

Lineární rozsah přístroje je nutno zkontrolovat pro všechny aminokyseliny.

Standardní roztok se ředí citrátovým tlumivým roztokem tak, aby se dosáhlo ploch píků uprostřed tohoto rozsahu.

- 9.2 Pokud je k analýze hydrolyzátů použito zařízení pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii, musí být podmínky zkoušek optimalizovány v souladu s doporučením výrobce.
- 9.3 Při použití této metody u krmiv obsahujících více než 1 % chloridu (koncentráty, minerální krmiva, doplňková krmiva) může dojít k podhodnocení obsahu methioninu, a musí se proto použít speciální postup.

#### G. STANOVENÍ OBSAHU TRYPTOFANU

##### 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu celkového a volného tryptofanu v krmivech. Nerozlišuje mezi D- a L- formou.

##### 2. Princip

Pro stanovení celkového tryptofanu se vzorek hydrolyzuje za alkalických podmínek nasyceným roztokem hydroxidu barnatého při 110 °C po dobu 20 hodin. Po hydrolyze se přidává vnitřní standard.

Pro stanovení volného tryptofanu se vzorek extrahuje za mírně kyselých podmínek v přítomnosti vnitřního standardu.

Tryptofan a vnitřní standard se stanoví v hydrolyzátu nebo extraktu metodou HPLC s fluorescenční detekcí.

##### 3. Chemikálie

- 3.1 Dvakrát destilovaná voda nebo voda stejné kvality (vodivost < 10 µS/cm).
- 3.2 Standardní látka: tryptofan (čistota/obsah ≥ 99 %), vakuově vysušený nad oxidem fosforečným.
- 3.3 Vnitřní standard: α-methyl-tryptofan (čistota/obsah ≥ 99 %), vakuově vysušený nad oxidem fosforečným.
- 3.4 Hydroxid barnatý, oktahydrát (Ba(OH)<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub>O), nesmí být nadměrně vystavován vzduchu, aby nedocházelo ke vzniku BaCO<sub>3</sub>, který by mohl narušovat stanovení (viz poznámka 9.3).
- 3.5 Hydroxid sodný.
- 3.6 Kyselina fosforečná, w (w/w) = 85 %.
- 3.7 Kyselina chlorovodíková, ρ<sub>20</sub> 1,19 g/ml.
- 3.8 Methanol, pro HPLC.
- 3.9 Petrolether, bod varu 40–60 °C.
- 3.10 Roztok hydroxidu sodného, c = 1 mol/l:  
40,0 g NaOH (3.5) se rozpustí ve vodě a vodou (3.1) se doplní na 1 litr.
- 3.11 Kyselina chlorovodíková, c = 6 mol/l:  
492 ml HCl (3.7) se doplní vodou na 1 litr.

- 3.12 Kyselina chlorovodíková,  $c = 1 \text{ mol/l}$ :  
82 ml HCl (3.7) se doplní vodou na 1 litr.
- 3.13 Kyselina chlorovodíková,  $c = 0,1 \text{ mol/l}$ :  
8,2 ml HCl (3.7) se doplní vodou na 1 litr.
- 3.14 Kyselina fosforečná,  $c = 0,5 \text{ mol/l}$ :  
34 ml kyseliny fosforečné (3.6) se doplní vodou (3.1) na 1 litr.
- 3.15 Koncentrovaný roztok tryptofanu (3.2),  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
v 500 ml odměrné baňce se rozpustí 0,2553 g tryptofanu (3.2) v kyselině chlorovodíkové (3.13) a doplní se jí po značku. Skladuje se při  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  nejdéle 4 týdny.
- 3.16 Koncentrovaný vnitřní standardní roztok,  $c = 2,50 \text{ } \mu\text{mol/ml}$ :  
v 500 ml odměrné baňce se rozpustí 0,2728 g  $\alpha$ -methyl-tryptofanu (3.3) v kyselině chlorovodíkové (3.13) a doplní se jí po značku. Skladuje se při  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  nejdéle 4 týdny.
- 3.17 Kalibrační standardní roztok tryptofanu a vnitřního standardu:  
2,00 ml koncentrovaného roztoku tryptofanu (3.15) a 2,00 ml koncentrovaného roztoku vnitřního standardu  $\alpha$ -methyl-tryptofanu (3.16) se zředí vodou (3.1) a methanolem (3.8) přibližně na stejný objem a stejnou koncentrací methanolu (10–30 %) jako v konečném hydrolyzátu.  
  
