raztopine je 56 enot IE vitamina A na ml.

### 5.6.2. Priprava raztopin za umeritev in umeritvena krivulja

Prenesemo 1,0; 2,0; 5,0 in 10,0 ml razredčene delovne standardne raztopine v serijo 20 ml merilnih bučk, dopolnimomo do oznake z metanolom (3.3) in premešamo. Nominalne koncentracije teh raztopin so 2,8; 5,6; 14,0 in 28,0 IE vitamina A na ml.

Večkrat vbrizgamo 20 µl vsake od raztopin za umerjanje in določimo srednjo vrednost višin (površin) vrhov. Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov pripravimo umeritveno krivuljo ob upoštevanju rezultatov UV kontrole (5.6.3.3).

### 5.6.3. UV standardizacija standardnih raztopin

#### 5.6.3.1. Osnovna raztopina acetata vitamina A

Odpipetiramo 2,0 ml osnovne raztopine acetata vitamina A (3.11.1) v 50 ml merilno bučko (4.2.2) in dopolnimo do oznake z 2-propanolom (3.8). Nominalna koncentracija te raztopine je 56 IE vitamina A na ml. Odpipetiramo 3,0 ml te razredčene raztopine acetata vitamina A v 25 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake z 2-propanolom (3.8). Nominalna koncentracija te raztopine je 6,72 IE vitamina A na ml. Izmerimo UV spekter te raztopine proti 2-propanolu (3.8) v spektrofotometru (4.6) med 300 nm in 400 nm. Maksimum ekstinkcije mora biti med 325 nm in 327 nm.

Izračun vsebnosti vitamina A:

Enote IE vitamina A/ml =  $E_{326} \times 19,0$

( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  za acetat vitamina A = 1 530 pri 326 nm v 2-propanolu)

#### 5.6.3.2. Osnovna raztopina palmitata vitamina A

Odpipetiramo 2,0 ml osnovne raztopine palmitata vitamina A (3.12.1) v 50 ml merilno bučko (4.2.2) in dopolnimo do oznake z 2-propanolom (3.8). Nominalna koncentracija te raztopine je 56 IE vitamina A na ml. Odpipetiramo 3,0 ml te razredčene raztopine palmitata vitamina A v 25 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake z 2-propanolom (3.8). Nominalna koncentracija te raztopine je 6,72 IE vitamina A na ml. Izmerimo UV spekter te raztopine proti 2-propanolu (3.8) v spektrofotometru (4.6) med 300 nm in 400 nm. Maksimum ekstinkcije mora biti med 325 nm in 327 nm.

Izračun vsebnosti vitamina A:

Enote IE vitamina A/ml =  $E_{326} \times 19,0$

( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  za palmitat vitamina A = 975 pri 326 nm v 2-propanolu)

#### 5.6.3.3. Delovna standardna raztopina vitamina A

Odpipetiramo 3,0 ml nerazredčene delovne standardne raztopine vitamina A, pripravljene v skladu s 5.6.1, v 50 ml merilno bučko (4.2.2) in dopolnimo do oznake z 2-propanolom (3.8). Odpipetiramo 5,0 ml te raztopine v 25 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake z 2-propanolom (3.8). Nominalna koncentracija te raztopine je 6,72 IE vitamina A na ml. Izmerimo UV spekter te raztopine proti 2-propanolu (3.8) v spektrofotometru (4.6) med 300 nm in 400 nm. Maksimalna ekstinkcija mora biti med 325 nm in 327 nm.

Izračun vsebnosti vitamina A:

Enote IE vitamina A/ml =  $E_{325} \times 18,3$

( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$  za vitamin A alkohol = 1 821 pri 325 nm v 2-propanolu)

## 6. Izračun rezultatov

Iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov vitamina A iz raztopine vzorca določimo koncentracijo raztopine vzorca v IE/ml iz umeritvene krivulje (5.6.2).

Vsebnost vitamina A w v IE/kg v vzorcu je podana z naslednjo formulo:

$$w = \frac{500 \cdot \beta \cdot V_2 \cdot 1\,000}{V_1 \cdot m} \text{ [IE/kg]}$$

kjer je:

$\beta$  = koncentracija raztopine vzorca vitamina A (5.4), v IE/ml

$V_1$  = volumen raztopine vzorca (5.4), v ml

$V_2$  = volumen alikvota, uporabljenega v 5.4, v ml

m = masa preskusnega vzorca, v g

## 7. Opazanja

7.1. Za vzorce z nizko koncentracijo vitamina A je morda koristno združiti ekstrakte petroletra iz dveh saponifikacijskih šarž (natehtana množina: 25 g) v eno raztopino vzorca za določanje s HPLC.

7.2. Masa vzorca, ki ga vzamemo za analizo, ne sme vsebovati več kakor 2 g maščobe.

7.3. Če se ločitev faz ne pojavi, dodamo približno 10 ml etanola (3.1) za razbitje emulzije.

7.4. Pri ribjem olju in drugih čistih maščobah se čas saponifikacije lahko podaljša na 45 – 60 minut.

7.5. Namesto BHT se lahko uporabi hidrokinon.

7.6. Z uporabo običajne fazne kolone je možno ločiti izomere retinola.

7.7. Približno 150 mg askorbinske kisline se lahko uporabi namesto raztopine natrijevega askorbata.

7.8. Približno 50 mg EDTA se lahko uporabi namesto raztopine natrijevega sulfida.

## 8. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 15 % glede na višji rezultat.

## 9. Rezultati medlaboratorijske študije<sup>1</sup>

	Premiks	Krmna mešanica	Mineralni koncentrat	Beljakovinska krma	Pujski
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
srednja vr.[IE/kg]	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s <sub>r</sub> [IE/kg]	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r [IE/kg]	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV <sub>r</sub> [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s <sub>R</sub> [IE/kg]	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R [IE/kg]	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV <sub>R</sub> [%]	8,0	6,2	8,6	15	20

L: število laboratorijev

n: število posameznih vrednosti

s<sub>r</sub>: standardni odmik ponovljivosti

s<sub>R</sub>: standardni odmik obnovljivosti

r: ponovljivost

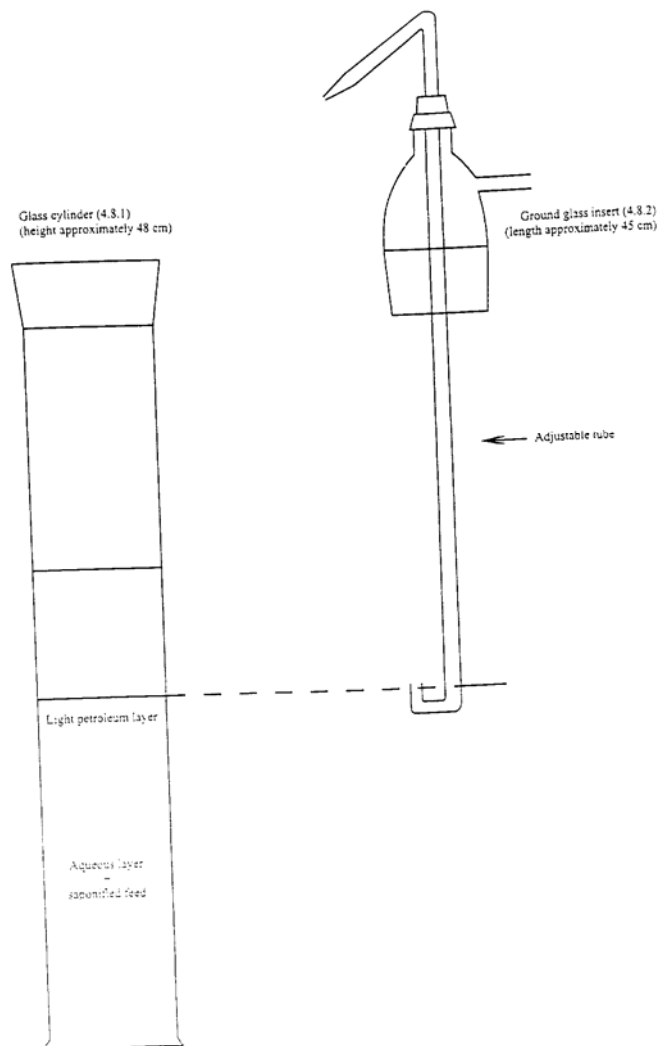
R: obnovljivost

CV<sub>r</sub>: koeficient variacije ponovljivosti

CV<sub>R</sub>: koeficient variacije obnovljivosti

<sup>1</sup> Izvedla delovna skupina za krmo Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Skica 1: Aparatura za ekstrakcijo (4.8)



Glass cylinder (4.8.1) = Stekleni valj (4.8.1)

(height approximately 48 cm) = (višina približno 48 cm)

Ground glass insert (4.8.2) = Vložek iz brušenega stekla (4.8.2)

(length approximately 45 cm) = (dolžina približno 45 cm)

Adjustable tube = Nastavljiva cevka

Light petroleum layer = Plast petroletra

Aqueous layer + saponified feed = Vodna plast + saponificirana krma

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 2000/45/ES.

## METODA 27\*

### DOLOČANJE VITAMINA E

#### 1. Namen in področje uporabe

Metoda se uporablja za določanje vitamina E v krmi in premiksih. Vsebnost vitamina E se izrazi v mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetata na kg. 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferol acetata ustreza 0,91 mg DL- $\alpha$ -tokoferola (vitamina E).

Meja določanja je 2 mg vitamina E/kg.

#### 2. Princip

Vzorec hidroliziramo z raztopino etanolnega kalijevega hidroksida, vitamin E ekstrahiramo v petroleter. Topilo odstranimo z uparjanjem, ostanek raztopimo v metanolu in po potrebi razredčimo do zahtevane koncentracije. Vsebnost vitamina E določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC) z uporabo UV ali fluorescenčnega detektorja.

#### 3. Reagenti

3.1. Etanol,  $\sigma = 96\%$

3.2. Petroleter, vrelišče  $40^\circ - 60^\circ\text{C}$

3.3. Metanol

3.4. Raztopina kalijevega hidroksida,  $\beta = 50\text{ g}/100\text{ ml}$

3.5. Raztopina natrijevega askorbata,  $\beta = 10\text{ g}/100\text{ ml}$  (glej opažanja 7.7)

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

3.6.1. Raztopina natrijevega sulfida,  $c = 0,5\text{ mol/l}$  v glicerolu,  $\beta = 120\text{ g/l}$  (za  $x = 9$ ) (glej opažanja 7.8)

3.7. Raztopina fenoltaleina,  $\beta = 2\text{ g}/100\text{ ml}$  v etanolu (3.1)

3.8. Mobilna faza za HPLC: mešanica metanola (3.3) in vode, npr.  $980 + 20$  ( $v + v$ ). Točno razmerje bo določeno glede na značilnosti uporabljene kolone.

3.9. Dušik, brez kisika

3.10. Acetat DL- $\alpha$ -tokoferola, posebne čistosti, certificirane aktivnosti

3.10.1. Osnovna raztopina acetata DL- $\alpha$ -tokoferola: natehtamo 100 mg acetata DL- $\alpha$ -tokoferola (3.10), s točnostjo 0,1 mg, v 100 ml merilno bučko. Raztopimo v etanolu (3.1) in dopolnimo do oznake z istim topilom. 1 ml te raztopine vsebuje 1 mg acetata DL- $\alpha$ -tokoferola. (UV kontrola, glej 5.6.1.3; stabilizacija glej opažanja 7.4).

3.11. DL- $\alpha$ -tokoferol, posebne čistosti, certificirane aktivnosti

3.11.1. Natehtamo 100 mg DL- $\alpha$ -tokoferola (3.10), s točnostjo 0,1 mg, v 100 ml merilno bučko. Raztopimo v etanolu (3.1) in dopolnimo do oznake z istim topilom. 1 ml te raztopine vsebuje 1 mg DL- $\alpha$ -tokoferola. (UV kontrola, glej 5.6.2.3; stabilizacija glej 7.4 opažanja).

3.12. 2,6 Di-tert-butil-4-metilfenol (BHT) (glej 7.5 opažanja)

#### 4. Oprema

4.1. Rotacijski vakuumski uparjalnik

4.2. Temna steklovina

4.2.1. Bučke z ravnim dnom ali erlenmajerice, 500 ml, z brusom

4.2.2. Merilne bučke z zamaški iz brušenega stekla, z ozkim vratom, 10, 25, 100 in 500 ml

4.2.3. Liji ločniki, konusni, 1 000 ml, z zamaški iz brušenega stekla

4.2.4. Hruškaste bučke, 250 ml, z zamaški iz brušenega stekla

4.3. Allihnov kondenzator, dolžina obroča 300 mm, s spojem iz brušenega stekla, z nastavkom za dovodno cev plina

4.4. Naguban filtrirni papir za ločevanje faz, premera 185 mm (npr. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2)

4.5. Oprema za kromatografijo HPLC s sistemom vbrizgavanja

4.5.1. Kolona za tekočinsko kromatografjo, 250 mm x 4 mm  $\text{C}_{18}$ , 5 ali 10  $\mu\text{m}$  polnitev, ali enakovredna

4.5.2. Fluorescenčni ali UV detektor, s spremenljivo nastavitvijo valovne dolžine

4.6. Spektrofotometer z 10 mm kremenovimi kivetami

4.7. Vodna kopel z magnetnim mešalnikom

4.8. Aparatuta za ekstrakcija (glej skico 1), sestavljena iz:

4.8.1. Steklenega valja s kapaciteto 1 litra, opremljenega z vratom iz brušenega stekla in zamaškom

4.8.2. Vložka iz brušenega stekla, opremljenega s stransko ročico in nastavljivo cevjo, ki gre skozi središče. Nastavljiva cev mora imeti spodnji del v obliki črke U in vbrizg na nasprotnem koncu, tako da vrhnja plast tekočine v valju lahko preide v lij ločnik.

## 5. Postopek

Opomba: Vitamin E je občutljiv na (UV) svetlobo in oksidacijo. Vse operacije moramo izvajati brez svetlobe (z uporabo temne steklovine ali steklene posode, zaščitene z aluminijevo folijo) in kisika (spiranje z dušikom). Med ekstrakcijo je treba zrak nad tekočino zamenjati z dušikom (previsokemu tlaku se izognemo z občasnim popuščanjem zamaška).

### 5.1. Priprava vzorca

Vzorec zdrobimo tako, da preide skozi 1 mm sito in pri tem pazimo, da se ne razvije toplota. Drobljenje moramo izvesti tik pred tehtanjem in saponifikacijo; v nasprotnem primeru lahko nastanejo izgube vitamina E.

### 5.2. Saponifikacija

Odvisno od vsebnosti vitamina E natehtamo s točnostjo 0,01g, 2g do 25 g vzorca v 500 ml bučko z ravnim dnom ali erlenmajeric (4.2.1). Nato postopoma dodajamo med obračanjem 130 ml etanola (3.1), približno 100 mg BHT (3.12), 2 ml raztopine natrijevega askorbata (3.5) in 2 ml raztopine natrijevega sulfida (3.6). Kondenzator (4.3) spojimo z bučko in potopimo bučko v vodno kopel z magnetnim mešalnikom (4.7). Segrejemo do vrenja in pustimo pod povratnim hladilnikom 5 minut. Nato skozi kondenzator dodamo 25 ml raztopine kalijevega hidroksida (3.4) in pustimo pod povratnim hladilnikom nadaljnjih 25 minut, z mešanjem pod rahlim pretokom dušika. Nato kondenzator speremo s približno 20 ml vode in ohladimo vsebino bučke na sobno temperaturo.

### 5.3. Ekstrakcija

Z dekantiranjem prenesemo saponifikacijsko raztopino kvantitativno v 1 000 ml lij ločnik (4.2.3) ali v aparaturo za ekstrakcijo (4.8) tako, da jo spiramo s skupno 250 ml vode. Nato bučko za saponifikacijo speremo s 25 ml etanola (3.1) in 100 ml petroletra (3.2) ter raztopine za izpiranje prenesemo v lij ločnik ali v aparaturo za ekstrakcijo. Razmerje vode in etanola v združenih raztopinah bi moralo znašati 2:1. Močno stresamo dve minuti in nato pustimo dve minuti, da se umiri.

#### 5.3.1. Ekstrakcija z lijem ločnikom (4.2.3)

Ko so plasti ločene (glej opombo 7.3), prenesemo plast petroletra v drug lij ločnik (4.2.3). Ekstrakcijo ponovimo dvakrat s 100 ml petroletra (3.2) in dvakrat s 50 ml petroletra (3.2).

Dvakrat speremo združene ekstrakte v liju ločniku med rahlim obračanjem (da preprečimo nastanek emulzij) s 100 ml porcijama vode in nato s ponavljajočim se stresanjem z nadaljnimi 100 ml porcijami vode, dokler voda ne postane brezbarvna na dodatek raztopine fenolftaleina (3.7) (navadno zadostuje štirikratno izpiranje). Filtriramo sprani ekstrakt skozi suh naguban filter za ločevanje faz (4.4), da odstranimo suspendirano vodo, v 500 ml merilno bučko (4.2.2). Lij ločnik in filter speremo s 50 ml petroletra (3.2), dopolnimo do oznake s petroletrom (3.2) in dobro premešamo.

#### 5.3.2. Ekstrakcija z uporabo aparature za ekstrakcijo (4.8)

Ko so se plasti ločile (glej opombo 7.3), zamenjamo zamašek steklenega valja (4.8.1) z vložkom iz brušenega stekla (4.8.2) in namestimo spodnji del nastavljive cevi v obliki črke U tik nad raven vmesnika. S tlakom, ki ga tvori dušik v stranski ročici, zgornjo plast petroletra prenesemo v 1 000 ml lij ločnik (4.2.3). Dodamo 100 ml petroletra (3.2) v stekleni valj, zamašimo in dobro pretresemo. Počakamo, da se plasti ločijo, in prenesemo zgornjo plast v lij ločnik tako kot prej. Ponovimo postopek ekstrakcije z novimi 100 ml petroletra (3.2), nato dvakrat s 50 ml porcijami petroletra (3.2) in dodamo plasti petroletra v lij ločnik.

Združene ekstrakte petroletra speremo, kot je opisano pod 5.3.1 in nadaljujemo, kot je tam opisano.

### 5.4. Priprava raztopine vzorca za HPLC

Odpipetiramo alikvot raztopine petroletra (iz 5.3.1 ali 5.3.2) v 250 ml hruškasto bučko (4.2.4). Topilo uparimo skoraj do suhega v rotacijskem uparjalniku (4.1) pri znižanem tlaku pri temperaturi kopeli, ki ne presega 40° C. Znova vzpostavimo atmosferski tlak z dovajanjem dušika (3.9) in bučko odstranimo iz rotacijskega uparjalnika. Preostalo topilo odstranimo v toku dušika (3.9) in ostanek takoj raztopimo v znanem volumnu (10-100 ml) metanola (3.3) (koncentracija DL- $\alpha$ -tokoferola mora biti v območju od 5  $\mu$ g/ml do 30  $\mu$ g/ml).

### 5.5. Določanje s HPLC

Vitamin E ločimo na C<sub>18</sub> koloni z reverzno fazo (4.5.1), koncentracijo izmerimo s fluorescenčnim detektorjem (vzbujanje: 295 nm, emisija: 330 nm) ali z UV detektorjem (295 nm) (4.5.2).

Vbrizgamo alikvot (npr. 20  $\mu$ l) metanolne raztopine, dobljene v skladu s 5.4, in eluiramo z mobilno fazo (3.8). Izračunamo srednje vrednosti višin (površin) vrhov za več vbrizgov iste raztopine vzorca in srednje vrednosti višin (površin) vrhov za več vbrizgov raztopin za umeritev (5.6.2).

#### Pogoji za HPLC

Navedeni pogoji so ponujeni kot vodilo; lahko se uporabijo tudi drugi pogoji, če dajo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.5.1):	250 mm x 4 mm C <sub>18</sub> , polnitev 5 ali 10 $\mu$ m ali enakovredna
Mobilna faza (3.8):	Mešanica metanola (3.3) in vode, npr. 980 + 20 (v + v)
Hitrost pretoka:	1-2 ml/min
Detektor (4.5.2):	Fluorescenčni detektor (Vzbujanje: 295 nm/emisija: 330 nm) ali UV detektor (292 nm)

## 5.6. Umeritev (acetat DL- $\alpha$ -tokoferola ali DL- $\alpha$ -tokoferol)

### 5.6.1. Standardni acetat DL- $\alpha$ -tokoferola

#### 5.6.1.1. Priprava delovne standardne raztopine

Odpipetiramo 25 ml osnovne raztopine acetata DL- $\alpha$ -tokoferola (3.10.1) v 500 ml bučko z ravnim dnom ali erlenmajerico (4.2.1) in hidroliziramo, kot je opisano pod 5.2. Nato ekstrahiramo s petroletrom (3.2) v skladu s 5.3 in dopolnimo do 500 ml s petroletrom. 25 ml tega ekstrakta uparimo v rotacijskem uparjalniku (glej 5.4) skoraj do suhega, odstranimo preostalo topilo v toku dušika (3.9) in ponovno raztopimo ostanek v 25, 0 ml metanola (3.3). Nominalna koncentracija te raztopine je 45,5  $\mu\text{g}$  DL- $\alpha$ -tokoferola na ml, kar je enakovredno 50  $\mu\text{g}$  acetata DL- $\alpha$ -tokoferola na ml. Standardno delovno raztopino moramo sveže pripraviti pred uporabo.

#### 5.6.1.2. Priprava raztopin za umeritev in umeritvena krivulja

Prenesemo 1,0; 2,0; 4,0 in 10,0 ml delovne standardne raztopine v serijo 20 ml merilnih bučk, dopolnimo do oznake z metanolom (3.3) in premešamo. Nominalne koncentracije teh raztopin so 2,5; 5,0; 10,0 in 25,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  acetata DL- $\alpha$ -tokoferola to je 2,28; 4,55; 9,10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 22,8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DL- $\alpha$ -tokoferola.

Večkrat vbrizgamo 20  $\mu\text{l}$  vsake od raztopin za umeritev in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov pripravimo umeritveno krivuljo.

#### 5.6.1.3. UV standardizacija osnovne raztopine acetata DL- $\alpha$ -tokoferola (3.10.1)

Razredčimo 5,0 ml osnovne raztopine DL- $\alpha$ -tokoferola (3.10.1) na 25,0 ml z etanolom in izmerimo UV spekter raztopine proti etanolu (3.1) v spektrofotometru (4.6) med 250 nm in 320 nm.

Maksimum absorpcije bi moral biti pri 284 nm:

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

Pri tem razredčenju bi morali dobiti vrednost ekstinkcije 0,84 do 0,88.

### 5.6.2. DL- $\alpha$ -tokoferol standard

#### 5.6.2.1. Priprava delovne standardne raztopine

Odpipetiramo 2,0 ml osnovne raztopine DL- $\alpha$ -tokoferola (3.11.1) v 50 ml merilno bučko, raztopimo v metanolu (3.3) in dopolnimo z metanolom do oznake. Nominalna koncentracija te raztopine je 40  $\mu\text{g}$  DL- $\alpha$ -tokoferola na ml oz. 44,0  $\mu\text{g}$  acetata DL- $\alpha$ -tokoferola na ml. Standardno delovno raztopino moramo sveže pripraviti pred uporabo.

#### 5.6.2.2. Priprava raztopin za umeritev in umeritvena krivulja

Prenesemo 1,0; 2,0; 4,0 in 10,0 ml delovne standardne raztopine v serijo 20 ml merilnih bučk, dopolnimo do oznake z metanolom (3.3) in premešamo. Nominalne koncentracije teh raztopin so 2,0; 4,0; 8,0 in 20,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DL- $\alpha$ -tokoferola, to je 2,20; 4,40; 8,79  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 22,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  acetata DL- $\alpha$ -tokoferola.

Večkrat vbrizgamo 20  $\mu\text{l}$  vsake od raztopin za umerjanje in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov. Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov pripravimo umeritveno krivuljo.

#### 5.6.2.3. UV standardizacija osnovne raztopine DL- $\alpha$ -tokoferola (3.11.1)

Razredčimo 2,0 ml osnovne raztopine DL- $\alpha$ -tokoferola (3.11.1) do 25,0 ml z etanolom in izmerimo UV spekter te raztopine proti etanolu (3.1) v spektrofotometru (4.6) med 250 nm in 320 nm. Maksimum absorpcije bi moral biti pri 292 nm:

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

Pri tem razredčenju bi morali dobiti vrednost ekstinkcije 0,6.

## 6. Izračun rezultatov

Iz srednje vrednosti višine (površine) vrhov vitamina E iz raztopine vzorca določimo koncentracijo raztopine vzorca v  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (izračunane kot acetat DL- $\alpha$ -tokoferola) iz umeritvene krivulje (5.6.1.2) ali (5.6.2.2).

Vsebnost vitamina E  $w$  v  $\text{mg}/\text{kg}$  v vzorcu je podana z naslednjo formulo:

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

kjer je:

$\beta$  = koncentracija vitamina E (5.4) v raztopini vzorca, v  $\mu\text{g}/\text{ml}$

$V_1$  = volumen raztopine vzorca (5.4), v ml

$V_2$  = volumen alikvota, uporabljenega v 5.4, v ml

$m$  = masa preskusnega vzorca, v g



## 7. Opazanja

7.1. Za vzorce z nizko koncentracijo vitamina E je morda koristno združiti ekstrakte petroletra iz dveh saponifikacijskih šarž (natehtana množina: 25 g) v eno raztopino vzorca za določanje s HPLC.

7.2. Masa vzorca, ki ga vzamemo za analizo, ne sme vsebovati več kakor 2 g maščobe.

7.3. Če se ločitev faz ne pojavi, dodamo približno 10 ml etanola (3.1) za razbitje emulzije.

7.4. Po spektrofotometrični meritvi acetata DL- $\alpha$ -tokoferola ali raztopine DL- $\alpha$ -tokoferola v skladu s 5.6.1.3. ali pa 5.6.2.3. dodamo približno 10 mg BHT (3.12) v raztopino (3.10.1 ali 3.10.2) in hranimo raztopino v hladilniku (rok hranjenja največ štiri tedne).

7.5. Namesto BHT lahko uporabimo hidrokinon.

7.6. Z uporabo običajne fazne kolone je možno ločiti  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - in  $\delta$ - tokoferol.

7.7. Približno 150 mg askorbinske kisline se lahko uporabi namesto raztopine natrijevega askorbata.

7.8. Približno 50 mg EDTA se lahko uporabi namesto raztopine natrijevega sulfida.

## 8. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presežati 15 % glede na najvišji rezultat.

## 9. Rezultati medlaboratorijske študije<sup>1</sup>

	Premiks	Krmna mešanica	Mineralni koncentrat	Proteinska krma	Pujski
L	12	12	12	12	12
n	48	48	48	48	48
srednja vr.[mg/kg]	17 380	1 187	926	315	61,3
$s_r$ [mg/kg]	384	45,3	25,2	13,0	2,3
r [mg/kg]	1 075	126,8	70,6	36,4	6,4
$CV_r$ [%]	2,2	3,8	2,7	4,1	7,8
$s_R$ [mg/kg]	830	65,0	55,5	18,9	3,8
R [mg/kg]	2 324	182,0	155,4	52,9	21,8
$CV_R$ [%]	4,8	5,5	6,0	6,0	12,7

L: število laboratorijev

n: število posameznih vrednosti

$s_r$ : standardni odmik ponovljivosti

$s_R$ : standardni odmik obnovljivosti

r: ponovljivost

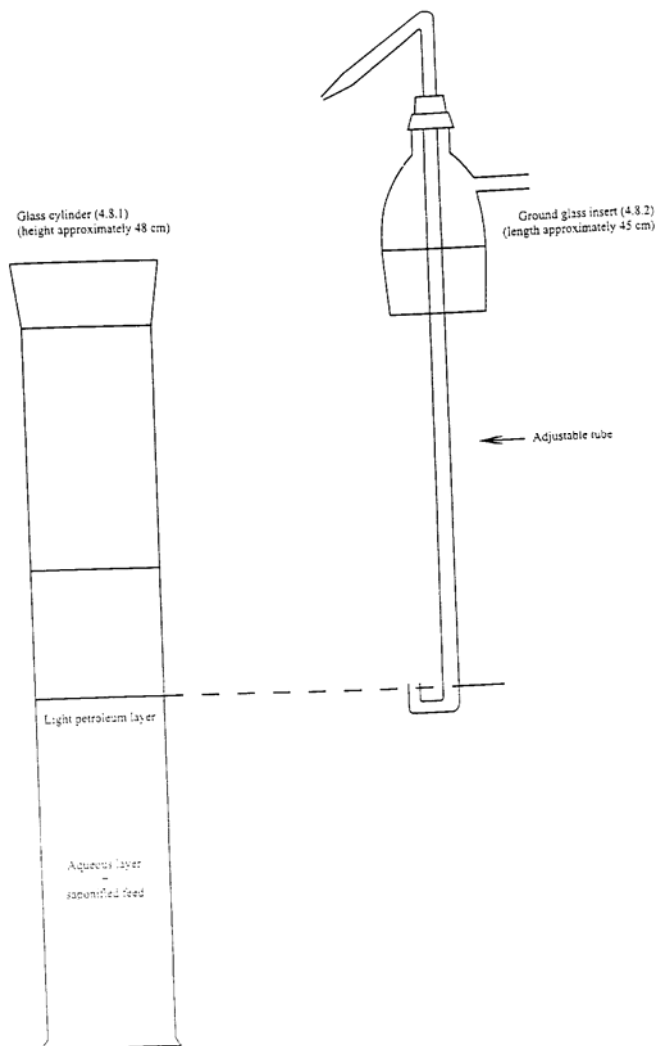
R: obnovljivost

$CV_r$ : koeficient variacije ponovljivosti

$CV_R$ : koeficient variacije obnovljivosti

<sup>1</sup> Izvedla delovna skupina za krmo Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Skica 1: Oprema za ekstrakcijo (4.8)



Glass cylinder (4.8.1) = Stekljeni valj (4.8.1)

(height approximately 48 cm) = (višina približno 48 cm)

Ground glass insert (4.8.2) = Vložek iz brušenega stekla (4.8.2)

(length approximately 45 cm) = (dolžina približno 45 cm)

Adjustable tube = Nastavljiva cevka

Light petroleum layer = Plast petroletra

Aqueous layer + saponified feed = Vodna plast + saponificirana krma

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 2000/45/ES.

**METODA 28\***  
**DOLOČANJE CINK BACITRACINA**  
**- z difuzijo na agarinem gojišču -**

### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo se določa cink bacitracina v krmi in premiksih. Spodnja meja določanje je 5 mg/kg (5 ppm)<sup>1</sup>

### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo pri pH 2 z mešanico metanol/voda/klorovodikova kislina in raztopine natrijevega sulfida. Natrijev sulfid dodamo zato, da se oborijo topne bakrove soli, ki bi sicer lahko motile preskus. Ekstrakt naravnamo do vrednosti pH 6,5, koncentriramo (kjer je potrebno) in razredčimo. Njegova antibiotična aktivnost določimo tako, da izmerimo difuzijao cink bacitracina v agarinem gojišču, ki je nacepljeno z *Micrococcus luteus* (*flavus*). Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Za premer teh con velja, da je premosorazmeren logaritmu koncentracije antibiotika v območju uporabljenih koncentracij antibiotika.

### 3. Mikroorganizem: *Micrococcus luteus* (*flavus*) ATCC 10240

#### 3.1 Vzdrževanje osnovne kulture

Epruvete s poševnimi nanosi gojišča (4.1) nacepimo z *Micrococcus luteus* (*flavus*) in inkubiramo 24 ur pri 30° C. Kulturo hranimo v hladilniku pri 4° C. Vsakih štirinajst dni precepimo.

#### 3.2 Priprava suspenzije bakterij<sup>(a)</sup>

Z 2 do 3 ml raztopine natrijevega klorida (4.3) posnamemo prirastek z agarnega nanosa (3.1). S to suspenzijo nacepimo 250 ml gojišča (4.1), ki se nahaja v Rouxovi steklenici, in inkubiramo od 18 do 20 ur pri 30° C. Kulturo posnamemo v 25 ml natrijevega klorida (4.3) in premešamo. Suspenzijo razredčimo z raztopino natrijevega klorida (4.3) na 1/10. Prepustnost svetlobe suspenzije mora biti 75 %, izmerjena pri 650 nm v 1-centimetrski kiveti, proti raztopini natrijevega klorida (4.3). Suspenzija je obstojna en teden pri približno 4° C.

### 4. Gojišča kulture in reagenti

#### 4.1 Gojišče<sup>(b)</sup>

Mesni pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar od	10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH	6,5 do 6,6 (po sterilizaciji).

#### 4.2 Preskusno gojišče<sup>(b)</sup>

Tripton	10,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar od	10,0 do 20,0 g
Tween 80	1 ml
Voda	1 000 ml
pH	6,5 (po sterilizaciji).

#### 4.3 Raztopina natrijevega klorida 0,8 % (m/v):

v vodi raztopimo 8 g natrijevega klorida in razredčimo do 1 000 ml; nato steriliziramo.

<sup>1</sup> 1 mg cinkovega bacitracina ustreza 42 mednarodnim enotam (IE).

<sup>(a)</sup> Uporabijo se lahko tudi druge metode, če je ugotovljeno, da dajejo podobne suspenzije bakterij.

<sup>(b)</sup> Uporabi se lahko katerokoli komercialno gojišče kulture, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

4.4 Mešanica metanol/voda/klorovodikove kisline (4.6):

80/17,5/2,5 (v/v/v).

4.5 Fosfatni pufer, pH 6,5:

Kalijev hidrogenfosfat,  $K_2HPO_4$  22,15 g.

Kalijev dihidrogenfosfat,  $KH_2PO_4$  27,85 g.

Voda do 1 000 ml.

4.6 Klorovodikova kislina (d: od 1,18 do 1,19).

4.7 Klorovodikova kislina (0,1 M).

4.8 Raztopina natrijevega hidroksida 1 M.

4.9 Raztopina natrijevega sulfida 0,5 M.

4.10 Bromkrezol rdeče, raztopina 0,04 % (m/v): 0,1 g bromkrezol rdečega raztopimo v 18,5 ml raztopine natrijevega hidroksida 0,01 M. Dopolnimo z vodo do 250 ml in premešamo.

4.11 Standardna substanca: cink bacitracin z znano aktivnostjo (v IE).

## 5. Standardne raztopine

Natehtamo določeno količino standardnega cink bacitracina (4.11), ki ustreza 1 050 IE (glede na navedeno aktivnost). Dodamo 5 ml klorovodikove kisline 0,1 M (4.7) in pustimo stati 15 minut. Dodamo 30 ml vode, uravnamo pH s fosfatnim pufrom (4.5) (približno 4 ml) na 4,5, nato z vodo dopolnimo do 50 ml in dobro premešamo (1 ml = 21 IE).

Z zaporednim razredčevanjem s fosfatnim pufrom (4.5) iz te raztopine pripravimo naslednje raztopine:

$s_8$  0,42 IE/ml

$s_4$  0,21 IE/ml

$s_2$  0,105 IE/ml

$s_1$  0,0525 IE/ml

## 6. Priprava ekstrakta in preskusnih raztopin

### 6.1 Ekstrakcija

#### 6.1.1 Premiksi in mineralna krma

Natehtamo od 2,0 do 5,0 g vzorca, dodamo 29,0 ml mešanice (4.4) in 1,0 ml raztopine natrijevega sulfida (4.9) ter na hitro pretresemo. Preverimo, da je vrednost pH približno 2. Nato stresamo 10 minut, dodamo 30 ml fosfatnega pufra (4.5), stresamo 15 minut in centrifugiramo. Odpipetiramo ustrezen alikvot bistre raztopine nad usedlino in z 1 M raztopino hidroksida (4.8) vrednost pH naravnamo na 6,5, pri čemer kot indikator služi bodisi pH-meter bodisi raztopina bromkrezol rdečega (4.10). Mešanico razredčimo s fosfatnim pufrom (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost cink bacitracina 0,42 IE/ml (=  $u_8$ ).

#### 6.1.2 Beljakovinski koncentradi

Natehtamo 10,0 g vzorca, dodamo 49,0 ml mešanice (4.4) in 1,0 ml raztopine natrijevega sulfida (4.9) ter na hitro pretresemo. Preverimo, da je pH vrednost približno 2, in stresamo 10 minut. Dodamo 50 ml fosfatnega pufra (4.5), stresamo 15 minut in centrifugiramo. Odpipetiramo ustrezen volumen bistre raztopine nad usedlino in z dodajanjem raztopine natrijevega hidroksida 1 M (4.8) vrednost pH naravnamo na 6,5, pri čemer kot indikator služi bodisi pH-meter bodisi raztopina bromkrezol rdečega (4.10). V rotacijskem uparjalniku uparimo približno polovico volumna pri temperaturi, ki ne presega 35° C.

Razredčimo s fosfatnim pufrom (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost cink bacitracina 0,42 IE/ml (=  $u_8$ ).

#### 6.1.3 Druga krma

Natehtamo 10,0 g vzorca (20,0 g za pričakovano vsebnost cink bacitracina 5 mg/kg). Dodamo 24,0 ml mešanice (4.4) in 1,0 ml raztopine natrijevega sulfida (4.9) ter 10 minut mešamo. Dodamo 25 ml fosfatnega pufra (4.5), stresamo 15 minut in centrifugiramo. Odpipetiramo 20 ml bistre raztopine nad usedlino in z dodajanjem raztopine natrijevega hidroksida 1 M (4.8) vrednost pH naravnamo na 6,5, pri čemer kot indikator služi bodisi pH-meter bodisi raztopina bromkrezol rdečega (4.10). V rotacijskem uparjalniku uparimo do 4 ml pri temperaturi, ki ne presega 35° C. Ostanek razredčimo s fosfatnim pufrom (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost cink bacitracina 0,42 IE/ml (=  $u_8$ ).

### 6.2 Preskusne raztopine

Z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) s fosfatnim pufrom (4.5) iz raztopine  $u_8$  pripravimo raztopine  $u_4$  (pričakovana vsebnost: 0,21 IE/ml),  $u_2$  (pričakovana vsebnost: 0,105 IE/ml), in  $u_1$  (pričakovana vsebnost: 0,0525 IE/ml).

## 7. Preskusni postopek

### 7.1 Nacepljenje preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.2) nacepimo s suspenzijo bakterij (3.2) pri približno 50° C. S predhodnimi preskusi na ploščah s preskusnim gojiščem (4.2) določimo količino suspenzije bakterij, ki je potrebna, da dobimo največje in najbistrejše inhibicijske cone z različnimi koncentracijami cink bacitracina.

## 7.2 Priprava plošč

Difuzijo skozi agar izvajamo na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine ( $s_8, s_4, s_2$  in  $s_1$ ) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine ( $u_8, u_4, u_2$  in  $u_1$ ). Na vsako ploščo je treba nujno nanesti vse štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine. V ta namen zberemo plošče, ki so dovolj velike za najmanj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm in z razdaljo najmanj 30 mm med središči, ki jih je treba vdolbsti v agarno gojišče. Preskus lahko izvajamo na steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike s premera 200 mm in višine 20 mm.

Na plošče nanese določeno količino gojišča (4.2), ki je nacepljeno skladno s točko 7.1, da dobimo približno 2 mm debela plast (60 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počakamo, da se površina utrdi. Nato izdolbimo vdolbine in vanje nanese natanko odmerjene volumne preskusnih in standardnih raztopin (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, odvisno od premera). Vsaka koncentracija se uporabi najmanj štirikrat, tako da se pri vsakem preskusu ovrednoti 32 inhibicijskih con.

## 7.3. Inkubacija

Plošče inkubiramo od 16 do 18 ur pri  $30 \pm 2^\circ \text{C}$ .

## 8. Vrednotenje

Premer inhibicijskih con izmerimo s točnostjo 0,1 mm. Srednje vrednosti za vsako koncentracijo vnesemo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premerov inhibicijskih con. Na diagramu izrišemo premici z najboljšim potekom, tako za standardno raztopino kot tudi za ekstrakt, kakor je navedeno na primeru spodaj:

Z naslednjo formulo določimo »najboljšo« točko za najmanjšo vrednost standardne raztopine (SL):

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

Z naslednjo formulo določimo »najboljšo« točko za največjo vrednost standardne raztopine (SH):

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

Na podoben način izračunamo »najboljši« točki za najmanjšo (UL) in največjo (UH) vrednost ekstrakta, in sicer tako, da z  $u_1, u_2, u_4$  in  $u_8$  v zgornjih formulah zamenjamo  $s_1, s_2, s_4$  in  $s_8$ .

