

## C. STANOVENÍ OBSAHU STOPOVÝCH PRVKŮ ŽELEZA, MĚDI, MANGANU A ZINKU

## 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení stopových prvků železa, mědi, manganu a zinku v krmivech. Meze stanovitelnosti jsou:

- železo (Fe): 20 mg/kg,
- měď (Cu): 10 mg/kg,
- mangan (Mn): 20 mg/kg,
- zinek (Zn): 20 mg/kg.

## 2. Princip

Vzorek se převede po destrukci organické hmoty (pokud je obsažena) do roztoku kyselinou chlorovodíkovou. Prvky železo, měď, mangan a zinek se stanovují po příslušném zředění atomovou absorpční spektrofotometrií.

## 3. Chemikálie

*Úvodní poznámky*

Pro přípravu chemikálií a analytických roztoků se používá voda, dvakrát destilovaná ve skleněném destilačním přístroji (borosilikátové nebo křemičité sklo) nebo po dvojitým průchodu přes ionex, která prokazatelně neobsahuje kationty.

Chemikálie musí být nejméně analytické čistoty. Nepřítomnost prvků, které mají být stanoveny, musí být kontrolována slepou zkouškou. Pokud je to nutné, musí být chemikálie přečištěny.

Místo standardních roztoků popsaných níže mohou být použity komerční standardní roztoky za předpokladu, že mají deklarovaný obsah a před použitím byly překontrolovány.

- 3.1 Kyselina chlorovodíková (d: 1,19 g/ml).
- 3.2 Kyselina chlorovodíková (6 mol/l).
- 3.3 Kyselina chlorovodíková (0,5 mol/l).
- 3.4 Kyselina fluorovodíková 38–40 % (v/v) s obsahem železa (Fe) pod 1 mg/l a zbytkem po odpaření menším než 10 mg (jako sulfát)/l.
- 3.5 Kyselina sírová (d: 1,84 g/ml).
- 3.6 Peroxid vodíku (přibližně 100 objemů kyslíku (30 % hmotnostních)).
- 3.7 Standardní roztok železa (1 000 µg Fe/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok: v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 200 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) rozpustí 1 g železného drátu, přidá se 16 ml peroxidu vodíku (3.6) a doplní se po značku vodou.
  - 3.7.1 Pracovní standardní roztok železa (100 µg Fe/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.7) vodou v poměru 1 + 9.
- 3.8 Standardní roztok mědi (1 000 µg Cu/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok:
  - v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 25 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) rozpustí 1 g práškové mědi, přidá se 5 ml peroxidu vodíku (3.6) a doplní se po značku vodou.

- 3.8.1 Pracovní standardní roztok mědi (10 µg Cu/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.8) vodou v poměru 1 + 9 a potom zředěním výsledného roztoku vodou v poměru 1 + 9.
- 3.9 Standardní roztok manganu (1 000 µg Mn/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok:
- v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 25 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) rozpustí 1 g práškového manganu a doplní se po značku vodou.
- 3.9.1 Pracovní standardní roztok manganu (10 µg Mn/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.9) vodou v poměru 1 + 9 a potom zředěním výsledného roztoku vodou v poměru 1 + 9.
- 3.10 Standardní roztok zinku (1 000 µg Zn/ml) připravený podle níže uvedeného postupu nebo obdobný komerčně dostupný roztok:
- v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 25 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) rozpustí 1 g páskového nebo plátkového zinku a doplní se po značku vodou.
- 3.10.1 Pracovní standardní roztok zinku (10 µg Zn/ml) připravený zředěním standardního roztoku (3.10) vodou v poměru 1 + 9 a potom zředěním výsledného roztoku vodou v poměru 1 + 9.
- 3.11 Roztok chloridu lanthanitého: v odměrné baňce na 1 000 ml se ve 150 ml vody a 100 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) rozpustí 12 g kysličníku lanthanitého a doplní se po značku vodou.