Roztok musí být připravován čerstvý před použitím.  
  
Během přípravy musí být roztok chráněn před slunečním světlem.
- 3.18 Kyselina octová.
- 3.19 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanol.
- 3.20 Ethanolamin w (w/w) > 98 %.
- 3.21 Roztok 1 g 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanolu (3.19) ve 100 ml methanolu (3.8).
- 3.22 Mobilní fáze pro HPLC: 3,00 g kyseliny octové (3.18) + 900 ml vody (3.1) + 50,0 ml roztoku (3.21) 1,1,1-trichloro-2-methyl-2-propanolu (3.19) v methanolu (3.8) (1 g/100 ml). pH se upraví ethanolaminem (3.20) na hodnotu 5,00. Doplní se vodou (3.1) na 1 000 ml.

#### 4. **Přístroje a pomůcky**

- 4.1 HPLC vybavení s fluorometrickým detektorem.
- 4.2 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 125 mm  $\times$  4 mm,  $C_{18}$ , náplň 3  $\mu\text{m}$ , nebo obdobná.
- 4.3 pH metr.
- 4.4 Nádoba polypropylenová s širokým hrdlem a šroubovacím uzávěrem o objemu 125 ml.
- 4.5 Membránový filtr, 0,45  $\mu\text{m}$ .
- 4.6 Autokláv, 110 ( $\pm 2$ )  $^\circ\text{C}$ , 1,4 ( $\pm 0,1$ ) bar.
- 4.7 Mechanická třepačka nebo magnetické míchací zařízení.
- 4.8 Ponorný mixér.

**5. Postup****5.1 Příprava vzorků**

Vzorek se upraví mletím tak, aby prošel sítím s oky 0,5 mm. Vzorky s vysokým obsahem vlhkosti musí být před mletím předsušeny buď na vzduchu při teplotě do 50 °C, nebo při zmrazení. Vzorky s vysokým obsahem tuku se před mletím extrahují petroletherem (3.9).

**5.2 Stanovení volného tryptofanu (extrakt)**

Vhodné množství (1–5 g) upraveného vzorku (5.1) se naváží s přesností na 1 mg do kónické baňky. Přidá se 100,0 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.13) a 5,00 ml koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (3.16). Směs se třepe nebo míchá 60 minut na mechanické třepačce nebo magnetickém míchacím zařízení (4.7). Sediment se nechá usadit a odpipetuje se 10,0 ml supernatantu do kádinky. Přidá se 5 ml roztoku kyseliny fosforečné (3.14). pH se upraví roztokem hydroxidu sodného (3.10) na 3,0. Přidá se tolik methanolu (3.8), aby jeho konečná koncentrace v roztoku byla 10–30 %. Roztok se převede do odměrné baňky vhodného objemu a zředí se vodou na objem potřebný pro chromatografické stanovení (přibližně stejný objem, jako mají kalibrační standardní roztoky (3.17)).

Před nástřikem na kolonu HPLC se přefiltruje několik ml roztoku přes 0,45 µm membránový filtr (4.5). Dále se postupuje podle bodu 5.4 – chromatografie.

Standardní roztok a extrakty je nutno chránit před přímým slunečním světlem. Pokud není možné provést zkoušku tentýž den, extrakty lze skladovat při 5 °C nejvýše tři dny.