Izračunani vrednosti SL in SH vnesemo v isti diagram in povežemo, da dobimo premico z »najboljšim« potekom za standardno raztopino. Na podoben način izračunamo vrednosti UL in UH ter povežemo, da dobimo premico z »najboljšim« potekom za ekstrakt.

Če ni interferenc, morata biti premici vzporedni. Iz praktičnih razlogov se premici lahko štejeta za vzporedni, če se vrednosti (SH-SL) ter (UH-UL) ne razlikujejo za več kot 10 % od njihove srednje vrednosti.

Če premici nista vzporedni, lahko izločimo bodisi  $u_1$  in  $s_1$  ali  $u_8$  in  $s_8$  in vrednosti SL, SH, UL in UH izračunamo z alternativnima formulama, s katerima dobimo alternativni premici z »najboljšim« potekom:

$$(a') \text{ SL} = (5s_1 + 2s_2 - s_4)/6 \text{ ali } (5s_2 + 2s_4 - s_8)/6$$

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

in podobno velja tudi za UL in UH. Tudi v tem primeru veljajo ista merila za vzporednost. Če je bil rezultat izračunan s tremi vrednostmi, je treba to navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da sta premici vzporedni, izračunamo logaritem relativne aktivnosti ( $\log A$ ), in sicer z eno od naslednjih enačb, odvisno od tega, ali so bile za oceno vzporednosti uporabljene tri ali štiri vrednosti.

Za štiri vrednosti

$$(c) \log A = ((u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602)/(u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2)$$

Za tri vrednosti

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

ali

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

Aktivnost ekstrakta vzorca = aktivnost ustreznega standarda  $\times A$

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

Če relativna aktivnost presega območje od 0,5 do 2,0, preskus ponovimo tako, da ustrezno prilagodimo koncentracije ekstrakta, ali če to ni mogoče, prilagodimo standardne raztopine. Kadar relativne aktivnosti ni mogoče dovesti do zahtevanega območja, je treba vsak dobljeni rezultat obravnavati kot približek in to tudi navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da premici nista vzporedni, določanje ponovimo. Če vzporednost še vedno ni dosežena, določanje štejeemo za nezadovoljivo.

Rezultat izrazimo v miligramih cink bacitracina na kilogram krme.

## 9. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določanj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presežati:

- 2 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti cink bacitracina do 10 mg/kg,
- 20 % glede na večjo vrednost za vsebnosti od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % glede na večjo vrednost za vsebnosti nad 50 mg/kg.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 78/633/EGS.

**METODA 29\***  
**DOLOČANJE VIRGINIAMICINA**  
**- z difuzijo na agarinem gojišču -**

### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo določamo virginiamicin v krmi in premiksih. Spodnja meja določanja je 2 mg/kg (2 ppm)<sup>1</sup>.

### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z metanolno raztopino Tween 80. Ekstrakt oddekaniramo ali centrifugiramo in razredčimo. Njegovo antibiotično aktivnost določimo tako, da izmerimo difuzijo virginiamicina na agarinem gojišču, ki je nacepljen z *Micrococcus luteus*. Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Za premer teh con velja, da je premosorazmeren logaritmu koncentracije antibiotika v območju uporabljenih koncentracij antibiotika.

### 3. Mikroorganizem:

*Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

#### 3.1 Vzdrževanje osnovne kulture

Epruvete s poševnimi nanosi gojišča (4.1) nacepimo z *Micrococcus luteus* in inkubiramo 24 ur pri 30° C. Kulturo hranimo v hladilniku pri 4° C. Vsakih štirinajst dni precepimo.

#### 3.2 Priprava suspenzije bakterij<sup>(a)</sup>

Z 2 do 3 ml raztopine natrijevega klorida (4.3) posnamemo prirastek z agarne gojišča (3.1). S to suspenzijo nacepimo 250 ml gojišča (4.1), ki se nahaja v Rouxovi steklenici, in inkubiramo od 18 do 20 ur pri 30° C. Kulturo se posnamemo v 25 ml natrijevega klorida (4.3) in premešamo. Suspenzijo z raztopino natrijevega klorida (4.3) razredčimo na 1/10. Prepustnost svetlobe suspenzije mora biti okrog 75 %, izmerjena pri 650 nm v 1-centimetrski kivetki, proti raztopini natrijevega klorida (4.3). Suspenzija je obstojna en teden pri približno 4° C.

### 4. Gojišča in reagenti

#### 4.1 Gojišča kulture in preskusna gojišča<sup>(b)</sup>

Mesni pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar od	10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH	6,5 (po sterilizaciji).

#### 4.2 Fosfatni pufer, pH 6

Kalijev hidrogenfosfat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0 g
Kalijev dihidrogenfosfat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,0 g
Voda do	1 000 ml

4.3 Raztopina natrijevega klorida 0,8 % (m/v): v vodi raztopimo 8 g natrijevega klorida in razredčimo na 1 000 ml; nato steriliziramo.

4.4 Metanol.

4.5 Mešanica fosfatnega pufera (4.2)/metanola (4.4): 80/20 (v/v).

4.6 Metanolna raztopina Tween 80 0,5 % (m/v): 5 g Tween 80 raztopimo v metanolu (4.4) in razredčimo z metanolom do 1 000 ml.

4.7 Standardna substanca: virginiamicin z znano aktivnostjo.

### 5. Standardne raztopine

Točno natehtano količino standardne substance (4.7) raztopimo v metanolu (4.4) in razredčimo z metanolom (4.4), da dobimo osnovno raztopino, ki vsebuje 1 000 µg virginiamicina na ml.

Raztopina je stabilna do pet dni, če jo hranimo v zaprti posodi pri 4° C.

<sup>1</sup> 1 mg virginiamicina je enako 1 000 enotam UK.

<sup>(a)</sup> Uporabijo se lahko tudi drugi načini, če je ugotovljeno, da omogočajo podobne suspenzije bakterij.

<sup>(b)</sup> Uporabi se lahko katero koli drugo komercialno gojišče, ki je podobne sestave in daje enake rezultate.

Z zaporednim razredčevanjem z mešanico (4.5) iz te osnovne raztopine pripravimo naslednje raztopine:

$s_8$	1 $\mu\text{g/ml}$
$s_4$	0,5 $\mu\text{g/ml}$
$s_2$	0,25 $\mu\text{g/ml}$
$s_1$	0,125 $\mu\text{g/ml}$

## 6. Priprava ekstrakta in preskusnih raztopin

### 6.1 Ekstrakcija

#### 6.1.1 Proizvodi z vsebnostjo virginiamicina do 100 mg/kg

Natehtamo 50 g vzorca, dodamo 200 ml raztopine (4.6) in stresamo 30 minut. Pustimo, da se mešanica usede, ali centrifugiramo, nato odpipetiramo 20 ml bistre raztopine nad usedlino in pustimo, da izpari do približno 5 ml v rotacijskem uparjalniku pri temperaturi, ki ne presega 40° C. Ostanek razredčimo z mešanico (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost virginiamicina 1  $\mu\text{g/ml}$  (=  $u_8$ ).

#### 6.1.2 Proizvodi z vsebnostjo virginiamicina, ki presega 100 mg/kg

Natehtamo količino vzorca, ki ne presega 10,0 g in vsebuje od 1 do 50 mg virginiamicina, dodamo 100 ml raztopine (4.6) in stresamo 30 minut. Pustimo, da se mešanica usede, ali centrifugiramo, nato bistro raztopino nad usedlino razredčimo z mešanico (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost virginiamicina 1  $\mu\text{g/ml}$  (=  $u_8$ ).

### 6.2 Preskusne raztopine

Z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z mešanico (4.5) iz raztopine  $u_8$  pripravimo raztopine  $u_4$  (pričakovana vsebnost: 0,5  $\mu\text{g/ml}$ ),  $u_2$  (pričakovana vsebnost: 0,25  $\mu\text{g/ml}$ ),  $u_1$  (pričakovana vsebnost: 0,125  $\mu\text{g/ml}$ ).

## 7. Postopek preskusa

### 7.1. Nacepljenje preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.1) nacepimo s suspenzijo bakterij (3.2) pri približno 50° C. S predhodnimi preskusi na ploščah z gojiščem (4.1) določimo količino suspenzije bakterij, ki je potrebna za nastanek največjih in najbistrejših inhibicijskih con z različnimi koncentracijami virginiamicina.

### 7.2 Priprava plošč

Difuzijo skozi agar izvajamo na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine ( $s_8$ ,  $s_4$ ,  $s_2$  in  $s_1$ ) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine ( $u_8$ ,  $u_4$ ,  $u_2$  in  $u_1$ ). Na vsako ploščo nanese vse štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine. V ta namen izberemo ploščice, ki so dovolj velike za najmanj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm z razdaljo najmanj 30 mm med središči, ki jih je treba vdolbsti v agarno gojišče. Preskus se lahko izvaja na steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike s premerom 200 mm in višino 20 mm.

Na ploščice nanese določeno količino gojišča (4.1), ki je nacepljeno skladno s točko 7.1, da dobimo približno 2 mm debelo plast (60 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počakamo, da se površina utrdi. Nato izdolbimo vdolbine in vanje nanese natanko odmerjene volumne preskusnih in standardnih raztopin (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, odvisno od premera). Vsako koncentracijoe uporabimo najmanj štirikrat, tako da pri vsakem preskusu ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

### 7.3 Inkubacija

Ploščice inkubiramo od 16 do 18 ur pri 30  $\pm$ 2° C.

## 8. Vrednotenje

Premer inhibicijskih con izmerimo s točnostjo 0,1 mm. Srednje vrednosti za vsako koncentracijo vnesemo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premerov inhibicijskih con. Na diagramu izrišemo premici z najboljšim potekom, tako za standardno raztopino kot tudi za ekstrakt, kakor je navedeno na primeru spodaj:

«Najboljšo» točko za najmanjšo vrednost standarda (SL) določimo po formuli:

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

«Najboljšo» točko za največjo vrednost standarda (SH) določimo po formuli:

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

Na podoben način izračunamo »najboljši« točki za najmanjšo (UL) in največjo (UH) vrednost ekstrakta, in sicer tako, da z  $u_1$ ,  $u_2$ ,  $u_4$  in  $u_8$  v zgornjih formulah zamenjamo  $s_1$ ,  $s_2$ ,  $s_4$  in  $s_8$ .

Izračunani vrednosti SL in SH vnesemo na isti diagram in povežemo, da dobimo premico z »najboljšim« potekom za standardno raztopino. Na podoben način vnesemo vrednosti UL in UH ter povežemo, da dobimo premico z »najboljšim« potekom za ekstrakt.

Če ni interferenc, morata biti premici vzporedni. Iz praktičnih razlogov se premici lahko štejeta za vzporedni, če se vrednosti (SH-SL) ter (UH-UL) ne razlikujejo za več kot 10 % od njihove srednje vrednosti.

Če premici nista vzporedni, lahko izločimo bodisi  $u_1$  in  $s_1$  ali  $u_8$  in  $s_8$ , in vrednosti SL, SH, UL in UH izračunamo z alternativnima formulama, s katerima dobimo alternativni premici z »najboljšim« potekom:

$$(a') \text{ SL} = (5s_1 + 2s_2 - s_4)/6 \text{ ali } (5s_2 + 2s_4 - s_8)/6$$

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

in podobno velja tudi za UL in UH. Tudi v tem primeru veljajo ista merila za vzporednost. Če je bil rezultat izračunan s tremi vrednostmi, je treba to navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da sta premici vzporedni, izračunamo logaritem relativne aktivnosti (log A), in sicer z eno od naslednjih enačb, odvisno od tega, ali so bile za oceno vzporednosti uporabljene tri ali štiri vrednosti.

Za štiri vrednosti

$$(c) \log A = ((u_1 + u_2 + u_4 + u_8 - s_1 - s_2 - s_4 - s_8) \times 0,602) / (u_4 + u_8 + s_4 + s_8 - u_1 - u_2 - s_1 - s_2)$$

Za tri vrednosti

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

ali

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

Aktivnost ekstrakta vzorca = aktivnost ustreznega standarda  $\times$  A

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

Če relativna aktivnost presega območje od 0,5 do 2,0, preskus ponovimo tako, da ustrezno prilagodimo koncentracije ekstrakta, ali če to ni mogoče, prilagodimo standardne raztopine. Kadar relativne aktivnosti ni mogoče privedi do zahtevanega območja, je treba vsak dobljeni rezultat obravnavati kot približek in to tudi navesti v končnem poročilu.

Kadar se šteje, da premici nista vzporedni, določanje ponovimo. Če vzporednost še vedno ni dosežena, določanje štejeemo za nezadovoljivo.

Rezultat izrazimo v miligramih virginiamicina na kilogram krme.

## 9. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presegati:

- 2 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti virginiamicina do 10 mg/kg,
- 20 % glede na največjo vrednost za vsebnosti od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % glede na največjo vrednost za vsebnosti nad 50 mg/kg.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 72/199/EGS.

## METODA 30\*

### DOLOČANJE TILOZINA

#### - Z difuzijo na agarju -

### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče določiti tilozin v krmi, koncentratih in premiksih pri vsebnostih nad 2 ppm.

### 2. Princip

Vzorec obdelamo z raztopino fosfatnega pufra (pH 8), ki smo ga poprej segreli na 80° C, in ga nato ekstrahiramo z metanolom. Po centrifugiranju ekstrakt razredčimo in določimo njegovo antibiotično aktivnost tako, da izmerimo difuzijo tilozina na agarjem gojišču, ki je nacepljeno s *Sarcina lutea*. Difuzija je potrjena, ko se ob navzočnosti mikroorganizma oblikujejo inhibicijske cone. Premer teh con je neposredno sorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika.

### 3. Mikroorganizem:

*Sarcina lutea* ATCC št. 9341

#### 3.1 Vzdrževanje osnovnega seva

V epruveto s poševnim nanosom agarja nacepimo *Sarcina lutea* iz gojišča (4.1) in vrednost pH uravnamo na 7,0. Inkubiramo prek noči pri približno 35° C. Kulturo hranimo v hladilniku, poševni nanos agarja pa ponovno nacepimo vsak mesec.

#### 3.2 Priprava suspenzije bakterij

Z 2 do 3 ml fiziološke raztopine (4.4) speremo bakterije iz pravkar pripravljene epruvete s poševnim nanosom agarja (3.1). S to suspenzijo zasejemo v Rouxovi steklenici 250 ml gojišča (4.1), katerega vrednost pH je bila uravnana na 7,0. Po inkubaciji, ki traja 24 ur pri 35° C, bakterije zberemo v 25 ml fiziološke raztopine (4.4). Premešamo in suspenzijo razredčimo, da dobimo pri 650 nm približno 75 % prepustnost svetlobe.

Suspenzija je, če jo hranimo v hladilniku, obstojna en teden.

S poprejšnjimi preskusi na ploščah z gojiščem (4.1) ugotovimo količino cepiva, ki bo pri različnih koncentracijah uporabljenega tilozina dala največje možne in še vedno povsem jasne inhibicijske cone. Gojišče nacepimo pri temperaturi od 48 do 50° C.



#### 4. Gojišča in reagenti

##### 4.1 Osnovno gojišče za določanje<sup>(1)</sup>

Glukoza	1 g
Triptik pepton	10 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Kvasni ekstrakt	3 g
Agar, odvisno od kakovosti	od 10 do 20 g
Destilirana voda	do 1 000 ml

Za vzdrževanje osnovnega seva in pripravo suspenzije bakterij tik pred uporabo uravnamo pH na 7,0, za določanje pa pH na 8,0.

##### 4.2 Raztopina fosfatnega pufra, pH 8

Kalijev dihidrogenfosfat $\text{KH}_2\text{PO}_4$ p.a.	0,523 g
Dikalijev hidrogenfosfat $\text{K}_2\text{HPO}_4$ p.a.	16,730 g
Destilirana voda	do 1 000 ml

##### 4.3 Raztopina fosfatnega pufra, pH 7

Kalijev dihidrogenfosfat $\text{KH}_2\text{PO}_4$ p.a.	5,5 g
Dikalijev hidrogenfosfat $\text{K}_2\text{HPO}_4$ p.a.	13,6 g
Destilirana voda	do 1 000 ml

##### 4.4 Sterilna fiziološka raztopina.

##### 4.5 Čisti metanol.

##### 4.6 40 % (v/v) metanol.

##### 4.7 Mešanica (volumska) raztopine fosfatnega pufra (4.2)/čistega metanola: 60/40 po prostornini.

##### 4.8 Standardna snov: tilozin z znano aktivnostjo.

#### 5. Standardne raztopine

Standardno snov (4.8) sušimo 3 ure pri 60° C v vakuumskem sušilniku (5 mm živega srebra). Natehtamo od 10 do 50 mg v merilno bučko, raztopimo v 5 ml metanola (4.5) in to raztopino razredčimo z raztopino fosfatnega pufra, pH 7 (4.3), da dobimo koncentracijo tilozina 1000 µg na ml.

Osnovno raztopino razredčimo z mešanico (4.7), da dobimo standardno delovno raztopino  $S_8$ , ki vsebuje 2 µg na ml tilozina.

Nato z dodatnim razredčevanjem (1 + 1) z raztopino (4.7) pripravimo naslednje koncentracije:

$S_4$	1 µg/ml
$S_2$	0,5 µg/ml
$S_1$	0,25 µg/ml

#### 6. Ekstrakcija

Za koncentrate vzamemo 10 g preskusnega vzorca, za premikse in krmo pa 20 gramov. Dodamo 60 ml raztopine fosfatnega pufra, pH 8 (4.2), ki smo ga poprej segreti na 80° C, in 2 minuti mešamo (gospodinjski mešalnik, Ultra-turrax itn.).

Pustimo mirovati 10 minut, dodamo 40 ml metanola (4.5) in mešamo še 5 minut. Ekstrakt centrifugiramo in alikvot razredčimo z mešanico (4.7), da dobimo pričakovano vsebnost tilozina 2 µg na ml (=  $U_8$ ). Nato z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) z mešanico (4.7) pripravimo koncentracije  $U_4$ ,  $U_2$  in  $U_1$ .

Pri vsebnostih pod 10 ppm uparimo ekstrakt v rotacijskem uparjalniku pri 35° C do suhega, ostanek pa raztopimo v 40-odstotnem metanolu (4.6).

#### 7. Metoda določanja

##### 7.1 Nacepljenje gojišča

Osnovno gojišče za določanje (4.1) nacepimo pri 48 do 50°C s suspenzijo bakterij (3.2) in uravnamo pH na 8,0.

##### 7.2 Priprava plošč

Difuzijo na agarju izvajamo na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine ( $S_8$ ,  $S_4$ ,  $S_2$ ,  $S_1$ ) in s štirimi koncentracijami ekstrakta ( $U_8$ ,  $U_4$ ,  $U_2$ ,  $U_1$ ). Na vsako ploščo moramo nanesti štiri koncentracije standardne raztopine in ekstrakta.

<sup>(1)</sup> Uporabi se lahko katero koli drugo komercialno gojišče, ki je podobne sestave in daje enake rezultate.

Zato izberemo plošče, ki so dovolj velike, da v agarno gojišče lahko vdolbemo vsaj 8 vdolbin premera od 10 do 13 mm. Izračunamo količino nacepljenega gojišča (7.1), ki je potrebna, da dobimo enakomerno plast debeline približno 2 mm. Najbolje, da preskus izvajamo na ravnih ploščah s stekleno površino, ki so opremljene z aluminijevimi ali plastičnimi obroči, premera 200 mm in višine 20 mm.

V vdolbine odpipetiramo točno odmerjene količine raztopine antibiotika, od 0,10 do 0,15 ml, odvisno od premera vdolbin. Za vsak vzorec ponovimo difuzijo najmanj štirikrat z vsako koncentracijo, tako da pri vsakem določanju ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

### 7.3 Inkubacija

Inkubacija plošč poteka čez noč pri 35 do 37° C.

## 8. Vrednotenje

Izmerimo premer inhibicijskih con, po možnosti s projekcijo. Meritve vnesemo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premera inhibicijskih con. Narišemo premici standardne raztopine in ekstrakta. Če ni interference, bosta premici vzporedni.

Logaritem relativne aktivnosti izračunamo z naslednjo enačbo:

$$((U_1 + U_2 + U_4 + U_8 - S_1 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,602) / (U_4 + U_8 + S_4 + S_8 - U_1 - U_2 - S_1 - S_2)$$

Dejanska aktivnost = pričakovana aktivnost  $\times$  relativna aktivnost.

## 9. Ponovljivost

Relativna vrednost razlike med rezultati dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 10 %.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 72/199/EGS.

## METODA 31\*

### DOLOČANJE FLAVOFOSFOLIPOLA Z DIFUZIJO NA AGARNEM GOJIŠČU

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo določamo flavofosfolipol v krmi, koncentratih in premiksih. Spodnja meja določanja je 1 mg/kg (1 ppm).

#### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z razredčenim metanolom s segrevanjem pod povratnim tokom. Po centrifugiranju ekstrakt prečistimo (po potrebi) z ionskimi izmenjevalci in razredčimo. Njegovo antibiotično aktivnost določimo z merjenjem difuzije flavofosfolipola na agarnem gojišču, nacepljenem s *Staphylococcus aureus*. Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Za premer teh con velja, da je premosorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika v območju uporabljenih koncentracij antibiotika.

#### 3. Mikroorganizem:

*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P

##### 3.1 Vzdrževanje osnovne kulture

*Staphylococcus aureus* nacepimo na poševen nanos agarja na gojišču (4.1). Inkubiramo 24 ur pri 37° C, hranimo v hladilniku pri približno 4° C in vsak mesec precepimo na poševne nanose agarja.

##### 3.2 Priprava bakterijske suspenzije<sup>a</sup>

Dve epruveti osnovne kulture (3.1) precepimo vsak teden. Inkubiramo 24 ur pri 37° C in hranimo v hladilniku pri približno 4° C.

24 ur pred preskusom s tem prirastkom nacepimo dve do štiri epruvete s poševnimi nanosi gojišč (4.1). Inkubiramo od 16 do 18 ur pri 37° C. Pripravimo suspenzijo rasti v raztopini natrijevega klorida (4.3). Prepustnost svetlobe suspenzije mora biti približno 40 %, izmerjena pri 578 nm v 1-centimetrski kiveti proti raztopini natrijevega klorida (4.3).

<sup>a</sup> Uporabijo se lahko tudi druge metode, če je ugotovljeno, da omogočajo podobne suspenzije bakterij.

#### 4. Gojišča in reagenti

##### 4.1 Gojišče<sup>b</sup>

Mesni pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	15,0 g
Voda	1 000 ml
pH	6,5 (po sterilizaciji)

##### 4.2. Preskusnogojišče

###### 4.2.1 Osnovna plast<sup>c</sup>

Mesni pepton	6,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Agar	10,0 g
Voda	1 000 ml
pH	6,5 (po sterilizaciji)

###### 4.2.2 Zasejalna plast

Kot v točki 4.1, z dodatkom 2,0 g silikonske emulzije proti penjenju.<sup>d</sup>

4.3 Raztopina natrijevega klorida 0,4 % (m/v): v vodi raztopimo 4 g natrijevega klorida p.a. in razredčimo do 1 000 ml; steriliziramo.

4.4 Metanol, čisti.

4.5 Metanol 50 % (v/v): 500 ml metanola (4.4) razredčimo s 500 ml vode.

4.6 Metanol 80 % (v/v): 800 ml metanola(4.4) razredčimo z 200 ml vode.

4.7 Tris (hidroksimetil) aminometan p.a.

4.8 Metanolna raztopina kalijevega klorida 1,5 % (m/v): 1,5 g kalijevega klorida p.a. raztopimo v 20 ml vode, nato dopolnimo z metanolom do 100 ml (4.4).

4.9 Kationski izmenjevalec: Dowex 50 W x 8,20 do 50 mesh, Na oblika (kat. Serva št. 41 600) ali enakovreden.

4.10 Anionski izmenjevalec: Dowex 1 x 2,50 do 100 mesh, Cl oblika (kat. Serva. št 41 010) ali enakovreden. Pred uporabo 12 do 14 ur pustimo v 80-odstotnem metanolu (4.6).

4.11 Steklena volna.

4.12 pH indikatorski papir (pH 6,6 do 8,1).

4.13 Askorbinska kislina.

4.14 Standardna substanca: flavofosfolipol znane aktivnosti.

#### 5. Oprema

5.1 Steklena cev za kromatografijo, notranji premer: 9 mm, dolžina: 150 do 200 mm, opremljena s petelinčkom na zoženem spodnjem delu in brusom (za povezavo s kapalnim lijakom (5.2)) na zgornjem delu.

5.2 Kapalni lijak 250 ml, opremljen s petelinčkom in brusom.

5.3 250-mililitrska erlenmajerica z brusom.

5.4 Povratni hladilnik z brusom.

#### 6. Standardne raztopine

Točno natehtano količino standardne substance (4.14) raztopimo v 50-odstotnem metanolu (4.5) in razredčimo, da dobimo osnovno raztopino, ki vsebuje 100 µg flavofosfolipola na mililiter. Raztopina je stabilna do dveh mesecev, če jo hranimo v zaprti posodi pri 4° C.

<sup>b</sup> Uporabimo lahko katerokoli običajno gojišče, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate, npr. oksoidno antibiotično gojišče 1 (CM 327) z dodatkom oksoidnega agarja št. 3 (L 13).

<sup>c</sup> Uporabimo lahko katero koli običajno gojišče, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate, npr. oksoidno

<sup>d</sup> npr. SE 2 Wacker Chemie GmbH, München.

Z zaporednim razredčevanjem s 50-odstotnim metanolom (4.5) iz te osnovne raztopine pripravimo naslednje raztopine:

S <sub>8</sub>	0,2 µg/ml
S <sub>4</sub>	0,1 µg/ml
S <sub>2</sub>	0,05 µg/ml
S <sub>1</sub>	0,025 µg/ml

## 7. Priprava ekstrakta

### 7.1 Ekstrakcija

#### 7.1.1 Koncentrati, premiksi in mineralna krma

Natehtamo od 2,0 do 5,0 g vzorca in dodamo približno 150 mg askorbinske kisline (4.13). V erlenmajerici (5.3) homogeniziramo s 150 ml 50-odstotnega metanola (4.5) in z okoli 400 mg tris(hidroksimetil)aminometana (4.7) uravnamo pH na 8,1 do 8,2. Preverimo pH z indikatorskim papirjem (4.12). Pustimo stati 15 minut, nato s tris(hidroksimetil)aminometanom (4.7) ponovno uravnamo pH na 8,1 do 8,2 in 10 minut vremo pod povratnim hladilnikom (5.4) ter pri tem neprestano mešamo. Mešanico ohladimo in centrifugiramo, nato dekantiramo ekstrakt.

#### 7.1.2 Druga krma

Natehtamo od 5,0 do 30,0 g vzorca, ki vsebuje vsaj 30 µg flavofosfolipola. V erlenmajerici (5.3) premešamo s 150 ml 50-odstotnega metanola (4.5) in uravnamo pH na 8,1 do 8,2 s približno 400 mg tris(hidroksimetil)aminometana (4.7). Preverimo pH z indikatorskim papirjem (4.12). Pustimo stati 15 minut, nato s tris(hidroksimetil)aminometanom (4.7) ponovno uravnamo pH na 8,1 do 8,2 in 10 minut vremo pod povratnim hladilnikom (5.4) ter pri tem neprestano mešamo. Mešanico ohladimo, centrifugiramo in dekantiramo ekstrakt.

### 7.2 Čiščenje (ta korak lahko pri koncentratih, premiksih in mineralni krmi izpustimo)

110 ml ekstrakta dodamo 11 g kationskega izmenjevalca (4.9), eno minuto vremo pod povratnim hladilnikom (5.4) in neprestano mešamo. Kationski izmenjevalec ločimo s centrifugiranjem ali filtriranjem. 100 ml ekstrakta dodamo 150 ml metanola (4.4) in raztopino hranimo 12 do 15 ur pri temperaturi 4° C. Na hladnem odfiltriramo kosmiče.

Na dno steklene cevi (5.1) vstavimo zamašek iz steklene volne (4.11), v cev vlijemo 5 ml anionskega izmenjevalca (4.10) in kolono speremo s 100 ml 80-odstotnega metanola (4.6). Z uporabo lijaka (5.2) v kolono prenesemo najmanj 100 ml filtrata, za katerega predvidevamo, da vsebuje 16 µg flavofosfolipola (200 ml za 30-gramski vzorec krme pri 1 ppm). Po potrebi, preden ga vlijemo v kolono, filtrat razredčimo z 80 odstotnim metanolom (4.6), da dobimo pričakovano vsebnost flavofosfolipola 16 µg/100 ml. Hitrost pretoka naravnamo na približno 2 ml/minuto. Eluat zavržemo. Nato speremo kolono s 50 ml 80-odstotnega metanola (4.6) in eluat zavržemo.

Flavofosfolipol eluiramo z metanolno raztopino kalijevega klorida (4.8) s hitrostjo pretoka do približno 2 ml/minuto. 50 ml eluata prenesemo v merilno bučko, dodamo 30 ml vode in premešamo. Ta raztopina bi morala vsebovati 0,2 µg/ml (= U<sub>8</sub>) flavofosfolipola.

### 7.3 Preskusne raztopine

Po potrebi (to je, če smo izpustili čiščenje) ekstrakt, dobljen v točki 7.1.1, razredčimo s 50-odstotnim metanolom (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost flavofosfolipola 0,2 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

Iz raztopine U<sub>8</sub> pripravimo raztopine U<sub>4</sub> (pričakovana vsebnost: 0,1 µg/ml), U<sub>2</sub> (pričakovana vsebnost: 0,05 µg/ml), in U<sub>1</sub> (pričakovana vsebnost: 0,025 µg/ml), in sicer z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) s 50-odstotnim metanolom (4.5).

## 8. Preskusni postopek

### 8.1 Nacepljenje preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.2.2) nacepimo z bakterijsko suspenzijo (3.2) pri približno 50° C. S predhodnimi preskusi na ploščah s preskusnim gojiščem (4.2.2) določimo količino bakterijske suspenzije, ki je potrebna, da dobimo največje in najjasnejše inhibicijske cone z različnimi koncentracijami flavofosfolipola (približno 30 ml/l).

### 8.2 Priprava plošč

Difuzijo skozi agar izvajamo na ploščah s štirimi koncentracijami standardnih raztopin (S<sub>8</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>2</sub> in S<sub>1</sub>) in s štirimi koncentracijami preskusnih raztopin (U<sub>8</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>2</sub> in U<sub>1</sub>) na vsaki izmed njih. Te štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine moramo nujno dodati na vsako ploščo. Zato izberemo dovolj velike plošče za vsaj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm, z najmanj 30 mm razdalje med središči, ki jih vdolbemo v agarno gojišče. Preskus lahko izvajamo na steklenih ploščah, na katere postavimo obroč iz obdelanega aluminija ali plastike in imajo premer 200 mm, v višino pa merijo 20 mm.

Na plošče nalijemo določeno količino gojišča (4.2.1), da dobimo približno 1,5 mm debelo plast (45 ml za ploščo s premerom 200 mm). Ko se vsebina izravna, prelijemo določeno količino gojišča (4.2.2), ki je nacepljeno skladno s točko 8.1, da dobimo približno 1 mm debelo plast (30 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počakamo, da se površina ponovno izravna. Nato izdolbemo vdolbine in vanje naneseemo točno odmerjene volumne preskusnih in standardnih raztopin (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, glede na premer).

Vsako koncentracijo naneseemo najmanj štirikrat, tako da pri vsakem preskusu ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

### 8.3 Inkubacija

Plošče inkubiramo od 16 do 18 ur pri 28 do 30 °C.

## 9. Ovrednotenje

Izmerimo premer inhibicijskih con s točnostjo 0,1 mm. Srednje vrednosti za vsako koncentracijo naneseemo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij glede na premer inhibicijskih con. Na diagramu izrišemo premice z najboljšim potekom tako za standardno raztopino kot tudi za ekstrakt, kakor je prikazano spodaj.

Z naslednjo formulodoločimo »najboljšo« točko za najnižjo vsebnost standardne raztopine (SL):

$$(a) SL = (7S_1 + 4S_2 + S_4 + 2S_8)/10$$

$$(b) SH = (7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1)/10$$

Na podoben način izračunamo »najboljše« točke za najnižjo (UL) in najvišjo (UH) vsebnost ekstrakta, in sicer tako, da v zgornjih formulah z  $U_1, U_2, U_4$  in  $U_8$  nadomestimo  $S_1, S_2, S_4$  in  $S_8$ .

Izračunane vrednosti SL in SH naneseemo na isti diagram in jih povežemo, da dobimo premico z najboljšim potekom za standardno raztopino. Na podoben način zabeležimo vrednosti UL in UH ter jih povežemo, da dobimo premico z najboljšim potekom za ekstrakt.

Če ni interferenc, bi morale biti premice vzporedne. Za praktične namene lahko premice štejeemo za vzporedne, če se vrednosti (SH-SL) ter (UH-UL) ne razlikujejo za več kot 10 % od njihovih srednjih vrednosti.

Če premice niso vzporedne, lahko izločimo bodisi  $U_1$  in  $S_1$  ali  $U_8$  in  $S_8$ , in SL, SH, UL in UH izračunamo z alternativnimi formulami, s katerimi dobimo alternativne premice z najboljšim potekom:

$$(a') SL = (5S_1 + 2S_2 - S_4)/6 \text{ ali } (5S_2 + 2S_4 - S_8)/6$$

$$(b') SH = (5S_4 + 2S_2 - S_1)/6 \text{ ali } (5S_8 + 2S_4 - S_2)/6$$

Z najboljšim potekom preverimo vzporednost kot zgoraj. Če rezultat izračunamo iz treh vsebnosti, moramo to navesti v končnem poročilu.

Ko premice štejeemo za vzporedne, izračunamo logaritem relativne aktivnosti (log. A) s pomočjo ene izmed naslednjih formul.

Za štiri vrednosti

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

Za tri vrednosti

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

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

Dejanska aktivnost = domnevna aktivnost  $\times$  relativna aktivnost.

Kadar premic ne štejeemo za vzporedne, določitev ponovimo. Če vzporednost še vedno ni dosežena, izračunamo logaritem relativne aktivnosti (log. A) s formulo (c). Vendar moramo tako dobljeni rezultat jemati kot približnega, in to moramo navesti v končnem poročilu.

## 10. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh določitev, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presegati:

0,5 mg/kg v absolutni vrednosti, za vsebnosti flavofosfolipola od 1 do 2 mg/kg;

25 % glede na višjo vrednost, za vsebnosti nad 2 in do 10 mg/kg;

20 % glede na višjo vrednost, za vsebnosti nad 10 in do 25 mg/kg;

5 mg/kg v absolutni vrednosti, za vsebnosti nad 25 in do 50 mg/kg;

10 % glede na višjo vrednost, za vsebnosti nad 50 mg/kg.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 78/633/EGS.

## METODA 32\*

### DOLOČANJE AVOPARCINA Z DIFUZIJO NA AGARNEM GOJIŠČU

#### 1. Namen in področje uporabe

S tem postopkom določamo vsebnost avoparcina v krmi in premiksih. Spodnja meja za določitev je 2 mg/kg (2 ppm). Vsebnost polietrnih antibiotikov lahko vpliva na določanje.

## 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z mešanico acetona, vode in klorovodikove kisline. Antibiotično aktivnost ekstrakta določimo tako, da izmerimo difuzijo avoparcina v agarstem gojišču, inokuliranim z *Bacillus subtilis*. Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Za premer teh con velja, da je premer sorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika na obseg uporabljenih koncentracij antibiotika.

## 3. Mikroorganizem:

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIB 8054)

### 3.1 Ohranjanje prvotne kulture

Epruvete, ki vsebujejo poševne nanose gojišč (4.1), inokuliramo z *Bacillus subtilis* in pustimo čez noč pri 30° C. Kulturo shranimo v hladilniku pri približno 4° C. Vsak mesec znova inokuliramo.

### 3.2 Priprava suspenzije spor<sup>1</sup>

Z 2 do 3 ml sterilne vode posnamemo mlado kulturo z agarne gojišča (3.1). S to suspenzijo inokuliramo 300 ml gojišč (4.1), postavljenih v Rouxovo bučko, in inkubiramo tri do pet dni pri 30° C. Mikroskopsko preverimo razvoj spor, nato posnamemo mlado kulturo s 15 ml etanola (4.2) in dobro premešamo. Ta suspenzija se lahko shrani vsaj za pet mesecev pri približno 4° C.

## 4. Gojišča in reagenti

### 4.1 Gojišče<sup>2</sup>

Pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	15,0 g
Voda	1000 ml
pH	6,5 (po sterilizaciji)

4.2 20-odstotni etanol (v/v): razredčimo 200 ml etanola z 800 ml vode.

4.3 Klorovodikova kislina, d: od 1,18 do 1,19.

4.4 Raztopina natrijevega hidroksida 2 M.

4.5 Fosfatni pufer, 0,1 M:

Kalijev dihidrogenfosfat, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,6 g.
Voda	do 1000 ml.
Uravnemo pH na	4,5.

4.6 Mešanica metanola, vode in klorovodikove kisline (4.3): 65/32,5/2,5 (v/v/v).

4.7 Standardna snov: avoparcinsulfat z znano aktivnostjo.

## 5. Standardne raztopine

Pazljivo odmerimo približno 10 mg standardne snovi (4.7) in jo raztopimo v fosfatnem pufru (4.5) ter razredčimo s tem pufrom, da dobimo osnovno raztopino, ki vsebuje 100µg avoparcina na ml. Ta raztopina ostane nespremenjena do sedem dni, če jo hranimo v zaprti bučki pri 4° C.

### 5.1 Za premikse

Z zaporednim razredčevanjem s pufrom (4.5) pripravimo iz te osnovne raztopine naslednje raztopine:

S <sub>8</sub>	4,0 µg/ml
S <sub>4</sub>	2,0 µg/ml
S <sub>2</sub>	1,0 µg/ml
S <sub>1</sub>	0,5 µg/ml

<sup>1</sup> Uporabijo se lahko tudi druge metode, če je ugotovljeno, da dajejo podobne suspenzije spor.

<sup>2</sup> Uporabimo lahko katerokoli običajno gojišče, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

## 5.2 Za krmo

Z zaporednim razredčevanjem s pufrom (4.5) pripravimo iz osnovne raztopine naslednje raztopine:

S <sub>8</sub>	2,0 µg/ml
S <sub>4</sub>	1,0 µg/ml
S <sub>2</sub>	0,5 µg/ml
S <sub>1</sub>	0,25 µg/ml

## 6. Priprava ekstrakta in preskusnih raztopin

### 6.1 Premiksi

Na 10 mg natančno odtehtamo toliko vzorca, da vsebuje 10 do 100 mg avoparcina. Položimo ga v 100 mililitrsko merilno bučko skupaj s 60 ml mešanice (4.6) in pretresamo 15 minut z mehanskim stresalnim aparatom. Preverimo pH in ga po potrebi s klorovodikovo kislino (4.3) uravnamo na pH 2. Bučko napolnimo z mešanico (4.6) in dobro premešamo. Del raztopine filtriramo s primernim filtrirnim papirjem (npr. Whatman št. 1), pri tem pa odlijemo prvih 5 ml filtrata. Vzamemo nekaj filtrata in pH z raztopino natrijevega hidroksida (4.4) uravnamo na 4,5. To raztopino razredčimo s fosfatnim pufrom (4.5), da dobimo pričakovano koncentracijo avoparcina 4 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

Iz raztopine U<sub>8</sub> pripravimo raztopine U<sub>4</sub> (pričakovana vsebnost: 2 µg/ml), U<sub>2</sub> (pričakovana vsebnost: 1 µg/ml) in U<sub>1</sub> (pričakovana vsebnost: 0,5 µg/ml), in sicer z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) s pufrom (4.5).