#### 4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Muflová pec s regulací teploty a záznamníkem (pokud možno).
- 4.2 Skleněné nádobí rezistentního borosilikátového typu. Doporučuje se používat přístroje, které jsou používány výlučně pro stanovení stopových prvků.
- 4.3 Atomový absorpční spektrofotometr splňující požadavky metody na citlivost a přesnost v požadovaném rozsahu.

#### 5. Postup <sup>(1)</sup>

##### 5.1 Vzorky obsahující organickou hmotu

##### 5.1.1 Spalování a příprava roztoku pro zkoušku <sup>(2)</sup>

- 5.1.1.1 Do platinového nebo křemenného kelímku (4.3) (viz poznámka b)), předem zváženého, se navází 5–10 g vzorku s přesností na 0,2 mg, vysuší se v sušárně při 105 °C a potom se vloží do chladné muflové pece (4.1). Pec se uzavře (viz poznámka c)) a teplota se postupně zvyšuje na 450–475 °C během asi 90 minut. Tato teplota se udržuje 4 až 16 hodin (např. přes noc), aby se odstranily uhlíkaté částice. Potom se pec otevře a nechá vychladnout (viz poznámka d)).

Popel se zvlhčí vodou a přeneše se do 250 ml kádinky. Kelímeček se vypláchne celkem asi 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a další kyselina se přidává pomalu a opatrně do kádinky (může proběhnout prudká reakce v důsledku tvorby CO<sub>2</sub>). Kyselina chlorovodíková (3.1) se přidává po kapkách a za míchání, dokud neustane šumění. Odpaří se do sucha za občasného zamíchání skleněnou tyčinkou.

<sup>(1)</sup> Lze použít i jiné metody mineralizace, pokud prokazatelně poskytují podobné výsledky (např. mikrovlnný tlakový rozklad).

<sup>(2)</sup> Zelené pícniny (čerstvé nebo suché) často obsahují velké množství rostlinného křemíku, který může zadržovat stopové prvky, a proto musí být odstraněn. U vzorků těchto krmiv musí být proto dodržen následující modifikovaný postup. Postupuje se podle bodu 5.1.1.1 až k filtraci. Filtrační papír obsahující nerozpustný zbytek se promyje dvakrát vroucí vodou a vloží se zpět do křemíkového nebo platinového kelímku. Spaluje se v muflové peci (4.1) při teplotě pod 550 °C, dokud všechny uhlíkaté částice zcela nezmizí. Nechá se vychladnout, přidá se několik kapek vody a poté 10–15 ml kyseliny fluorovodíkové (3.4) a odpaří se do sucha při asi 150 °C. Pokud zůstane nějaký křemičitý zbytek, rozpustí se znovu v několika mililitrech kyseliny fluorovodíkové (3.4) a odpaří se do sucha. Přidá se pět kapek kyseliny sírové (3.5) a zahřívá se, dokud se nepřestane uvolňovat bílý kouř. Po přidání 5 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) a asi 30 ml vody se roztok zahřeje, přefiltruje do 250 ml odměrné baňky a doplní se po značku vodou (koncentrace HCl je asi 0,5 mol/l). Pak se pokračuje podle bodu 5.1.2.

K odparku se přidá 15 ml kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) a poté asi 120 ml vody. Promíchá se skleněnou tyčinkou, která se ponechá v kádince, a poté se kádinka zakryje hodinovým sklem. Obsah kádinky se uvede do mírného varu a udržuje se na bodu varu, dokud se popel nerozpustí. Roztok se přefiltruje přes bezpopelný papírový filtr a filtrát se jímá do 250 ml odměrné baňky. Kádinka a filtr se promyjí 5 ml horké kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2) a dvakrát vroucí vodou. Odměrná baňka se doplní po značku vodou (koncentrace HCl je asi 0,5 mol/l).