**5.3 Stanovení celkového tryptofanu (hydrolyzát)**

Do polypropylenové nádoby (4.4) se naváží 0,1–1 g upraveného vzorku (5.1) s přesností na 0,2 mg. Obsah dusíku v navážce vzorku je asi 10 mg. Přidá se 8,4 g oktahydrátu hydroxidu barnatého (3.4) a 10 ml vody. Promíchá se ponorným mixerem (4.8) nebo na magnetickém míchacím zařízení (4.7). Magnet s teflonovým povrchem se ponechá ve směsi. Stěny nádoby se opláchnou 4 ml vody. Nádoba se uzavře a víčko se volně dotáhne. Uzavřená nádoba se umístí na 30–60 minut do autoklávu (4.6) s vroucí vodou a párou. Potom se autokláv uzavře a směs se hydrolyzuje 20 hodin při teplotě 110 (± 2) °C.

Před otevřením autoklávu se sníží teplota pod 100 °C. Aby se zabránilo krystalizaci Ba(OH)<sub>2</sub> · 8 H<sub>2</sub>O, přidá se k horké směsi 30 ml vody o laboratorní teplotě. Mírně se zamíchá nebo protřepe. Přidají se 2,00 ml roztoku koncentrovaného vnitřního standardu α-methyl-tryptofanu (3.16). Nádoba se vychladí 15 minut ve vodní lázni s ledem.

Dále se přidá 5 ml roztoku kyseliny fosforečné (3.14). Nádoba se ponechá v ledové lázni a za stálého míchání se neutralizuje roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.11) a potom se pH upraví roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.12) na hodnotu 3,0. Přidá se tolik methanolu, aby jeho výsledná koncentrace v konečném objemu byla 10–30 %. Roztok se převede do odměrné baňky vhodného objemu a zředí se vodou na stanovený objem, který je nutný pro chromatografické stanovení (např. 100 ml). Přídavek methanolu nesmí způsobit tvorbu sraženiny.

Před nástřikem na kolonu HPLC se přefiltruje několik ml roztoku přes 0,45 µm membránový filtr (4.5). Dále se postupuje podle bodu 5.4 – chromatografie.

Standardní roztok a hydrolyzáty je nutno chránit před přímým slunečním světlem. Pokud není možné provést zkoušku tentýž den, hydrolyzáty lze skladovat při 5 °C nejvýše tři dny.

**5.4 Stanovení HPLC**

Následující podmínky izokratické eluce jsou pouze doporučené; mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky (viz poznámky 9.1 a 9.2):

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.2): 125 mm × 4 mm, C<sub>18</sub>, náplň 3 µm, nebo obdobná

Teplota kolony: laboratorní teplota

Mobilní fáze (3.22): 3,00 g kyseliny octové (3.18) + 900 ml vody (3.1) + 50,0 ml roztoku (3.21) 1,1,1- trichlor-2-methyl-2-propanolu (3.19) v methanolu (3.8) (1 g/100 ml). pH se upraví na 5,00 ethanolaminem (3.20). Objem se doplní na 1 000 ml vodou (3.1).

Průtok: 1 ml/min

Celková doba zkoušky: asi 34 minut

Detekční vlnová délka: excitace: 280 nm, emise: 356 nm

Objem nástřiku: 20 µl.

6. **Výpočet a vyjádření výsledků**

Obsah tryptofanu (X) v g na 100 g vzorku se vypočte podle následujícího vzorce:

$$X = \frac{A \times B \times V_1 \times c \times V_2 \times M}{C \times D \times V_3 \times 10\,000 \times m}$$

A = plocha píku vnitřního standardu v kalibračním standardním roztoku (3.17)

B = plocha píku tryptofanu v extraktu (5.2) nebo hydrolyzátu (5.3)

V<sub>1</sub> = objem koncentrovaného roztoku tryptofanu (3.15) přidaného do kalibračního roztoku (3.17) v ml (2 ml)

c = koncentrace tryptofanu v koncentrovaném roztoku tryptofanu (3.15) přidaném do kalibračního roztoku (3.17) v μmol/ml (= 2,50)

V<sub>2</sub> = objem koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (3.16) přidaný při extrakci (5.2) (= 5,00 ml) nebo do hydrolyzátu (5.3) v ml (= 2,00 ml)

C = plocha píku vnitřního standardu v extraktu (5.2) nebo hydrolyzátu (5.3)

D = plocha píku tryptofanu v kalibračním standardním roztoku (3.17)

V<sub>3</sub> = objem koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (3.16) přidaného do kalibračního standardního roztoku (3.17) v ml (= 2,00 ml)

m = hmotnost navážky vzorku v g (korigovaná na původní hmotnost, pokud byl vzorek vysušen a/nebo odtučněn)

M = molekulární hmotnost tryptofanu (= 204,23 g/mol).