### 6.2 Krma

Odmerimo 50 g vzorca in 100 ml mešanice (4.6), pretresamo 30 minut z mehanskim stresalnim aparatom. Ekstrakt zbistriamo s centrifugiranjem (z uporabo zaprtih centrifugirnih epruvet), odvzamemo del zbistrenega ekstrakta (glej tabelo spodaj) in pH uravnamo na 4,5 z raztopino natrijevega hidroksida (4.4). Razredčimo s pufrom (4.5), da dobimo U<sub>8</sub> (glej tabelo spodaj). Iz raztopine U<sub>8</sub> pripravimo raztopine U<sub>4</sub> (pričakovana vsebnost: 1 µg/ml), U<sub>2</sub> (pričakovana vsebnost: 0,5 µg/ml) in U<sub>1</sub> (pričakovana vsebnost: 0,25 µg/ml), in sicer z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) s pufrom (4.5).

Domnevna vsebnost avoparcina (mg/kg)	5	7,5	10	15	20	40
Teža vzorca (g(±0,1 g))	50	50	50	50	50	50
Prostornina zmesi (4.6) (ml)	100	100	100	100	100	100
Prostornina bistrega ekstrakta (ml)	20	15	20	15	20	10
Končna prostornina (ml) U <sub>8</sub>	25	25	50	50	100	100
Pričakovana koncentracija U <sub>8</sub> (µg/ml)	2	pribl. 2	2	pribl. 2	2	2

## 7. Preskusni postopek

### 7.1 Inokulacija preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.1) inokuliramo s suspenzijo spor (3.2) pri 50 do 60° C. S predhodnimi preskusi na ploščah s preskusnim gojiščem (4.1) določimo količino suspenzije spor, ki je potrebna, da pridobimo največje in najjasnejše inhibicijske cone z različnimi koncentracijami avoparcina.

7.2 Difuzija skozi agar se izvaja na ploščah s štirimi koncentracijami običajne raztopine (S<sub>8</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>2</sub> in S<sub>1</sub>) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine (U<sub>8</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>2</sub> in U<sub>1</sub>) na vsaki izmed njih. Na vsako ploščo moramo nanesti vse štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine. V ta namen izberemo ploščo, ki so dovolj velike za vsaj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm, z najmanj 30 mm razdalje med središči, ki jih je treba vdolbsti v agarno gojišče. Preskus se lahko izvaja na tankih steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike, premera 200 mm in višine 20 mm.

Na plošče nanesimo določeno količino gojišča (4.1), ki je inokulirano skladno s točko 7.1, da dobimo približno 2 mm debelo plast (60 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počakajmo, da se površina utrdi. Nato izdolbimo vdolbine in vlijemo vanje natančno odmerjeno količino preskusne in standardne raztopine (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, glede na premer). Vsako koncentracijo uporabimo vsaj štirikrat, tako da je pri vsakem preskusu treba oceniti 32 inhibicijskih con.

### 7.3 Inkubacija

Plošče inkubiramo od 16 do 18 ur pri 30° C.

## 8. Določanje vrednosti

Premer inhibicijskih con izmerimo do 0,1 mm natančno. Zabeležimo srednje vrednosti za vsako koncentracijo na semilogaritemskem grafu, ki kaže logaritem koncentracij glede na premere inhibicijskih con. Na grafu prikažemo najustreznejše premice, in sicer za običajno raztopino in tudi za ekstrakt, kakor je navedeno v spodnjem primeru.

Z naslednjo formulo določimo najustreznejšo točko za najvišjo raven običajne raztopine (SL):

$$(a) SL = (7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8)/10$$

Z naslednjo formulo določimo najustreznejšo točko za najvišjo raven običajne raztopine (SH):

$$(b) SH = (7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1)/10$$

Podobno izračunamo najustreznejše točke za najnižjo (UL) in najvišjo (UH) raven ekstrakta, in sicer tako, da v zgornjih enačbah z  $U_1, U_2, U_4$  in  $U_8$  nadomestimo  $S_1, S_2, S_4$  in  $S_8$ .

Zabeležimo izračunane vrednosti SL in SH na istem grafu in jih povežemo, da dobimo najustreznejšo črto za standardno raztopino. Podobno zabeležimo vrednosti UL in UH ter jih povežemo, da dobimo najustreznejšo črto za ekstrakt.

Če ni interferenc, bi morale biti črte vzporedne. Iz praktičnih razlogov lahko črte štejemo za vzporedne, če med vrednostmi (SH-SL) ter (UH-UL) in njihovimi srednjimi vrednostmi ni več kakor 10 % odklona.

Če premice niso vzporedne, lahko izločimo bodisi  $U_1$  in  $S_1$  ali  $U_8$  in  $S_8$ , z vrednostmi SL, SH, UL in UH pa z alternativnimi formulami izračunamo alternativne najustreznejše premice:

$$(a) SL = (5S_1 + 2S_2 - S_4)/6 \text{ ali } (5S_2 + 2S_4 - S_8)/6$$

$$(b) SH = (5S_4 + 2S_2 - S_1)/6 \text{ ali } (5S_8 + 2S_4 - S_2)/6$$

Podobno velja za UL in UH. Za alternativne najustreznejše premice preverimo vzporednost kakor zgoraj. Če rezultat izračunamo na treh ravneh, moramo to zabeležiti v končnem poročilu.

Kadar premice štejemo za vzporedne, izračunamo logaritem relativne dejavnosti (log. A) z uporabo ene izmed naslednjih enačb:

Za štiri vrednosti

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

Za tri vrednosti

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

ali

$$(d) \log. A = ((U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401)/(U_8 + S_8 - U_2 - S_2)$$

Dejanska aktivnost = domnevna aktivnost  $\times$  relativna aktivnost.

Če relativno delovanje presega razpon od 0,5 do 2,0, ponovimo preskus tako, da ustrezno prilagodimo koncentracije ekstrakta, če je to mogoče, sicer prilagodimo standardne raztopine. Kadar relativnega delovanja ne moremo pripeljati do zahtevanih vrednosti, moramo vse rezultate jemati kot približke in to tudi zabeležiti v končnem poročilu.

Kadar premic ne štejemo za vzporedne, postopek določevanja ponovimo. Če vzporednosti še vedno ne dosežemo, je treba določanje šteti kot nezadovoljivo.

## 9. Ponovljivost

Razlika med rezultati dveh določevanj, ki jih na istem vzorcu izvede isti analitik, ne sme presegati:

- 2 mg/kg v absolutni vrednosti za vsebnost avoparcina od 2 do 10 mg/kg,
- 20 % pri najvišjih vrednostih za vsebnosti od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg v absolutni vrednosti za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % pri najvišjih vrednostih za vsebnosti nad 50 mg/kg.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 81/715/EGS.



**METODA 33\***  
**DOLOČANJE NATRIJEVEGA MONENZINA Z DIFUZIJO NA AGARNEM GOJIŠČU**

### 1. Namen in obseg

S tem postopkom določamo vsebnost natrijevega monenzina v krmi in premiksih. Spodnja meja za določevanje je 10 mg/kg (10 ppm)<sup>1</sup>.

### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z 90-odstotnim metanolom. Ekstrakt obdelamo z ustreznimi postopki glede na vsebnost natrijevega monenzina v vzorcu. Njegovo antibiotično delovanje določimo tako, da izmerimo difuzijo natrijevega monenzina v agarjem gojišču, inokuliranem z *Bacillus subtilis*. Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Za premer teh con velja, da je premosorazmeren z logaritmom koncentracije antibiotika na obseg uporabljenih koncentracij antibiotika. Občutljivost preskusnega sistema se zmanjša v prisotnosti natrijevih ionov.

### 3. Mikroorganizem:

*Bacillus subtilis* ATCC 6633 (NCIB 8054)

#### 3.1 Ohranjanje prvotne kulture

Epruvete, ki vsebujejo poševne nanose gojišč (4.1), inokuliramo z *Bacillus subtilis* in pustimo čez noč pri 30° C. Kulturo shranimo v hladilniku pri približno 4° C. Vsak mesec znova inokuliramo.

#### 3.2 Priprava suspenzije spor<sup>2</sup>

Z 2 do 3 ml sterilne vode posnamemo mlado kulturo z agarne gojišča (3.1). S to suspenzijo inokuliramo 300 ml gojišč (4.1), postavljenih v Rouxovo bučko, in inkubiramo tri do pet dni pri 30° C. Mikroskopsko preverimo razvoj spor, nato posnamemo mlado kulturo s 15 ml 20-odstotnega etanola (4.3) in dobro premešamo. Ta suspenzija se lahko shrani za vsaj pet mesecev pri približno 4° C.

### 4. Gojišča in reagenti

#### 4.1 Gojišče<sup>3</sup>

Tripton	10,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar (odvisno od kakovosti)	10,0 do 20,0 g
Voda	1000 ml
pH	6,5 (po sterilizaciji)

#### 4.2 Preskusno gojišče

Glukoza	10,0 g
Kvasni ekstrakt	2,5 g
Dikalijev hidrogenfosfat	0,69 g
Kalijev dihidrogenfosfat	0,45 g
Agar	10,0 do 20,0 g
Voda	1000 ml
pH	6,5 (po sterilizaciji)

4.3 20-odstotni etanol (v/v): razredčimo 200 ml etanola z 800 ml vode.

4.4 Metanol, anhidriden.

4.5 90-odstotni metanol (v/v): razredčimo 900 ml metanola (4.4) s 100 ml vode.

4.6 50-odstotni metanol (v/v): razredčimo 500 ml metanola (4.4) s 500 ml vode.

4.7 Aluminijev oksid, v zrnih (alcoa F, 20 mesh; aktivirani aluminijev oksid UG1: F. Lancaster and Co., ali ekvivalent).

4.8 Standardne snovi: natrijev monenzin z znano aktivnostjo (npr. iz International Laboratory for Biological Standards. Central Veterinary Laboratory, Weybridge, UK-Surrey KT 15 3NB).

<sup>1</sup> 1 mg natrijevega monenzina ustreza 1000 enot UK.

<sup>2</sup> Uporabimo lahko tudi druge metode, če je dokazano, da dajejo podobne suspenzije spor.

<sup>3</sup> Uporabimo lahko katerokoli komercialno gojišče, ki ima podobno sestavo in daje enake rezultate.

## 5. Naprave

5.1 Rotacijski vakuumski izparilnik z 250 mililitrsko bučko z okroglim dnom.

5.2 Steklena cev za kromatografijo, notranji premer: 25 mm, dolžina: 400 mm, z odprtim koncem, ki ima v premeru 2 mm.

5.3 Steklena cev za kromatografijo, notranji premer: 11 mm, dolžina: približno 300 mm, z odprtim koncem, ki ima v premeru 2 mm.

## 6. Standardne raztopine

Natančno odmerjeno količino standardne snovi (4.8) raztopimo v metanolu (4.4) in razredčimo, da dobimo osnovno raztopino, ki vsebuje 800 g natrijevega monenzina na ml. Ta raztopina ostane nespremenjena do štirinajst dni, če jo hranimo v zaprtih bučkah pri 4 °C.

Z zaporednim razredčevanjem s 50-odstotnim metanolom (4.6) pripravimo iz te osnovne raztopine naslednje raztopine:

S<sub>8</sub> 8,0 µg/ml

S<sub>4</sub> 4,0 µg/ml

S<sub>2</sub> 2,0 µg/ml

S<sub>1</sub> 1,0 µg/ml

## 7. Priprava ekstrakta

### 7.1 Ekstrakcija

#### 7.1.1 Premiksi

Odtehtamo 2 g vzorca, dodamo 100 ml 90-odstotnega metanola (4.5) ter nekaj minut homogeniziramo in centrifugiramo. Supernatantno raztopino razredčimo s 50 odstotnim metanolom (4.6), da dobimo pričakovano koncentracijo natrijevega monenzina 8 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

#### 7.1.2 Krma z vsebnostjo natrijevega monenzina najmanj 50 ppm

Odtehtamo 10 do 20 g vzorca, dodamo 100 ml 90 odstotnega metanola (4.5), 15 minut homogeniziramo in pustimo, da se umiri.

V ožji del steklene epruvete (5.2) vstavimo zamašek iz vate in z rahlim trkanjem dodamo aluminijev oksid (4.7), da dobimo 75 do 80 mm visok steber.

Ekstrakt prelijemo na steber aluminijevega oksida in zberemo filtrat. Z vodo razredčimo 30 ml filtrata na 50 ml. Še naprej redčimo s 50 odstotnim metanolom (4.6), da dobimo pričakovano koncentracijo natrijevega monenzina 8 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

#### 7.1.3 Krma z vsebnostjo natrijevega monenzina pod 50 ppm (do 10 ppm)

Odtehtamo 10 do 20 g vzorca, dodamo 100 ml 90 odstotnega metanola (4.5) in 15 minut homogeniziramo. Centrifugiramo, da se zbistri.

Za vzorec, ki vsebuje 20 ppm natrijevega monenzina, vzamemo 40 ml supernatantne tekočine. Za vzorec, ki vsebuje 10 ppm, vzamemo 80 ml in izparevamo, dokler se ne posuši, v vakuumu na rotacijskem izparilniku (5.1) pri največ 40° C. Preostanek raztopimo v 10 ml 90-odstotnega metanola (4.5).

V ožji del steklene epruvete (5.3) vstavimo zamašek iz vate in z rahlim trkanjem dodamo aluminijev oksid (4.7), da dobimo 75 do 80 mm visok steber.

Raztopino preostanka v metanolu prelijemo na steber aluminijevega oksida in zberemo filtrat. Steber splaknemo z 10 ml 90-odstotnega metanola (4.5) in zmešamo to tekočino s filtratom.

Raztopino izparevamo v vakuumu na rotacijskem izparilniku (5.1) pri manj kakor 40° C, dokler se ne posuši.

Preostanek raztopimo v 10 ml anhidridnega metanola (4.4) in dolijemo vodo, da dobimo 20 ml. Raztopino centrifugiramo vsaj pet minut pri 4000 obr./min. Še naprej redčimo s 50-odstotnim metanolom (4.6), da dobimo pričakovano vsebnost natrijevega monenzina 8 µg/ml (= U<sub>8</sub>).

### 7.2 Preskusne raztopine

Z raztopino U<sub>8</sub> pripravimo raztopine U<sub>4</sub> (pričakovana vsebnost: 4 µg/ml), U<sub>2</sub> (pričakovana vsebnost: 2 µg/ml) in U<sub>1</sub> (pričakovana vsebnost: 1 µg/ml), in sicer z zaporednim razredčevanjem (1 + 1) s 50-odstotnim metanolom (4.6).

## 8. Preskusni postopek

### 8.1 Inokulacija preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.2) inokuliramo s suspenzijo spor (3.2) pri 50 do 60° C. S predhodnimi preskusi na ploščah s preskusnim gojiščem (4.2) določimo količino suspenzije spor, ki je potrebna, da se pridobi največje in najjasnejše inhibicijske cone z različnimi koncentracijami natrijevega monenzina.

### 8.2 Priprava plošč

Difuzija skozi agar se izvaja na ploščah s štirimi koncentracijami običajne raztopine (S<sub>8</sub>, S<sub>4</sub>, S<sub>2</sub> in S<sub>1</sub>) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine (U<sub>8</sub>, U<sub>4</sub>, U<sub>2</sub> in U<sub>1</sub>) na vsaki izmed njih. Na vsako ploščo moramo nanesti vse štiri koncentracije ekstrakta in standardne raztopine. V ta namen izberemo plošče, ki so dovolj velike za vsaj osem vdolbin s

premerom od 10 do 13 mm, z najmanj 30 mm razdalje med središči, ki jih je treba vdolbsti v agarno gojišče. Preskus se lahko izvaja na tankih steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike, premera 200 mm in višine 20 mm.

Na plošče nanese določeno količino gojišča (4.2), inokuliranega skladno s točko 8.1, da dobimo približno 2 mm debelo plast (60 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počakamo, da se površina utrdi. Nato izdobljemo vdolbine in vanje vlijemo natanko odmerjeno količino preskusne in standardne raztopine (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, glede na premer). Vsako koncentracijo uporabimo vsaj štirikrat, tako da je pri vsakem preskusu treba oceniti 32 inhibicijskih con.

### 8.3 Inkubacija

Plošče inkubiramo približno 18 ur pri temperaturi od 35 do 37° C.

## 9. Določanje vrednosti

Premer inhibicijskih con izmerimo do 0,1 mm natančno. Zabeležimo srednje vrednosti za vsako koncentracijo na semilogaritmskem grafu, ki kaže logaritem koncentracij glede na premer inhibicijskih con. Na grafu prikažemo najustreznejše premice, in sicer za običajno raztopino, pa tudi za ekstrakt, kakor je navedeno v spodnjem primeru.

Z naslednjo formulo določimo najustreznejšo točko za najnižjo raven standardne raztopine (SL):

$$(a) SL = (7S_1 + 4S_2 + S_4 - 2S_8)/10$$

Z naslednjo enačbo določimo najustreznejšo točko za najvišjo raven običajne raztopine (SH):

$$(b) SH = (7S_8 + 4S_4 + S_2 - 2S_1)/10$$

Podobno izračunamo najustreznejše točke za najnižjo (UL) in najvišjo (UH) raven ekstrakta, in sicer tako, da v zgornjih enačbah z  $U_1, U_2, U_4$  in  $U_8$  nadomestimo  $S_1, S_2, S_4$  in  $S_8$ .

Zabeležimo izračunane vrednosti SL in SH na istem grafu ter jih povežemo, da dobimo najustreznejšo črto za standardno raztopino. Podobno zabeležimo vrednosti UL in UH ter jih povežemo, da dobimo najustreznejšo črto za ekstrakt.

Če ni interferenc, bi morale biti črte vzporedne. Iz praktičnih razlogov lahko štejemo črte za vzporedne, če med vrednostmi (SH-SL) in (UH-UL) ter njihovimi srednjimi vrednostmi ni več kakor 10 % odklona.

Če premice niso vzporedne, lahko izločimo bodisi  $U_1$  in  $S_1$  ali  $U_8$  in  $S_8$ , z vrednostmi SL, SH, UL in UH pa z alternativnimi enačbami izračunamo alternativne najustreznejše premice:

$$(a) SL = (5S_1 + 2S_2 - S_4)/6 \text{ ali } (5S_2 + 2S_4 - S_8)/6$$

$$(b) SH = (5S_4 + 2S_2 - S_1)/6 \text{ ali } (5S_8 + 2S_4 - S_2)/6$$

Podobno velja tudi za UL in UH. Za alternativne najustreznejše premice preverimo vzporednost kakor zgoraj. Če rezultat izračunamo na treh ravneh, moramo to zabeležiti v končnem poročilu.

Kadar premice štejemo za vzporedne, izračunamo logaritem relativne dejavnosti (log. A) z uporabo ene izmed naslednjih enačb:

za štiri vrednosti

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

za tri vrednosti

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

ali

$$(d) \log. A = (U_2 + U_4 + U_8 - S_2 - S_4 - S_8) \times 0,401 / (U_8 + S_8 - U_2 - S_2)$$

Dejanska aktivnost = domnevna aktivnost x relativna aktivnost.

Če relativno delovanje presega razpon od 0,5 do 2,0, ponovimo preskus tako, da ustrezno prilagodimo koncentracije ekstrakta, če je to mogoče, sicer prilagodimo standardne raztopine. Kadar relativnega delovanja ne moremo pripeljati do zahtevanih vrednosti, moramo vse rezultate jemati kot približke in to tudi zabeležiti v končnem poročilu.

Kadar se premice ne štejejo za vzporedne, postopek določevanja ponovimo. Če vzporednosti še vedno ne dosežemo, je treba določanje šteti kot nezadovoljivo.

## 10. Ponovljivost

Razlika med rezultati dveh določenj, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme presegati:

- 20 % pri najvišjih vrednostih vsebnosti natrijevega monenzina od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg absolutne vrednosti za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % pri najvišjih vrednostih vsebnosti nad 50 mg/kg.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 81/715/EGS.

## METODA 34\*

### DOLOČANJE SPIRAMICINA Z DIFUZIJO NA AGARNEM GOJIŠČU

#### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda se uporablja za določanje spiramicina v krmi in premiksih. Meja določanja je 1 mg/kg (1 ppm)<sup>1</sup>.

#### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z mešanico metanol/fosfatbikarbonatnega pufra pri pH 8. Ekstrakt dekantiramo ali centrifugiramo in razredčimo. Njegovo antibiotično aktivnost določimo z merjenjem difuzije spiramicina na agarjem gojišču, nacepljenem z *Micrococcus luteus*. Znak difuzije je oblikovanje inhibicijskih con mikroorganizma. Premer teh con je premosorazmeren logaritmu koncentracije antibiotika v območju uporabljenih koncentracij antibiotika.

#### 3. Mikroorganizem:

*Micrococcus luteus* ATCC 9341 (NCTC 8340, NCIB 8553)

##### 3.1 Vzdrževanje osnovne kulture

V epruvete s poševnim nanosom gojišča (4.1) nacepimo *Micrococcus luteus* in inkubiramo 24 ur pri 30° C. Kulturo hranimo v hladilniku pri približno 4° C. Vsakih štirinajst dni precepimo.

##### 3.2 Priprava suspenzije bakterij<sup>a</sup>

Prirastek pred kratkim pripravljenega agarnega poševnega nanosa (3.1) posnamemo z 2 do 3 ml raztopine natrijevega klorida (4.3). To suspenzijo uporabimo za nacepljenje 250 ml gojišča (4.1), vsebovanega v Rouxovi bučki, in inkubiramo 18 do 20 ur pri temperaturi 30° C. Prirastek posnamemo s 25 ml raztopine natrijevega klorida (4.3) in premešamo. Z raztopino natrijevega klorida (4.3) razredčimo suspenzijo na 1/10. Prepustnost svetlobe suspenzije mora biti 75 odstotna, izmerjena pri 650 nm v 1 cm kivetu proti raztopini natrijevega klorida (4.3). Suspenzijo lahko hranimo en teden pri temperaturi približno 4° C.

#### 4. Gojišča in reagenti

##### 4.1 Gojišče<sup>b</sup>

Mesni pepton	6,0 g
Tripton	4,0 g
Kvasni ekstrakt	3,0 g
Mesni ekstrakt	1,5 g
Glukoza	1,0 g
Agar	od 10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH	6,5 do 6,6 (po sterilizaciji)

<sup>1</sup> 1 mg baze spiramicina je enakovreden 3200 mednarodnim enotam (IE)

<sup>a</sup> Uporabimo lahko tudi druge metode, če je ugotovljeno, da dajejo podobne bakterijske suspenzije.

<sup>b</sup> Uporabimo lahko vsakršno komercialno gojišče podobne sestave, ki daje enake rezultate.

#### 4.2 Preskusno gojišče<sup>b</sup>

Tripton	5,0 g
Kvasni ekstrakt	4,0 g
Mesni ekstrakt	3,0 g
Agar	od 10,0 do 20,0 g
Voda	1 000 ml
pH	8,0 (po sterilizaciji).

#### 4.3 0,8 odstotna (m/v) raztopina natrijevega klorida

V vodi raztopimo 8 g natrijevega klorida in ga razredčimo z vodo do 1000 ml; nato steriliziramo.

4.4 Fosfatnobikarbonatni pufer,	pH 8,0
Dikalijev hidrogenfosfat $K_2HPO_4$	16,7 g
Kalijev dihidrogenfosfat $KH_2PO_4$	0,5 g
Natrijev hidrogenkarbonat $NaHCO_3$	20,0 g
Voda	do 1000 ml

#### 4.5 Mešanica metanola in fosfatbikarbonatnega pufru (4.4)

50/50 (v/v).

#### 4.6 Standardna substanca

Spiramicin znane aktivnosti (v IE).

### 5. Standardne raztopine

Točno natehtano količino standardne substance (4.6) raztopimo v mešanici (4.5) in razredčimo z isto mešanico, da dobimo osnovno raztopino, ki vsebuje 1 000 IE spiramicina na mililiter. Raztopina je stabilna do pet dni, če jo hranimo v zaprti bučki pri 4° C.

Iz te osnovne raztopine z zaporednimi razredčenji z mešanico (4.5) pripravimo naslednje raztopine:

$S_8$	1 IE/ml
$S_4$	0,5 IE/ml
$S_2$	0,25 IE/ml
$S_1$	0,125 IE/ml

### 6. Priprava ekstrakta in preskusnih raztopin

#### 6.1 Ekstrakcija

Pri krmi natehtamo 20,0 g vzorca, pri premiksah pa 1,0 do 20,0 g. Dodamo 100 ml mešanice (4.5) in stresamo 30 minut. Centrifugiramo ali dekantiramo in bistro raztopino nad usedlino razredčimo z mešanico (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost spiramicina 1 IE/ml (=  $U_8$ ).

Za pričakovane vsebnosti spiramicina, nižje od 2,5 mg/l krme, mora biti ekstrakcija izvedena na naslednji način. Natehtamo 20 g vzorca, dodamo 100 ml mešanice (4.5) in 30 minut stresamo. Nato nekaj minut centrifugiramo in 50 ml raztopine nad usedlino pri znižanem tlaku uparimo do približno 4 ml v rotacijskem uparjalniku pri temperaturi, ki ne presega 40° C. Ostanek razredčimo z mešanico (4.5), da dobimo pričakovano vsebnost spiramicina 1 IE/ml (=  $U_8$ ).

#### 6.2 Preskusne raztopine

Iz raztopine  $U_8$  z zaporednim redčenjem (1 + 1) z mešanico (4.5) pripravimo raztopine  $U_4$  (pričakovana vsebnost: 0,5 IE/ml),  $U_2$  (pričakovana vsebnost: 0,25 IE/ml) in  $U_1$  (pričakovana vsebnost: 0,125 IE/ml).

### 7. Preskusni postopek

#### 7.1 Nacepljenje preskusnega gojišča

Preskusno gojišče (4.2) naceplimo s suspenzijo bakterij (3.2) pri približno 50° C. S predhodnimi poskusi na ploščah s preskusnim gojiščem (4.2) določimo količino bakterijske suspenzije, ki daje največje in najjasnejše inhibicijske cone z različnimi koncentracijami spiramicina.

#### 7.2 Priprava plošč

Difuzijo skozi agar izvajamo na ploščah s štirimi koncentracijami standardne raztopine ( $S_8$ ,  $S_4$ ,  $S_2$ ,  $S_1$ ) in s štirimi koncentracijami preskusne raztopine ( $U_8$ ,  $U_4$ ,  $U_2$ ,  $U_1$ ). Na vsako ploščo moramo nanesti vse štiri koncentracije ekstrakta in standarda. V ta namen izberemo plošče, ki so dovolj velike za najmanj osem vdolbin s premerom od 10 do 13 mm, z najmanj 30 mm razdalje med središči, ki jih izdolbemo v agarskem gojišču. Preskus lahko izvajamo na steklenih ploščah, na katerih je obroč iz obdelanega aluminija ali plastike, premera 200 mm in višine 20 mm.

Na plošče naneseemo določeno količino gojišča (4.2), nacepljenega skladno s točko 7.1, da dobimo približno 2 mm debelo plast (60 ml za ploščo s premerom 200 mm). Počakamo, da se površina utrdi. Nato izdolbemo vdolbine ter vlijemo vanje točno odmerjene volumne preskusnih in standardnih raztopin (med 0,10 in 0,15 ml na vdolbino, odvisno od premera). Vsako koncentracijo naneseemo najmanj štirikrat, tako da pri vsakem preskusu ovrednotimo 32 inhibicijskih con.

### 7.3 Inkubacija

Plošče inkubiramo 16 do 18 ur pri temperaturi  $30 \pm 2^\circ \text{C}$ .

## 8. Vrednotenje

Premer inhibicijskih con izmerimo s točnostjo 0,1 mm. Srednje vrednosti za vsako koncentracijo vnesemo v semilogaritemski diagram, ki prikazuje logaritem koncentracij v odvisnosti od premera inhibicijskih con. Na diagramu izrišemo premice z najboljšim potekom, in sicer za standardno raztopino, pa tudi za ekstrakt, kakor je navedeno spodaj.

Z naslednjo formulo določimo »najboljšo« točko za najnižjo vrednost standardne raztopine (SL):

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

Z naslednjo formulo določimo »najboljšo« točko za najvišjo vrednost standardne raztopine (SH):

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

Podobno izračunamo »najboljše« točke za najnižjo (UL) in najvišjo vrednost ekstrakta (UH), tako da v zgornjih enačbah  $S_1, S_2, S_4$  in  $S_8$  nadomestimo z  $U_1, U_2, U_4$ , in  $U_8$  (<sup>1</sup>).

Izračunani vrednosti SL in SH vnesemo v isti diagram in ju povežemo, da dobimo premico z najboljšim potekom za standardno raztopino. Podobno vnesemo vrednosti UL in UH ter ju povežemo, da dobimo premico z »najboljšim« potekom za ekstrakt.

Če ni interferenc, bi morali biti premici vzporedni. Iz praktičnih razlogov lahko premici obravnavamo kot vzporedni, če se vrednosti (SH – SL) in (UH – UL) ne razlikujejo za več kakor 10 % od svojih srednjih vrednosti.

Če premici nista vzporedni, lahko izločimo bodisi  $U_1$  in  $S_1$  ali  $U_8$  in  $S_8$ , z vrednostmi SL, SH, UL in UH pa z alternativnimi formulami izračunamo alternativni premici z »najboljšim« potekom:

$$(a') \text{ SL} = (5S_1 + 2S_2 - S_4) / 6 \text{ ali } (5S_2 + 2S_4 - S_8) / 6$$

$$(b') \text{ SH} = (5S_4 + 2S_2 - S_1) / 6 \text{ ali } (5S_8 + 2S_4 - S_2) / 6$$

in podobno za UL in UH. Tudi v tem primeru veljajo iste zahteve za vzporednost. Če rezultat izračunamo iz treh vrednosti, moramo to navesti v končnem poročilu.

Kadar premici obravnavamo kot vzporedni, izračunamo logaritem relativne aktivnosti (log A), in sicer z eno od naslednjih enačb, odvisno od tega, ali smo za oceno vzporednosti uporabili tri ali štiri vrednosti.

Za štiri vrednosti

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

Za tri vrednosti

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

ali

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

Aktivnost ekstrakta vzorca = aktivnost ustreznega standarda  $\times$  A

$$(U_8 = S_8 \times A)$$

Če je relativna aktivnost zunaj območja od 0,5 do 2,0, ponovimo preskus tako, da ustrezno prilagodimo koncentracije ekstrakta, če je to mogoče, sicer prilagodimo standardne raztopine. Če relativne aktivnosti ni mogoče privedi v zahtevano območje, obravnavamo vse rezultate kot približke in moramo to navesti v končnem poročilu.

Če menimo, da premici nista vzporedni, postopek določanja ponovimo. Če vzporednost še vedno ni dosežena, moramo določitev obravnavati kot nezadovoljivo.

Rezultat izrazimo v miligramih spiramicinske baze na kilogram krme.

## 9. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, ki jih na istem vzorcu izvede isti analitik, ne sme presegati:

- 2 mg/kg v absolutni vrednosti, za vsebnosti spiramicinske baze do 10 mg/kg,
- 20 % glede na višjo vrednost, za vsebnosti od 10 do 25 mg/kg,
- 5 mg/kg v absolutni vrednosti, za vsebnosti od 25 do 50 mg/kg,
- 10 % glede na višjo vrednost, za vsebnosti nad 50 mg/kg.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 84/425/EGS.

**METODA 35\***  
**DOLOČANJE HALOFUGINONA**

DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]l]-kvinazolin-4-(3H)-ena hidrobromid

### 1. Namen in področje uporabe

Metoda omogoča določanje halofuginona v krmi. Spodnja meja določanja je 1 mg/kg.

### 2. Princip

Po obdelavi z vročo vodo halofuginon ekstrahiramo v obliki proste baze v etilni acetat in jo nato ločimo kot hidroklorid v vodno raztopino kisline. Ekstrakt prečistimo z ionsko izmenjalno kromatografijo. Vsebnost halofuginona določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo in z UV-detektorjem.

### 3. Reagenti

3.1 Acetonitril, za HPLC

3.2 Izmenjevalec amberlit XAD-2

3.3 Amonijev acetat

3.4 Etil acetat

3.5 Ledocetna kislina

3.6 Standardna substanca halofuginon (DL-trans-7-bromo-6-kloro-3-[3-(3-hidroksi-2-piperidil)acetoni]l]-kvinazolin-4-(3H)-ena hidrobromid, E 764)

3.6.1 Osnovna standardna raztopina halofuginona, 100 µg/ml

50 mg halofuginona (3.6) natehtamo s točnostjo 0,1 mg v 500 ml merilno bučko in ga raztopimo v raztopini amonacetatnega pufra (3.18), dopolnimo s pufrsko raztopino do oznake in premešamo. Raztopina je stabilna tri tedne pri 5° C, če jo hranimo v temi.

3.6.2 Raztopine za umerjanje

V serijo 100 ml merilnih bučk prenesemo 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 in 6,0 ml osnovne standardne raztopine (3.6.1). Do oznake dopolnimo z mobilno fazo (3.21) in premešamo. Te raztopine imajo koncentracije 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 in 6,0 µg/ml halofuginona. Raztopine moramo pripraviti sveže pred uporabo.

3.7 Klorovodikova kislina ( $\rho_{20}$  približno 1,16 g/ml)

3.8 Metanol

3.9 Srebrov nitrat

3.10 Natrijev askorbat

3.11 Natrijev karbonat

3.12 Natrijev klorid

3.13 EDTA (etilendiamintetraocetna kislina, dinatrijeva sol)

3.14 Voda za HPLC

3.15 Raztopina natrijevega karbonata,  $\sigma = 10$  g/100 ml

3.16 Raztopina nasičenega natrijevega klorida in natrijevega karbonata,  $\sigma = 5$  g/100 ml

50 g natrijevega karbonata (3.11) raztopimo v vodi, razredčimo do 1 l in dodamo natrijev klorid (3.12), dokler raztopina ni nasičena.

3.17 Klorovodikova kislina, približno 0,1 mol/l

10 ml HCl (3.7) razredčimo z vodo do 1 l.

3.18 Raztopina amonacetatnega pufra, približno 0,25

Raztopimo 19,3 g amonijevega acetata (3.3) in 30 ml očetne kisline (3.5) v vodi (3.14) ter razredčimo do 1 l.

3.19 Priprava izmenjevalca amberlita XAD-2

Ustrezno količino amberlita (3.2) spiramo z vodo, dokler niso odstranjeni vsi kloridni ioni, kar dokazuje preskus s srebrovim nitratom (3.20) v zavrženi vodni fazi. Nato speremo izmenjevalec s 50 ml metanola (3.8), tega zavržemo in izmenjevalec hranimo v svežem metanolu.

3.20 Raztopina srebrovega nitrata, približno 0,1 mol/l

Raztopimo 0,17 g srebrovega nitrata (3.9) v 10 ml vode.

3.21 Mobilna faza HPLC

500 ml acetonitrila (3.1) zmešamo s 300 ml pufrske raztopine amonijevega acetata (3.18) in 1200 ml vode (3.14). pH naravnamo na 4,3 z uporabo očetne kisline (3.5). Filtriramo skozi 0,22 µm filter (4.8) in razplinimo raztopino (npr. deset minut v ultrazvočni kopeli). Raztopina je stabilna en mesec, če jo hranimo na temnem v zaprti posodi.

## 4. Oprema

4.1 Ultrazvočna kopel

4.2 Rotacijski uparjalnik

4.3 Centrifuga

4.4 Oprema HPLC z ultravijoličnim detektorjem z nastavitvijo valovne dolžine ali detektorjem s serijo diod.

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 300 mm × 4 mm, C 18, polnitev 10 µm ali enakovredna kolona

4.5 Steklена kolona (300 mm x 10 mm) s filtrom iz sintranega stekla in petelinčkom

4.6 Filtri iz steklenih vlaken premera 150 mm

4.7 Membranski filtri 0,45 µm

4.8 Membranski filtri 0,22 µm

## 5. Postopek

Opomba: Halofuginon kot prosta baza je nestabilen v alkalnih in etil acetatnih raztopinah. V etil acetatu ga ne smemo pustiti več kakor 30 minut.

### 5.1 Splošno

5.1.1 Analizirati moramo slepo krmo, da preverimo, da nista prisotna halofuginon oz. moteče snovi.

5.1.2 Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki smo jo obogatili z ustrežno količino halofuginona, podobno količini v vzorcu. Za obogatitev na 3 mg/kg dodamo desetim gramom slepe krme 300 µl osnovne standardne raztopine (3.6.1), premešamo in počakamo 10 minut, preden začnemo postopek ekstrakcije (5.2).

Opomba: Pri tej metodi mora biti vrsta slepe krme podobna vrsti vzorca in pri analizi ne smemo zaznati halofuginona.

### 5.2 Ekstrakcija

V 200-ml centrifugirno epruveto natehtamo, s točnostjo 0,1 g, 10 g pripravljenega vzorca, dodamo 0,5 g natrijevega askorbata (3.10), 0,5 g EDTA (3.13) in 20 ml vode ter premešamo. Epruveto postavimo za 5 min v vodno kopel (80° C). Po ohladitvi na sobno temperaturo dodamo 20 ml raztopine natrijevega karbonata (3.15) in premešamo. Takoj nato dodamo 100 ml etil acetata (3.4) in 15 sekund ročno, močno stresamo. Nato epruveto postavimo za tri minute v ultrazvočno kopel (4.1) in zrahljamo zamašek. Centrifugiramo dve minuti in dekantiramo fazo etilen acetata skozi filter iz steklenih vlaken (4.6) v 500 ml lij ločnik. Ponovimo ekstrakcijo vzorca z drugo 100 ml porcijo etil acetata. Sestavljene ekstrakte spiramo eno minuto s 50 ml raztopine nasičenega natrijevega klorida-natrijevega karbonata (3.16) in zavržemo vodno plast.

Organsko plast ekstrahiramo 1 minuto s 50 ml klorovodikove kisline (3.17). Spodnjo kislinsko plast spustimo v 250 ml lij ločnik. Ponovno ekstrahiramo organsko plast 1,5 minute z nadaljnjimi 50 ml klorovodikove kisline in ekstrakt združimo s prvim ekstraktom. Združena ekstrakta približno 10 sekund spiramo, ob vrtenju, z 10 ml etil acetata (3.4).

Kvantitativno prenesemo vodno plast v 250 ml bučko z okroglim dnom in zavržemo organsko fazo. Uparimo ves preostali etil acetat iz kisle raztopine v rotacijskem uparjalniku (2.4). Temperatura vodne kopeli ne sme preseči 40° C. Ves preostali etil acetat odstranimo v vakuumu pri približno 25 mbarih in 38° C v 5 minutah.

### 5.3 Čiščenje vzorca

#### 5.3.1 Priprava kolone z amberlitom

Kolono XAD-2 pripravimo za vsak ekstrakt vzorca. Z metanolom (3.8) prenesemo 10 g pripravljenega amberlita (3.19) v stekleno kolono (4.5). Na vrh posteljice izmenjevalca položimo majhen zamašek iz steklene volne. Metanol izpustimo iz kolone in izmenjevalec speremo s 100 ml vode tako, da tok vode ustavimo, ko vrh posteljice doseže izmenjevalec. Pustimo, da se kolona uravnoteži, ali pred uporabo počakamo 10 minut. Nikoli ne smemo dopustiti, da se kolona izsuši.

#### 5.3.2 Čiščenje vzorca

Ekstrakt (5.2) kvantitativno prenesemo na vrh pripravljene amberlitne kolone (5.3.1) in eluiramo, tako da eluat zavržemo. Hitrost eluiranja ne sme biti večja od 20 ml/min. Bučko z okroglim dnom speremo z 20 ml klorovodikove kisline (3.17) in le-to uporabimo za spiranje izmenjalne kolone. Kakršno koli preostalo raztopino kisline prepihamo z zrakom. Ostanek po izpiranju zavržemo. V kolono dodamo 100 ml metanola (3.8) in eluiramo 5 do 10 ml v 250 ml bučko z okroglim dnom. Preostali metanol pustimo 10 minut, da se uravnoteži z izmenjevalcem, in nadaljujemo eluiranje s hitrostjo, ki ni večja od 20 ml/min, s tem da eluat lovimo v isto bučko. Metanol uparimo na rotacijskem uparjalniku (4.2), pri čemer temperatura vodne kopeli ne sme preseči 40° C. Ostanek kvantitativno prenesemo z mobilno fazo (3.21) v 10 ml merilno bučko. Dopolnimo do oznake z mobilno fazo in premešamo. Alikvot prefiltriramo skozi membranski filter (4.7). Raztopino shranimo za določitev HPLC (5.4).