- 5.1.1.2 Pokud je zbytek na filtru zbarven černě (uhlík), vrátí se do pece a spaluje se další tři až pět hodin při 450–475 °C. Spalování je dokončeno, když je popel bílý nebo téměř bílý. Popel se rozpustí v asi 2 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), odpaří se do sucha a přidá se 5 ml odměrné baňky. Kádinka a filtr se promyjí 5 ml horké kyseliny chlorovodíkové 6 mol/l (3.2). Roztok se zahřeje k varu a potom se přefiltruje do odměrné baňky a doplní po značku vodou (koncentrace HCl je asi 0,5 mol/l).

*Poznámky:*

- a) Při stanovení stopových prvků je důležité zabránit riziku kontaminace, zejména zinkem, mědí a železem. Z tohoto důvodu musí být vybavení používané při přípravě vzorků bez těchto kovů.

Ke snížení obecného rizika kontaminace se pracuje v bezprašné atmosféře s úzkostlivě čistým vybavením a pečlivě umývaným nádobím. Stanovení zinku je zvláště citlivé na mnoho typů kontaminace, např. z nádobí, chemikálií, prachu atd.

- b) Navážka vzorku se počítá z přibližného předpokládaného obsahu stopového prvku v krmivu ve vztahu k citlivosti použitého spektrofotometru. U určitých krmiv s nízkým obsahem stopových prvků může být nezbytné začít s 10–20 g vzorku a doplnit konečný roztok pouze na 100 ml.
- c) Spalování se musí provádět v uzavřené peci bez vhánění vzduchu nebo kyslíku.
- d) Teplota ukazovaná pyrometrem nesmí překročit 475 °C.

5.1.2 Spektrofotometrické stanovení

5.1.2.1 Příprava kalibračních roztoků

Pro každý stanovovaný prvek se připraví z pracovních standardních roztoků (3.7.1, 3.8.1, 3.9.1 a 3.10.1) řada kalibračních roztoků. Kalibrační roztoky mají koncentraci HCl asi 0,5 mol/l a (v případě železa, manganu a zinku) koncentraci chloridu lanthanitého asi 0,1 % La (w/v).

Koncentrace vybraných stopových prvků musí ležet v rozsahu citlivosti použitého spektrofotometru. Níže uvedené tabulky ukazují příklad složení typických řad kalibračních roztoků; v závislosti na typu a citlivosti použitého spektrofotometru však může být nutno zvolit jiné koncentrace.

**Železo**

µg Fe/ml	0	0,5	1	2	3	4	5
pracovní standardní roztok (3.7.1) (1 ml = 100 µg Fe) v ml	0	0,5	1	2	3	4	5
HCl (3.2) v ml	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.11) a doplní se vodou po značku.

**Měď**

µg Cu/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
pracovní standardní roztok (3.8.1) (1 ml = 10 µg Cu) v ml	0	1	2	4	6	8	10
HCl (3.2) v ml	8	8	8	8	8	8	8

**Mangan**

µg Mn/ml	0	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
pracovní standardní roztok (3.9.1) (1 ml = 10 µg Mn) v ml	0	1	2	4	6	8	10
HCl (3.2) v ml	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.11) a doplní se vodou po značku.

**Zinek**

µg Zn/ml	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8
pracovní standardní roztok (3.10.1) (1 ml = 10 µg Zn) v ml	0	0,5	1	2	4	6	8
HCl (3.2) v ml	7	7	7	7	7	7	7

+ 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.11) a doplní se vodou po značku.

5.1.2.2 *Příprava roztoku pro zkoušku*

Při stanovení mědi lze použít přímo roztok připravený podle bodu 5.1.1. Pokud je nutné jeho koncentraci naředit na úroveň kalibračních roztoků, odpipetujte se alikvotní část roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplní se po značku kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l (3.3).

Při stanovení železa, manganu a zinku se odpipetujte alikvotní část roztoku připraveného podle bodu 5.1.1 do 100 ml odměrné baňky, přidá se 10 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.11) a doplní se po značku kyselinou chlorovodíkovou 0,5 mol/l (3.3) (viz rovněž bod 8 Poznámka).