7. **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku nesmí překročit 10 % relat. z hodnoty nejvyššího výsledku.

8. **Výsledky kruhových testů**

ES uspořádala kruhové testy (4. porovnání) pro tři vzorky, které byly zkoušeny ve 12 laboratořích, aby byl ověřen postup stanovení celkového tryptofanu (hydrolyza). Každý vzorek byl zkoušen pětkrát. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Vzorek 1 Krmivo pro prasata	Vzorek 2 Krmivo pro prasata s přidaným L-tryptofanem	Vzorek 3 Koncentrát pro prasata
L	12	12	12
n	50	55	50
Průměr (g/kg)	2,42	3,40	4,22
s <sub>r</sub> (g/kg)	0,05	0,05	0,08
r (g/kg)	0,14	0,14	0,22
CV <sub>r</sub> (%)	1,9	1,6	1,9
S <sub>R</sub> (g/kg)	0,15	0,20	0,09
R (g/kg)	0,42	0,56	0,25
CV <sub>R</sub> (%)	6,3	6,0	2,2

L = počet laboratoří, které poskytly výsledky

n = počet jednotlivých výsledků po vyloučení odlehlých hodnot (určených Cochranovým a Dixonovým testem)

s<sub>r</sub> = standardní odchylka opakovatelnosti

S<sub>R</sub> = standardní odchylka reprodukovatelnosti

r = opakovatelnost

R = reprodukovatelnost

CV<sub>r</sub> = variační koeficient opakovatelnosti v %

CV<sub>R</sub> = variační koeficient reprodukovatelnosti v %

Další kruhový test ES (3. porovnání) byl proveden na dvou vzorcích ve 13 laboratořích pro ověření postupu extrakce volného tryptofanu. Každý vzorek byl zkoušen pětkrát. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce:

	Vzorek 4 Směs pšenice a sóji	Vzorek 5 Směs pšenice a sóji (= vzorek 4) s přidaným tryptofanem (0,457 g/kg)
L	12	12
n	55	60
Průměr (g/kg)	0,391	0,931
$s_r$ (g/kg)	0,005	0,012
r (g/kg)	0,014	0,034
$CV_r$ (%)	1,34	1,34
$S_R$ (g/kg)	0,018	0,048
R (g/kg)	0,050	0,134
$CV_R$ (%)	4,71	5,11

L = počet laboratoří, které poskytly výsledky

n = počet jednotlivých výsledků po vyloučení odlehlých hodnot (určených Cochranovým a Dixonovým testem)

$s_r$  = standardní odchylka opakovatelnosti

$S_R$  = standardní odchylka reprodukovatelnosti

r = opakovatelnost

R = reprodukovatelnost

$CV_r$  = variační koeficient opakovatelnosti v %

$CV_R$  = variační koeficient reprodukovatelnosti v %

Další kruhový test ES byla proveden na na čtyřech vzorcích v 7 laboratořích pro ověření hydrolyzy tryptofanu. Každý vzorek byl zkoušen pětkrát. Výsledky jsou uvedeny níže.