### 5.4 Določitev HPLC

#### 5.4.1 Parametri

Naslednji pogoji so dani kot vodila, uporabimo lahko druge pogoje, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.4.1)

Mobilna faza HPLC (3.21)

Hitrost pretoka: 1,5 do 2 ml/min

Valovna dolžina detekcije: 243 nm

Volumen vbrizga: 40 do 100 µl



Stabilnost kromatografskega sistema preverimo z večkratnim vbrizganjem raztopine za umerjanje (3.6.2), ki vsebuje 3,0 µg/ml, dokler niso dosežene stalne višine (ali površine) vrhov in retenzijskih časov.

#### 5.4.2. Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umerjanje (3.6.2) večkrat vbrizgamo in izmerimo višine (površine) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na ordinato nanašamo višine ali površine vrhov raztopin za umerjanje, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

#### 5.4.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.3.2), pri čemer uporabimo enake volumne kakor za raztopino za umerjanje, in določimo srednjo vrednost višin (površin) vrhov halofuginona.

### 6. Izračun rezultatov

Koncentracijo raztopine v µg/ml določimo iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov halofuginona raztopine vzorca iz umeritvene krivulje (5.4.2).

Vsebnost halofuginona  $w$  (mg/kg) vzorca je dana z formulo:

$$w = (c \times 10)/m$$

pri čemer je:

$c$ : koncentracija halofuginona v raztopini vzorca v µg/ml,

$m$ : masa preskušane vzorca, v gramih.

### 7. Validacija rezultatov

#### 7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z detektorjem s serijo diod, s katero primerjamo spekter ekstrakta vzorca in raztopine za umeritev (3.6.2), ki vsebuje 6,0 µg/ml.

##### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca obogatimo z dodatkom ustrezne množine raztopine za umerjanje (3.6.2). Množina dodanega halofuginona mora biti podobna ocenjeni množini halofuginona v ekstraktu vzorca.

Povišan je lahko le vrh halofuginona, potem ko smo upoštevali dodano množino, pa tudi razredčitev ekstrakta. Širina vrha na polovici maksimalne višine mora biti znotraj  $\pm 10$  % prvotne širine.

##### 7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo po naslednjih merilih:

(a) valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standardov, zabeležena na najvišji točki kromatograma, mora biti ista znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo s serijo diod je to normalno znotraj  $\pm 2$  nm;

(b) med 225 in 300 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki kromatografskega vrha, v tem delu spektra ne smejo razlikovati znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi isti in kadar na nobeni opazovani točki odmik med spektroma ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;

(c) med 225 in 300 nm se spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha, ki ju dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi isti in kadar na nobeni od opazovanih točk odmik med spektri ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke.

Če eno teh meril ni doseženo, prisotnost analita ni bila potrjena.

#### 7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme biti večja od 0,5 mg/kg za vsebnost halofuginona do 3 mg/kg.

#### 7.3 Izkoristek

Za obogateni slepi vzorec mora biti izkoristek najmanj 80 %.

### 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija<sup>1</sup> treh vzorcev, ki so bili analizirani v osmih laboratorijih.

<sup>1</sup> The Analyst 108,1983, strani od 1252 do 1256

## Rezultati

	Vzorec A (slepi) ob sprejemu	Vzorec B (moka)		Vzorec C (peleti)	
		Ob sprejemu	Po dveh mesecih	Ob sprejemu	Po dveh mesecih
Srednja vrednost <sup>(1)</sup>	n.d.	2,80	2,42	2,89	2,45
S <sub>R</sub>	-	0,45	0,43	0,40	0,42
CV <sub>R</sub>	-	16	18	14	17
Izk.		86	74	88	75

<sup>(1)</sup> enote v mg/kg

n. d.: ni zaznano

S<sub>R</sub>: standardni odmik obnovljivosti

CV<sub>R</sub> koeficient variacije (%)

Izk.: izkoristek (%)

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 93/70/EGS.

### METODA 36\*

#### DOLOČANJE ROBENIDINA

#### 1,3-bis[(4-klorobenziliden)amino] gvanidine-hidroklorid

### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo se določa robenidin v krmi. Spodnja meja določanja je 5 mg/kg.

### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z nakisanim metanolom. Ekstrakt osušimo in alikvot prečistimo na koloni iz aluminijevega oksida. Robenidin eluiramo s kolone z metanolom, koncentriramo in dopolnimo do ustreznega volumna z mobilno fazo. Vsebnost robenidina določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo in UV-detektorjem.

### 3. Reagenti

3.1 Metanol

3.2 Nakisani metanol

4,0 ml klorovodikove kisline (P<sub>20C</sub>, 1,18 g/ml) prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo do oznake z metanolom (3.1) in premešamo. Raztopino pred vsako uporabo sveže pripravimo.

3.3 Acetonitril, za HPLC

3.4 Molekularno sito

Tip 3A, kroglice 8 do 12 mesh (1,6 – 2,5 mm kroglice, kristalinični alumo-silikat, premer por 0,3 mm)

3.5 Aluminijev oksid: stopnja kislinske aktivnosti I, za kolonsko kromatografijo

V primerno posodo prenesemo 100 g aluminijevega oksida in dodamo 2,0 ml vode. Zamašimo in stresamo približno 20 minut. Hranimo v dobro zaprti posodi.

3.6 Raztopina kalijevega dihidrogenfosfata, c = 0,025 mol/l

Raztopimo 3,40 g kalijevega dihidrogenfosfata v vodi (za HPLC) v 1000 mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake in premešamo.

3.7 Raztopina di-natrijevega hidrogenfosfata, c = 0,025 mol/l

Raztopimo 3,55 g brezvodnega (ali 4,45 g dihidrata ali 8,95 g dodekahidrata) di-natrijevega hidrogenfosfata v vodi (za HPLC) v 1000 mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake in premešamo.

3.8 HPLC-mobilna faza

Zmešamo naslednje reagente:

650 ml acetonitrila (3.3),

250 ml vode (za HPLC),

50 ml raztopine kalijevega di-hidrogenfosfata (3.6),

50 ml raztopine di-natrijevega hidrogenfosfata (3.7).

Filtriramo skozi 0,22 µm filter (4.6) in razplinimo raztopino (npr. v ultrazvočni kopeli 10 min).

### 3.9 Standardna substanca

Čisti robenidin: 1,3-bis[4-klorobenziliden]amino] gvanidine hidroklorid, E 750.

#### 3.9.1 Osnovna standardna raztopina robenidina: 300 µg/ml:

Natehtamo 30 mg standardne substance robenidina (3.9) s točnostjo 0,1 mg. Raztopimo v nakisanem metanolu (3.2) v 100 mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake z istim topilom in premešamo. Bučko ovijemo v aluminijevo folijo in jo hranimo v temi.

#### 3.9.2 Vmesna standardna raztopina robenidina: 12 µg/ml

10 ml osnovne standardne raztopine robenidina (3.9.1) prenesemo v 250 mililitrsko merilno bučko, napolnimo do oznake z mobilno fazo (3.8) in premešamo. Bučko ovijemo v aluminijevo folijo in hranimo v temi.

#### 3.9.3 Raztopine za umeritev

V serijo 50 mililitrskih merilnih bučk prenesemo 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 in 25,0 ml vmesne standardne raztopine (3.9.2). Z mobilno fazo (3.8) dopolnimo do oznake in premešamo. Te raztopine ustrezajo koncentracijam 1,2; 2,4; 3,6; 4,8 in 6,0 µg/ml robenidina. Raztopine moramo pripraviti sveže pred uporabo.

## 4. Oprema

### 4.1 Steklena kolona

Iz temnega stekla, s petelinčkom in rezervoarjem s kapaciteto približno 150 ml, notranji premer 10 do 15 mm, dolžina 250 mm.

### 4.2 Laboratorijski stresalnik

### 4.3 Rotacijski uparjalnik

4.4 Oprema HPLC z ultravijoličnim detektorjem ali detektorjem s serijo diod, z nastavljivo valovno dolžino v območju od 250 do 400 nm

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 300 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, polnitev 10 µm ali enakovredna

4.5 Filtrirni papir iz steklenih vlaken (Whatman GF/A ali enakovreden)

4.6 Membranski filtri, 0,22 µm

4.7 Membranski filtri, 0,45 µm

## 5. Postopek

Opomba: Robenidin je občutljiv na svetlobo. Pri vseh operacijah moramo uporabljati temno steklovino.

### 5.1 Splošno

5.1.1 Slepo krmo je treba z analizo preveriti, da ni prisoten niti robenidin niti moteče substance.

5.1.2 Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki ji je bila dodana količina robenidina, podobna količini v vzorcu. Za obogatitev na vrednost 60 mg/kg prenesemo 3,0 ml osnovne standardne raztopine (3.9.1) v 250 mililitrsko erlenmajerico in jo uparimo v toku dušika do približno 0,5 ml, dodamo 15 g slepe krme, premešamo in počakamo 10 min, preden začnemo s postopkom ekstrakcije (5.2).

Opomba: Za namen te metode mora biti slepa krma podobna vrsti vzorca in pri analizi ne smemo zaznati robenidina.

### 5.2 Ekstrakcija

Natehtamo približno 15 g pripravljenega vzorca s točnostjo 0,01 g. Prenesemo v 250 mililitrsko erlenmajerico in dodamo 100,0 ml nakisanega metanola (3.2), zamašimo in stresamo eno uro na stresalniku (4.2). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.5) v 150 mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 7,5 molekularnega sita (3.4), zamašimo in stresamo pet minut. Takoj filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken. Raztopino zadržimo za fazo čiščenja (5.3).

### 5.3 Čiščenje

#### 5.3.1 Priprava kolone z aluminijevim oksidom

V spodnji del steklene kolone vstavimo zamašek iz steklene volne (4.1) in ga potlačimo s stekleno palčko. Natehtamo 11,0 g pripravljenega aluminijevega oksida in ga prenesemo v kolono. Pazimo, da je pri tem postopku čim manj izpostavljen atmosferi. Rahlo udarjamo po spodnjem delu polne kolone, da se aluminijev oksid sesede.

#### 5.3.2 Čiščenje vzorca

Na kolono s pipeto prenesemo 5,0 ml ekstrakta vzorca, pripravljenega v (5.2). Pipeto naslonimo na steno kolone in pustimo, da se raztopina absorbira na aluminijevem oksidu. Robenidin eluiramo iz kolone s 100 ml metanola (3.1) s hitrostjo pretoka 2 do 3 ml/min in eluat lovimo v 250 mililitrsko bučko z okroglim dnom. Metanolno raztopino uparimo do suhega pri znižanem tlaku pri 40° C v rotacijskem uparjalniku (4.3). Ostanek raztopimo v 3 do 4 ml mobilne faze (3.8) in ga kvantitativno prenesemo v 10 mililitrsko merilno bučko. Bučko nekolikokrat speremo z 1 do 2 ml mobilne faze, ki ju

prenesemo v merilno bučko. Napolnimo do oznake z istim topilom in premešamo. Alikvot filtriramo skozi 0,45 µm (4.7). S to raztopino izvedemo HPLC-določitev (5.4).

#### 5.4 HPLC-določitev

##### 5.4.1 Parametri

Navedeni pogoji so podani kot vodila, uporabimo lahko tudi druge pogoje, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.4.1)

HPLC-mobilna faza (3.8)

Hitrost pretoka: 1,5 – 2 ml/min.

Valovna dolžina detekcije: 317 nm

Volumen vbrizga: 20 do 50 µl.

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo z večkratnim vbrizgavanjem raztopine za umeritev (3.9.3), ki vsebuje 3,6 µg/ml, dokler ne dobimo konstantnih višin vrhov in retenzijskih časov.

##### 5.4.2 Umeritvena krivulja

Večkrat vbrizgamo raztopino za umerjanje (3.9.3) in merimo višine (površine) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na ordinato nanašamo srednje vrednosti višin ali površin vrhov raztopin za umerjanje, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

##### 5.4.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.3.2), uporabljajoč enake volumne, kakor smo jih uporabili pri raztopini za umerjanje, in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov robenidina.

## 6. Izračun rezultatov

Koncentracijo raztopine vzorca v µg/ml določimo iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov robenidina iz umeritvene krivulje (5.4.2).

Vsebnost robenidina  $w$  (mg/kg) v vzorcu je podana z naslednjo enačbo:

$$w = (c \times 200)/m$$

pri čemer je:

$c$  = koncentracija robenidina v raztopini vzorca, v µg/ml,

$m$  = masa preskusnega vzorca, v gramih.

## 7. Validacija rezultatov

### 7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z detektorjem s serijo diod, pri čemer primerjamo spekter ekstrakta vzorca (3.9.3) in raztopine za umerjanje, ki vsebuje 6,0 µg/ml.

#### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca obogatimo z dodatkom primerne množine raztopine za umeritev (3.9.3). Množina dodanega robenidina mora biti podobna ocenjeni množini robenidina, prisotni v ekstraktu vzorca.

Povišana je lahko le višina vrha robenidina, potem ko smo upoštevali tako dodano množino kakor tudi razredčitev ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove največje višine mora biti v mejah približno 10 % prvotne širine.

#### 7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednje kriterije:

(a) Valovna dolžina največje absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha kromatograma, mora biti ista znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo s serijo diod je to ponavadi v območju približno 2 nm;

(b) Med 250 in 400 nm se spektri vzorca in standarda na najvišji točki kromatografskega vrha v tem delu spektra ne smejo razlikovati znotraj območja od 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in razlika med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;

(c) Med 250 in 400 nm se spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in ko odmik med spektri na nobeni od opazovanih točk ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke.

Če eden od teh kriterijev ni izpolnjen, prisotnost analita ni bila potrjena.

### 7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, ki se izvedeta na istem vzorcu, ne sme presegati 10 % od višjega rezultata za vsebnost robenidina nad 15 mg/kg.

### 7.3 Izkoristek

Za obogateni slepi vzorec mora biti izkoristek najmanj 85 %.

## 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

V Skupnosti je bila organizirana medlaboratorijska primerjalna študija štirih vzorcev perutninske in kunčje krme v prahu in briketih, ki so bili analizirani v dvanajstih laboratorijih. Vsak vzorec je bil analiziran dvakrat. Rezultati so zbrani v spodnji preglednici:

	Perutnina		Kunci	
	Moka	Peleti	Moka	Peleti
Srednja vrednost mg/kg	27,00	27,99	43,6	40,1
S <sub>r</sub> (mg/kg)	1,46	1,26	1,44	1,66
CV <sub>r</sub> (%)	5,4	4,5	3,3	4,1
S <sub>R</sub> (mg/kg)	4,36	3,36	4,61	3,91
CV <sub>R</sub> (%)	16,1	12,0	10,6	9,7
Obnovitev (%)	90,0	93,3	87,2	80,2

S<sub>r</sub> = standardni odmik ponovljivosti

CV<sub>r</sub> = koeficient variacije ponovljivosti

S<sub>R</sub> = standardni odmik obnovljivosti

CV<sub>R</sub> = koeficient variacije obnovljivosti

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 93/117/ES.

## METODA 37\*

### DOLOČANJE METIL BENZOKVATA

#### 7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-quinolon

### 1. Namen in področje uporabe

Z opisano metodo se določa metil benzokvat v krmi. Spodnja meja določanja je 1 mg/kg.

### 2. Princip

Metil benzokvat ekstrahiramo iz vzorca z raztopino metanol metansulfonske kisline. Ekstrakt prečistimo z diklorometanom z ionsko izmenjalno kromatografijo, nato ponovno z diklorometanom. Vsebnost metil benzokvata določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo in UV-detektorjem.

### 3. Reagenti

3.1 Diklorometan

3.2 Metanol, za HPLC

3.3 HPLC-mobilna faza:

mešanica metanola (3.2) in vode (za HPLC) 75 + 25 (v + v).

Filtriramo skozi 0,22 µm filter (4.5) in razplinimo raztopino (npr. 10 minut v ultrazvočni kopeli).

3.4 Raztopina metansulfonske kisline,  $\sigma = 2 \%$

Razredčimo 20,0 ml metansulfonske kisline do 1 000 ml z metanolom (3.2).

3.5 Raztopina klorovodikove kisline,  $\sigma = 10 \%$

Razredčimo 100 ml klorovodikove kisline (P<sub>20</sub> c. 1,18 g/ml) do 1 000 ml z vodo.

3.6 Kationsko izmenjalna smola amberlit CG-120 (Na), 100 do 200 mesh

Smolo pred uporabo obdelamo: 100 g smole suspendiramo v 500 ml raztopine klorovodikove kisline (3.5) in med neprestanim mešanjem segrejemo na vroči plošči do vrenja. Ohladimo in dekantiramo kislino. Filtriramo skozi papirni filter pod vakuumom. Dvakrat speremo smolo s po 500 ml vode, nato z 250 ml metanola (3.2). Nato jo še enkrat

speremo z 250 ml metanola in osušimo z zrakom, ki prehaja skozi filtrirano pogačo. Suho smolo hranimo v zaprti steklenici.

3.7 Standardna substanca: čisti metil benzokvat (7-benziloksi-6-butil-3-metoksikarbonil-4-quinolon)

3.7.1 Standardna osnovna raztopina metil benzokvata, 500 µg/ml

Natehtamo s točnostjo 0,1 mg 50 mg standardne substance (3.7), raztopimo v metansulfonski kislini (3.4) v 100 mililitrski merilni bučki, napolnimo do oznake in premešamo.

3.7.2 Vmesna standardna raztopina metil benzokvata: 50 µg/ml

5,0 ml osnovne standardne raztopine metil benzokvata (3.7.1) prenesemo v 50 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo do oznake z metanolom (3.2) in premešamo.

3.7.3 Umeritvene raztopine

V serijo 25 mililitrskih merilnih bučk prenesemo 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 in 5,0 ml vmesne standardne raztopine metil benzokvata (3.7.2). Dopolnimo do oznake z mobilno fazo (3.3) in premešamo. Te raztopine imajo koncentracije 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 in 10,0 µg/ml metil benzokvata. Raztopine moramo pripraviti sveže pred uporabo.

## 4. Oprema

4.1 Laboratorijski stresalnik

4.2 Rotacijski uparjalnik

4.3 Steklena kolona (250 mm x 15 mm) s petelinčkom in kapaciteto rezervoarja približno 200 ml.

4.4 HPLC-oprema z ultravijoličnim detektorjem z nastavljivo valovno dolžino ali detektorjem s serijo diod

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo, 300 mm x 4 mm, C-18, polnitev 10 µm ali enakovredna

4.5 Membranski filtri, 0,22 µm

4.6 Membranski filtri, 0,45 µm.

## 5. Postopek

5.1 Splošno

5.1.1 Slepo krmo je treba z analizo preveriti, da nista prisotna niti metil benzokvat niti moteče substance.

5.1.2 Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki smo ji dodali metil benzokvat v količini, podobni količini metil benzokvata v vzorcu. Za obogatitev na vsebnost 15 mg/kg dodamo 600 µl osnovne standardne raztopine (3.7.1) v 20 g slepe krme, premešamo in počakamo 10 minut, preden nadaljujemo s postopkom ekstrakcije (5.2).

Opomba: Po tej metodi mora biti slepa krma podobna vrsti vzorca in pri analizi ne smemo zaznati metil benzokvata.

5.2 Ekstrakcija

Natehtamo približno 20 g pripravljenega vzorca s točnostjo 0,01 g in ga prenesemo v 250 mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 100,0 ml raztopine metansulfonske kisline (3.4) in mehansko (4.1) stresamo 30 minut. Raztopino filtriramo skozi papirni filter in ohranimo filtrat za postopek ločevanja tekočina-tekočina (5.3).

5.3 Ločevanje tekočina-tekočina

V 500 mililitrski lij ločnik, v katerem je 100 ml raztopine klorovodikove kisline (3.5), prenesemo 25,0 ml filtrata, dobljenega pod (5.2). V lij dodamo 100 ml diklorometana (3.1) in stresamo eno minuto. Počakamo, da se plasti ločijo, in odlijemo spodnjo (diklorometansko) plast v 500 mililitrsko bučko z okroglim dnom. Ponovimo ekstrakcijo vodne faze z dvema nadaljnjima 40 mililitrskima porcijama diklorometana, ki ju priključimo prvemu ekstraktu v bučki z okroglim dnom. Uparimo ekstrakt diklorometana do suhega v rotacijskem uparjalniku (4.2) pri znižanem tlaku in 40° C. Ostanek raztopimo v 20 do 25 ml metanola (3.2), bučko zamašimo in ves ekstrakt hranimo za ionsko izmenjalno kromatografijo (5.4).

5.4 Ionsko izmenjalna kromatografija

5.4.1 Priprava kationsko izmenjalne kolone

V spodnji del steklene kolone (4.3) vstavimo zamašek iz steklene volne. Pripravimo suspenzijo s 5,0 g obdelane kationsko izmenjalne smole (3.6) in 50 ml klorovodikove kisline (3.5) in jo vlijemo v stekleno kolono ter počakamo, da se sesede. Presežek kisline odstranimo do višine tik nad površino smole, nato spiramo kolono z vodo do nevtralne reakcije eluata na lakmusov papir. 50 ml metanola (3.2) prenesemo v kolono in pustimo, da prodre na površino smole.

5.4.2 Kolonska kromatografija

S pipeto pazljivo prenesemo v (5.3) dobljeni ekstrakt na kolono. Bučko z okroglim dnom dvakrat speremo s 5 do 10 ml metanola (3.2), ki jih prenesemo na kolono. Ekstrakt spustimo do površine smole in speremo kolono s 50 ml metanola, pri čemer hitrost pretoka ne sme preseči 5 ml na minuto. Eluat zavržemo. Metil benzokvat eluiramo iz kolone s 150 ml raztopine metansulfonske kisline (3.4) v 250 mililitrsko erlenmajerico.

5.5 Ločevanje tekočina-tekočina

Eluat, dobljen v (5.4.2), prenesemo v 1 litrski lij ločnik. Erlenmajerico speremo s 5 do 10 ml metanola (3.2), ki ga združimo z vsebino v liju ločniku. Dodamo 300 ml raztopine klorovodikove kisline (3.5) in 130 ml diklorometana (3.1). Stresamo 1 minuto in pustimo, da se fazi ločita. Odtočimo spodnjo (diklorometansko) plast v 500 mililitrsko bučko z okroglim dnom. Ponovimo ekstrakcijo vodne faze z dvema nadaljnjima volumnoma po 70 ml diklorometana in oba ekstrakta združimo s prvimi v bučki z okroglim dnom.

Ekstrakt diklorometana uparimo do suhega v rotacijskem uparjalniku (4.2) pri znižanem tlaku in 40° C. Ostanek v bučki raztopimo v približno 5 ml metanola (3.2) in prenesemo raztopino kvantitativno v 10 mililitrsko merilno bučko. Bučko z okroglim dnom speremo dvakrat s po 1 do 2 ml metanola, in to prenesemo v merilno bučko. Napolnimo do oznake z metanolom in premešamo. Alikvot filtriramo skozi membranski filter (4.6). Raztopino hranimo za HPLC-določitev (5.6).

## 5.6 HPLC-določitev

### 5.6.1 Parametri

Navedeni pogoji so podani kot smernice, lahko se uporabijo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate:

- Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.4.1)
- HPLC-mobilna faza: mešanica metanol-voda (3.3)
- Hitrost pretoka: 1 do 1,5 ml/min.
- Valovna dolžina detekcije: 265 nm
- Volumen vbrizga: od 20 do 50 µl.

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo z večkratnim vbrizganjem raztopine za umeritev (3.7.3), ki vsebuje 4,0 µg/ml, dokler ne dobimo konstantnih višin ali površin vrhov in retenzijskih časov.

### 5.6.2 Umeritvena krivulja

Večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.7.3) in izmerimo višine (površine) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da na ordinato nanašamo srednje vrednosti višin ali površin vrhov raztopin za umeritev, na absciso pa ustrezne koncentracije v µg/ml.

### 5.6.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.5) in pri tem uporabljamo enake volumne kakor pri raztopini za umeritev ter določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov metil benzokvata.

## 6. Izračun rezultatov

Koncentracijo raztopine vzorca v µg/ml določimo iz srednjih vrednosti vrhov (površin) metil benzokvata iz umeritvene krivulje (5.6.2).

Vsebnost metil benzokvata  $w$  (mg/kg) v vzorcu je podana z naslednjo formulo:

$$w = (c \times 40) / m$$

pri čemer je:

$c$  = koncentracija metil benzokvata v raztopini vzorca, v µg/ml,

$m$  = masa preskusnega vzorca, v gramih.

## 7. Validacija rezultatov

### 7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z detektorjem s serijo diod, s katerim primerjamo spekter ekstrakta vzorca in raztopine za umeritev (3.7.3.), ki vsebuje 10,0 µg/ml.

#### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca obogatimo z dodatkom ustrezne množine vmesne standardne raztopine (3.7.2). Množina dodanega metil benzokvata mora biti podobna ovrednoteni množini metil benzokvata iz ekstrakta vzorca.

Povišan je lahko le vrh metil benzokvata, potem ko smo upoštevali tako dodano množino kakor tudi razredčitev ekstrakta. Širina vrha na polovici največje višine mora biti približno znotraj 10 % prvotne širine.

#### 7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednje kriterije:

(a) valovna dolžina največje absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki kromatograma, mora biti enaka znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Za detekcijo s serijo diod je to navadno v območju približno 2 nm;

(b) med 220 in 350 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha kromatograma, v tem delu spektra ne smejo razlikovati znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in kadar odmik med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne preseže 15 % absorbance standardnega analita;

(c) med 220 in 350 nm se spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha, ki ga dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj znotraj območja 10 do 100 % relativne absorbance. Ta kriterij je izpolnjen, kadar so prisotni isti maksimumi in kadar odmik med spektri na nobeni od opazovanih točk ne preseže 15 % absorbance spektra najvišje točke.

Če eden od teh kriterijev ni izpolnjen, prisotnost analita ni bila potrjena.

## 7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme biti večja od 10 % glede na višji rezultat za vsebnost metil benzokvata med 4 in 20 mg/kg.

## 7.3 Izkoristek

Za obogateni slepi vzorec mora biti izkoristek najmanj 90 %.

## 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

V desetih laboratorijih so analizirali pet vzorcev. Vsak vzorec je bil analiziran dvakrat.

### Rezultati

	Slepi	Moka 1	Peleti 1	Moka 2	Peleti 2
Srednja vrednost mg/kg	n.d.	4,50	4,50	8,90	8,70
S <sub>r</sub> (mg/kg)	-	0,30	0,20	0,60	0,50
CV <sub>r</sub> (%)	-	6,70	4,40	6,70	5,70
S <sub>R</sub> (mg/kg)	-	0,40	0,50	0,90	1,00
CV <sub>R</sub> (%)	-	8,90	11,10	10,10	11,50
Obnovitev (%)	-	92,00	93,00	92,00	89,00

n.d. ni zaznano

S<sub>r</sub> = standardni odmik ponovljivosti

CV<sub>r</sub> = koeficient variacije ponovljivosti

S<sub>R</sub> = standardni odmik obnovljivosti

CV<sub>R</sub> = koeficient variacije obnovljivosti

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 93/117/ES.

### METODA 38\*

#### DOLOČANJE OLAKVINDOKSA

#### (2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoi]-3-metilkinoksalin-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioksid)

### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda je namenjena določanju vsebnosti olakvindoksa v krmi. Spodnja meja določanja je 5 mg/kg.

### 2. Princip

Vzorec ekstrahira z mešanico vode in metanola. Vsebnost olakvindoksa določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo UV-detektorja.

### 3. Reagenti

3.1 Metanol

3.2 Metanol za HPLC

3.3 Voda za HPLC

3.4 Mobilna faza za HPLC:

Mešanica vode (3.3) in metanola (3.2), 900 + 100 (V + V).

3.5 Standardna substanca: čisti olakvindoks 2-[N-2'-(hidroksietil)karbamoi]-3-metilkinoksalin-N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioksid, E 851



### 3.5.1 Osnovna standardna raztopina olakvindoksa, 250 µg/ml

Natehtamo 50 mg olakvindoksa (3.5) s točnostjo 0,1 mg, prenesemo v merilno bučko in dodamo približno 190 ml vode. Bučko postavimo za 20 minut v ultrazvočno kopel (4.1). Po ultrazvočni obdelavi raztopino segrejemo do sobne temperature, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevi folijo in jo shranimo v hladilnik. Raztopino moramo pripraviti svežo vsak mesec.

### 3.5.2 Vmesna standardna raztopina olakvindoksa, 25 µg/ml

Prenesemo 10,0 ml osnovne standardne raztopine (3.5.1) v 100 mililitrsko merilno bučko, dodamo do oznake mobilno fazo (3.4) in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevi folijo in jo shranimo v hladilnik. Raztopino moramo pripraviti svežo vsak dan.

### 3.5.3 Raztopine za umeritev:

V več 50 mililitrskih merilnih bučk prenesemo 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 in 20,0 ml vmesne standardne raztopine (3.5.2). Do oznake dopolnimo z mobilno fazo (3.4) in premešamo. Bučke ovijemo z aluminijevo folijo. Te raztopine ustrezajo 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 in 10,0 µg olakvindoksa na ml.

Raztopine moramo pripraviti sveže vsak dan.

## 4. Oprema

### 4.1 Ultrazvočna kopel

### 4.2 Mehanski stresalnik

### 4.3 Oprema HPLC z detektorjem ultravijolične svetlobe z nastavitvijo valovnih dolžin ali detektor s serijo diod

#### 4.3.1 Tekočinska kromatografska kolona, 250 mm x 4 mm, C18, 10 µm polnitev, ali enakovredna

#### 4.4 Membranski filtri 0,45 µm

## 5. Postopek

Opomba: Olakvindoks je občutljiv na svetlobo. Vse postopke izvajamo v temnem ali pa uporabljamo posode iz rjavega stekla.

### 5.1 Splošno

5.1.1 Analizirati moramo slepo krmo, da preverimo, da ni prisoten niti olakvindoks niti moteče substance.

5.1.2 Izvedemo preskus izkoristka z analizo slepe krme, ki smo jo obogatili s količino olakvindoksa, podobno količini v vzorcu. Za obogatitev s koncentracijo 50 mg/kg prenesemo 10,0 ml osnovne standardne raztopine (3.5.1) v 250 mililitrsko erlenmajerico in uparimo raztopino do približno 0,5 ml. Dodamo 50 g slepe krme, temeljito premešamo in pustimo stati 10 minut. Preden nadaljujemo ekstrakcijo (5.2), ponovno večkrat premešamo.

Opomba: Za to metodo mora biti slepa krma podobna vrsti krme vzorca in v njej ne smemo zaznati prisotnosti olakvindoksa.

### 5.2 Ekstrakcija

Približno 50 g vzorca natehtamo s točnostjo 0,01 g. Prenesemo ga v 1000 mililitrsko erlenmajerico, dodamo 100 ml metanola (3.1) in postavimo erlenmajerico za 5 minut v ultrazvočno kopel (4.1). Dodamo 410 ml vode in pustimo še 15 minut v ultrazvočni kopeli. Bučko odstranimo iz ultrazvočne kopeli, jo 30 minut stresamo s stresalnikom (4.2) in nato filtriramo skozi naguban filter. 10,0 ml filtrata prenesemo v 20 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Alikvot prefiltriramo skozi membranski filter (4.4). (glej opombo v 9). Nadaljujemo določanje s pomočjo HPLC (5.3).

### 5.3 Določanje s HPLC

#### 5.3.1 Parametri:

Naslednji pogoji so navedeni kot vodilo, uporabljajo se lahko tudi drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Analitska kolona (4.3.1)

Mobilna faza (3.4): mešanica vode (3.3) – metanola (3.2), 900 + 100 (V + V)

Hitrost pretoka: 1,5-2 ml/min.

Valovna dolžina detekcije: 380 nm

Volumen vbrizga: 20 µl-100 µl

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.5.3), ki vsebuje 2,5 µg/ml, dokler niso dosežene konstantne višine vrhov in retenzijskih časov.

#### 5.3.2 Umeritvena krivulja

Večkrat vbrizgamo vsako raztopino za umeritev (3.5.3) in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da naneseemo srednje vrednosti višin (površin) vrhov raztopin za umeritev na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

#### 5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakt vzorca (5.2) in pri tem uporabimo enake volumne, kot smo jih uporabili pri raztopinah za umeritev, ter določimo srednjo vrednost višine (površine) vrha olakvindoksa.

## 6. Izračun rezultatov

Koncentracijo raztopine vzorca v  $\mu\text{g/ml}$  določimo (5.3.2) iz srednje vrednosti višine (površine) vrha olakvindoksa v raztopini vzorca iz umeritvene krivulje.

Vsebnost olakvindoksa v vzorcu  $w$  v  $\text{mg/kg}$  ima naslednjo formulo:

$$w = (c \times 1000) / m$$

pri čemer je:

$c$  = koncentracija olakvindoksa v ekstraktu vzorca (5.2) v  $\mu\text{g/ml}$

$m$  = masa preskusnega vzorca v  $\text{g}$  (5.2).

## 7. Validacija rezultatov

### 7.1 Identiteta

Identiteto analiziranega vzorca lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporabo detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca (5.2) in raztopine za umeritev (3.5.3), ki vsebuje  $5,0 \mu\text{g/ml}$ .

#### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt (5.2) obogatimo z dodatkom ustrezne množine raztopine za umeritev (3.5.3). Množina dodanega olakvindoksa naj bo podobna množini olakvindoksa v ekstraktu vzorca.

Zvišana je lahko edino višina vrha olakvindoksa ob upoštevanju dodane množine in razredčitve ekstrakta. Širina vrha mora biti na polovici njegove višine znotraj  $\pm 10\%$  prvotne širine vrha olakvindoksa v neobogatenem ekstraktu vzorca.

#### 7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultat ocenimo v skladu z naslednjimi merili

(a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeleženih na najvišji točki vrha na kromatogramu mora biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Pri detekciji s serijo diod je to navadno  $\pm 2 \text{ nm}$ .

(b) Spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, se v delih spektra med  $220$  in  $400 \text{ nm}$  v območju  $10$ - $100\%$  relativne absorbanca, ne smejo razlikovati. To merilo je izpolnjeno, če so prisotni isti maksimumi in če odstopanje med dvema spektroma na nobeni opazovani točki ne presega  $15\%$  absorbanca standardnega analita.

(c) Spektri naraščanja, najvišje točke in padanja vrha ekstrakta vzorca se v delih spektra med  $220$  in  $400 \text{ nm}$  v območju  $10$ - $100\%$  relativne absorbanca ne smejo razlikovati. To merilo je izpolnjeno, če so prisotni isti maksimumi in če odstopanje med dvema spektroma na nobeni opazovani točki na presega  $15\%$  absorbanca spektra na najvišji točki vrha.

Če eno od teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analiziranega vzorca ni potrjena.

### 7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati  $15\%$  relativno glede na višji rezultat za vsebnost olakvindoksa med  $10$  in  $20 \text{ mg/kg}$ .

### 7.3 Izkoristek

V obogatenem slepem vzorcu mora biti izkoristek najmanj  $90\%$ .

## 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

V EU je bila izvedena medlaboratorijska primerjalna študija, v kateri so v do 13 laboratorijih analizirali štiri različne vrste krme za pujske, med katerimi je bila tudi slepa krma. Rezultati so prikazani spodaj:

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4
L	13	10	11	11
n	40	40	44	44
Srednja vrednost (mg/kg)	-	14,6	48,0	95,4
(S <sub>r</sub> ) (mg/kg)	-	0,82	2,05	6,36
(S <sub>R</sub> ) (mg/kg)	-	1,62	4,28	8,42
CV <sub>r</sub> (%)	-	5,6	4,3	6,7
CV <sub>R</sub> (%)	-	11,1	8,9	8,8
Nominalna vsebnost (mg/kg)	-	15	50	100
Izkoristek (%)	-	97,3	96,0	95,4

L: število laboratorijev

n: število posamičnih vrednosti  
S<sub>r</sub> = standardni odmik ponovljivosti  
S<sub>R</sub> = standardni odmik obnovljivosti  
CV<sub>r</sub> = koeficient variacije ponovljivosti  
CV<sub>R</sub> = koeficient variacije obnovljivosti

## 9. Opomba

Čeprav metoda ni bila validirana za krmo, ki vsebujejo več kot 100 mg/kg olakvindoksa, je mogoče dobiti zadovoljive rezultate tako, da uporabimo manjšo maso vzorca in/ali razredčimo ekstrakt (5.2), tako da dobimo koncentracijo v območju umeritvene krivulje (5.3.2).

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive Komisije 98/64/ES.

## METODA 39\* DOLOČANJE AMPROLA

### 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridin klorid hidroklorid

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo določamo vsebnost amprola v krmi in premiksih. Meja zaznavanja je 1 mg/kg, meja določanja pa 25 mg/kg.

#### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo z mešanico metanola in vode. Po redčenju z mobilno fazo in membransko filtracijo vsebnost amprola določimo s kationsko izmenjevalno tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z uporabo detektorja UV.

#### 3. Reagenti

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitril, za HPLC.

3.3 Voda, za HPLC.

3.4 Raztopina natrijevega dihidrogen fosfata, c = 0,1 mol/l

V 1000 mililitrski merilni bučki v vodi (3.3) raztopimo 13,80 g natrijevega dihidrogen fosfata monohidrata, dopolnimo z vodo (3.3) do oznake in premešamo.

3.5 Raztopina natrijevega perklorata, c = 1,6 mol/l

V 1000 mililitrski merilni bučki v vodi (3.3) raztopimo 224,74 g natrijevega perklorata monohidrata, dopolnimo z vodo (3.3) do oznake in premešamo.

3.6 Mobilna faza za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (glej opombo 9.1).

Mešanica acetonitrila (3.2), raztopine natrijevega dihidrogen fosfata (3.4) in raztopine natrijevega perklorata (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v). Pred uporabo filtriramo z membranskim filtrom 0,22 µm (4.3) in raztopino razplinimo (npr. najmanj 15 minut v ultrazvočni kopeli (4.4)).

3.7 Standardna substanca: čisti amprol, 1-[(4-amino-2-propilpirimidin-5-il)metil]-2-metil-piridin klorid hidroklorid, E 750 (glej 9.2).

3.7.1 Osnovna standardna raztopina amprola, 500 µg/ml

S točnostjo 0,1 mg natehemo 50 mg amprola (3.7) v 100 mililitrsko merilno bučko, raztopimo v 80 ml metanola (3.1) in bučko za 10 minut postavimo v ultrazvočno kopel (4.4). Po ultrazvočni obdelavi ohladimo raztopino na sobno temperaturo, dopolnimo z vodo do oznake in premešamo. Pri temperaturi ≤4° C je raztopina stabilna en mesec.

3.7.2 Vmesna standardna raztopina amprola, 50 µg/ml

Odpipetiramo 5 ml osnovne standardne raztopine (3.7.1) v 50 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z ekstrakcijskim topilom (3.8) do oznake in premešamo. Pri temperaturi ≤4° C je raztopina stabilna en mesec.

3.7.3 Raztopine za umeritev

V serijo 50 ml merilnih bučk odpipetiramo 0,5; 1 in 2 ml vmesne standardne raztopine (3.7.2). Bučke dopolnimo do oznake z mobilno fazo (3.6) in premešamo. Te raztopine ustrezajo 0,5; 1 in 2 µg amprola na mililiter. Pripravimo jih sveže pred uporabo.

3.8 Ekstrakcijsko topilo

Mešanica vode in metanola (3.1) 2 + 1 (v + v).

## 4. Oprema

4.1 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) s sistemom za vbrizgavanje, primernim za vbrizgavanje volumnov 100 µl.

4.1.1 Kromatografske tekočinske kolone 125mm x 4mm, kationski izmenjevalec Nucleosil 10 SA, polnitev 10 µm ali ekvivalentna.

4.1.2 Detektor UV z nastavljivo valovno dolžino ali detektor s serijo diod.

4.2 Membranski filter, material PTFE, 0,45 µm.

4.3 Membranski filter, 0,22 µm.

4.4 Ultrazvočna kopel.

4.5 Mehanski stresalnik ali magnetno mešalo.

## 5. Postopek

### 5.1 Splošno

#### 5.1.1 Slepa krma

Za zmogljivost izkoristka (5.1.2) analiziramo slepo krmo, da preverimo, ali niso prisotni niti amproli niti moteče substance. Slepa krma mora biti podobna krmi vzorca in v njej ne smemo zaznati niti amprola niti motečih snovi.