5.1.2.3 *Slepá zkouška*

Slepá zkouška musí zahrnovat všechny předepsané kroky postupu, ale vlastní vzorek se nepoužije. „0“ kalibrační roztok nemůže být použit jako slepá zkouška.

5.1.2.4 *Měření atomové absorpce*

Atomová absorpce kalibračních roztoků a zkoušeného roztoku se změří s použitím oxidačního plamene vzduch-acetylen při následujících vlnových délkách:

Fe: 248,3 nm

Cu: 324,8 nm

Mn: 279,5 nm

Zn: 213,8 nm

Každé měření se provede čtyřikrát.

5.2 *Minerální krmiva*

Pokud vzorek neobsahuje organickou hmotu, nemusí se spalovat. Příprava se provádí podle druhého odstavce bodu 5.1.1.1. Nemusí se provádět ani odpařování s kyselinou fluorovodíkovou.

6. **Výpočet a vyjádření výsledků**

Koncentrace příslušného stopového prvku v roztoku se vypočte z kalibrační křivky a výsledek se vyjádří v miligramech stopového prvku na kilogram vzorku (ppm).

## 7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku týměž laborantem nesmí překročit:

- 5 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahů příslušného stopového prvku do 50 mg/kg,
- 10 % z vyššího výsledku u obsahů příslušného stopového prvku od 50 do 100 mg/kg,
- 10 mg/kg v absolutní hodnotě u obsahů příslušného stopového prvku od 100 do 200 mg/kg,
- 5 % z vyššího výsledku u obsahů příslušného stopového prvku nad 200 mg/kg.

## 8. Poznámka

Přítomnost velkého množství fosfátů může ovlivňovat stanovení železa, manganu a zinku. Proto musí být přidáván roztok chloridu lanthanitého (3.11). Pokud je váhový poměr (Ca + Mg)/P ve vzorku > 2, nemusí se do roztoku pro zkoušku ani do kalibračních roztoků přidávat roztok chloridu lanthanitého (3.11).

### D. STANOVENÍ OBSAHU HALOFUGINONU

*DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-quinazolin-4-(3H)-1-hydrobromid*

#### 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu halofuginonu v krmivech. Mez kvantifikace je 1 mg/kg.

#### 2. Princip

Obsah halofuginonu se stanoví jako volná báze po extrakci horkou vodou do ethylacetátu a následně se rozdělí jako hydrochlorid do vodného kyselého roztoku. Extrakt se přečistí na ionexové chromatografické koloně. Obsah halofuginonu se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) na reverzní fázi s UV detekcí.

#### 3. Chemikálie

- 3.1 Acetonitril, pro HPLC.
- 3.2 Amberlit XAD-2 ionexová pryskyřice.
- 3.3 Octan amonný.
- 3.4 Ethylacetát.
- 3.5 Kyselina octová, ledová.
- 3.6 Halofuginon, standardní látka (DL-trans-7-brom-6-chlor-3-[3-(3-hydroxy-2-piperidyl)acetyl]-quinazolin-4-(3H)-1-hydrobromid, E 764).
- 3.6.1 Halofuginon, standardní zásobní roztok, 100 µg/ml

Do 500 ml odměrné baňky se naváží 50 mg halofuginonu (3.6) s přesností na 0,1 mg, rozpustí se v tlumivém roztoku octanu amonného (3.18), doplní po značku tlumivým roztokem a promíchá. Tento roztok je stálý tři týdny při teplotě 5 °C, je-li skladován ve tmě.

#### 3.6.2 Kalibrační roztoky

Do řady 100 ml odměrných baněk se odpipetuje 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 ml standardního zásobního roztoku (3.6.1). Doplní se po značku mobilní fázi (3.21) a promíchá. Roztoky mají koncentrace halofuginonu 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 6,0 µg/ml. Tyto roztoky se musí připravovat čerstvé před použitím.