	Vzorek 1 Krmná směs pro prasata (CRM 117)	Vzorek 2 Nízkotučná rybí moučka (CRM 118)	Vzorek 3 Sójová moučka (CRM 119)	Vzorek 4 Sušené odstředěné mléko (CRM 120)
L	7	7	7	7
n	25	30	30	30
Průměr (g/kg)	2,064	8,801	6,882	5,236
$s_r$ (g/kg)	0,021	0,101	0,089	0,040
r (g/kg)	0,059	0,283	0,249	0,112
$CV_r$ (%)	1,04	1,15	1,30	0,76
$S_R$ (g/kg)	0,031	0,413	0,283	0,221
R (g/kg)	0,087	1,156	0,792	0,619
$CV_R$ (%)	1,48	4,69	4,11	4,22

L = počet laboratoří, které poskytly výsledky

n = počet jednotlivých výsledků po vyloučení odlehlých hodnot (určených Cochranovým a Dixonovým testem)

$s_r$  = standardní odchylka opakovatelnosti

$S_R$  = standardní odchylka reprodukovatelnosti

r = opakovatelnost

R = reprodukovatelnost

$CV_r$  = variační koeficient opakovatelnosti v %

$CV_R$  = variační koeficient reprodukovatelnosti v %.

## 9. Poznámky

- 9.1 Pro lepší oddělení tryptofanu a  $\alpha$ -methyl-tryptofanu jsou doporučeny níže uvedené zvláštní podmínky pro chromatografii.

Po izokratické eluci následuje gradientové čištění kolony:

Kolona pro kapalinovou chromatografii:	125 mm × 4 mm, C <sub>18</sub> , náplň 5 μm, nebo obdobná		
Teplota kolony:	32 °C		
Mobilní fáze:	A: 0,01 mol/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> a methanol, 95 + 5 (V+V)		
	B: methanol		
Gradient:	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
Průtok:	1,2 ml/min		
Celková doba zkoušky:	asi 33 minut.		

- 9.2 Chromatografie se může měnit podle typu HPLC a náplně kolony. Zvolený systém musí být schopen oddělit tryptofan a vnitřní standard až na základní „baseline“. Navíc je důležité, aby byly degradační produkty dobře odděleny od tryptofanu a vnitřního standardu. Pro kontrolu obsahu nečistot, které by se mohly eluovat ve stejném čase jako vnitřní standard, se provede zkouška hydrolyzátu bez přidaného vnitřního standardu. Je důležité, aby celková doba zkoušky byla dostatečná pro dokonalé vymytí všech degradačních produktů, jinak může docházet v následujících chromatografiích k interferencím.

Chromatografický systém musí v rozsahu měření poskytovat lineární odezvu. Lineární odezva se měří s konstantní (normální) koncentrací vnitřního standardu a různými koncentracemi tryptofanu. Je důležité, aby velikost píků tryptofanu i vnitřního standardu byla v lineárním rozsahu HPLC/fluorescenčního systému. Pokud jsou píky tryptofanu a/nebo vnitřního standardu příliš velké nebo příliš malé, zkouška se zopakuje s jinou navázkou vzorku a/nebo s jiným konečným objemem.

### 9.3 *Hydroxid barnatý*

Stárnutím hydroxidu barnatého se zhoršuje jeho rozpustnost, což způsobuje, že roztok pro stanovení HPLC není čirý a výsledky obsahu tryptofanu mohou být nízké.

## H. STANOVENÍ OBSAHU TUKU

### 1. Účel a rozsah

Touto metodou se stanoví obsah tuku v krmivech. Metoda se nevztahuje na zkoušení olejnatých semen a plodin.

Podle druhu a složení krmiva a podle účelu, pro který se zkouška provádí, se použije jeden ze dvou níže uvedených postupů.

#### 1.1 *Postup A – přímo extrahovatelné tuky*

Tato metoda je použitelná pro krmiva rostlinného původu s výjimkou těch, která jsou uvedena v postupu B.

#### 1.2 *Postup B – celkové tuky*

Tato metoda je použitelná pro krmiva živočišného původu a pro všechny krmné směsi. Používá se pro všechny materiály, z nichž není možné tuk zcela extrahovat bez předchozí hydrolyzy (např. lepky, kvasnice, bramborové proteiny a výrobky, které byly podrobeny zpracování, jako je vytlačování, vločkování a zahřívání).

#### 1.3 *Interpretace výsledků*

Ve všech případech, kdy se dosáhlo postupem B vyššího výsledku než postupem A, je třeba považovat za platnou hodnotu výsledek dosažený postupem B.