#### 5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme, ki smo ji dodali določeno količino amprola, podobno vsebnosti v vzorcu. Za obogatitev pri 100 mg/kg amprola prenesemo 10 ml osnovne standardne raztopine (3.7.1) v 250 mililitrsko erlenmajerico in izparimo raztopino do približno 0,5 ml. Dodamo 50 g slepe krme, dobro premešamo, pustimo 10 minut in pri tem večkrat premešamo, preden nadaljujemo z ekstrakcijo (5.2).

Če nimamo slepe krme, ki bi bila podobna krmi vzorca (glej 5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo z metodo standardnega dodatka. V tem primeru vzorcu za analizo dodamo toliko amprola, kolikor ga je v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z vzorcem brez dodanega amprola, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

### 5.2 Ekstrakcija

#### 5.2.1 Premiksi (vsebnost amprola <1 %) in krma

V 500 mililitrsko erlenmajerico natehtamo s točnostjo 0,01 g 5 do 40 g vzorca, glede na vsebnost amprola, in dodamo 200 ml ekstrakcijskega topila (3.8). Erlenmajerico postavimo v ultrazvočno kopel (4.4) in jo pustimo v njej 15 minut. Nato jo odstranimo iz ultrazvočne kopeli in 1 uro stresamo s stresalnikom ali mešamo z magnetnim mešalom (4.5). Alikvot ekstrakta razredčimo z mobilno fazo (3.6), da dobimo vsebnost amprola od 0,5 do 2 µg/ml in premešamo (glej opombo 9.3). Nato 5 do 10 ml tako razredčene raztopine filtriramo skozi membranski filter (4.2). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

#### 5.2.2 Premiksi (vsebnost amprola ≥1 %)

V 500 mililitrsko erlenmajerico natehtamo s točnostjo 0,001 g 1 do 4 g premiksa, glede na vsebnost amprola, in dodamo 200 ml ekstrakcijskega topila (3.8). Erlenmajerico postavimo v ultrazvočno kopel (4.4) in jo pustimo v njej 15 minut. Nato jo odstranimo iz ultrazvočne kopeli in 1 uro stresamo s stresalnikom ali mešamo z magnetnim mešalom (4.5). Alikvot ekstrakta razredčimo z mobilno fazo (3.6), da dobimo vsebnost amprola od 0,5 do 2 µg/ml in premešamo. Nato 5 do 10 ml tako razredčene raztopine filtriramo skozi membranski filter (4.2). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

### 5.3 Določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

#### 5.3.1 Parametri:

Navedeni pogoji so podani kot vodilo, lahko se uporabljajo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Tekočinska kromatografska kolona (4.1.1): 125 mm x 4 mm, kationski izmenjevalec Nucleosil 10 SA, polnitev 10 µm ali ekvivalent.

Mobilna faza (3.6): Mešanica acetonitrila (3.2), raztopine natrijevega dihidrogen fosfata (3.4) in raztopine natrijevega perklorata (3.5), 450 + 450 + 100 (v + v + v).

Pretok: 0,7 do 1 ml/min.

Valovna dolžina: 264 nm.

Volumen vbrizga: 100 µl.

Preverimo stabilnost kromatografskega sistema tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.7.3), ki vsebuje 1,0 µg/ml, dokler ne dosežemo konstantnih višin vrhov in retenzijskih časov.

#### 5.3.2 Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umeritev (3.7.3) večkrat vbrizgamo in določimo srednjo vrednost višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da srednje vrednosti višin (površin) vrhov raztopin za umeritev nanašamo na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

#### 5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo enake volumne ekstrakta vzorca (5.2), kakršne smo uporabili za raztopine za umeritev, in določimo povprečno višino (površino) vrhov amprola.

## 6. Izračun rezultatov

Iz srednje vrednosti višine (površine) vrhov amprola v raztopini vzorca določimo koncentracijo v raztopini vzorca v  $\mu\text{g/ml}$  iz umeritvene krivulje (5.3.2).

Vsebnost amprola  $w$  v  $\text{mg/kg}$  vzorca izračunamo z naslednjo formulo:

$$w = (V \cdot \gamma \cdot f) / m \text{ [mg/kg]}$$

pri čemer je:

$V$  = volumen ekstrakcijskega topila (3.8) v ml v skladu s 5.2 (to je 200 ml)

$\gamma$  = koncentracija amprola v ekstraktu vzorca (5.2), v  $\mu\text{g/ml}$

$f$  = faktor razredčitve v skladu s 5.2

$m$  = masa preskusnega vzorca, v g

## 7. Validacija rezultatov

### 7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporabo detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca (5.2) in raztopine za umeritev (3.7.3), ki vsebuje 2,0  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca (5.2) obogatimo s primerno množino raztopine za umeritev (3.7.3). Množina dodanega amprola mora biti podobna množini amprola, najdenega v ekstraktu vzorca.

Zvišana je lahko le višina vrha amprola, potem ko smo upoštevali dodano množino, pa tudi razredčenje raztopine ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove višine mora biti znotraj  $\pm 10\%$  prvotne širine vrha amprola v vzorcu, ki mu amprol ni bil dodan.

#### 7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednja merila:

(a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha na kromatogramu, mora biti ista znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Ta je pri detekciji s serijo diod normalno  $\pm 2$  nm.

(b) Med 210 in 320 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, v tem delu spektra ne smejo razlikovati v območju 10-100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektroma ne presegajo 15 % absorbance standardnega analita.

(c) Med 210 in 320 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj v območju 10-100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektri ne presegajo 15 % absorbance spektra najvišje točke vrha.

Kadar eno izmed teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

### 7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

– 15 % relativno, glede na višjo vsebnost amprola med 25  $\text{mg/kg}$  in 500  $\text{mg/kg}$

– 75  $\text{mg/kg}$  za vsebnosti amprola med 500  $\text{mg/kg}$  in 1000  $\text{mg/kg}$

-7,5 % relativno, glede na višjo vsebnost amprola nad 1000  $\text{mg/kg}$

### 7.3 Izkoristek

Za obogateni (slepi) vzorec mora biti izkoristek najmanj 90 %.

## 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija, v kateri so bile analizirane tri perutninske krme (vzorci 1-3), ena mineralna krma (vzorec 4) in en premiks (vzorec 5). Rezultati so prikazani v naslednji tabeli

	Vzorec 1 (slepa krma)	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5
L	14	14	14	14	15
n	56	56	56	56	60
Srednja vrednost (mg/kg)	-	45,5	188	5129	25140
s <sub>r</sub> (mg/kg)	-	2,26	3,57	178	550
CV <sub>r</sub> (%)	-	4,95	1,90	3,46	2,20
s <sub>R</sub> (mg/kg)	-	2,95	11,8	266	760
CV <sub>R</sub> (%)	-	6,47	6,27	5,19	3,00
Nominalna vsebnost (mg/kg)	-	50	200	5000	25000

L: število laboratorijev

n: število posamičnih vrednosti

s<sub>r</sub> = standardni odmik ponovljivosti

CV<sub>r</sub> = koeficient variacije ponovljivosti

s<sub>R</sub> = standardni odmik obnovljivosti

CV<sub>R</sub> = koeficient variacije obnovljivosti

## 9. Opombe

9.1 Če vzorec vsebuje tiamin, se vrh tiamina v kromatogramu pojavi malo pred vrhom amprola. Pri tej metodi moramo amprol in tiamin ločiti. Če amprola in tiamina nismo ločili s kolono (4.1.1), ki se uporablja pri tej metodi, zamenjamo do 50 % dela acetonitrila v mobilni fazi (3.6) z metanolom.

9.2 Britanska Pharmacopoeia pravi, da ima spekter raztopine amprola (c = 0,02 mol/l) v klorovodikovi kislini (c = 0,1 mol/l) maksimuma pri 246 nm in 262 nm. Absorbanca bi morala znašati 0,84 pri 246 nm in 0,80 pri 262 nm.

9.3 Ekstrakt moramo vedno razredčiti z mobilno fazo, ker bi se sicer retenzijski čas vrha amprola občutno premaknil zaradi sprememb v ionski moči.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 1999/27/ES.

## METODA 40\*

### DOLOČANJE DIKLAZURILA

(+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril.

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo določamo vsebnost diklazurila v krmi in premiksih. Meja zaznavnosti je 0,1 mg/kg, meja določanja pa 0,5 mg/kg.

#### 2. Princip

Po dodatku internega standarda ekstrahiramo vzorec z nakisanim metanolom. Pri krmi del ekstrakta prečistimo na kartuši C18 za ekstrakcijo v trdni fazi. Diklazuril iz kartuše eluiramo z mešanico nakisanega metanola in vode. Po izparevanju ostanek raztopimo v raztopini DMF in vode. Pri premiksih ekstrakt izparevamo in nato ostanek raztopimo v raztopini DMF in vode. Vsebnost diklazurila določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo s ternarnim gradientom, z uporabo detektorja UV.

### 3. Reagenti

3.1 Voda, za HPLC.

3.2 Amonijev acetat.

3.3 Tetrabutilamonijev hidrogen sulfat (TBHS).

3.4 Acetonitril, za HPLC.

3.5 Metanol, za HPLC.

3.6 N,N-dimetilformamid (DMF).

3.7 Klorovodikova kislina,  $\rho_{20} = 1,19$  g/ml.

3.8 Standardna substanca: diklazuril II-24: (+)-4-klorfenil [2,6-diklor-4-(2,3,4,5-tetrahidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2-il) fenil] acetonitril zajamčene čistoče, E771.

3.8.1 Osnovna standardna raztopina diklazurila, 500  $\mu$ g/ml

V 50 mililitrsko merilno bučko natehtamo 25 mg standardne substance diklazurila (3.8) s točnostjo 0,1 mg. Raztopimo v DMF (3.6), bučko dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi  $\leq 4^\circ$  C je raztopina stabilna en mesec.

3.8.2 Standardna raztopina diklazurila, 50  $\mu$ g/ml

5,00 ml osnovne standardne raztopine (3.8.1) prenesemo v 50 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi  $\leq 4^\circ$  C je raztopina stabilna en mesec.

3.9 Interni standard: 2,6 dikloro- $\alpha$ -(4-klorofenil)-4-(4,5 dihidro-3,5-diokso-1,2,4-triazin-2 (3H) – il)  $\alpha$  -metilbenzen-acetonitril.

3.9.1 Osnovna raztopina internega standarda, 500  $\mu$ g/ml

V 50 mililitrsko merilno bučko natehtamo 25 mg internega standarda (3.9) s točnostjo 0,1 mg. Raztopimo v DMF (3.6), bučko dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi  $\leq 4^\circ$  C je raztopina stabilna en mesec.

3.9.2 Raztopina internega standarda, 50  $\mu$ g/ml

5,00 ml osnovne raztopine internega standarda (3.9.1) prenesemo v 50 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z DMF (3.6) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi  $\leq 4^\circ$  C je raztopina stabilna en mesec.

3.9.3 Raztopina internega standarda za premikse, p/1000 mg/ml (p = nominalna vsebnost diklazurila v premiksu v mg/kg).

S točnostjo 0,1 mg natehtamo p/10 mg substance internega standarda v 100 mililitrsko merilno bučko, raztopimo v DMF (3.6) v ultrazvočni kopeli (4.6), dopolnimo z DMF do oznake in premešamo. Bučko ovijemo z aluminijevo folijo ali uporabimo rjavo bučko in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi  $\leq 4^\circ$  C je raztopina stabilna en mesec.

3.10 Raztopina za umeritev, 2  $\mu$ g/ml.

Odpipetiramo 2,00 ml standardne raztopine diklazurila (3.8.2) in 2,00 ml raztopine internega standarda (3.9.2) v 50 mililitrsko merilno bučko. Dodamo 16 ml DMF (3.6), bučko dopolnimo do oznake z vodo in premešamo. To raztopino moramo pripraviti svežo tik pred uporabo.

3.11 Ekstrakcijska kartuša za trdno fazo C18, npr. Bond Elut, velikost: 1 cc, masa absorbenta: 100 mg.

3.12 Ekstrakcijsko topilo: nakisani metanol.

Odpipetiramo 5,0 ml klorovodikove kisline (3.7) v 1000 ml metanola (3.5) in premešamo.

3.13 Mobilna faza za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC).

Eluent A:

raztopina amonijevega acetata in tetrabutilamonijevega hidrogen sulfata.

3.13.1 V 1000 ml vode (3.1) raztopimo 5 g amonijevega acetata (3.2) in 3,4 g TBHS (3.3) ter premešamo.

3.13.2 Eluent B: acetonitril (3.4).

3.13.3 Eluent C: metanol (3.5).

### 4. Oprema

4.1 Mehanski stresalnik.

4.2 Oprema za HPLC s terciarnim gradientom.

4.2.1 Tekočinske kromatografske kolone, hypersil ODS, polnitev 3  $\mu$ m, 100 mm x 4,6 mm ali ekvivalentna.

4.2.2 Detektor UV z nastavljivo valovno dolžino ali detektor s serijo diod.

4.3 Rotacijski vakuumski uparjalnik

4.4 Membranski filter, 0,45  $\mu$ m.

4.5 Vakuumski ventil.

4.6 Ultrazvočna kopel.

## 5. Postopek

### 5.1 Splošno

#### 5.1.1 Slepa krma

Slepo krmo analiziramo za preveritev, da ni ne diklazurila ne motečih substanc. Slepa krma mora biti podobna tisti v vzorcu in pri analizi ne smemo zaznati diklazurila ali motečih substanc.

#### 5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka izvedemo tako, da analiziramo slepo krmo, ki smo jo obogatili s toliko diklazurila, kolikor ga je v vzorcu. Da dobimo 1 mg/kg, dodamo 0,1 ml osnovne standardne raztopine (3.8.1) v 50 g slepe krme, dobro premešamo in pustimo 10 min, pred nadaljevanjem (5.2) pa večkrat dobro premešamo.

Če pa slepe krme, ki bi bila podobna tisti v vzorcu, nimamo (glej 5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo po metodi standardnega dodatka. V tem primeru vzorec za analizo obogatimo s količino diklazurila, podobno tisti, ki je že v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z vzorcem brez dodanega diklazurila, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

### 5.2 Ekstrakcija

#### 5.2.1 Krma

S točnostjo 0,01 g natehtamo približno 50 g vzorca. Prenesemo v 500 mililitrsko erlenmajerico, dodamo 1,00 ml raztopine internega standarda (3.9.2), 200 ml ekstrakcijskega topila (3.12) in zamašimo erlenmajerico. Mešanico stresamo v stresalniku (4.1) prek noči. Pustimo 10 minut, da se umiri. Prenesemo 20 ml alikvot bistre raztopine nad oborino v primerno stekleno posodo in razredčimo z 20 ml vode. To raztopino prenesemo na ekstrakcijsko kartušo (3.11) in jo skozi prepustimo z vakuumom (4.5). Kartušo speremo s 25 ml mešanice ekstrakcijskega topila (3.12) in vode, 65 + 35 (V + V). Zavržemo zbrane frakcije in eluiramo spojine s 25 ml mešanice ekstrakcijskega topila (3.12) in vode, 80 + 20 (V + V). To frakcijo uparimo v rotacijskem uparjalniku (4.3) pri 60° C do prve sušine. Ostanek raztopimo v 1,0 ml DMF (3.6), dodamo 1,5 ml vode (3.1) in premešamo. Filtriramo skozi membranski filter (4.4). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

#### 5.2.2 Premiksi

S točnostjo 0,001 g natehtamo približno 1 g vzorca. Prenesemo v 500 mililitrsko erlenmajerico, dodamo 1,00 ml raztopine internega standarda (3.9.3), 200 ml ekstrakcijskega topila (3.12) in zamašimo erlenmajerico. Mešanico stresamo v stresalniku (4.1) prek noči. Pustimo 10 minut, da se umiri. Prenesemo alikvot, ki vsebuje 10 000/p ml (p = nominalna vsebnost diklazurila v premiksu v mg/kg), bistre raztopine nad oborino v primerno veliko bučko z okroglim dnom. Uparevamo do prve sušine pri znižanem tlaku pri 60° C v rotacijskem uparjalniku (4.3). Ostanek ponovno raztopimo v 10,0 ml DMF (3.6), dodamo 15,0 ml vode (3.1) in premešamo. Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.3).

### 5.3 Določanje tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC)

#### 5.3.1 Parametri

Navedeni pogoji so dani kot vodilo, lahko se uporabljajo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Tekočinske kromatografske kolone (4.2.1): 100 mm x 4,6 mm, Hypersil ODS, polnitev 3µm ali ekvivalent.

Mobilna faza:

– Eluat A (3.13.1): vodna raztopina amonijevega acetata in tetrabutilamonijevega hidrogen sulfata

– Eluat B (3.13.2): acetonitril

– Eluat C (3.13.3): metanol

Način eluiranja:

– linearni gradient

– začetni pogoji: A + B + C = 60 + 20 + 20 (v + v + v)

– po 10 minutah gradientno eluiranje 30 minut v: A + B + C = 45 + 20 + 35 (v + v + v)

10 minut izpiramo z B

Pretok: 1,5 – 2 ml/min

Volumen vbrizga: 20 µl

Valovna dolžina detektorja: 280 nm

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.10), ki vsebuje 2 µg/ml, dokler ne dosežemo konstantnih višin vrhov in retenzijskih časov.

#### 5.3.2 Raztopina za umeritev

Večkrat vbrizgamo 20 µl raztopine za umeritev (3.10) in določimo srednjo vrednost višine (površine) vrhov diklazurila in vrhov raztopine internega standarda.

#### 5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo 20 µl raztopine vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) in določimo srednjo vrednost višine (površine) vrha diklazurila in raztopine internega standarda.



## 6. Izračun rezultatov

### 6.1 Krma

Vsebnost diklazurila  $w$  (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

$$w = [(h_{ds} \cdot h_{ic} / h_{is} \cdot h_{dc}) \cdot (\gamma_{dc} \cdot 10V/m)] \text{ [mg/kg]}$$

pri čemer je:

$h_{ds}$  = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini vzorca (5.2.1)

$h_{is}$  = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini vzorca (5.2.1)

$h_{dc}$  = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini za umeritev (3.10)

$h_{ic}$  = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini za umeritev (3.10)

$\gamma_{dc}$  = koncentracija diklazurila v raztopini za umeritev, v  $\mu\text{g/ml}$  (3.10)

$m$  = masa preskusnega vzorca, v gramih

$V$  = volumen ekstrakta vzorca v skladu s 5.2.1 (to je 2,5 ml)

### 6.2 Premiksi

Vsebnost diklazurila  $w$  (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

$$w = [(h_{ds} \cdot h_{ic} / h_{is} \cdot h_{dc}) \cdot (\gamma_{dc} \cdot 0,02V \cdot \rho/m)] \text{ [mg/kg]}$$

pri čemer je:

$h_{dc}$  = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini za umeritev (3.10)

$h_{ic}$  = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini za umeritev (3.10)

$h_{ds}$  = višina (površina) vrha diklazurila v raztopini vzorca (5.2.2)

$h_{is}$  = višina (površina) vrha internega standarda v raztopini vzorca (5.2.2)

$\gamma_{dc}$  = koncentracija diklazurila v raztopini za umeritev (3.10)

$m$  = masa preskusnega vzorca, v gramih

$V$  = volumen ekstrakta vzorca v skladu s 5.2.2 (to je 25 ml)

$\rho$  = nominalna vsebnost diklazurila v mg/kg v premiksu

## 7. Validacija rezultatov

### 7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporabo detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) in raztopine za umeritev (3.10).

#### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstraktu vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) dodamo primerno množino raztopine za umeritev (3.10). Množina dodanega diklazurila mora biti podobna množini diklazurila, najdenega v ekstraktu vzorca.

Zvišana smeta biti le vrhova diklazurila in internega standarda, potem ko smo upoštevali tako dodano množino in razredčitev raztopine ekstrakta. Širina vrha na polovici višine mora biti znotraj  $\pm 10\%$  prvotne širine vrha diklazurila ali vrha internega standardnega v vzorcu, ki mu diklazuril ni bil dodan.

#### 7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo v skladu z naslednjimi merili:

(a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektra vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha na kromatogramu, mora biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Ta je pri detekciji s serijo diod navadno  $\pm 2$  nm.

(b) Med 230 in 320 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, v tem delu spektra ne smejo razlikovati v območju 10-100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektroma ne presegajo 15 % absorbance standardnega analita.

(c) Med 230 in 320 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj v območju 10-100 % relativne absorbance. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektri ne presegajo 15 % absorbance spektra najvišje točke vrha.

Če eno izmed teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

### 7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev na istem vzorcu ne sme presegati:

– 30 % relativno, glede na višjo vsebnost diklazurila med 0,5 mg/kg in 2,5 mg/kg

– 0,75 mg/kg za vsebnosti diklazurila med 2,5 mg/kg in 5 mg/kg

– 15 % relativno, glede na višjo vsebnost diklazurila nad 5 mg/kg

### 7.3 Izkoristek

Za obogateni (slepi) vzorec mora biti izkoristek najmanj 80 %.

## 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija, pri kateri so v 11 laboratorijih analizirali pet vzorcev. Vzorce sta sestavljala dva premiksa; eden je bil mešan z organsko matriko (O 100) in drugi z anorgansko matriko (A 100). Teoretična vsebnost je 100 mg diklazurila na kg. Tri mešane perutninske krme so naredili trije različni proizvajalci (NL) (L1/Z1/K1). Teoretična vsebnost je 1 mg diklazurila na kg. Laboratorijem so naročili, naj analizirajo vsak vzorec enkrat ali dvakrat. (Za natančnejše podatke o navedeni primerjalni študiji glej Journal of AOAC International, knjiga 77, št. 6, 1994, str. 1359-1361). Rezultati so navedeni v naslednji tabeli:

	Vzorec 1 A 100	Vzorec 2 O 100	Vzorec 3 L1	Vzorec 4 Z1	Vzorec 5 K1
L	11	11	11	11	6
n	19	18	19	19	12
Povprečje	100,8	103,5	0,89	1,15	0,89
S <sub>r</sub> (mg/kg)	5,88	7,64	0,15	0,02	0,03
CV <sub>r</sub> (%)	5,83	7,38	17,32	1,92	3,34
S <sub>R</sub> (mg/kg)	7,59	7,64	0,17	0,11	0,12
CV <sub>R</sub> (%)	7,53	7,38	18,61	9,67	13,65
Nominalna vsebnost (mg/kg)	100	100	1	1	1

L: število laboratorijev

n: število posamičnih vrednosti

S<sub>r</sub> = standardni odmik ponovljivosti

CV<sub>r</sub> = koeficient variacije ponovljivosti

S<sub>R</sub> = standardni odmik obnovljivosti

CV<sub>R</sub> = koeficient variacije obnovljivosti

## 9. Opombe

Predhodno moramo dokazati, da je odziv diklazurila v območju koncentracij, ki jih merimo, linearen.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 1999/27/ES.

### METODA 41\* DOLOČANJE KARBADOKSA Metil 3-(2-kvinoksalinilmetilen)karbazat N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioksid

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo določamo vsebnost karbadoksa v krmi, premiksah in preparatih. Meja zaznavanja je 1 mg/kg, meja določanja pa 10 mg/kg.

#### 2. Princip

Vzorec uravnotežimo z vodo in ekstrahiramo z metanol-acetonitrilom. Pri krmi alikvot filtriranega ekstrakta prečistimo na koloni iz aluminijevega oksida. Pri premiksah in preparatih alikvot filtriranega ekstrakta razredčimo do primerne koncentracije z vodo, metanolom in acetonitrilom. Vsebnost karbadoksa določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo detektorja UV.

### 3. Reagenti

3.1 Metanol.

3.2 Acetonitril, za HPLC.

3.3 Ocetna kislina, w = 100 %.

3.4 Aluminijev oksid: nevtralni, stopnja aktivnosti I.

3.5 Metanol-acetonitril 1 + 1 (v + v).

500 ml metanola (3.1) zmešamo s 500 ml acetonitrila (3.2).

3.6 Ocetna kislina,  $\sigma$  = 10 %.

10 ml očetne kisline (3.3) razredčimo z vodo do 100 ml.

3.7 Natrijev acetat, CH<sub>3</sub>COONa.

3.8 Voda za HPLC.

3.9 Raztopina acetatnega pufra, c = 0,01 mol/l, pH = 6,0.

V 700 ml vode (3.8) raztopimo 0,82 g natrijevega acetata (3.7) in z očetno kislino (3.6) naravnamo pH na 6,0. Prelijemo v 1000 mililitrsko merilno bučko, z vodo (3.8) dopolnimo do oznake in premešamo.

3.10 Mobilna faza za visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC).

825 ml raztopine acetatnega pufra (3.9) zmešamo s 175 ml acetonitrila (3.2). Filtriramo skozi filter 0,22  $\mu$ m (4.5) in raztopino razplinimo (npr. 10 minut v ultrazvočni kopeli).

3.11 Standardna substanca.

Čisti karbadoks: metil 3-(2-kvinoksalinilmetilen)karbazat N<sup>1</sup>,N<sup>4</sup>-dioksid, E 850.

3.11.1 Osnovna standardna raztopina karbadoksa, 100  $\mu$ g/ml (glej točko 5: Postopek):

V 250 mililitrsko merilno bučko natehtamo 25 mg standardne substance karbadoksa (3.11) s točnostjo 0,1 mg. V ultrazvočni kopeli (4.7) raztopimo v metanol-acetonitrilu (3.5). Po ultrazvočni obdelavi ohladimo raztopino do sobne temperature, dopolnimo z metanol-acetonitrilom (3.5) do oznake in premešamo. Bučko ovijemo v aluminijevo folijo ali uporabimo posodo iz rjavega stekla in shranimo v hladilnik. Pri temperaturi  $\leq 4^\circ$  C je raztopina stabilna en mesec.

3.11.2 Raztopine za umeritev

2,0; 5,0; 10,0 in 20,0 ml osnovne standardne raztopine (3. 11.1) prenesemo v 100 mililitrske merilne bučke. Dodamo 30 ml vode, bučke do oznake napolnimo z metanol-acetonitrilom (3.5) in premešamo. Bučke ovijemo v aluminijevo folijo. Te raztopine ustrezajo 2,0; 5,0; 10,0 in 20,0  $\mu$ g/ml karbadoksa. Raztopine za umeritev sveže pripravimo pred uporabo.

Opomba: Za določanje karbadoksa v krmi, ki vsebuje manj kakor 10 mg/kg, moramo pripraviti raztopine za umeritev s koncentracijo, nižjo od 2,0  $\mu$ g/ml.

3.12 Mešanica voda-[metanol-acetonitril] (3.5), 300 + 700 (v + v)

300 ml vode zmešamo s 700 ml mešanice metanol-acetonitrila (3.5).

### 4. Oprema

4.1 Laboratorijski stresalnik ali magnetni mešalnik.

4.2 Filtrirni papir iz steklenih vlaken (Whatman GF/A ali ustrezen).

4.3 Steklena kolona (dolžina 300 do 400 mm, notranji premer približno 10 mm) s sintrano stekleno frito in odtočnim ventilom.

Opomba: Lahko se uporablja tudi steklena kolona s petelinčkom ali zamaškom; v tem primeru se v spodnji konec vstavi majhen zamašek iz steklene volne in potlači s stekleno palčko.

4.4 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC) s sistemom za vbrizgavanje, primernim za vbrizgavanje po 20  $\mu$ l.

4.4.1 Kolona za tekočinsko kromatografijo: 300 mm x 4 mm, C18, polnitev 10  $\mu$ m ali ekvivalentna.

4.4.2 UV-detektor z nastavljivo valovno dolžino ali detektor s serijo diod v območju 225 do 400 nm.

4.5 Membranski filter, 0,22  $\mu$ m.

4.6 Membranski filter, 0,45  $\mu$ m.

4.7 Ultrazvočna kopel.

### 5. Postopek

Opomba: Karbadoks je občutljiv za svetlobo. Vse postopke opravljamo pri zmanjšani svetlobi ali uporabljamo posodo iz rjavega stekla ali zavito v aluminijevo folijo.

5.1 Splošno

5.1.1 Slepa krma.

Za preskus izkoristka (5.1.2) analiziramo slepo krmo za preveritev, da ni ne karbadoksa ne motečih substanc. Slepa krma mora biti podobna krmi vzorca in pri preskusu ne smemo zaznati karbadoksa ali motečih substanc.

### 5.1.2 Preskus izkoristka.

Preskus izkoristka izvedemo z analizo slepe krme (5.1.1), ki smo jo obogatili z določeno količino karbadoksa, podobno količini v vzorcu. Da dobimo 50 mg/kg karbadoksa, prenesemo 5,0 ml osnovne standardne raztopine (3.11.1) v 200 mililitrsko erlenmajerico. Raztopino uparimo na približno 0,5 ml v toku dušika. Dodamo 10 g slepe krme, premešamo, pustimo 10 minut in nadaljujemo z ekstrakcijo (5.2).

Če pa slepe krme, ki bi bila podobna tisti v vzorcu, nimamo (glej 5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo po metodi standardnega dodatka. V tem primeru v vzorcu za analizo dodamo količino karbadoksa, podobno tisti, ki je že v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z vzorcem brez dodanega karbadoksa, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

## 5.2 Ekstrakcija

### 5.2.1 Krma.

Natehtamo približno 10 g vzorca s točnostjo 0,01 g in ga prenesemo v 200 mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 15,0 ml vode, premešamo in pustimo 5 minut. Dodamo 35,0 ml metanol-acetonitrila (3.5), zamašimo in stresamo 30 minut na stresalniku ali mešamo z magnetnim mešalcem (4.1). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.2). To raztopino obdržimo za prečiščevanje (5.3).

### 5.2.2 Premiksi (0,1 do 2,0 %).

Natehtamo približno 1 g nezdroljenega vzorca s točnostjo 0,01 g in ga prenesemo v 200 mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 15,0 ml vode, premešamo in pustimo stati 5 minut. Dodamo 35,0 ml metanol-acetonitrila (3.5), zamašimo in stresamo 30 minut na stresalniku ali mešamo z magnetnim mešalcem (4.1). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.2). Odpipetiramo alikvot filtrata v 50 mililitrsko merilno bučko. Dodamo 15,0 ml vode, bučko do oznake napolnimo z metanol-acetonitrilom (3.5) in premešamo. Koncentracija karbadoksa v končni raztopini mora biti približno 10 µg/ml. Alikvot filtriramo skozi filter 0,45 µm (4.6). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.4).

### 5.2.3 Preparati (> 2 %).

Natehtamo približno 0,2 g nezdroljenega vzorca s točnostjo 0,001 g in ga prenesemo v 250 mililitrsko erlenmajerico. Dodamo 45,0 ml vode, premešamo in pustimo stati 5 minut. Dodamo 105,0 ml metanol-acetonitrila (3.5), zamašimo in premešamo. Vzorec 15 minut obdelujemo v ultrazvočni kopeli (4.7), nato ga 15 minut stresamo ali mešamo (4.1). Raztopino filtriramo skozi filtrirni papir iz steklenih vlaken (4.2). Alikvot filtrata razredčimo z mešanico vode, metanola in acetonitrila (3.12), da dobimo končno koncentracijo karbadoksa 10-15 µg/ml (za 10 odstotni preparat je faktor razredčitve 10). Alikvot filtriramo skozi filter 0,45 µm (4.6). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.4).

## 5.3 Čiščenje

### 5.3.1 Priprava kolone iz aluminijevega oksida.

Natehtamo 4 g aluminijevega oksida (3.4) in ga prenesemo v stekleno kolono (4.3).

### 5.3.2 Čiščenje vzorca.

15 ml filtriranega ekstrakta (5.2.1) nanese na kolono iz aluminijevega oksida in zavržemo prva 2 ml eluata. Naslednjih 5 ml zberemo in alikvot filtriramo skozi filter 0,45 µm (4.6). Nadaljujemo z določanjem s HPLC (5.4).

## 5.4 Določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

### 5.4.1 Parametri

Navedeni pogoji so dani kot vodilo, lahko se uporabljajo drugi pogoji, če z njimi dobimo enakovredne rezultate.

Kromatografska kolona (4.1.1): 300 mm x 4 mm, C 18, polnitev 10 µm ali ekvivalentna.

Mobilna faza (3.10): Mešanica raztopine acetatnega pufra (3.9) in acetonitrila (3.2), 825 + 175 (v + v).

Pretok: 1,5 do 2 ml/min.

Valovna dolžina detekcije: 365 nm.

Volumen vbrizga: 20 µl.

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo raztopino za umeritev (3.11.2), ki vsebuje 5,0 µg/ml, dokler ne dosežemo konstantnih višin (površin) vrhov in retenzijskih časov.

### 5.4.2 Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umeritev (3.11.2) večkrat vbrizgamo in izmerimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Umeritveno krivuljo pripravimo tako, da srednje vrednosti višin (površin) vrhov raztopin za umeritev nanašamo na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

### 5.4.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo raztopino vzorca [(5.3.2) za krmo, (5.2.2) za premikse in (5.2.3) za preparate] in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov karbadoksa.

## 6. Izračun rezultatov

Iz srednje vrednosti višin (površin) vrhov karbadoksa raztopine vzorca določimo koncentracijo v raztopini vzorca v g/ml iz umeritvene krivulje (5.4.2).

### 6.1 Krma:

Vsebnost karbadoksa  $w$  (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

$$w = (\gamma \cdot V_1 / m) \text{ [mg/kg]}$$

pri čemer je:

$\gamma$  = koncentracija karbadoksa v ekstraktu vzorca (5.3.2), v  $\mu\text{g/ml}$

$V_1$  = volumen ekstrakta, v ml (to je 50)

$m$  = masa preskusnega vzorca, v gramih

### 6.2 Premiksi in preparati

Vsebnost karbadoksa  $w$  (mg/kg) v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

$$w = (\gamma \cdot V_2 \cdot f / m) \text{ [mg/kg]}$$

pri čemer je:

$\gamma$  = koncentracija karbadoksa v ekstraktu vzorca (5.2.2 ali 5.2.3), v  $\mu\text{g/ml}$

$V_2$  = volumen ekstrakta v ml (to je 50 za premikse; 150 za preparate)

$f$  = faktor razredčitve v skladu s 5.2.2 (premiksi) ali 5.2.3 (preparati)

$m$  = masa preskusnega vzorca, v gramih

## 7. Validacija rezultatov

### 7.1 Identiteta

Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo ali z uporabo detektorja s serijo diod, s katerim primerjamo spektre ekstrakta vzorca in raztopine za umeritev (3.11.2), ki vsebuje 10,0  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstraktu vzorca dodamo primerno množino raztopine za umeritev (3.11.2). Množina dodanega karbadoksa mora biti enaka množini karbadoksa, najdenega v ekstraktu vzorca.

Zvišana je lahko le višina vrha karbadoksa, potem ko smo upoštevali dodano množino in tudi razredčitev raztopine ekstrakta. Širina vrha na polovici njegove maksimalne višine mora biti znotraj 10 % njegove prvotne širine.

#### 7.1.2 Detekcija s serijo diod

Rezultate ovrednotimo glede na naslednja merila:

(a) Valovna dolžina maksimalne absorpcije spektrov vzorca in standarda, zabeležena na najvišji točki vrha na kromatogramu, mora biti znotraj meja, določenih z ločljivostjo sistema za detekcijo. Ta je pri detekciji s serijo diod normalno  $\pm 2$  nm.

(b) Med 225 in 400 nm se spektri vzorca in standarda, zabeleženi na najvišji točki vrha na kromatogramu, v tem delu spektra ne smejo razlikovati v območju 10 do 100 % relativne absorbanče. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektroma ne presegajo 15 % absorbanče standardnega analita.

(c) Med 225 in 400 nm se spektri naraščanja, najvišje točke vrha in padanja vrha, ki jih dobimo iz ekstrakta vzorca, v tem delu spektra ne smejo razlikovati med seboj v območju 10 do 100 % relativne absorbanče. To merilo je izpolnjeno, kadar so maksimumi enaki in kadar na nobeni opazovani točki odstopanja med spektri ne presegajo 15 % absorbanče spektra najvišje točke vrha.

Če eno izmed teh meril ni izpolnjeno, prisotnost analita ni potrjena.

### 7.2 Ponovljivost.

Za vsebnost 10 mg/kg in več razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati 15 % relativno glede na višji rezultat.

### 7.3 Izkoristek.

Na obogatnem (slepem) vzorcu mora biti izkoristek najmanj 90 %.

## 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija, v kateri je osem laboratorijev analiziralo šest vrst krme, štiri premikse in tri preparate. Za vsak vzorec sta bili izvedeni dve analizi. (Za natančnejše podatke o navedeni skupni raziskavi glej Journal of AOAC, knjiga 71, št. 1988, str. 484-490.) Rezultati (razen izjem) so prikazani spodaj:

Tabela 1: Rezultati primerjalne študije krme

	Vzorec 1	Vzorec 2	Vzorec 3	Vzorec 4	Vzorec 5	Vzorec 6
L	8	8	8	8	8	8
n	15	14	15	15	15	15
Srednja vrednost (mg/kg)	50,0	47,6	48,2	49,7	46,9	49,7
S <sub>r</sub> (mg/kg)	2,90	2,69	1,38	1,55	1,52	2,12
CV <sub>r</sub> (%)	5,8	5,6	2,9	3,1	3,2	4,3
S <sub>R</sub> (mg/kg)	3,92	4,13	2,23	2,58	2,26	2,44
CV <sub>R</sub> (%)	7,8	8,7	4,6	5,2	4,8	4,9
Nominalna vsebnost (mg/kg)	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Tabela 2: Rezultati primerjalne študije premiksov in preparatov

	Premiksi				Preparati		
	A	B	C	D	A	B	C
L	7	7	7	7	8	8	8
n	14	14	14	14	16	16	16
Srednja vrednost (mg/kg)	8,89	9,29	9,21	8,76	94,6	98,1	104
S <sub>r</sub> (mg/kg)	0,37	0,28	0,28	0,44	4,1	5,1	7,7
CV <sub>r</sub> (%)	4,2	3,0	3,0	5,0	4,3	5,2	7,4
S <sub>R</sub> (mg/kg)	0,37	0,28	0,28	0,55	5,4	6,4	7,7
CV <sub>R</sub> (%)	4,2	3,0	3,0	6,3	5,7	6,5	7,4
Nominalna vsebnost (mg/kg)	10,0	10,0	10,0	10,0	100	100	100

L: število laboratorijev

n: število posamičnih vrednosti

S<sub>r</sub> = standardni odmik ponovljivostiCV<sub>r</sub> = koeficient variacije ponovljivostiS<sub>R</sub> = standardni odmik obnovljivostiCV<sub>R</sub> = koeficient variacije obnovljivosti

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 1999/27/ES.

**METODA 42\***  
**DOLOČANJE NATRIJEVEGA LASALOCIDA**  
**Natrijeva sol polieter monokarboksilne kisline, proizvedena s *Streptomyces lasaliensis***

### 1. Namen in področje uporabe

Metoda je namenjena določanju natrijevega lasalocida v krmi in premiksih. Meja zaznavnosti je 5 mg/kg, meja določanja je 30 mg/kg.

### 2. Princip

Natrijev lasalocid ekstrahiramo iz vzorca v nakisani metanol in določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z reverzno fazo z uporabo spektrofluorimetričnega detektorja.

### 3. Reagenti

3.1 Kalijev dihidrogen fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

3.2 Ortofosforjeva kislina,  $w = 85 \%$

3.3 Raztopina ortofosforjeve kisline,  $\sigma = 20 \%$

Razredčimo 23,5 ml ortofosforjeve kisline (3.2) do 100 ml z vodo.

3.4 6-metil-2-heptilamin (1,5-dimetilheksilamin),  $w = 99\%$

3.5 Metanol, za HPLC

3.6 Klorovodikova kislina,  $\rho_{20} 1,19 \text{ g/ml}$

3.7 Fosfatna pufrna raztopina,  $c = 0,01 \text{ mol/l}$

Raztopimo 1,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (3.1) v 500 ml vode (3.11), dodamo 3,5 ml ortofosforjeve kisline (3.2) in 10,0 ml 6-metil-2-heptilamina (3.4). pH naravnamo na 4,0 z raztopino ortofosforjeve kisline (3.3) in razredčimo do 1000 ml z vodo (3.11).

3.8 Nakisani metanol

5,0 ml klorovodikove kisline (3.6) prenesemo v 1 000 mililitrsko merilno bučko, napolnimo z metanolom (3.5) do oznake in premešamo. Raztopino moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.9 Mobilna faza za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC), raztopina fosfatnega pufrna in metanola 5 + 95 (V + V)

Zmešamo 5 ml fosfatne pufrne raztopine (3.7) s 95 ml metanola (3.5).

3.10 Natrijev lasalocid standardna substanca zagotovljene čistosti,  $\text{C}_{34}\text{H}_{53}\text{O}_8\text{Na}$  (natrijeva sol polieter monokarboksilne kisline, proizvedena s *Streptomyces lasaliensis*), E763

3.10.1 Natrijev lasalocid, osnovna standardna raztopina, 500  $\mu\text{g/ml}$

Natehtamo 50 mg natrijevega lasalocida (3.10) s točnostjo 0,1 mg v 100 mililitrsko merilno bučko, raztopimo v nakisanem metanolu (3.8), napolnimo z istim topilom do oznake in premešamo. Raztopino moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.10.2 Natrijev lasalocid, vmesna standardna raztopina, 50  $\mu\text{g/ml}$

Odipetiramo 10,0 ml osnovne standardne raztopine (3.10.1) v 100 mililitrsko merilno bučko, napolnimo z nakisanim metanolom (3.8) do oznake in premešamo. Raztopino moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.10.3 Raztopine za umeritev

V serijo 50 mililitrskih merilnih bučk prenesemo 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 in 10,0 ml vmesne standardne raztopine (3.10.2). Do oznake napolnimo z nakisanim metanolom (3.8) in premešamo. Te raztopine ustrezajo 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 in 10,0  $\mu\text{g}$  natrijevega lasalocida na ml. Raztopine moramo pripraviti tik pred uporabo.

3.11 Voda, za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

### 4. Oprema

4.1 Ultrazvočna kopel (ali stresalna vodna kopel) z nadzorom temperature

4.2 Membranski filtri, 0,45  $\mu\text{m}$

4.3 Oprema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) z injektorskim sistemom, primernim za prostornine vbrizga 20  $\mu\text{l}$

4.3.1 Kolona 125 mm x 4 mm za tekočinsko kromatografijo, reverzna faza C18, 5  $\mu\text{m}$  polnilo ali enakovredna

4.3.2 Spektrofluorimeter s spremenljivo nastavitvijo valovnih dolžin vzbujanja in emisije

### 5. Postopek

5.1 Splošno

5.1.1 Slepna krma

Za izvedbo preskusa izkoristka (5.1.2) analiziramo slepo krmo, da preverimo, da niso prisotni natrijev lasalocid ali moteče substance. Slepa krma naj bo podobne vrste kot vzorec in v njej ne smemo zaznati natrijevega lasalocida ali motečih substanc.

#### 5.1.2 Preskus izkoristka

Preskus izkoristka izvedemo z analiziranjem slepe krme, ki smo jo obogatili z dodatkom količine natrijevega lasalocida, podobni količini, prisotni v vzorcu. Za obogatitev na 100 mg/kg prenesemo 10,0 ml osnovnega standarda (3.10.1) v 250 mililitrsko erlenmajerico in uparimo raztopino do približno 0,5 ml. Dodamo 50 g slepe krme, dobro premešamo in pustimo 10 minut ter vmes nekajkrat ponovno premešamo, nato nadaljujemo postopek ekstrakcije (5.2).

Če nimamo slepe krme podobne vrste, kot je vzorec (5.1.1), lahko preskus izkoristka izvedemo z metodo standardnega dodatka. V tem primeru se vzorec, ki ga bomo analizirali, obogati z dodatkom natrijevega lasalocida, podobnega tistemu, ki je že prisoten v vzorcu. Ta vzorec analiziramo skupaj z neobogatenim vzorcem, izkoristek pa izračunamo z odštevanjem.

### 5.2 Ekstrakcija

#### 5.2.1 Krma

Natehtamo od 5 g do 10 g vzorca s točnostjo 0,01 g v 250 mililitrsko erlenmajerico z zamaškom. S pipeto dodamo 100,0 ml nakisanega metanola (3.8). Rahlo zapremo zamašek in zavrtimo, da se delci razpršijo. Erlenmajerico postavimo v ultrazvočno kopel (4.1) pri približno 40° C za 20 minut, nato jo odstranimo iz kopeli in ohladimo na sobno temperaturo. Pustimo stati približno eno uro, dokler se suspenzija ne obori, nato filtriramo alikvot skozi 0,45 µm membranski filter (4.2) v primerno posodo. Nadaljujemo določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (5.3).

#### 5.2.2 Premiksi

Natehtamo približno 2 g nezmetlega premiksa s točnostjo 0,001 g v 250 mililitrsko merilno bučko. Dodamo 100,0 ml nakisanega metanola (3.8) in zavrtimo, da se delci razbijejo. Bučko z vsebino postavimo v ultrazvočno kopel (4.1) pri približno 40° C za 20 minut, nato jo odstranimo iz kopeli in ohladimo na sobno temperaturo. Razredčimo do oznake z nakisanim metanolom (3.8) in dobro premešamo. Pustimo stati eno uro, dokler se suspenzija ne obori, nato filtriramo alikvot skozi 0,45 µm membranski filter (4.2). Primeren volumen čistega filtrata razredčimo z nakisanim metanolom (3.8), da dobimo končno preskusno raztopino, ki vsebuje približno 4 µg/ml natrijevega lasalocida. Nadaljujemo določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (5.3).

### 5.3 Določanje s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

#### 5.3.1 Parametri

Navedeni pogoji so dani kot vodilo, uporabijo se lahko tudi drugi, če z njimi dobimo enakovredne rezultate:

Kolona za tekočinsko kromatografijo (4.3.1) 125 mm x 4 mm, reverzna faza C18, polnilo 5 µm ali enakovredno

Mobilna faza (3.9) Mešanica fosfatne pufrne raztopine (3.7) in metanola (3.5), 5 + 95 (V + V)

Hitrost pretoka 1,2 ml/min

Valovne dolžine detektorjev:

– vzbujanje: 310 nm

– emisija: 419 nm

Volumen vbrizga: 20 µl

Stabilnost kromatografskega sistema preverimo tako, da večkrat vbrizgamo 4,0 µg/ml raztopine za umeritev (3.10.3), dokler niso dosežene konstantne višine (ali površine) vrhov in retenzijskih časov.

#### 5.3.2 Umeritvena krivulja

Vsako raztopino za umeritev (3.10.3) večkrat vbrizgamo in določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov za vsako koncentracijo. Narišemo umeritveno krivuljo, tako da srednje vrednosti višin (površin) vrhov nanašamo na ordinato in ustrezne koncentracije v µg/ml na absciso.

#### 5.3.3 Raztopina vzorca

Večkrat vbrizgamo ekstrakte vzorca, dobljene po 5.2.1 ali 5.2.2 in pri tem uporabimo enake volumne kot pri raztopinah za umeritev ter določimo srednje vrednosti višin (površin) vrhov natrijevega lasalocida.

## 6. Izračun rezultatov

Iz srednjih vrednosti višin (površin) vrhov, ki smo jih dobili z vbrizganjem raztopine vzorca (5.3.3), določimo koncentracijo natrijevega lasalocida (µg/ml) iz umeritvene krivulje.

### 6.1 Krma

Vsebnost natrijevega lasalocida  $w$  (mg/kg) v vzorcu je dana z naslednjo formulo:

$$w = (\beta \cdot V_1) / m \text{ [mg/kg]}$$

pri čemer je:

$\beta$  = koncentracija natrijevega lasalocida v raztopini vzorca (5.2.1) v µg/ml

$V_1$  = volumen ekstrakta vzorca v skladu z 5.2.1 v ml (i.e. 100)

$m$  = masa preskusnega vzorca v g



## 6.2 Premiksi

Vsebnost natrijevega lasalocida  $w$  (mg/kg) v vzorcu je dana z naslednjo formulo:

$$w = (\beta \cdot V_2 \cdot f) / m \text{ [mg/kg]}$$

pri čemer je:

$\beta$  = koncentracija natrijevega lasalocida v raztopini vzorca (5.2.2) v  $\mu\text{g/ml}$

$V_2$  = volumen ekstrakta vzorca v skladu z 5.2.2 v ml (i.e. 250)

$f$  = faktor razredčitve v skladu s 5.2.2

$m$  = masa preskusnega vzorca v g

## 7. Validacija rezultatov

### 7.1 Identiteta

Metode, ki temeljijo na spektrofluorimetriji, imajo manj motenj kot metode, pri katerih se uporablja UV-detekcija. Identiteto analita lahko potrdimo z dodatno kromatografijo.

#### 7.1.1 Dodatna kromatografija

Ekstrakt vzorca (5.2.1 ali 5.2.2) obogatimo z dodatkom ustrezne množine raztopine za umeritev (3.10.1). Množina dodanega natrijevega lasalocida naj bo podobna množini natrijevega lasalocida v ekstraktu vzorca. Povišan je lahko le vrh natrijevega lasalocida na vrednost, ki temelji na množini dodanega natrijevega lasalocida in razredčitve ekstrakta. Širina vrha na polovici višine mora biti znotraj  $\pm 10\%$  prvotne širine vrha, ki smo ga dobili z neobogatenim ekstraktom vzorca.

### 7.2 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

- 15 % relativno glede na višjo vrednost, za vsebnosti natrijevega lasalocida od 30 mg/kg do 100 mg/kg;
- 15 mg/kg za vsebnosti natrijevega lasalocida od 100 mg/kg do 200 mg/kg;
- 7,5 % relativno glede na višjo vrednost, za vsebnosti natrijevega lasalocida več kot 200 mg/kg.

### 7.3 Izkoristek

Za obogateno (slepo) krmo naj bi bil izkoristek najmanj 80 %. Za obogatene vzorce premiksov naj bi bil izkoristek najmanj 90 %.

## 8. Rezultati medlaboratorijske primerjalne študije

Organizirana je bila medlaboratorijska primerjalna študija<sup>(1)</sup>, v kateri je 12 laboratorijev analiziralo 2 premiksa (vzorca 1 in 2) in 5 krmnih mešanic (vzorci 3-7). Za vsak vzorec sta bili opravljeni dve analizi. Rezultati so v naslednji tabeli:

	Vzorec 1 Premiks za piščance	Vzorec 2 Premiks za purane	Vzorec 3 Peleti za purane	Vzorec 4 Drobljenec za piščance	Vzorec 5 Krma za purane	Vzorec 6 Krma za perutnino A	Vzorec 7 Krma za perutnino B
L	12	12	12	12	12	12	12
n	23	23	23	23	23	23	23
Srednja vrednost (mg/kg)	5050	16200	76,5	78,4	92,9	48,3	32,3
$s_r$ (mg/kg)	107	408	1,71	2,23	2,27	1,93	1,75
$CV_r$ (%)	2,12	2,52	2,24	2,84	2,44	4,00	5,37
$CV_r$ (%)	286	883	3,85	7,32	5,29	3,47	3,49
$s_R$ (mg/kg)	5,66	5,45	5,03	9,34	5,69	7,18	10,70
$CV_R$ (%)							
Nominalna vsebnost (mg/kg)	5000*	16000*	80*	105*	120*	50 <sup>+</sup>	35 <sup>+</sup>

L: število laboratorijev

<sup>(1)</sup> Analyst, 1995, 120, 2175-2180.

n: število posamičnih vrednosti

$S_r$  = standardni odmik ponovljivosti

$CV_r$  = koeficient variacije ponovljivosti

$S_R$  = standardni odmik obnovljivosti

$CV_R$  = koeficient variacije obnovljivosti

\* = vsebnost po proizvajalčevi deklaraciji

+ = krma, pripravljena v laboratoriju

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 1999/76/ES.

## **METODA 43\***

### **DOLOČANJE CIANOVIDIKOVE KISLINE**

#### **1. Namen in področje uporabe**

Z opisano metodo določamo vsebnost cianovodikove kisline, proste in vezane v obliki glikozidov, v krmi in predvsem v proizvodih iz lanenih semen, maniokine moke in nekaterih vrst fižola.

#### **2. Princip**

Vzorec suspendiramo v vodi. Z delovanjem encimov se sprosti cianovodikova kislina, ki jo ločimo z destilacijo z vodno paro in lovimo v določen volumen nakisane raztopine srebrovega nitrata. Srebrov cianid ločimo s filtriranjem in presežek srebrovega nitrata titriramo z raztopino amonijevega tiocianata.

#### **3. Reagenti**

3.1 Suspenzija sladkih mandljev: dvajset olupljenih sladkih mandljev zdrobimo v 100 ml vode pri 37 do 40° C. Z uporabo papirja iz natrijevega pikrata ali tako da izvedemo slepi preskus, kakor je opisano v zadnjem odstavku 5, preverimo, da v 10 ml suspenzije ni cianovodikove kisline.

3.2 10 odstotna (m/v) raztopina natrijevega acetata, nevtralnega na fenolftalein

3.3 Emulzija proti penjenju (npr. silikon)

3.4 Dušikova kislina, d: 1,40

3.5 Raztopina srebrovega nitrata: 0,02 N

3.6 Raztopina amonijevega tiocianata: 0,02 N

3.7 Nasičena raztopina amonij-železovega sulfata

3.8 Amoniak, d: 0,958

#### **4. Oprema**

4.1 Sušilnik s termostatom, nastavljenim na 38° C

4.2 Aparatura za destilacijo z vodno paro, opremljena s povratnim hladilnikom z upognjenim nastavkom

4.3 1 000 mililitrske bučke z ravnim dnom in brušenimi zamaški

4.4 Oljna kopel

4.5 Bireta, graduirana na 1/20 ml

#### **5. Postopek**

Natehemo 20 g vzorca s točnostjo 5 mg, prenesemo v litrsko bučko z ravnim dnom in dodamo 50 ml vode ter 10 ml suspenzije sladkih mandljev (3.1). Bučko zamašimo in jo za šestnajst ur postavimo v sušilnik pri 38° C. Nato jo ohladimo na sobno temperaturo, dodamo 80 ml vode, 10 ml raztopine natrijevega acetata (3.2) in kapljico emulzije proti penjenju (3.3).

Bučko povežemo z aparaturo za destilacijo z vodno paro in jo postavimo v oljno kopel, ki smo jo predhodno segreti do temperature nekoliko nad 100° C. 200 do 300 ml tekočine destiliramo tako, da spustimo močan tok pare skozi bučko in rahlo segrevamo oljno kopel. Destilat lovimo v erlenmajerico, zaščiten pred svetlobo, kjer se nahaja natančno 50 ml raztopine srebrovega nitrata 0,02 N (3.5) in 1 ml dušikove kisline (3.4). Zagotovimo, da je nastavek kondenzatorja potopljen v raztopino srebrovega nitrata.

Vsebino erlenmajerice prenesemo v 500 mililitrsko merilno bučko, dopolnimo z vodo, premešamo in filtriramo. Odpipetiramo 250 ml filtrata, dodamo približno 1 ml raztopine amonij-železovega (III) sulfata (3.7) in titriramo presežek srebrovega nitrata z raztopino amonijevega tiocianata 0,02 N (3.6), ki ga dodajamo iz birete z graduirano skalo 1/20 ml.

Po enakem postopku lahko po potrebi izvedemo slepi preskus z 10 ml suspenzije sladkih mandljev (3.1) brez analiziranega vzorca.

## 6. Izračun rezultata

Če je bila pri slepem preskusu porabljena raztopina srebrovega nitrata 0,02 N, to vrednost odštejemo od volumna, porabljenega za destilat vzorca. 1 ml  $\text{AgNO}_3$  0,02 N ustreza 0,54 mg HCN. Rezultat izrazimo v odstotnih masnih deležih glede na vzorec.

## 7. Opomba

Če vzorec vsebuje večjo količino sulfidov (npr. fižol), nastane črna oborina srebrovega sulfida, ki jo filtriramo skupaj z oborino srebrovega cianida. Nastanek te oborine povzroči izgubo raztopine srebrovega nitrata 0,02 N, ki jo moramo odšteti od volumna, uporabljenega za izračun vsebnosti HCN. To izvedemo takole:

Oborino na filtru prelijemo s 50 ml amoniaka (3.8), da raztopimo srebrov cianid. Preostanek spiramo z razredčenim amoniakom in v njem določimo vsebnost srebra. Dobljeno vrednost pretvorimo v mililitre raztopine srebrovega nitrata 0,02 N.

Vsebnost HCN v vzorcu je mogoče določiti tudi s titiranjem z dušikovo kislino nakisanega amoniakovega filtrata.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 71/250/EGS.

## METODA 44\*

### DOLOČANJE VSEBNOSTI PROSTEGA IN SKUPNEGA GOSIPOLA

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo je v krmnih mešanica mogoče določiti vsebnost prostega in skupnega gosipola ter kemijsko sorodnih snovi v semenu, moki in tropinah bombaževca, kjer je njihova vsebnost nad 20 ppm.

#### 2. Princip

Gosipol ekstrahiramo v navzočnosti 3-aminopropan-1-ola z mešanico propan-2-ola in heksana pri določanju prostega gosipola ali z dimetilformamidom pri določanju skupnega gosipola. Z anilinom gosipol pretvorimo v gosipol-dianilin, katerega optično gostoto izmerimo pri 440 nm.

#### 3. Reagenti

3.1 Mešanica propan-2-ola in heksana: Zmešamo 60 volumskih delov propan-2-ola p.a. s 40 volumskimi deli n-heksana.

3.2 Topilo A: V litrsko merilno bučko vlijemo približno 500 ml mešanice propan-2-ola in heksana (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-ola, 8 ml ledoceta in 50 ml vode. Z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) dopolnimo do oznake. Reagent je obstojen en teden.

3.3 Topilo B: V 100 mililitrsko merilno bučko odpipetiramo 2 ml 3-aminopropan-1-ola in 10 ml ledoceta. Ohladimo na sobno temperaturo in dopolnimo z N,N-dimetilformamidom do oznake. Reagent je obstojen en teden.

3.4 Anilin p.a.: Če optična gostota v slepem preskusu presega 0,022, destiliramo anilin prek cinkovega prahu, pri čemer zavrzemo prvih in zadnjih 10 % destilata. Če reagent hranimo v rjavi, zaprti stekleni posodi v hladilniku, je obstojen več mesecev.

3.5 Standardna raztopina gosipola A: V 250 mililitrski merilni bučki raztopimo 27,9 mg gosipolacetata s topilom A (3.2) in z njim dopolnimo bučko do oznake. V 250 mililitrsko merilno bučko odpipetiramo 50 ml te raztopine in s topilom A dopolnimo bučko do oznake. Koncentracija gosipola v tej raztopini je 0,02 mg na ml. Pred uporabo pustimo raztopino eno uro na sobni temperaturi.

3.6 Standardna raztopina gosipola B: V 50 mililitrski merilni bučki raztopimo 27,9 mg gosipolacetata s topilom B (3.3) in z njim dopolnimo bučko do oznake. Koncentracija gosipola v tej raztopini je 0,5 mg na ml.

Če standardni raztopini gosipola A in B hranimo zaščiteni pred svetlobo, sta obstojni 24 ur.

#### 4. Oprema

4.1 Mešalec: približno 35 obr./min

4.2 Spektrofotometer

#### 5. Postopek

##### 5.1 Preskusni vzorec

Količina uporabljenega preskusnega vzorca je odvisna od pričakovane vsebnosti gosipola v vzorcu. Primerneje je uporabiti majhen preskusni vzorec in relativno velik alikvot filtrata, da dobimo dovolj gosipola, s katerim omogočimo natančne fotometrične meritve. Za določanje prostega gosipola v semenu, moki in bombaževih pogačah preskusni

vzorec ne sme presegati 1 g, pri krmnih mešanica pa ga je lahko tudi 5 g. V večini primerov je najbolj primeren 10 mililitrski alikvot filtrata; vsebuje naj od 50 do 100 µg gosipola. Za določanje celotnega gosipola naj bi imeli od 0,5 do 5 g preskusnega vzorca, da bo 2 mililitrski alikvot filtrata vseboval od 40 do 200 µg gosipola.

Analizo je treba izvajati pri sobni temperaturi okrog 20° C.

## 5.2 Določanje prostega gosipola

Preskusni vzorec prenesemo v 250 mililitrsko bučko z brusom, katere dno je prekrito z drobci stekla. S pipeto dodamo 50 ml topila A (3.2), bučko zamašimo in z mešalnikom mešamo eno uro. Filtriramo skozi suhi filter v majhno bučko z brusom. Med filtriranjem prekrijemo lijak z urnim steklom. V dve 25 mililitrski merilni bučki (A in B) odpipetiramo enaka alikvota filtrata, ki vsebujeta od 50 do 100 µg gosipola. Po potrebi dopolnimo do 10 ml s topilom A (3.2). Bučko (A) dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) do oznake. To raztopino bomo uporabili kot primerjalno raztopino, proti kateri bomo merili raztopino vzorca.

V dve drugi 25 mililitrski merilni bučki (C in D) odpipetiramo 10 ml topila A (3.2). Bučko (C) dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) do oznake. To raztopino bomo uporabili kot primerjalno raztopino, proti kateri bomo merili raztopino iz slepega preskusa.

V vsako od bučk (D) in (B) dodamo po 2 ml anilina (3.4). Nato ju 30 minut segrevamo nad vrelo vodno kopeljo, da se razvije barva. Ohladimo ju na sobno temperaturo, dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) do oznake, premešamo in pustimo stati eno uro.

V spektrofotometru pri 440 nm in 1 cm kiveti določimo optično gostoto raztopine iz slepega preskusa (D) tako, da jo primerjamo s primerjalno raztopino (C), optično gostoto raztopine vzorca (B) pa primerjamo s primerjalno raztopino (A).

Optično gostoto raztopine iz slepega preskusa odštejemo od optične gostote raztopine vzorca (= korigirana optična gostota). S to vrednostjo izračunamo vsebnost prostega gosipola, kakor je navedeno v 6.

## 5.3 Določanje skupnega gosipola

V 50 mililitrsko merilno bučko prenesemo preskusni vzorec, ki vsebuje od 1 do 5 mg gosipola, in dodamo 10 ml topila B (3.3). Hkrati pripravimo slepi preskus, in to tako, da v drugo 50 mililitrsko merilno bučko vlijemo 10 ml topila B (3.3). Obe bučki segrevamo 30 minut nad vrelo vodno kopeljo. Nato ju ohladimo na sobno temperaturo in dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) do oznake. Premešamo in pustimo od 10 do 15 minut, da se usede, nato filtriramo v bučko z brusom.

V dve 25 mililitrski merilni bučki odpipetiramo po 2 ml filtrata vzorca, v dve drugi 25 mililitrski bučki pa po 2 ml filtrata iz slepega preskusa. Po eno od bučk iz vsake serije dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) do oznake. Te raztopine bomo uporabili kot primerjalne raztopine.

V vsako od drugih dveh bučk dodamo po 2 ml anilina (3.4). Nato ju 30 minut segrevamo nad vrelo vodno kopeljo, da se razvije barva. Ohladimo ju na sobno temperaturo, dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) do oznake, premešamo in pustimo stati eno uro.

Določimo optično gostoto, kakor je opisano v 5.2 za prosti gosipol. S to vrednostjo izračunamo vsebnost skupnega gosipola, kakor je navedeno v 6.

## 6. Izračun rezultatov

Rezultate lahko izračunamo iz specifične optične gostote (6.1) ali iz umeritvene krivulje (6.2).

### 6.1 Iz specifične optične gostote

Pod opisanimi pogoji bodo imele specifične optične gostote naslednje vrednosti:

Prosti gosipol:  $E (1 \% / 1 \text{ cm}) = 625$

Skupni gosipol:  $E (1 \% / 1 \text{ cm}) = 600$

Vsebnost prostega ali skupnega gosipola v vzorcu izračunamo z naslednjo formulo:

$$\% \text{ gosipola} = (E \times 1250) / (E_{1\text{cm}}^{1\%} \times p \times a)$$

pri čemer je:

E = korigirana optična gostota, določena, kakor je opisano v 5.2

p = preskusni vzorec, v gramih

a = alikvot filtrata, v ml

### 6.2 Z umeritvene krivulje

#### 6.2.1 Prosti gosipol

Pripravimo dve seriji po pet 25 mililitrskih merilnih bučk. V vsako serijo odmerimo po 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 in 10,0 ml standardne raztopine gosipola A (3.5). Volumne dopolnimo do 10 ml s topilom A (3.2). Vsaki seriji dodamo 25 mililitrsko merilno bučko, ki vsebuje samo 10 ml topila A (3.2) (slepi preskus).

Bučke iz prve serije (vključno z bučko za slepi preskus) dopolnimo do 25 ml z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) (primerjalna serija).

V vsako bučko iz druge serije (vključno z bučko za slepi preskus) dodamo 2 ml anilina (3.4). Nato jih 30 minut segrevamo nad vrelo vodno kopeljo, da se razvije barva. Ohladimo jih na sobno temperaturo, jih do oznake dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1), premešamo in pustimo eno uro mirovati (standardna serija).

Kakor je navedeno v 5.2, določimo optično gostoto raztopin v standardni seriji v primerjavi z ustreznimi raztopinami v primerjalni seriji. Na umeritveno krivuljo nanašamo optične gostote v odvisnosti od količin gosipola (v µg).

#### 6.2.2 Skupni gosipol

Pripravimo šest 50 mililitrskih merilnih bučk. V prvo bučko vlijemo 10 ml topila B (3.3), v druge pa po 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 in 10,0 ml standardne raztopine gosipola B (3.6). Volumne dopolnimo do 10 ml s topilom B (3.3). Nato jih 30 minut segrevamo nad vrelo vodno kopeljo, zatem pa ohladimo na sobno temperaturo in dopolnimo bučke z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) ter premešamo.

V vsako 25 mililitrsko merilno bučko iz obeh serij odpipetiramo po 2,0 ml teh raztopin. Bučke dopolnimo do 25 ml z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1) (primerjalni preskus).

Dodamo 2 ml anilina (3.4). Nato jih 30 minut segrevamo nad vrelo vodno kopeljo, zatem pa jih ohladimo na sobno temperaturo, jih do oznake dopolnimo z mešanico propan-2-ola in heksana (3.1), premešamo in pustimo eno uro mirovati (standardna serija).

Kakor je navedeno v 5.2, določimo optično gostoto raztopin v standardni seriji v primerjavi z ustreznimi raztopinami v primerjalni seriji. Na umeritveno krivuljo nanašamo optične gostote v odvisnosti od količine gosipola (v µg).

#### 6.3 Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določanj, izvedenih na istem vzorcu, ne sme presegati:

- 15 %, v relativni vrednosti, za vsebnost gosipola pod 500 ppm,
- 75 ppm, v absolutni vrednosti, za vsebnost gosipola od 500 ppm do 750 ppm,
- 10 %, v relativni vrednosti, za vsebnost gosipola nad 750 ppm.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 72/199/EGS.

## METODA 45\* DOLOČANJE AFLATOKSINA B<sub>1</sub>

### A. ENODIMENZIONALNA TANKOPLASTNA KROMATOGRAFSKA METODA

#### 1. Namen in področje uporabe

S to metodo je mogoče določiti vsebnost aflatoksina B<sub>1</sub> v posamičnih krmilih. Ta metoda se ne uporablja kadar je v krmi prisotna citrusova pulpa. Spodnja meja določevanja je 0,01 mg/kg (10 ppb).

Ob prisotnosti motečih snovi je treba analizo ponoviti z uporabo metode B (HPLC).

#### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo s kloroformom. Ekstrakt filtriramo in ustrezen alikvot prečistimo s kolonsko kromatografijo na silikagelu. Eluat uparimo in ostanek raztopimo v določenem volumnu kloroforma ali mešanici benzena in acetonitrila. Alikvot kromatografiramo na tankoplastni kromatografiji (TLC). Količino aflatoksina B<sub>1</sub> določimo z opazovanjem kromatograma pod UV-svetlobo, vizualno ali s fluorodensitometrijo, s primerjavo z znanimi količinami standardnega aflatoksina B<sub>1</sub>. Identiteta aflatoksina B<sub>1</sub>, ekstrahiranega iz krmila, mora biti potrjena z opisanim postopkom.

#### 3. Reagenti

Opomba: Vsi reagenti morajo biti kakovosti »analitskega reagenta«, če ni navedeno drugače.

3.1 Aceton.

3.2 Kloroform, stabiliziran z 0,5 do 1,0 % 96 odstotnega etanola (v/v).

3.3 N-heksan.

3.4 Metanol.

3.5 Brezvodni dietileter, brez peroksidov.

3.6 Mešanica benzena in acetonitrila: 98/2 (v/v).

3.7 Mešanica kloroforma (3.2) in metanola (3.4): 97/3 (v/v).

3.8 Silikagel za kolonsko kromatografijo, velikost delcev od 0,05 do 0,20 mm.

3.9 Hidrofilna vata, predhodno razmaščena s kloroformom, ali steklena volna.

3.10 Natrijev sulfat, brezvodni, v zrnu.

3.11. Inertni plin, npr. dušik.

3.12 1 N klorovodikova kislina.

- 3.13 50 odstotna (v/v) žveplova (VI) kislina.
- 3.14 Kieselguhr (hyflosupercel), opran v kislini.
- 3.15 Silikagel G-HR ali enakovreden, za TLC.
- 3.16 Standardna raztopina s približno 0,1 µg aflatoksina B<sub>1</sub> na ml v kloroformu (3.2) ali mešanici benzen/acetoni-tril (3.6), pripravljena in preverjena, kakor je navedeno v oddelku 7.
- 3.17 Standardna raztopina za kvalitativen preskus s približno 0,1 µg aflatoksina B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub> na ml v kloroformu (3.2) ali mešanici benzen/acetoni-tril (3.6). Te koncentracije so navedene kot vodilo. Njihovo razmerje mora biti tako, da je intenziteta fluorescences za oba aflatoksina enaka.
- 3.18 Topila za razvijanje:
- 3.18.1 Kloroform (3.2)/aceton (3.1): 9/1 (v/v), nenasičena kad;
- 3.18.2 Dietileter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 96/3/1 (v/v/v), nenasičena kad;
- 3.18.3 Dietileter (3.5)/metanol (3.4)/voda: 94/4.5/1.5 (v/v/v), nasičena kad;
- 3.18.4 Kloroform (3.2)/metanol (3.4): 94/6 (v/v), nasičena kad;
- 3.18.5 Kloroform (3.2)/metanol (3.4): 97/3 (v/v), nasičena kad.

#### 4. Oprema

- 4.1 Drobilni mešalnik.
- 4.2 Naprava za stresanje ali magnetno mešalo.
- 4.3 Nagubani filtri, Schleicher in Schüll št. 588 ali enakovredni, premer: 24 cm.
- 4.4 Steklena cev za kromatografijo (notranji premer: 22 mm, dolžina: 300 mm) s teflonskim petelinčkom in 250 mililitrskim napajalnikom.
- 4.5 Rotacijski vakuumski uparjalnik s 500 mililitrsko bučko z okroglim dnom.
- 4.6 500 mililitrske erlenmajerice z brusom.
- 4.7 Aparatura za TLC.
- 4.8 Steklene plošče za TLC, 200 × 200 mm, pripravljene, kakor sledi (navedene količine zadostujejo za premaz petih plošč). V erlenmajerico prenesemo 30 g silikagela G-HR (3.15). Dodamo 60 ml vode, zamašimo in stresamo eno minuto. Suspenzijo porazdelimo po ploščah tako, da dobimo enakomerno plast, debelo 0,25 mm. Pustimo, da se posuši na zraku, in nato shranimo v eksikator s silikagelom. Pred uporabo plošče aktiviramo tako, da jih eno uro sušimo v sušilniku pri temperaturi 110° C.
- Plošče, pripravljene za uporabo, so primerne, če dajo podobne rezultate, kakor jih dobimo s ploščami, pripravljenimi, kakor je navedeno zgoraj.
- 4.9 Dolgovalovna (360 nm) UV-svetilka. Intenziteta sevanja mora omogočiti, da se madež 1 ng aflatoksina B<sub>1</sub> še vedno jasno razloči na plošči TLC z razdalje 10 cm od svetilke.
- 4.10 10 mililitrske graduirane epruvete s polietilenskimi zamaški.
- 4.11 UV-spektrofotometer.
- 4.12 Fluorodensitometer (neobvezno).

#### 5. Postopek

- 5.1 Priprava vzorca (glej »Opombe«, del C, točka 1).

Vzorec zdrobimo tako, da v celoti preide skozi sito z velikostjo odprtin 1 mm (skladno s priporočilom ISO R 565).

##### 5.2 Ekstrakcija

50 g zdrobljenega, homogeniziranega vzorca prenesemo v 500 mililitrsko erlenmajerico (4.6). Dodamo 25 g Kieselguhr (3.14), 25 ml vode in 250 ml kloroforma (3.2). Erlenmajerico zamašimo, stresamo ali mešamo 30 minut z napravo (4.2) in filtriramo skozi naguban filter (4.3). Prvih 10 ml filtrata zavržemo in nato zberemo 50 ml.

##### 5.3 Čiščenje kolon

Spodnji del kromatografske cevi (4.4) zamašimo z vato ali stekleno volno (3.9), dve tretjini cevi napolnimo s kloroformom (3.2) in dodamo 5 g natrijevega sulfata (3.10).

Preverimo, da je zgornja površina plasti natrijevega sulfata ravna, nato v majhnih porcijah dodamo 10 g silikagela (3.8). Po vsakem dodajanju pazljivo premešamo, da odstranimo zračne mehurčke. Pustimo stati 15 minut in nato pazljivo dodamo 15 g natrijevega sulfata (3.10). Pustimo, da tekočina upade, dokler ni tik nad zgornjo površino plasti natrijevega sulfata.

50 ml ekstrakta, dobljenega v 5.2, zmešamo s 100 ml n-heksana (3.3) in mešanico kvantitativno prenesemo v kolono. Pustimo, da tekočina upade, dokler ni tik nad zgornjo površino plasti natrijevega sulfata. Izpiralno tekočino zavržemo. Nato dodamo 100 ml dietiletra (3.5) in ponovno pustimo, da upade do zgornje površine plasti natrijevega sulfata. Med temi postopki pazimo, da je hitrost pretoka od 8 do 12 ml na minuto in da se kolona ne osuši. Tekočino, ki izteka, zavržemo. Nato eluiramo s 150 ml mešanice kloroforma/metanola (3.7) in zberemo ves eluat.

Eluat uparimo skoraj do suhega pri temperaturi, ki ne presega 50° C, pod tokom inertnega plina (3.11) v rotacijskem uparjalniku (4.5). Kvantitativno ostanek z uporabo kloroforma (3.2) ali mešanice benzen/acetoni-trila (3.6) prenesemo v 10 mililitrsko graduirano epruveto (4.10). Raztopino koncentriramo pod tokom inertnega plina (3.11) ter nato dopolnimo volumen do 2 ml s kloroformom (3.2) ali mešanico benzen/acetoni-trila (3.6).

#### 5.4 Tankoplastna kromatografija

Na TLC-ploščo (4.8), 2 cm od spodnjega roba in v razdaljah 2 cm, nanese volumne standardne raztopine in ekstrakta, navedenih spodaj:

- 10; 15; 20; 30 in 40 µl standardne raztopine aflatoksina B<sub>1</sub> (3.16),
- 10 µl ekstrakta, dobljenega v 5.3, in, nanese na isto točko, 20 µl standardne raztopine (3.16),
- 10 in 20 µl ekstrakta, dobljenega v 5.3.

Kromatogram se razvije v temi z enim od topil za razvijanje (3.18). Topilo je treba izbrati vnaprej, tako da nanese 25 µl kvalitativne standardne raztopine (3.17) na ploščo in preverimo, da sta, kadar sta razvita, aflatoksina B<sub>1</sub> in B<sub>2</sub> popolnoma ločena.

Pustimo, da topila izhlapijo v temi, in nato ploščo osvetlimo z UV-svetlobo, tako da jo postavimo 10 cm od svetilke (4.9). Madeži aflatoksina B<sub>1</sub> oddajajo modro fluorescenco.

#### 5.5 Kvantitativno določanje

Določi se vizualno ali s fluorodensitometrijo, kakor je navedeno spodaj.

##### 5.5.1 Vizualne meritve

Količino aflatoksina B<sub>1</sub> v ekstraktu določimo s primerjanjem intenzitete fluorescence madežev ekstrakta s fluorescenco madežev standardne raztopine. Po potrebi interpoliramo. Fluorescenca, dobljena z nanosom ekstrakta na standardno raztopino, mora biti intenzivnejša od fluorescence 10 µl ekstrakta in viden sme biti samo en madež. Če je intenziteta fluorescence, ki jo povzroči 10 µl ekstrakta, večja od intenzitete 40 µl standardne raztopine, ekstrakt 10 ali 100 krat razredčimo s kloroformom (3.2) ali mešanico benzen/acetona (3.6), preden jo ponovno izpostavimo tankoplastni kromatografiji.

##### 5.5.2 Meritve s fluorodensitometrijo

Intenziteto fluorescence madežev aflatoksina B<sub>1</sub> merimo s fluorodensitometrom (4.12) pri valovni dolžini vzbujanja 365 nm in valovni dolžini emisije 443 nm. Količino aflatoksina B<sub>1</sub> v madežih ekstrakta določimo s primerjanjem intenzitete njihove fluorescence s fluorescenco madežev standardnega aflatoksina B<sub>1</sub>.

#### 5.6 Potrditev identitete aflatoksina B<sub>1</sub>

Identiteto aflatoksina B<sub>1</sub> v ekstraktu potrdimo s postopki, navedenimi spodaj.

##### 5.6.1 Obdelava z žveplovo (VI) kislino

Žveplovo (VI) kislino (3.13) razpršimo na kromatogram, dobljen v 5.4. Fluorescenca madežev aflatoksina B<sub>1</sub> se mora pod UV-žarki iz modre spremeniti v rumeno.

##### 5.6.2 Dvodimenzionalna kromatografija, ki vključuje nastanek aflatoksina B<sub>1</sub>-hemiacetala (aflatoksina B<sub>2a</sub>)

Opomba: Pri izvajanju spodaj navedenih postopkov je treba natančno upoštevati diagram na sliki 3.

###### 5.6.2.1 Nanašanje raztopin

Na ploščo (4.8) vzporedno z robovi (6 cm navznoter od vsake strani) vrežemo dve ravni črti, da omejimo potovanje fronte topil. Na ploščo s kapilarnimi pipetami ali mikrobrizgalkami nanese naslednji raztopini:

- na točko A: volumen prečiščenega ekstrakta vzorca, dobljenega v 5.3, ki vsebuje približno 2,5 nm aflatoksina B<sub>1</sub>,
- na točki B in C: 25 µl standardne raztopine (3.16).

###### 5.6.2.2 Razvijanje

Kromatogram se razvije v smeri I, v temi, z uporabo topila za razvijanje (3.18.1) (1-centimetrska plast v nenasičeni kadi), dokler fronta topila ne doseže mejne črte topila.

Ploščo odstranimo iz kadi in pustimo, da se pet minut suši v temi pri sobni temperaturi. Nato klorovodikovo kislino (3.12) razpršimo po 2,5 cm visokem pasu, ki zajema točki A in B (prikazano s šrafiranim območjem na sliki 3), dokler ne potemni, pri tem pa preostanek plošče zaščitimo s stekleno ploščo. Pustimo 10 minut, da reagira v temi, in posušimo v toku zraka pri sobni temperaturi.

Nato se kromatogram razvije v smeri II, v temi, z uporabo topila za razvijanje (3.18.1) (1-centimetrska plast v nenasičeni kadi), dokler fronta topila ne doseže mejne črte topila. Ploščo odstranimo iz kadi in pustimo, da se posuši pri sobni temperaturi.

###### 5.6.2.3 Interpretacija kromatograma

Kromatogram opazujemo pod UV-svetlobo (4.9) in preverimo naslednje značilnosti.

(a) Pojav modrega fluorescentnega madeža aflatoksina B<sub>1</sub>, ki izhaja iz standardne raztopine, nanese na C (potovanje v smeri I).

(b) Pojav modrega fluorescentnega madeža nereagiranega (s klorovodikovo kislino) aflatoksina B<sub>1</sub> in intenzivnejše modrega fluorescentnega madeža aflatoksina B<sub>1</sub>-hemiacetala, ki oba izhajata iz standardne raztopine, nanese na B (potovanje v smeri II).

(c) Pojav madežev, ki ustrezajo madežem, opisanim v (b); izhajajo iz vzorca ekstrakta, nanesenega na A. Položaj teh madežev je opredeljen najprej s potovalno razdaljo aflatoksina B<sub>1</sub> iz A v smeri I (enaka, kakor jo je prepotoval standard, nanese na C) ter nato s potovalnimi razdaljami aflatoksina B<sub>1</sub>-hemiacetala od tam v smeri II (enake, kakor jih je prepotoval standard, nanese na B). Intenziteti fluorescence madežev hemiacetala, ki izhajajo iz ekstrakta in iz standarda, nanesenega na B, bi morali sovpadati.

## 6. Izračun rezultatov

### 6.1 Iz vizualnih meritev

Vsebnost aflatoksina B<sub>1</sub> v mikrogramih na kg vzorca (ppb) izračunamo s formulo:

$$(S \times Y \times V)/(W \times X)$$

pri čemer je:

Y in X = volumna, v mikrolitrih, standardne raztopine aflatoksina B<sub>1</sub> (3.16) in ekstrakta, ki ima podobno intenziteto fluorescence

S = koncentracija, v mikrogramih, aflatoksina B<sub>1</sub> na ml, v standardni raztopini (3.16)

V = končni volumen ekstrakta, v mikrolitrih, ob upoštevanju potrebnih razredčitev

W = masa, v gramih, vzorca, ki ustreza volumnu ekstrakta, prečiščenega na kolonah

### 6.2 Iz fluorodensitometričnih meritev

Vsebnost aflatoksina B<sub>1</sub> v mikrogramih na kg vzorca izračunamo s formulo:

$$(S \times V)/(W \times Y)$$

pri čemer je:

Y = volumen, v mikrolitrih, ekstrakta, nanesenega na ploščo (10 ali 20 µl)

S = količina, v nanogramih, aflatoksina B<sub>1</sub> v madežu ekstrakta (proporcionalna vrednosti vzetega Y), ki izhaja iz meritev

V = končni volumen ekstrakta, v mikrolitrih, ob upoštevanju potrebnih razredčitev

W = masa, v gramih, vzorca, ki ustreza volumnu ekstrakta, prečiščenega v koloni

## 7. Priprava in preskušanje standardne raztopine (3.16)

### 7.1 Določitev koncentracije aflatoksina B<sub>1</sub>

Pripravimo standardno raztopino aflatoksina B<sub>1</sub> v kloroformu (3.2) ali mešanici benzen/acetona (3.6) s koncentracijo od 8 do 10 µg/ml. S spektrofotometrom (4.11) določimo absorpcijski spekter med 330 in 370 nm.

Izmerimo optično gostoto (A) pri 363 nm, če je bila uporabljena raztopina kloroforma; oziroma pri 348 nm, če je raztapljanje potekalo v mešanici benzen/acetona.

Koncentracijo v mikrogramih aflatoksina B<sub>1</sub> na ml raztopine izračunamo s spodaj navedenimi formulami:

$$(312 \times A \times 1\,000)/20\,600 \text{ za raztopino kloroforma;}$$

$$(312 \times A \times 1\,000)/19\,800 \text{ za raztopino v mešanici benzen/acetona.}$$

Razredčimo po potrebi, zaščiteno pred dnevno svetlobo, da dobimo delovno standardno raztopino s koncentracijo aflatoksina B<sub>1</sub> približno 0,1 µg/ml. Če jo hranimo v hladilniku pri 4° C, je raztopina stabilna dva tedna.

### 7.2 Preskušanje kromatografske čistosti

Na ploščo (4.8) nanese 5 µl standardne raztopine aflatoksina B<sub>1</sub>, ki vsebuje od 8 do 10 µg/ml (7.1). Razvije se kromatogram, kakor je navedeno v 5.4. Na UV-svetlobi bi kromatogram moral prikazovati samo en madež in na območju začetnega nanosa ne sme biti zaznavne fluorescence.

## 8. Ponovljivost

Razlika med rezultatoma dveh vzporednih določitev, ki jih na istem vzorcu izvaja isti analitik, ne sme biti večja od:

- 25 % glede na največjo vrednost, za vsebnosti aflatoksina B<sub>1</sub> od 10 do 20 µg/kg,
- 5 µg, v absolutni vrednosti, za vsebnosti med 20 in do 50 µg/kg,
- 10 % glede na največjo vrednost, za vsebnosti nad 50 µg/kg.

## 9. Obnovljivost

Opombe v zvezi z metodama A in B

### 1. Razmastitev

Vzorci, ki vsebujejo več kakor 5 % maščob, moramo razmastiti s petroletrom (vrelišče 40 do 60° C) po pripravah, navedenih v 5.1.

V takih primerih morajo biti rezultati analize izraženi glede na maso nerazmaščene vzorca.

### 2. Obnovljivost rezultatov za metodo A

Obnovljivost rezultatov, tj. odstopanje med rezultati, dobljenimi v dveh ali več laboratorijih na istem vzorcu, je bila ocenjena pri:

±50 % glede na srednjo vrednost za srednje vrednosti aflatoksina B od 10 do 20 µg/kg;

±10 µg/kg k srednji vrednosti za srednje vrednosti, večje od 20 in do 50 µg/kg;

±20 % glede na srednjo vrednost za srednje vrednosti nad 50 µg/kg.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 76/372/EGS.



## B. DOLOČANJE AFLATOKSINA B<sub>1</sub> Z METODO TEKOČINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE LOČLJIVOSTI\*

### 1. Namen in področje uporabe

Ta metoda omogoča določanje aflatoksina B<sub>1</sub> v krmi, vključno s krmo, ki vsebuje citrusovo pulpo. Spodnja meja določevanja je 0,001 mg/kg (1 ppb).

### 2. Princip

Vzorec ekstrahiramo s kloroformom. Ekstrakt prefiltriramo in alikvotne dele prečistimo v Florisil kartuši in nato v kartuši C<sub>18</sub>. Končno ločevanje in določanje poteka po postopku tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) z uporabo kolone C<sub>18</sub> z reverzno fazo, čemur sledi postkolonska derivatizacija z jodom in vodo, ter določanje fluorescence.

#### Opomba:

Mikotoksini so izredno toksične snovi. Ravnanje z njimi se mora opravljati v digestoriju. Kadar so toksini v suhi obliki se morajo sprejeti posebni varstveni ukrepi zaradi njihove elektrostatične narave in tendence, da se razpršijo po delovni površini.

### 3. Reagenti

3.1. Kloroform, stabiliziran z 0,5 do 1,0 % etanola, glede na maso. Glej točko 10.2

3.2. Metanol, primeren za metodo HPLC za pripravo 3.6

3.3. Aceton

3.4. Acetonitril, primeren za metodo HPLC

3.5. Topila za razvijanje: Pripravimo jih en dan pred uporabo ali pa zrak v topilih odstranimo ultrazvočno

3.5.1. Mešanica acetona (3.3) in vode, 98 + 2 (v + v)

3.5.2. Mešanica vode in metanola (3.2), 80 + 20 (v + v)

3.5.3. Mešanica vode in acetona (3.3), 85 + 15 (v + v)

3.6. Mobilna faza za HPLC

Mešanica vode, metanola (3.2) in acetonitrila (3.4), 130 + 70 + 40 (v + v + v)

*Opomba:* Sestavo topila mobilne faze je treba prilagoditi glede na značilnosti uporabljene kolone HPLC.

3.7. Nasičena jodova raztopina: 400 ml vode dodamo 2 g joda. Mešamo vsaj 90 minut in filtriramo skozi membranski filter (4.15). Nasičeno raztopino zavarujemo pred svetlobo, da preprečimo fotokemijsko razgradnjo.

3.8. Celit 545, izpran v kislini, ali enakovreden

3.9. Florisil kartuša (Waters SEP-PAK) ali enakovredna

3.10. Kartuša C<sub>18</sub> (Waters SEP-PAK) ali enakovredna

3.11. Inertni plin, npr. dušik

3.12. Standardna raztopina aflatoksina B<sub>1</sub> v kloroformu, koncentracije 10 µg/ml. Koncentracijo raztopine preverimo na naslednji način: določimo absorpcijski spekter raztopine med 330 in 370 nm s pomočjo spektrofotometra (4.23). Izmerimo absorbenco (A) pri največji vrednosti blizu 363 nm. Izračunamo koncentracijo aflatoksina B<sub>1</sub> v mikrogramih na mililiter raztopine po enačbi:

Koncentracija (µg/ml) =

$$\frac{312 \times A \times 1000}{22\,300} = 13,991 \times A$$

3.12.1. Osnovna standardna raztopina aflatoksina B<sub>1</sub> v kloroformu

Prenesemo 2,5 ml standardne raztopine aflatoksina B<sub>1</sub> (3.12) v 50-ml merilno bučko in dopolnimo s kloroformom do oznake (3.1). Dobro zaprto raztopino, zavito v aluminijasto folijo, shranimo na hladno (4 °C) v temnem prostoru.

3.13. Raztopine aflatoksina B<sub>1</sub> za umeritev po metodi HPCL

*Opomba:* Za pripravo teh raztopin uporabimo stekleno posodo, izprano v kislini (glej 4, Oprema).

#### 3.13.1. Raztopina za umeritev 4ng/ml

Merilno bučko z osnovno standardno raztopino (3.12.1) segrevamo na sobno temperaturo v aluminijasti foliji (nekaj ur). Prenesemo 400 µl osnovne standardne raztopine (200 ng aflatoksina B<sub>1</sub>) v 50-ml merilno bučko in raztopino odparimo do suhega pod tokom inertnega plina (3.11).

Dobljen ostanek raztopimo v približno 20-ml mešanice vode/acetona (3.5.3), dopolnimo do oznake z mešanico vode/acetona in dobro premešamo.

#### 3.13.2. Raztopina za umeritev 3 ng/ml

Kvantitativno prenesemo 7,5 ml raztopine za umeritev (3.13.1) v 10-ml merilno bučko, dopolnimo do oznake z mešanico vode/acetona (3.5.3) in dobro premešamo.

#### 3.13.3. Raztopina za umeritev 2 ng/ml

Kvantitativno prenesemo 25 ml raztopine za umeritev (3.13.1) v 50-ml merilno bučko, dopolnimo do oznake z mešanico vode/acetona (3.5.3) in dobro premešamo.

Ta raztopina se imenuje tudi referenčni standard, ki se uporablja za ponovno vbrizganje med HPLC (5.5).

#### 3.13.4. Raztopina za umeritev 1 ng/ml

Kvantitativno prenesemo 2,5 ml raztopine za umeritev (3.13.1) v 10-ml merilno bučko, dopolnimo do oznake z mešanico vode/acetona (3.5.3) in dobro premešamo.

3.14. Ampula, ki vsebuje mešanice aflatoksinov B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> in G<sub>2</sub>, s koncentracijami približno 1, 0,5, 1 in 0,5 µg/ml v 1 ml kloroforma

#### 3.14.1. Kromatografska preskusna raztopina

Vsebino ampule (3.14) prenesemo v epruveto s steklenim zamaškom ali fiolo z navojem. Prenesemo 40 µl te raztopine v epruveto s steklenim zamaškom (izprano v kislini) (4.22). Kloroform odparimo pod tokom inertnega plina (3.11) in ponovno raztopimo v 10 ml mešanice vode/acetona (3.5.3).

#### 3.15. Reagenti za potrditveni preskus (6)

##### 3.15.1. Nasičena raztopina natrijevega klorida

##### 3.15.2. Natrijev sulfat, brezvoden, v zrnu

## 4. Oprema

*Opozorilo:* Uporaba steklene posode, ki ni izprana v kislini, za vodne raztopine aflatoksina lahko povzroči izgube. Posebno pazljivo je treba ravnati z novo stekleno posodo in stekleno posodo za enkratno uporabo, kot so fiole za samovzorčenje in pasteurjeve pipete. Laboratorijsko stekleno posodo, ki pride v stik z vodno raztopino aflatoksinov, je treba namočiti v razredčeno kislino (npr. žveplena kislina = 2 mol/l) več ur, nato pa izprati z destilirano vodo, da odstranimo sledove kisline (npr. trikrat, preverimo s pH indikatorjem). V praksi je to potrebno narediti za bučko z ovalnim dnom (4.4), merilne bučke, merilne valje, fiole ali epruvete, ki se uporabljajo za raztopine za umeritev in končne ekstrakte (zlasti fiole za samovzorčenje) in pasteurjeve pipete, če se te uporabljajo za prenos raztopin za umeritev ali ekstrakte.

#### 4.1. Naprava za mešanje in mletje

#### 4.2. Velikost odprtine sita 1,0 mm, (ISO R 565)

#### 4.3. Mehanski stresalnik

#### 4.4. Rotacijski vakumski izparilnik s 150 do 250-ml bučko z ovalnim dnom

4.5. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti, injektor z zanko primeren za vbrizganje 250 µl. Glej navodila proizvajalca za delno ali popolno polnjenje zanke

#### 4.6. Analitska kolona HPLC: pakiranje 3 µm ali 5 µm C<sub>18</sub>

#### 4.7. Nepulzirajoča črpalka za dodajanje jodovega postkolonskega reagenta

#### 4.8. Valco zero dead volume Tee, nerjavno jeklo (1/16" x 0,75 mm)

4.9. Reakcijska spirala; Teflon ali nerjavno jeklo. Dimenzije 3 000 x 0,5 mm do 5 000 x 0,5 mm so bile ugotovljene kot ustrezne v kombinaciji s 5-µm ali 3-µm HPLC kolonami

4.10. Termostatično vzdrževana vodna kopel, nastavljena na 60 °C, pri čemer se lahko temperatura regulira za vsaj 0,1 °C

4.11. Detektor fluorescence z valovnimi dolžinama vzbujanja pri 365 nm in emisije pri 435 nm. (Za filtrirni instrument: valovna dolžina emisije > 400 nm). Ki omogoča detekcijo vsaj 0,05 ng aflatoksina B<sub>1</sub>. Protipritisk je priporočljiv (npr. restriktor, spirala iz teflona ali nerjavnega jekla, povezana z izhodom iz detektorja), da bi s tem preprečili zračne mehurčke v pretočni celici

#### 4.12. Tračni zapisovalnik

#### 4.13. Elektronski integrator (neobvezen)

#### 4.14. Naguban filtrirni papir s premerom: 24 cm, Macherey-Nagel 617 1/4 ali enakovreden

#### 4.15. Membranski filter z velikostjo por 0,45 µm, Millipore HAWP 04700 ali enakovreden

#### 4.16. 500-ml erlenmajerica s steklenim zamaškom

#### 4.17. Steklена kolona (notranji premer približno 1 cm, dolžina približno 30 cm), opremljena s konico Luer

- 4.18. Luer petelinček , odporen na kloroform (npr. Bio-rad 7328017, Analytichem AI 6078, J.T. Baker 4514 ali enakovreden)
- 4.19. Brizga, odporna na kemikalije, 10-ml konektor Luer
- 4.20. Brizga za HPLC vbrizgavanje 250 µl (glej 4.5)
- 4.21. 100-µl mikro brizga za pripravo raztopin za umeritev (s tehtanjem preverimo, ali je točnost v okviru 2 %)
- 4.22. 10-ml steklenička z zamaškom, kalibrirana
- 4.23. Spektrofotometer, primeren za meritve v UV območju spektra
- 4.24. Oprema za potrditveni preskus (6)
- 4.24.1. 100-ml lij ločnik, izpran v kislini, s teflonskim petelinčkom
- 4.24.2. Grelni blok, 40 to 50 °C

## 5. Postopek

### 5.1. Priprava vzorca

Vzorec zdrobimo tako, da v celoti preide skozi sito (4.2).

### 5.2. Preskusni vzorec

Natehtamo 50 g pripravljenega preskusnega vzorca v erlenmajerico (4.16).

### 5.3. Ekstrakcija

Preskusnemu vzorcu dodamo 25 g Celita (3.8), 250 ml kloroforma (3.1) in 25 ml vode (5.2). Erlenmajerico zamašimo in stresamo 30 minut z mehanskim stresalnikom (4.3). Filtriramo skozi naguban filter (4.14). Zberemo 50 ml filtrata. Če je potrebno, vzamemo alikvot filtrata in razredčimo do 50 ml s kloroformom, tako da koncentracija aflatoksin B<sub>1</sub> ni večja od 4 ng/ml.

### 5.4. Čiščenje (postopek je treba izvesti brez večjih prekinitiv)

Opozorilo:

— Laboratorij, v katerem opravljamo analize, ustrezno zavarujemo pred dnevno svetlobo. To lahko učinkovito opravimo tako, da uporabimo :

- (i) folijo, ki absorbira UV, na oknih v kombinaciji z zasenčeno svetlobo (ni neposredne sončne svetlobe);
- (ii) zaveso ali žaluzije v kombinaciji z umetno svetlobo (sprejemljive so fluorescenčne cevi);

— Raztopine, ki vsebujejo aflatoksin, moramo čim bolj zaščititi pred svetlobo (hranimo jih na temnem, uporabimo aluminijasto folijo).

#### 5.4.1. Čiščenje s Florisil SEP-PAK

##### 5.4.1.1. Priprava sestava kolona-kartuša

Petelinček (4.18) pritrdimo na krajši del kartuše Florisil (3.9) (Glej sliko 1). Kartušo izperemo in odstranimo zrak tako, da vzamemo 10 ml kloroforma (3.1) in hitro pretočimo 8 ml kloroforma prek petelinčka skozi kartušo z uporabo brizge (4.19). Daljši del kartuše pritrdimo na stekleno kolono (4.17) in pretočimo preostala 2 ml kloroforma skozi kartušo v kolono. Petelinček zapremo. Brizgo odstranimo.

##### 5.4.1.2. Čiščenje

V sestav kolona-kartuša dodamo filtrat iz 5.3 in pustimo, da odteče s pomočjo težnosti. Izperemo s 5 ml kloroforma (3.1) in nato z 20 ml metanola (3.2). Eluate zavržemo. Med temi postopki zagotovimo, da se sestav kolona-kartuša ne osuši.

Eluiramo aflatoksin B<sub>1</sub> s 40 ml mešanice aceton/voda (3.5.1) in v bučko z ovalnim dnom rotacijskega uparjalnika zberemo ves eluat (4.4). Eluat koncentriramo na rotacijskem uparjalniku pri 40 °C do 50 °C, dokler se aceton ne destilira več. (*Opomba:* približno 0,5 ml tekočine ostane v bučki. Preskusi so pokazali, da nadaljnje uparjanje ni škodljivo in kadar ostane 0,5 ml tekočine, ni več znatne vsebnosti acetona. Ostanke acetona bi lahko povzročili izgube aflatoksin B<sub>1</sub> na kartuši C<sub>18</sub>). Dodamo 1 ml metanola (3.2), bučko stresemo, da raztopimo aflatoksin B<sub>1</sub> na straneh bučke, dodamo 4 ml vode in premešamo. Kartušo odstranimo in zavržemo. Stekleno kolono izperemo z vodo in pripravimo za čiščenje na C<sub>18</sub>.

## 5.4.2. Čiščenje C<sub>18</sub> SEP-PAK

### 5.4.2.1. Priprava sestava kolona-kartuša

Petelinček pritrdimo (4.18) na krajši del kartuše C<sub>18</sub> (3.10) (glej sliko 1). Nastavimo kartušo in odstranimo zrak, tako da hitro pretočimo 10 ml metanola (3.2) prek petelinčka z uporabo brizge (4.19). (Zračni mehurčki v kartuši so vidni kot svetle pike na sicer sivkastem ozadju). Vzamemo 10 ml vode in pretočimo 8 ml skozi kartušo (pri prehodu z metanola na vodo pazimo, da zrak ne pride v kartušo). Daljši del kartuše pritrdimo na stekleno kolono (4.17) in pretočimo preostala 2 ml vode skozi kartušo v kolono. Petelinček zapremo. Brizgo odstranimo.

### 5.4.2.2. Čiščenje

Ekstrakt, dobljen v 5.4.1.2, kvantitativno prenesemo v stekleno kolono (4.17), pri čemer bučko dvakrat speremo z mešanico 5 ml vode/metanola (3.5.2), pri čemer mešanica odteče s pomočjo težnosti. Med temi postopki zagotovimo, da se sestav kolona-kartuša ne osuši. (Kadar se naredijo zračni mehurčki v zoženem delu blizu kartuše, ustavimo pretok in potolčemo po vrhu steklene kolone, da odstranimo zračne mehurčke. Nato nadaljujemo). Eluiramo s 25 ml mešanice vode/metanola. Eluat zavrzemo. Aflatoksin B<sub>1</sub> eluiramo s 50 ml mešanice vode/acetona (3.5.3), in v 50-ml merilno bučko zberemo ves eluat. Z vodo dopolnimo do oznake in premešamo: nastalo preskusno raztopino uporabimo za kromatografijo (5.5).

*Opozorilo:* Filtracija končnega ekstrakta pred HPLC običajno ni potrebna. Če štejemo za potrebno, ne smemo uporabiti celuloznega filtra, ker lahko povzroči izgubo aflatoksina B<sub>1</sub>. Sprejemljivi so teflonski filtri.

## 5.5. Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

(Za nastavitev opreme glej sliko 2). Potrebno je dovolj časa za pripravo in stabilizacijo instrumentov.

### Opomba 1:

Stopnje pretoka za mobilno fazo in za postkolonski reagent so le okvirne. Po možnosti jih prilagodimo glede na značilnosti kolone HPLC.

### Opomba 2:

Odziv detektorja na aflatoksin B<sub>1</sub> je odvisen od temperature, zato je potrebna kompenzacija odklona (glej sliko 3). Z vbrizganjem določene količine referenčnega standarda aflatoksina B<sub>1</sub> (3.13.3) v rednih časovnih razmikih (tj. vsako tretje vbrizganje), lahko korigiramo vrednosti vrha aflatoksina B<sub>1</sub> med temi referenčnimi standardi tako, da uporabimo povprečni odziv, če je razlika med odzivi zaporednih referenčnih standardov zelo majhna (< 10 %). Zato je treba opraviti vbrizganje brez prekinitiv. Če je potrebna prekinitiv, mora biti prvo vbrizganje pred prekinitivjo in prvo vbrizganje po prekinitvi referenčni standard (3.13.3). Ker je umeritvena krivulja linearna in poteka skozi izhodišče, se količine aflatoksina B<sub>1</sub> v vzorcih določijo neposredno s sklicevanjem na bližnje standarde.

### 5.5.1. Nastavitev črpalke HPLC

Črpalke HPLC (4.5) nastavimo na pretok 0,5 ali 0,3 ml/min za 5- $\mu$ m ali 3- $\mu$ m kolono HPLC (4.6) z uporabo mobilne faze (3.6).

### 5.5.2. Nastavitev črpalke za postkolonsko reakcijo

Črpalke nastavimo (4.7) na pretok 0,2 do 0,4 ml/min z jodom nasičene vodne raztopine (3.7). Okvirni napotek: Pretoki približno 0,4 ali 0,2 ml/min so priporočljivi v kombinaciji s pretoki 0,5 oziroma 0,3 ml/min mobilne faze (3.6).

### 5.5.3. Detektor fluorescence

Detektor fluorescence nastavimo (4.11) na valovno dolžino vzbujanja = 365 nm in emisije = 435 nm (instrument s filtrom: > 400 nm). Atenuator detektorja nastavimo tako, da dosežemo približno 80 % polnega odklona pisala za 1 ng aflatoksina B<sub>1</sub>.

### 5.5.4. Injektor

Za vse raztopine vbrizgamo 250  $\mu$ l v skladu z navodili proizvajalca injektorja.

### 5.5.5. Preverjanje kromatografske separacije

Vbrizgamo kromatografsko preskusno raztopino (3.14.1). Spodnji deli krivulje morajo biti manjši od 5 % vsote zgornjih delov krivulje sosednjih vrhov.

### 5.5.6. Preverjanje stabilnosti sistema

Pred vsako serijo analiz vbrizgamo referenčni standard (3.13.3), dokler ne dosežemo stabilne površine vrhov (*Opomba:* Vrhovi aflatoksina B<sub>1</sub> med dvema zaporednima vbrizgoma se ne smejo razlikovati za več kot 6 %). Nemudoma nadaljujemo s preverjanjem linearosti (5.5.7).

### 5.5.7. Preverjanje linearosti

Vbrizgamo umeritvene raztopine aflatoksina B<sub>1</sub> (3.13.1 do 3.13.4). Pri vsakem tretjem vbrizganju uporabimo referenčni standard (3.13.3) za popravek odklona pri odzivu (*Opomba:* Odzivi vrhov za ta referenčni standard se ne smejo razlikovati za več kot 10 % v 90 minutah). Popravek odklona je v skladu z enačbo, navedeno v točki 7. Umeritveni graf mora biti linearen in potekati skozi izvor znotraj dvakratne standardne napake ocenjenega Y. Vrednosti se ne smejo razlikovati za več kot 3 % od nazivnih vrednosti. Če so te zahteve izpolnjene, nemudoma nadaljujemo. Če niso izpolnjene, pa težavo ugotovimo in odpravimo, preden nadaljujemo.

### 5.5.8. Vbrizganje ekstraktov vzorcev

Vbrizgamo očiščene ekstrakte vzorca (5.4.2.2). Po vsakem drugem vbrizganju ekstrakta vzorca ponovimo vbrizganje referenčnega standarda (3.13.3) v skladu z naslednjim nizom: referenčni standard, ekstrakt, ekstrakt, referenčni standard, ekstrakt, ekstrakt, referenčni standard itd.

## 6. Potrditveni preskus

### 6.1. Nadaljnja obdelava ekstrakta (5.4.2.2)

Končnemu ekstraktu iz 5.4.2.2. dodamo 5 ml raztopine natrijevega klorida (3.15.1). Ekstrahiramo trikrat z 2 ml kloroforma (3.1) eno minuto v liju ločniku (4.24.1). Kombinirane ekstrakte kloroforma prelijemo čez približno 1 g natrijevega sulfata (3.15.2) v 10-ml epruveto. Uporabimo lahko manjši lij (premer: 4 cm) s koščkom surovega bombaža v vratu lija, ki ga pokriva približno 1 g natrijevega sulfata.

Plast natrijevega sulfata izperemo z nekaj ml kloroforma, ki ga zberemo v isti epruveti. Ekstrakt kloroforma izparimo do suhega v isti epruveti z uporabo grelnega bloka (4.24.2) in ponovno raztopimo v 1 ml kloroforma.

### 6.2. Priprava derivata in tankoplastna kromatografija

V skladu s postopkom, določenim v točki 5.6.2. v metodi 45: Določanje aflatoksina B<sub>1</sub>, A. Enodimenzionalna tankoplastna kromatografska metoda.

## 7. Izračun rezultatov

Vsebnost aflatoksina B<sub>1</sub> (μg/kg) v vzorcu izračunamo s formulo:

vsebnost aflatoksina B<sub>1</sub> v

$$\mu\text{g/kg} = \frac{m \times V_{\text{ext}}}{V_m \times M \times \frac{V_f}{V_c}}$$

pri čemer je:

m = količina aflatoksina B<sub>1</sub> v ng, ki jo predstavlja vrh vzorca aflatoksina B<sub>1</sub>, izračunana na naslednji način:

$$m = \frac{P(\text{sample})}{P(\text{st}_1) + P(\text{st}_2)} \times 2 r(\text{st})$$

P (sample) = površina vrha aflatoksina B<sub>1</sub> vzorca

P(st<sub>1</sub>) = površina vrha aflatoksina B<sub>1</sub>, ki izhaja iz predhodnega vbrizganja referenčnega standarda (3.13.3)

P(st<sub>2</sub>) = površina vrha aflatoksina B<sub>1</sub>, ki izhaja iz naslednjega vbrizganja referenčnega standarda (3.13.3)

r(st) = vbrizgana količina aflatoksina B<sub>1</sub> v referenčnem standardu (3.13.3) v ng

V<sub>m</sub> = prostornina vbrizganega ekstrakta vzorca v ml

V<sub>ext</sub> = končna prostornina ekstrakta vzorca v ml, z upoštevanjem opravljene razredčitve

(5.3)

M = masa vzorca v g

V<sub>f</sub> = prostornina filtrata, prenesenega v kartušo Florisil (5.4.1.2) v ml

V<sub>c</sub> = prostornina kloroforma, uporabljenega za ekstrahiranje vzorca v ml

Če upoštevamo postopek v tem protokolu, se formula glasi: vsebnost aflatoksina B<sub>1</sub> v μg/kg = 20 x m.

7.1. Izračun lahko izvedemo tudi z merjenjem vrhov.

## 8. Ponovljivost:

Glej točko 10.1.

## 9. Obnovljivost:

Glej točko 10.1

## 10. Opazovanje

### 10.1. Natančnost

Rezultati ponovljivosti in obnovljivosti medlaboratorijske študije (<sup>1</sup>), opravljene na mednarodni ravni za krmne mešanice, so navedeni v Razpredelnici 1. Tu uporabljeni izraz ponovljivost (*r*) je definiran kot največje razmerje, ki ni signifikantno pri 95 % ravni verjetnosti za primerjavo dveh odčitkov za isti vzorec v istem laboratoriju pod podobnimi pogoji. Izraz obnovljivost (*R*) je definiran podobno, za primerjavo dveh različnih laboratorijev. V skladu z SIST ISO 3534 in Odločbo Komisije 89/610/EGS z dne 14. novembra 1989, ki predpisuje referenčne metode in seznam nacionalnih referenčnih laboratorijev za detekcijo reziduvov sta *r* in *R* navedena v Razpredelnici 1 kot koeficienta variacije.

#### Razpredelnica 1

### Ponovljivost (*r*) in obnovljivost (*R*), izraženi kot razmerje in ustrezni koeficienti variacije

(15 laboratorijev)

Raven	<i>r</i>	<i>R</i>	CV <sub>r</sub> (*)	CV <sub>R</sub>
(µg/kg)			(%)	(%)
8 & 14	1,4	1,7	11	18
(*) CV = koeficient variacije				

### 10.2. Stabilizacija kloroforma (3.1)

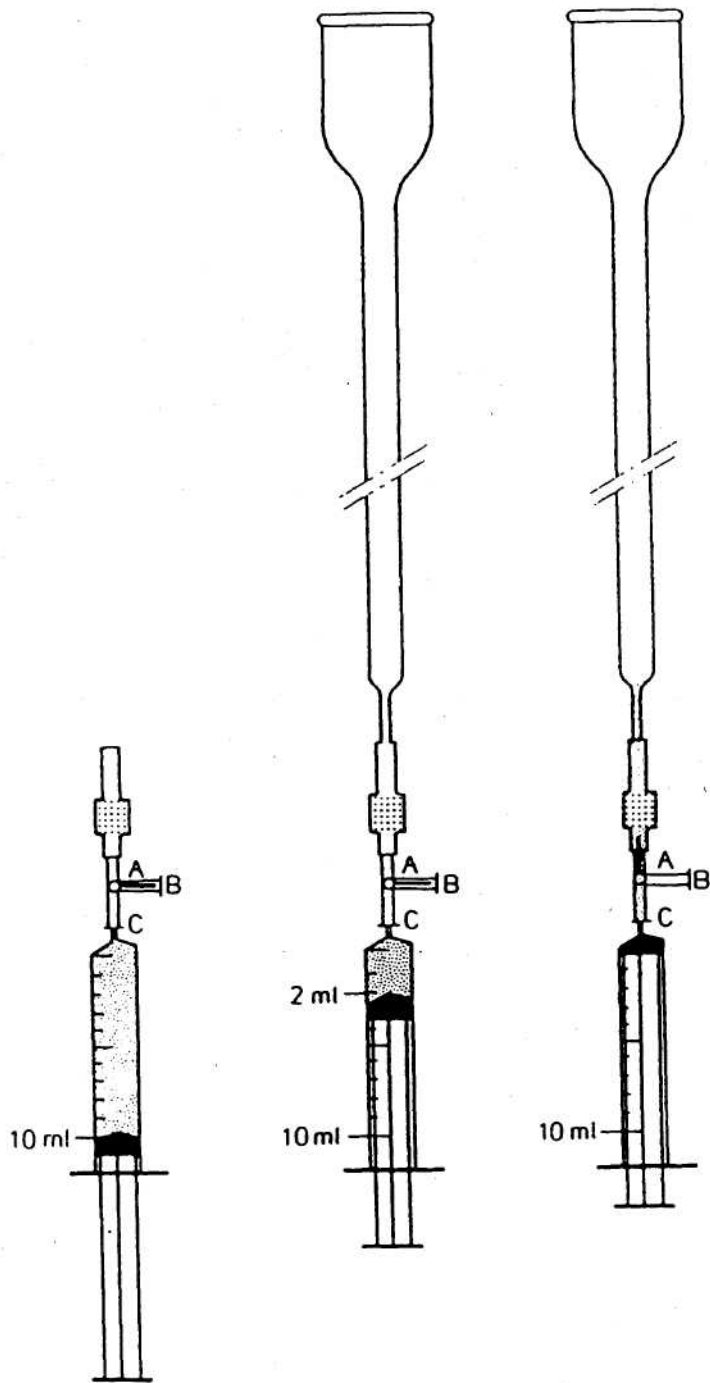
Adsorpcijske značilnosti kartuše se lahko spremenijo, če se uporabijo drugi stabilizatorji in ne etanol. To je treba preveriti v skladu s točko 10.3, kadar opisani kloroform ni na voljo.

### 10.3. Točnost

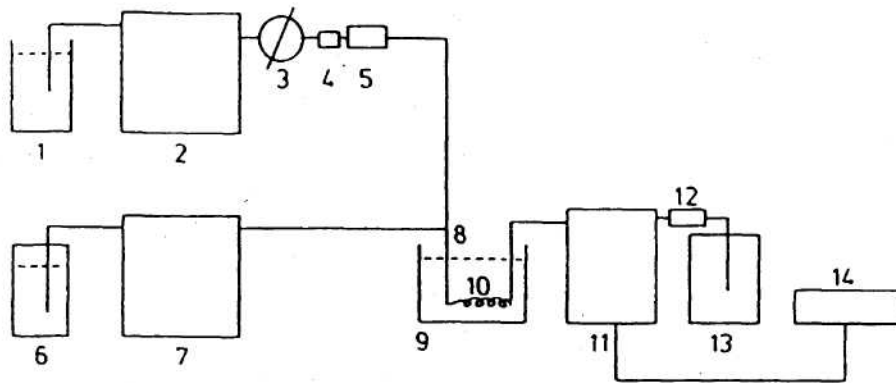
Pravilna uporaba metode se preveri s ponovljenimi merjenji na potrjenih referenčnih materialih. Če slednji niso na voljo, je treba izvajanje metode preveriti s ponovnimi preskusi na ojačanih slepih vzorcih. Odklon srednje vrednosti od dejanske vrednosti, izražene kot odstotek dejanske vrednosti, mora biti v mejah od -20 do +10%.

<sup>1</sup> Egmond, H.P. van, Heisterkamp, S.H. and Paulsch, W.E. (1991). *Food Additives and Contaminants* 8, 17-29.

Slika 1: Sestav kolona-kartuša



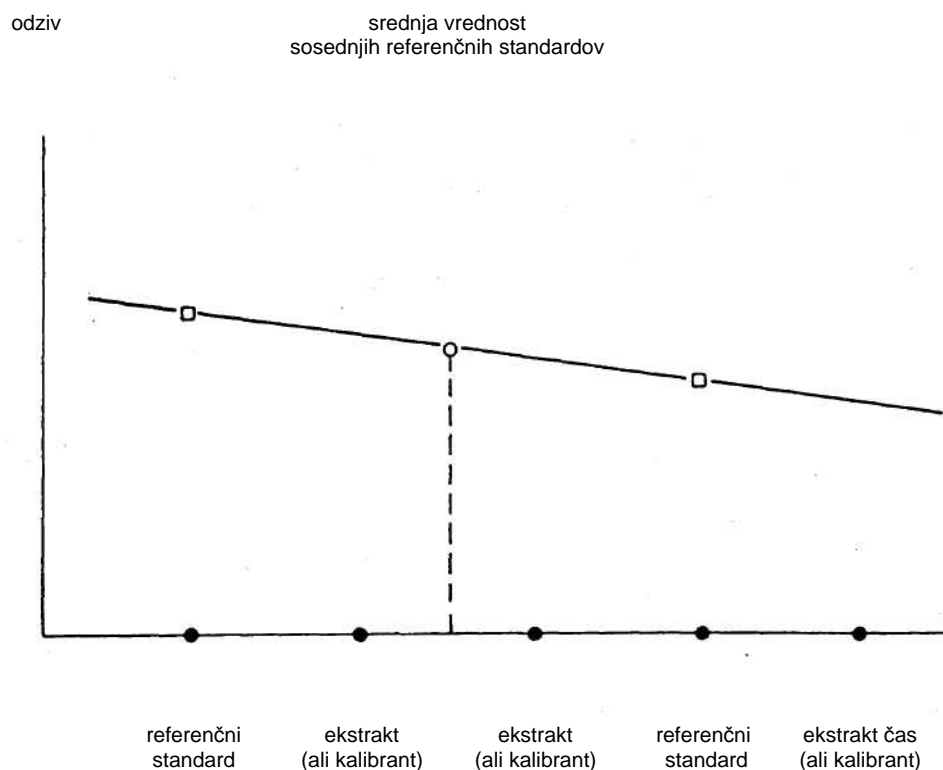
Slika 2: Shema poteka sistema LCs postkolonsko derivatizacijo z jodom.



1. Mobilna faza
2. Črpalka
3. Ventil za vbrizgavanje
4. Predkolona
5. Analitska kolona HPLC
6. Nasičena jodova raztopina
7. Črpalka za reagent
8. T spoj
9. Termostatska kopel
10. Reakcijska spirala
11. Detektor fluorescence
12. Regulirni ventil
13. Odpadna topila
14. Tračni zapisovalnik/integrator



Slika 3: Kompenzacija odklona pri odzivu na aflatoksin B<sub>1</sub> z vbrizganjem referenčnega standarda (3.13.3) v rednih razmikih



\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 92/95/EGS.

#### METODA 46\*

### ZAHTEVJE ZA MIKROSKOPSKO ODKRIVANJE, IDENTIFIKACIJO ALI OCENO SESTAVIN ŽIVALSKEGA IZVORA V KRMI

#### 1. Cilj in področje uporabe

Te zahteve se uporabljajo, kjer se odkrivanje sestavin živalskega izvora (opredeljenih kot proizvodi iz predelave teles in telesnih delov sesalcev, perutnine in rib) v krmi izvaja z mikroskopskimi preiskavami v okviru usklajenega programa nadzora na področju prehrane živali skladno z Direktivo Sveta 95/53/ES z dne 25. oktobra 1995 o določitvi načel izvajanja uradnega nadzora na področju prehrane živali (UL L št. 265, z dne 8.11. 1995, str. 17, z vsemi spremembami; v nadaljnjem besedilu: Direktiva 95/53/ES). Če se metode v tej prilogi uporabljajo pri vseh uradnih testih, se lahko izvedejo tudi dodatni testi, ki temeljijo na nekoliko spremenjeni ali drugi metodi, da bi se izboljšalo odkrivanje nekaterih vrst živalskih sestavin ali da se nadalje podrobneje opredeli izvor živalskih sestavin. Nadalje se pri pregledovanju nekaterih posebnih živalskih sestavin, kot so plazma ali kosti v loju (glej tudi točko 9), lahko uporabi variantni protokol, če so te analize opravljene poleg analiz, ki so predvidene z usklajenim programom nadzora.

#### 2. Občutljivost

V krmi lahko zaznamo, odvisno od sestavin živalskega izvora, zelo majhne količine (< 0,1 %).

#### 3. Princip

Za identifikacijo se uporabi reprezentativni vzorec, vzet v skladu z določbami Direktive Komisije 76/371/EGS z dne 1. marca 1976 o določitvi metod Skupnosti za vzorčenje pri uradnem nadzoru krme (UL L št. 102, z dne 15.4. 1976, str. 1 z vsemi spremembami, v nadaljnjem besedilu: Direktiva 76/371/EGS), ki je bil ustrezno pripravljen za obdelavo krme, ki ima nizko vsebnost vlage, je ustrezen naslednji protokol. Krma s količino vlage večje kot 14 % se pred obdelavo osuši (kondenzira). Posebno krmo ali sestavine te krme (npr. maščobe, olja) je treba namensko obdelati (glej točko 9). Sestavine živalskega izvora se identificirajo na podlagi tipičnih, mikroskopsko prepoznavnih značilnosti (to je mišičnih vlaken in drugih mesnih delcev, hrustanca, kosti, roževine, ščetin, krvi, perja, jajčnih lupin, ribjih kosti, luskin). Identifikacijo moramo izvesti na presejani frakciji (6.1) in koncentrirani usedlini (6.2) vzorca.

## 4. Reagenti

### 4.1 Sredstvo za pripravo preparatov

#### 4.1.1 Kloralhidrat (vodni, 60 % m/v)

#### 4.1.2 Lug (NaOH 2,5 % m/v or KOH 2,5 % m/v) za presejane frakcije

#### 4.1.3 Parafinsko olje ali glicerol (viskoznost: 68-81) za mikroskopska opazovanja v usedlini

### 4.2 Sredstva za izpiranje

#### 4.2.1 Alkohol, 96 %

#### 4.2.2 Aceton

### 4.3 Sredstvo za koncentriranje

#### 4.3.1 Tetrakloretilen (gostota 1,62)

### 4.4 Reagenti za obarvanje

#### 4.4.1 Jod/raztopina kalijevega jodida (raztopimo 2 g kalijevega jodida v 100 ml vode in dodamo 1 g joda ter pogosto pretresemo)

#### 4.4.2 Alizarin rdeče (razredčimo 2,5 ml 1M hidrosolne kisline v 100 ml vode in raztopini dodamo 200 mg alizarin rdeče)

#### 4.4.3 Cistinski reagent (2 g svinčevega acetata, 10 g NaOH/100 ml H<sub>2</sub>O)

#### 4.4.4 Raztopina jod/kalijev jodid (raztopljen v 70 % etanolu)

### 4.5 Reagent za beljenje

#### 4.5.1 Komercialna raztopina natrijevega hipoklorita (9,6 % aktivnega klora)

## 5. Oprema in pripomočki

### 5.1 Analitska tehtnica (točnost 0,01 g razen za koncentrirano usedlino: 0,001 g)

### 5.2 Pribor za mletje (drobilni mlin ali terilnica, posebej za krmo, ki ob analizi vsebuje > 15 % maščobe)

### 5.3 Sito z mrežico s kvadratnimi odprtini širine največ do 0,50 mm

### 5.4 Lij ločnik ali konična čaša za usedlino

### 5.5 Stereomikroskop (najmanj 40 kratna povečava)

### 5.6 Sestavljeni mikroskop (najmanj 400 kratna povečava), prepustna svetloba/polarizirana svetloba

### 5.7 Standardna laboratorijska steklovina

Vso opremo moramo temeljito očistiti. Liji ločniki in steklovina se morajo oprati v pomivalnem stroju. Sita se morajo očistiti z uporabo krtače s trdimi ščetinami.

## 6. Postopek

Peletirano krmo lahko predhodno presejemo, če se obe frakciji analizirata kot posamezen vzorec.

Obdelamo najmanj 50 g vzorca (previdno zdrobimo s primerno opremo za drobljenje (5.2), če je potrebno, da dobimo ustrezno strukturo). Iz zmlatega materiala vzamemo dva reprezentativna dela, enega za presejano frakcijo (najmanj 5 g) (6.1) in enega za koncentrirano usedlino (najmanj 5 g) (6.2). Za identifikacijo dodatno lahko uporabimo barvanje z reagenti za barvanje (6.3).

Da identificiramo naravo živalskih beljakovin in izvor delcev se za odločitev lahko uporabi sistem podpore, kot je Aries, in lahko dokumentiramo referenčne vzorce.

### 6.1 Identifikacija sestavin živalskega izvora v presejanih frakcijah

Najmanj 5 g vzorca presejemo skozi sito (5.3) v dve frakciji.

Presejano(e) frakcijo(e) z velikimi delci (ali reprezentativni del frakcije) v tankem sloju nanesimo na primerno podlago ter jo/jih pri različnih povečavah sistematično pregledamo pod stereomikroskopom (5.5), da bi ugotovili sestavine živalskega izvora.

Mikroskopski preparat iz presejane(ih) frakcije(-) z drobnimi delci pri različnih povečavah sistematično pregledamo pod sestavljenim mikroskopom (5.6), da bi ugotovili sestavine živalskega izvora.

### 6.2 Identifikacija sestavin živalskega izvora v koncentrirani usedlini

V lij ločnik ali konično čašo za usedlino prenesemo najmanj 5 g (točnost do 0,01 g) vzorca in ga obdelamo z najmanj 50 ml tetrakloretilena (4.3.1). Mešanico večkrat pretresemo ali premešamo.

– Če uporabimo zaprt lij ločnik, usedlino pustimo stati (najmanj tri minute), dokler se usedlina ne loči. Usedlino spet pretresemo in jo ponovno pustimo stati najmanj tri minute. Usedlino ponovno ločimo.

– Če uporabimo odprto čašo, usedlino pustimo stati vsaj pet minut, dokler se usedlina ne loči.

Celotno usedlino osušimo in nato stehamo (točnost do 0,001 g). Tehtanje je potrebno le, če se zahteva ocena. Če usedlina vsebuje mnogo velikih delcev, jo lahko skozi sito (5.3) presejemo v dve frakciji. Pod stereomikroskopom (5.5) in sestavljenim mikroskopom (5.6) preiščemo posušeno usedlino, da bi ugotovili kostne sestavine.

### 6.3 Uporaba sredstev za pripravo preparatov in reagentov za obarvanje

Mikroskopsko identifikacijo sestavin živalskega izvora lahko izboljšamo tudi s pomočjo posebnih sredstev za pripravo preparatov in reagentov za obarvanje.

Kloralhidrat (4.1.1):

S previdnim segrevanjem se vidi zgradba celic jasneje, ker zrnca škroba želatinirajo in se izloči nezaželena vsebina celic.

Lug (4.1.2):

Bodisi natrijev hidroksid ali kalijev hidroksid očisti krmo in pomaga pri odkrivanju mišičnih vlaken, dlak in drugih keratinskih struktur.

Parafinsko olje in glicerol (4.1.3):

V tem sredstvu za pripravo preparatov se kostne sestavine zelo dobro identificirajo, ker ostane večina votlinic (lacunae) v kosteh napolnjena z zrakom, tako da so vidne kot črne luknjice velikosti 5 do 15  $\mu\text{m}$ .

Raztopina jod/kalijev jodid (4.4.1):

Uporablja se za ugotovitev škroba (modro-vijolična barva) in proteinov (rumeno-oranžna barva). Če je treba, raztopino razredčimo.

Raztopina alizarin rdečega (4.4.2):

Rdeče/rožnato obarvanje kosti, ribjih kosti ali luskin. Preden usedlino osušimo (glej razdelek 6.2), celotno usedlino prenesemo v stekleno epruveto in dvakrat izperemo s približno 5 ml alkohola (4.2.1) (vsakič uporabimo vortex, topilo pustimo stati približno eno minuto, nato ga odlijemo). Preden uporabimo reagent za obarvanje, usedlino obelimo tako, da dodamo najmanj 1 ml raztopine natrijevega hipoklorita (4.5.1). Reakcija naj traja 10 minut. Epruveto napolnimo z vodo, usedlino pustimo stati dve do tri minute, vodo in suspendirane delce nato odlijemo. Usedlino izperemo še dvakrat s približno 10 ml vode (uporabimo vortex, pustimo stati, vsakič vodo odlijemo). Dodamo dve do 10 ali več kapljic (odvisno od količine ostankov) raztopine alizarin rdečega. Mešanico pretresemo in počakamo nekaj sekund, da reakcija nastopi. Obarvano usedlino izperemo dvakrat s približno 5 ml alkohola (4.2.1), nato pa izperemo še z acetonom (4.2.2) (vsakič uporabimo vortex, pustimo topilo stati približno eno minuto in ga odlijemo). Usedlina je pripravljena, da jo osušimo.

Cistinski reagent (4.3.3):

Pri previdnem segrevanju postanejo sestavine, ki vsebujejo cistin (dlake, perje itd.), črno-rjave.

### 6.4. Preiskava krme na morebitno vsebnost ribje moke

Pod sestavljenim mikroskopom pregledamo najmanj en mikroskopski preparat iz drobno presejane frakcije in drobne frakcije usedline (glej razdelke 6.1 in 6.2).

Kadar oznaka navaja, da sestavine vsebujejo ribjo moko ali kadar obstaja sum na vsebnost ribje moke ali kadar odkrijemo vsebnost ribje moke že pri začetni preiskavi, iz izvirnega vzorca pregledamo najmanj dva dodatna mikroskopska preparata iz drobno presejane frakcije ter frakcije celotne usedline.

## 7. Izračun in ovrednotenje

Države članice zagotovijo, da se postopki, opisani v tej točki, uporabljajo pri opravljanju uradne analize z namenom, da se oceni količina (in ne zgolj vsebnost) živalskih sestavin.

Izračun je možno narediti le, če sestavine živalskega izvora vsebujejo delce kosti.

Delce kosti toplokrvnih kopenskih vrst (npr. sesalcev in ptic) je v mikroskopskih preparatih možno ločiti od različnih vrst ribjih kosti na podlagi tipičnih kostnih votlinic (lacunae). Delež sestavin živalskega izvora določimo v materialu vzorca glede na:

ocenjeni delež (masni %) kostnih delcev v koncentrirani usedlini in

delež (masni %) kosti v sestavinah živalskega izvora.

Ocena mora temeljiti na najmanj treh mikroskopskih preparatih (če je možno) in na najmanj petih poljih na preparatu. Koncentrirana usedlina v krmnih mešanicah praviloma ne vsebuje samo delcev kosti kopenskih živali in rib, ampak tudi druge drobce visoke specifične mase, npr. minerale, pesek, delce olesenelih rastlin in podobno.

#### 7.1 Ocenjena vrednost odstotnega deleža delcev kosti

% delcev kosti kopenskih živali =  $(S \times c)/W$

% delcev ribjih kosti in luskin =  $(S \times d)/W$

(S = masa usedline (mg), c = korekcijski faktor (%) za ocenjeni delež kosti kopenskih živali v usedlini, d = korekcijski faktor (%) za ocenjeni delež delcev ribjih kosti in luskin v usedlini, W = masa materiala vzorca snovi za sedimentacijo (mg)).

#### 7.2 Ocenjena vrednost sestavin živalskega izvora

Delež kosti se v živalskih proizvodih lahko zelo razlikuje. (Odstotni delež kosti pri kostni moki je reda velikosti 50 do 60 %, pri mesni moki reda velikosti 20 do 30 %; pri ribji moki se vsebnost kosti in luskin razlikuje glede na kategorijo in izvor ribje moke, običajno pa je reda velikosti 10 do 20 %).

Če je vrsta živalske moke, prisotne v vzorcu, poznana, je mogoče oceniti vsebnost:

Ocenjena vsebnost sestavin proizvodov kopenskih živali (%) =  $(S \times c)/(W \times f) \times 100$

Ocenjena vsebnost sestavin ribjih proizvodov (%) =  $(S \times d)/(W \times f) \times 100$

(S = masa usedline (mg), c = korekcijski faktor (%) za ocenjeni delež kostnih sestavin kopenskih živali v usedlini, d = korekcijski faktor (%) za ocenjeni delež delcev ribjih kosti in luskin v usedlini, f = korekcijski faktor za delež kosti v sestavinah živalskega izvora v pregledanem vzorcu, W = masa materiala vzorca za sedimentacijo (mg)).

## 8. Izražanje rezultatov preiskave

Poročilo mora vsebovati podatke o prisotnosti sestavin kopenskih živali in ribje moke. O različnih primerih poročamo na naslednji način:

### 8.1 Za prisotnost sestavin izvora kopenskih živali:

Kolikor je bilo razvidno iz mikroskopske preiskave, ni bilo v dostavljenem vzorcu ugotovljenih nobenih sestavin izvora kopenskih živali,

ali:

Kolikor je bilo razvidno iz mikroskopske preiskave, so bile v dostavljenem vzorcu ugotovljene sestavine izvora kopenskih živali.

### 8.2 Za prisotnost ribje moke:

Kolikor je bilo razvidno iz mikroskopske preiskave, ni bilo v dostavljenem vzorcu ugotovljenih nobenih sestavin ribjega izvora,

ali:

Kolikor je bilo razvidno iz mikroskopske preiskave, so bile v dostavljenem vzorcu ugotovljene sestavine ribjega izvora.

V primeru ugotovljenih sestavin ribjega izvora ali izvora kopenskih živali lahko poročilo o rezultatih preiskave, če se zahteva, nadalje navede oceno količine ugotovljenih sestavin (x %, < 0,1 %; 0,1-0,5 %; 0,5-5 % ali > 5 %), podrobno opredeli vrsto kopenske živali, če je možno, in ugotovljene živalske sestavine (mišična vlakna, hrustanec, kosti, roževina, ščetine, kri, perje, jajčne lupine, ribje kosti, luskin).

Kadar se ocenjuje količina živalskih sestavin, se navede korekcijski faktor f, ki je bil uporabljen.

Kadar identificirajo kostne sestavine kopenskih živali, mora poročilo vsebovati dodatni stavek:

»Možnost, da so bile zgornje sestavine pridobljene iz sesalcev, ne more biti izključena.«

Ta stavek ni potreben, če so bili delci kosti kopenskih živali opredeljeni kot delci kosti perutnine ali sesalcev.

## 9. Izbirni protokol za analizo maščobe ali olja

Za analizo maščobe ali olja se lahko uporabi naslednji protokol:

- Če je maščoba trdna, jo segrevamo na primer v mikrovalovni pečici, dokler ne postane tekoča.
- Z uporabo pipete prenesemo 40 ml maščobe od dna vzorca v centrifugirko.
- Centrifugiramo 10 minut pri 4 000 vrt/min.
- Če je maščoba trdna po centrifugiranju, jo v pečici ponovno segrevamo, dokler ne postane tekoča. Ponovno centrifugiramo pet minut pri 4 000 vrt/min.
- Z uporabo žličke ali spatule prenesemo polovico dekantirane nečistoče v majhno petrijevko ali na mikroskopsko stekelce za mikroskopsko identifikacijo morebitne vsebnosti živalskih sestavin (mesnih vlaken, perja, delcev kosti). Za mikroskopijo se kot sredstvo za pripravo preparatov priporoča uporabo parafinskega olja ali glicerola.
- Ostanke nečistoče se uporabijo za usedlino, kakor je opisano v točki 6.2.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 2003/126/ES.

## METODA 47\*

### METODE VZORČENJA ZA URADNI NADZOR VSEBNOSTI DIOKSINOV (PCDD/PCDF) IN DIOKSINOM PODOBNIH POLIKLORIRANIH BIFENILOV (PCB-jev) V NEKATERIH VRSTAH KRME

#### 1. Namen in področje uporabe

Vzorci, ki so namenjeni za uradni nadzor vsebnosti dioksinov (PCDD/PCDF) kot tudi za opredelitev vsebnosti dioksinom podobnih PCB-jev (\*) v krmi, se odvzamejo v skladu s Prvo Direktiva Komisije 76/371/EGS z dne 1. marca 1976 o določitvi metod Skupnosti za vzorčenje pri uradnem nadzoru krme (UL L št. 102 z dne 15. 4. 1976, str.1, z vsemi spremembami; v nadaljnjem besedilu: Direktiva 76/371/EGS). Izpolnjene morajo biti zahteve v zvezi s količino glede nadzora snovi ali proizvodov, ki so enakomerno porazdeljeni v krmi v skladu s točko 5.A. Priloge k Direktivi 76/371/EGS. Tako dobljeni sestavljeni vzorci se štejejo za reprezentativne za serije ali podserije, iz katerih so vzeti. Skladnost z mejnimi vrednostmi iz Direktive 2002/32/ES se ugotavlja na osnovi vrednosti, določenih v laboratorijskih vzorcih.

#### 2. Skladnost serij ali podserij s specifikacijo

Serija je sprejeta, če rezultat analiznega preskušanja posamezne analize ne presega vrednosti zgornje meje, določene v Direktivi 2002/32/ES ob upoštevanju merilne negotovosti. Serija je neskladna glede na predpisano vrednost zgornje meje, določene v Direktivi 2002/32/ES, če analitski rezultati, ki so potrjeni s ponovitvijo dveh ločenih analiz vzorca, ob

izračunani povprečni vrednosti ponovljenih analiz vzorca presegajo vrednosti predpisane zgornje meje, ob upoštevanju določene merilne negotovosti analiznega določanja.

Merilna negotovost se lahko upošteva v skladu z enim od naslednjih pristopov:

- z izračunom razširjene negotovosti, ob uporabi faktorja pokrivanja 2, ki da raven zanesljivosti približno 95 %;
- z upoštevanjem meje odločanja ob podani merilni negotovosti analitskega rezultata s parametrom  $CC\alpha$  v skladu z Odločbo Komisije 2002/657/ES Odločba Komisije z dne 14. avgusta 2002 o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES glede opravljanja analitskih metod in razlage rezultatov (UL L št. 221 z dne 17. 8. 2002, str. 8, z vsemi spremembami) (točka 3.1.2.5. Priloge – v primeru snovi z določeno dovoljeno vsebnostjo).

Ta pravila se uporabljajo za interpretacijo rezultatov analiznega preskušanja vzorca, za inšpekcijski nadzor ali monitoring.

(\*) Preglednica dioksinom podobnih PCB-jev

Pripadniki iste vrste	TEF vrednost	Pripadniki iste vrste	TEF vrednost
<b>Dibenzo-p-dioksini (PCDD-ji)</b>		<b>Dioksinom podobni PCB-ji: Ne-orto PCB-ji + Mono-orto PCB-ji</b>	
2,3,7,8-TCDD	1	<b>Ne-orto PCB-ji</b>	
1,2,3,7,8-PeCDD	1	PCB 77	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1	PCB 81	0,0001
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1	PCB 126	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1	PCB 169	0,01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01		
OCDD	0,0001		
<b>Dibenzofurani (PCDF-ji)</b>		<b>Mono-orto PCB-ji</b>	
2,3,7,8-TCDF	0,1		
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05		
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5	PCB 105	0,0001
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1	PCB 114	0,0005
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 118	0,0001
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1	PCB 123	0,0001
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1	PCB 156	0,0005
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01	PCB 157	0,0005
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01	PCB 167	0,00001
OCDF	0,0001	PCB189	0,0001

Uporabljene okrajšave: T = tetra; Pe = penta; Hx = hekso; Hp = hepta; O = okta; CDD = klorodibenzo-p-dioksin; CDF = klorodibenzofuran; CB = klorobifenil.

Ta metoda je povzeta iz Direktive 2002/70/ES.

# PRIPRAVA VZORCEV IN ZAHTEVE ZA ANALIZNE METODE, UPORABLJENE PRI URADNEM NADZORU VSEBNOSTI DIOKSINOV (PCDD/PCDF) IN DIOKSINOM PODOBNIH POLIKLORIRANIH BIFENILOV PCB-jev V NEKATERIH VRSTAH KRME\*

## 1. Cilj in področje uporabe

Navedene zahteve naj bi se uporabljale, kadar se sestavine krme in krma analizirajo z namenom določitve dioksinov (poliklorirani dibenzo-p-dioksini (PCDD) in poliklorirani dibenzofurani (PCDF)) in dioksinom podobnih polikloriranih bifeniлов (PCB-jev).

Monitoring prisotnosti dioksinov v krmi se lahko izvaja s strategijo, ki vključuje presejalno metodo z namenom izbire tistih vzorcev, pri katerih so vrednosti dioksinov in dioksinom podobnih PCB-jev manj kakor 30 do 40 % pod predpisano vrednostjo ali jo presegajo. Koncentracija dioksinov v vzorcih z značilnimi vrednostmi se mora določiti/potrditi s potrditveno metodo.

Presejalne metode so metode, ki se uporabljajo za odkrivanje prisotnosti dioksinov in dioksinom podobnih PCB-jev pri predpisani vrednosti. Te metode imajo visoko prepustnost vzorcev in se uporabljajo za presejanje velikega števila vzorcev za določitev potencialno pozitivnih. So posebej oblikovane, da se z njimi izognemo lažno negativnim.

Potrditvene metode so metode, ki zagotavljajo popolne ali dopolnilne informacije, ki omogočijo, da se dioksini in dioksinom podobni PCB-ji ugotovijo in nedvoumno kvantificirajo pri predpisani vrednosti.

## 2. Ozadje

Ker okoljski in biološki vzorci (vključno z vzorci sestavin krme/krme) na splošno vsebujejo kompleksne mešanice različnih dioksinov, ki pripadajo isti vrsti, se je razvil koncept faktorjev ekvivalence toksičnosti (TEF-ov), da se omogoči ocena tveganja. Ti TEF-i so bili oblikovani za izražanje koncentracije mešanic 2,3,7,8-substituiranih PCDD-jev in PCDF-jev in nekaterih ne-orto in mono-orto s klorom substituiranih PCB-jev, ki imajo dioksinom podobne aktivnosti v ekvivalentih toksičnosti (TEQ-i) 2,3,7,8-TCDD (glej Tabelo v Metodi 47).

Koncentracije posameznih snovi v danem vzorcu se pomnožijo z njihovim TEF-om in se nato seštejejo, da se dobi celotna koncentracija dioksinom podobnih spojin, izraženih v TEQ-jih.

Pojem »zaokroženo navzgor« zahteva uporabo meje določanja za prispevek vsakega nekvantificiranega pripadnika iste vrste k TEQ.

Pojem »zaokroženo navzdol« zahteva uporabo ničle za prispevek vsakega nekvantificiranega pripadnika iste vrste k TEQ.

Pojem »zaokrožen v sredino« zahteva uporabo polovice meje določanja za izračun prispevka vsakega nekvantificiranega pripadnika iste vrste k TEQ.

Za namene te metode je sprejemljiva meja določljivosti posameznega kongenerja koncentracija analita v izvlečku (ekstraktu) vzorca, ki ustvari instrumentalni odziv na dva različna iona, ki se ju spremlja z razmerjem S/N (signal/šum) 3:1 za manj občutljivi signal od obeh izbranih ionov, in izpolnitev osnovnih zahtev, kot so ujemanje retencijskih časov, razmerje intenzitet signalov izotopske sestave v skladu s postopkom določanja, kakor je naveden v metodi EPA 1613, revizija B.

## 3. Skladnost z zahtevami za zagotavljanje kakovosti pri pripravi vzorca

Splošne določbe glede priprave vzorca za analizo so določene v Prilogi k Direktivi komisije 81/680/EGS z dne 30. julija 1981 o spremembi direktiv 71/250/EGS, 71/393/EGS, 72/199/EGS, 73/46/EGS, 74/203/EGS, 75/84/EGS, 76/372/EGS in 78/633/EGS o določitvi analiznih metod Skupnosti za uradni nadzor krme (UL L št. 246 z dne 29.8. 1981, str. 32, z vsemi spremembami). Dodatno mora biti dosežena skladnost tudi z naslednjimi zahtevami:

- vzorce moramo hraniti in prevažati v steklenih, aluminijastih, polipropilenskih ali polietilenskih posodah. Iz posod za vzorce moramo odstraniti sledove papirnega prahu. Steklene posode moramo sprati s topli, v katerih predhodno preverimo prisotnost dioksinov,
- izvedba slepe analize z izvedbo celotnega analitskega postopka, iz katerega izpustimo le vzorec,
- masa vzorca, uporabljenega za ekstrakcijo, mora biti zadostna, da so izpolnjene zahteve glede občutljivosti.

## 4. Zahteve za laboratorije

– Laboratoriji morajo dokazati zmogljivost metode v območju predpisane vrednosti, na primer 0,5 kratna, 1 kratna in 2 kratna predpisana vrednost s sprejemljivim koeficientom variacije za ponovljene analize. Za podrobnosti glede meril sprejemljivosti glej točko 5.

– Meja določanja za potrditveno metodo je v območju približno ene petine predpisane vrednosti, s čimer zagotovimo, da so v območju predpisanih vrednosti sprejemljivi koeficienti variacije.

– Redne slepe kontrole in preskuse z dodatkom ali analize kontrolnih vzorcev (če je na voljo, je zaželen certificiran referenčni material) izvajamo kot ukrepe za obvladovanje notranje kakovosti.

– Uspešno sodelovanje v medlaboratorijskih študijah, ki ocenjujejo sposobnost laboratorija, je najboljši način, da dokažemo usposobljenost za specifične analize. Vendar ni nujno, da uspešno sodelovanje v medlaboratorijskih študijah pri npr. vzorcih zemlje ali odpadnega blata dokazuje tudi usposobljenost za področje vzorcev živil in krme, ki

predstavljajo nižje ravni kontaminacije. Zato je nenehno sodelovanje v medlaboratorijskih študijah za določanje dioksinov in dioksinom podobnih PCB-jev v ustreznih matricah krme/hrane obvezno.

– Laboratorije akreditirajo priznani organi, ki delujejo v skladu z ISO Guide 58, s čimer je zagotovljeno, da le-ti uporabljajo analitsko zagotavljanje kakovosti. Laboratoriji naj bi bili akreditirani na podlagi standarda ISO/IEC/17025:1999.

## 5. Zahteve za analizne postopke za dioksine in dioksinom podobne PCB-je

Osnovne zahteve za sprejem analiznih postopkov:

– Visoka občutljivost in nizke meje zaznavanja. Zaradi izredne toksičnosti nekaterih od teh spojin morajo biti za PCDD-je in PCDF-je zaznavne količine v pikogramskem TEQ območju ( $10^{-12}$  g). Za PCB-je je znano, da se pojavljajo pri višjih vrednostih kot PCDD-ji in PCDF-ji. Za večino PCB-jev, ki pripadajo isti vrsti, je občutljivost v nanogramskem območju ( $10^{-9}$  g) že zadostna. Vendar pa mora biti za merjenje bolj toksičnih dioksinom podobnih PCB-jev (zlasti ne-orto substituiranih, ki pripadajo isti vrsti) dosežena ista občutljivost kakor za PCDD-je in PCDF-je.

– Visoka selektivnost (specifičnost). Zahteva se razlikovanje med PCDD-ji, PCDF-ji in dioksinom podobnimi PCB-ji ter številnimi drugimi možnimi motečimi spojinami, ki se ekstrahirajo hkrati in so morda s svojo prisotnostjo moteče pri koncentracijah, ki so za več velikostnih razredov višje od predpisanega analita. Za metode plinske kromatografije/masne spektrometrije (GC/MS) je treba razlikovati med različnimi pripadniki iste vrste, kot na primer med toksičnimi (npr. sedemnajstimi 2,3,7,8-substituiranimi PCDD-ji in PCDF-ji ter dioksinom podobnimi PCB-ji) in drugimi pripadniki iste vrste. Bioanalize bi morale omogočiti določanje TEQ vrednosti selektivno kot seštevke PCDD-jev, PCDF-jev in dioksinom podobnih PCB-jev.

– Visoka točnost (pravilnost in natančnost). Določanje naj zagotovi veljavne in zanesljive ocene pravih koncentracij v vzorcu. Visoka točnost (točnost meritve: ujemanje merilnega rezultata s pravo ali dogovorjeno vrednostjo meritve) je potrebna, da se prepreči zavrnitev rezultata analize vzorca na podlagi slabe zanesljivosti ocene TEQ. Točnost se izrazi kot pravilnost (razlika med srednjo vrednostjo izmerjenega analita v certificiranem materialu, in njegovo certificirano vrednostjo, izraženo kot odstotek te vrednosti) in natančnost (natančnost se običajno izračuna kot standardni odmik, ki vključuje ponovljivost in obnovljivost ter kaže ujemanje med rezultati, dobljenimi z večkratno ponovitvijo eksperimentalnih postopkov pri vnaprej določenih pogojih).

Presejalne analitske metode lahko obsegajo bioanalize in GC/MS metode; potrditvene metode so visoko ločljive plinske kromatografske/visoko ločljive masne spektrometrične (HRGC/HRMS) metode. Glede celotne TEQ vrednosti mora biti zagotovljena skladnost z naslednjimi merili:

	Presejalna metoda	Potrditvena metoda
Lažno negativna stopnja	<1%	
Pravilnost		-20% do +20%
CV	<30%	<15%

## 6. Specifične zahteve, s katerimi morajo biti usklajene GC/MS metode za izločitev ali potrditev

– Dodatek  $^{13}\text{C}$ -označenih 2,3,7,8-klor substituiranih notranjih PCDD/F standardov (in  $^{13}\text{C}$ -označenih internih standardov za dioksinom podobne PCB-je, če se morajo določiti dioksinom podobni PCB-ji) moramo izvesti na samem začetku analitske metode, na primer pred ekstrakcijo, da se validira analitski postopek. Dodati moramo vsaj enega pripadnika iste vrste za vsako od tetra do okta- kloriranih homolognih skupin za PCDD/F (in vsaj enega pripadnika iste vrste za vsako od homolognih skupin za dioksinom podobne PCB-je, če se morajo določiti dioksinom podobni PCB-ji in alternativno vsaj enega pripadnika iste vrste za vsak spektrometričen izbran ion s funkcijo evidentiranja, ki se uporablja za spremljanje PCDD/F in dioksinom podobnih PCB-jev). Prednost ima, še zlasti v primerih potrditvenih metod, uporaba vseh 17-ih  $^{13}\text{C}$ -označenih 2,3,7,8-klor substituiranih notranjih PCDD/F standardov in vseh 12-ih  $^{13}\text{C}$ -označenih internih standardov za dioksinom podobne PCB-je (če se morajo določiti dioksinom podobni PCB-ji).

Prav tako je treba določiti relativne odzivne faktorje za tiste pripadnike iste vrste, za katere ni dodan noben od  $^{13}\text{C}$ -označenih analogov z uporabo ustreznih raztopin za umerjanje.

– Pri krmi rastlinskega izvora in krmi živalskega izvora, ki vsebuje manj kakor 10 % maščob, je dodatek internih standardov pred ekstrakcijo obvezen. Pri krmi živalskega izvora, ki vsebuje več kakor 10 % maščob, se lahko notranji standardi dodajo ali pred ekstrakcijo ali po ekstrakciji maščob. Treba je izvesti ustrezno validacijo učinkovitosti ekstrakcije, ki je odvisna od faze, pri kateri se dodajo notranji standardi, in od tega, ali se o rezultatih poroča na podlagi proizvoda ali maščob.

– Pred GC/MS analizo moramo dodati še enega ali dva standarda za izkoristek (surogat).

– Potreben je nadzor izkoristka. Za potrditvene metode naj bi bili izkoristki posameznih internih standardov v območju od 60 do 120 %. Nižji ali višji izkoristki za posamezne pripadnike iste vrste, še zlasti za nekatere hepta in okta klorirane dibenzodioksine in dibenzofurane, so sprejemljivi pod pogojem, da njihov prispevek k TEQ vrednosti ne presega 10 % celotne TEQ vrednosti (temelji zgolj na PCDD/F). Pri presejalnih metodah naj bi bili izkoristki v območju od 30 do 140 %.

- Ločevanje dioksinov od motečih kloriranih spojin, kakor so PCB-ji in klorirani difenil etri, je treba izvesti z ustreznimi kromatografskimi tehnikami (prednost imajo Florisil kolone napolnjene z aluminijevim oksidom in/ali ogljikova kolona).
- Plinsko kromatografsko ločevanje izomerov naj bi bilo zadostno (< 25 % vrh do vrha med 1,2,3,4,7,8-HxCDF in 1,2,3,6,7,8-HxCDF).
- Določanje naj poteka v skladu z EPA metodo, revizija 1613 B: tetra-skozi okta-klorirani dioksini in furani z izotopsko razredčeno HRGC/HRMS ali drugo z enakimi merili zmogljivosti.
- Razlika med vrednostjo, zaokroženo navzgor in vrednostjo, zaokroženo navzdol, naj ne presega 20 % pri krmi, kontaminirani z dioksini, v območju najvišje vrednosti ali nad njo. Pri krmi z vrednostjo kontaminacije precej pod najvišjo vrednostjo, je lahko razlika v območju od 25 do 40 %.

## 7. Izločilne metode

### 7.1 Uvod

Pri uporabi izločilne metode se lahko uporabijo različni analitski pristopi: čisti izločilni pristop in količinski pristop.

#### Izločilni pristop

Odziv vzorcev se primerja z odzivom referenčnega vzorca pri predpisani vrednosti. Vzorca z odzivom, ki je manjši od referenčnega, se opredelijo kot negativni, za tiste z višjim odzivom pa se domneva, da so pozitivni.

#### Zahteve:

- v vsako preskusno serijo se mora vključiti slepi vzorec in referenčni vzorec(-i), ki se ekstrahirajo in preskušajo hkrati in pod enakimi pogoji. Referenčni vzorec mora pokazati izrazito višji odziv v primerjavi s slepim,
- vključijo se dodatni referenčni vzorci z 0,5-kratno in 2-kratno predpisano vrednostjo, da se dokaže primerna zmogljivost preskusa v območju predpisane vrednosti,
- pri preskušanju drugih matriksov se mora dokazati ustreznost referenčnega vzorca/vzorcev, prednostno z vključitvijo vzorcev, pri katerih se z HRGC/HRMS pokaže, da je vrednost TEQ v bližini vrednosti v referenčnem vzorcu, ali s slepim vzorcem z dodatkom pri tej vrednosti,
- ker se pri bioanalizah ne morejo uporabiti notranji standardi, so preskusi ponovljivosti zelo pomembni za pridobitev podatkov o standardnem odmiku v okviru ene preskusne serije. Koeficient variacije bi moral biti pod 30 %,
- za bioanalize je treba opredeliti ciljne spojine, možne interference in najvišje sprejemljive slepe vrednosti.

#### Količinski pristop

Količinski pristop zahteva standardne serije razredčitev, dvakratno ali trikratno čiščenje in merjenje ter kontrolo slepih vrednosti in izkoristka. Rezultati se lahko izrazijo kot TEQ, pri tem se predpostavlja, da spojine, odgovorne za signal, ustrezajo principu TEQ. To se lahko izvaja z uporabo TCDD (ali standardne dioksin/furan mešanice), s katero pripravimo umeritveno krivuljo za izračun vrednosti TEQ v ekstraktu in s tem v vzorcu. Ta se nato korigira za TEQ vrednost, izračunano za slepi vzorec (da se upošteva nečistost uporabljenih topil in kemikalij), in izkoristek (izračunan iz vrednosti TEQ v vzorcu za obvladovanje kakovosti v bližini mejne vrednosti). Bistveno je omeniti, da do dela navidezne izgube izkoristka pride zaradi vplivov matrice in/ali razlik med TEF vrednostmi pri bioanalizah in uradnimi TEF vrednostmi, ki jih določa WHO.

### 7.2 Zahteve za analitske metode, uporabljane pri izločitvi

– pri izločitvi se lahko uporabijo GC/MS analitske metode in bioanalize. Za GC/MS metode se uporabljajo zahteve, določene v točki 6. Za bioanalize na celični osnovi so posebne zahteve določene v točki 7.3 in za bioanalize na osnovi pribora v točki 7.4.

– Potrebna je informacija o številu lažno pozitivnih in lažno negativnih rezultatov večjega števila vzorcev pod najvišjo vrednostjo ali nad njo, ali vrednost ukrepanja, v primerjavi z vsebnostjo TEQ, določeno s potrditveno analitsko metodo. Dejanska stopnja lažno negativnih bi morala biti pod 1 %. Stopnja lažnih pozitivnih vzorcev bi morala biti dovolj nizka, da je uporaba presejalnega orodja prednostna.

– Pozitivni rezultati morajo biti vedno potrjeni s potrditveno analitsko metodo (HRGC/HRMS). Poleg tega bi bilo treba vzorce iz širokega TEQ območja potrditi s HRGC/HRMS (približno 2 do 10 % negativnih vzorcev). Na voljo bi morali biti tudi podatki o ujemanju med bioanalizo in rezultati HRGC/HRMS.

### 7.3 Posebne zahteve za bioanalizo na celični osnovi

– Pri izvajanju bioanalize vsaka serija preskusov zahteva serijo referenčnih koncentracij TCDD ali dioksin/furan mešanice (celotna krivulja odziva odmerka z  $R^2 > 0,95$ ). Vendar pa se za namene izločitve lahko za analizo vzorcev pri nizkih vrednostih uporabi razširjena krivulja nizkih vrednosti.

– Uporabiti bi bilo treba TCDD referenčno koncentracijo (približno trikratna količinska meja) na diagramu obvladovanja kakovosti rezultatov za rezultate bioanalize v neprekinjenem časovnem obdobju. Alternativa je lahko odziv referenčnega vzorca v primerjavi s TCDD umeritveno premico, kajti odziv celic je lahko odvisen od številnih dejavnikov.

– Za vsako vrsto referenčnega materiala je treba voditi in preverjati kontrolne karte (QC) za zagotovitev, da so rezultati v skladu z zastavljenimi smernicami.

– Zlasti pri količinskih izračunih mora biti uvedba uporabljene razredčitve vzorca znotraj linearnega dela krivulje odziva. Vzorca nad linearnim delom krivulje odziva se morajo razredčiti in ponovno preskusiti. Zato je priporočljivo, da se hkrati preskuša najmanj tri ali več razredčitev.

– Odstotni standardni odmik naj ne bo nad 15 % pri trikratnem določanju za vsako razredčitev vzorca in ne nad 30 % med tremi neodvisnimi eksperimenti.



– Meja zaznavanja se lahko določi kot trikratni standardni odmik slepega topila ali odziva ozadja. Drugi pristop je uporaba odziva, ki je nad ozadjem (uporabljeni faktor petkratno slepo topilo), izračunan iz umeritvene krivulje za tisti dan. Količinska meja se lahko določi kot petkratni ali šestkratni standardni odmik slepega topila ali odziva ozadja, ali pa se uporabi odziv, ki je razločno nad ozadjem (uporabljeni faktor desetkratno slepo topilo), izračunan iz umeritvene krivulje za tisti dan.

#### 7.4 Posebne zahteve za bioanalizo na osnovi pribora<sup>(1)</sup>

- Glede priprave vzorca in analize je treba slediti navodilom proizvajalca.
- Preskusna oprema se ne bi smela uporabljati po pretečenem roku.
- Ne sme se uporabljati materialov ali sestavnih delov, ki so bili oblikovani za druge pribore.
- Preskusno opremo je treba hraniti v ustreznem območju temperature hranjenja in jo uporabljati pri ustrezni delovni temperaturi.
- Meja zaznavnosti za imunoanalize se določi kot vsota srednje vrednosti in trikratnega standardnega odmika, ki temelji na 10 ponovitvah analize slepega vzorca, ki se deli z naklonom linearne regresijske enačbe.
- Referenčne standarde bi bilo treba uporabiti za preskuse v laboratorijih, da se zagotovi, da je odzivnost na standard v sprejemljivem območju.

### 8. Poročanje o rezultatih

Če uporabljeni analitski postopki to omogočajo, bi morali analitski rezultati vsebovati vrednosti posameznih PCDD/F in PCB-jev istih vrst in se o njih poročati glede zaokrožanja navzdol, navzgor ali v sredino, da se v poročilo o rezultatih vključi kar največ podatkov in tako omogoči razlago rezultatov glede na posebne zahteve.

Poročilo bi moralo vključiti tudi vsebnost lipidov v vzorcu in metodo, uporabljeno za ekstrakcijo lipidov.

Izkoristki posameznih notranjih standardov morajo biti na voljo v primeru, da so ti izkoristki izven območja, navedenega v točki 6, v primeru, da je presežena najvišja vrednost in na zahtevo tudi v drugih primerih.

\* Ta metoda je povzeta iz Direktive 2002/70/ES.

---

<sup>(1)</sup> Do sedaj še ni bil predložen dokaz o bioanalizi na osnovi pribora, ki bi bil na voljo na trgu, z zadostno občutljivostjo in zanesljivostjo, da bi se uporabila za presejanje za prisotnost doiksinov pri zahtevani vrednosti v vzorcih živil in krme.