

PŘÍLOHA IV

METODY ZKOUŠENÍ PRO KONTROLU OBSAHU POVOLENÝCH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK V KRMIVECH

A. STANOVENÍ OBSAHU VITAMINU A

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vitamínu A (retinolu) v krmivech a premixech. Vitamin A zahrnuje *all-trans*-retinyl alkohol a jeho *cis* izomery, které se stanovují touto metodou. Obsah vitamínu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (m. j.) na kilogram. Jedna mezinárodní jednotka odpovídá aktivitě 0,300 µg *all-trans* vitamínu A (alkohol) nebo 0,344 µg *all-trans* vitamínu A (acetát) nebo 0,550 µg *all-trans* vitamínu A (palmitát).

Mez kvantifikace je 2 000 m. j. vitamínu A/kg.

2. Princip

Vzorek se hydrolyzuje ethanolickým roztokem hydroxidu draselného a vitamin A se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se odpaří a zbytek se rozpustí v methanolu a, pokud je to nutné, naředí se na vhodnou koncentraci. Obsah vitamínu A se stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí. Chromatografické parametry jsou vybrány tak, aby nedocházelo k separaci *all-trans* vitamínu A (alkohol) a jeho *cis* izomerů.

3. Chemikálie

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

3.2 Petrolether, bod varu 40–60 °C.

3.3 Methanol.

3.4 Roztok hydroxidu draselného, $c = 50 \text{ g}/100 \text{ ml}$.

3.5 Roztok askorbátu sodného, $c = 10 \text{ g}/100 \text{ ml}$ (viz poznámky 7.7).

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

3.6.1. Roztok sulfidu sodného, $c = 0,5 \text{ mol}/\text{l}$ v glycerolu, $\beta = 120 \text{ g}/\text{l}$ (pro $x = 9$) (viz poznámky 7.8).

3.7 Roztok fenolftaleinu, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ v ethanolu (3.1).

3.8 2-propanol.

3.9 Mobilní fáze pro HPLC: směs methanolu (3,3) a vody, např. 980 + 20 (v + v). Přesný poměr bude upraven podle charakteristiky použité kolony.

3.10 Dusík, prostý kyslíku.

3.11 *All-trans*-vitamin A (acetát), extra čistý, s ověřenou aktivitou, např. $2,80 \times 10^6 \text{ m. j./g}$.

3.11.1 Zásobní roztok *all-trans*-vitamínu A (acetát): do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 50 mg vitamínu A (acetát) (3.11). Rozpustí se v 2-propanolu (3.8) a doplní se jím po značku. Nominální koncentrace vitamínu A v roztoku je 1 400 m. j./ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.1.

3.12 *All-trans*-vitamin A (palmitát), extra čistý, s ověřenou aktivitou, např. $1,80 \times 10^6 \text{ m. j./g}$.

3.12.1 Zásobní roztok *all-trans*-vitamínu A (palmitát): do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 80 mg vitamínu A (palmitát) (3.12). Rozpustí se v 2-propanolu (3.8) a doplní se jím po značku. Nominální koncentrace vitamínu A v roztoku je 1 400 m. j./ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.2.

3.13 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT) (viz poznámky 7.5).

4. **Přístroje a pomůcky**

4.1 Vakuová rotační odparka.

4.2 Tmavé sklo.

4.2.1 Baňky s plochým dnem nebo kónické baňky, 500 ml, se zábrusovým hrdlem.

4.2.2 Odměrné baňky s úzkým hrdlem a zábrusovou zátkou, objem 10, 25, 100 a 500 ml.

4.2.3 Dělicí nálevky, kónické, 1 000 ml, se zábrusovou zátkou.

4.2.4 Hruškovité baňky, 250 ml, se zábrusovým hrdlem.

4.3 Allihnův chladič, délka pláště 300 mm, se zábrusem a s adaptérem na zavádění plynu.

4.4 Skládaný filtrační papír pro oddělování fází, průměr 185 mm (např. Schleicher & Schuell 597 HY 1/2).

4.5 Zařízení pro HPLC s dávkovacím systémem.

4.5.1 Kolona pro kapalinovou chromatografii, 250 mm × 4 mm, C₁₈, náplň 5 nebo 10 μm nebo obdobná (výkonnostní parametry: pouze jediný pík pro všechny izomery retinolu za podmínek HPLC).

4.5.2 UV nebo fluorescenční detektor s nastavitelnou vlnovou délkou.

4.6 Spektrofotometr s 10 mm křemennými kvyetami.

4.7 Vodní lázeň s magnetickým mícháním.

4.8 Extrakční zařízení (viz obrázek 1) sestávající ze:

4.8.1 Skleněného válce o objemu 1 l vybaveného zábrusovým hrdlem a zátkou.

4.8.2 Vkladatelného zařízení se zábrusem, s postranním raménkem a nastavitelnou trubičkou, která prochází středem. Nastavitelná trubička má konec vytvarovaný do tvaru U a zúženou výpust na opačné straně tak, aby bylo možné převést horní vrstvu z válce do dělicí nálevky.

5. **Postup**

Poznámka: Vitamin A je citlivý na (UV) světlo a oxidaci. Všechny operace se provádí bez přístupu světla (používá se tmavé sklo nebo se chrání před světlem hliníkovou fólií) a kyslíku (pod dusíkem). Vzduch nad kapalinou se během extrakce vytěsňuje dusíkem (aby nedošlo k přetlakování, je nutno občas uvolnit zátku).

5.1 *Příprava vzorku*

Vzorek se rozmělní tak, aby prošel sítím o velikosti oka 1 mm a aby během úpravy nedošlo k jeho zahřátí. Vzorek se musí rozmělnovat **bezprostředně** před vážením a saponifikací, jinak může docházet ke ztrátám vitamínu A.

5.2 *Saponifikace*

Podle obsahu vitamínu A ve vzorku se s přesností na 1 mg naváží 2–25 g vzorku do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (4.2.1). Za intenzivního míchání se přidá 130 ml ethanolu (3.1), asi 100 mg BHT (3.13), 2 ml roztoku askorbátu sodného (3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (3.6). Baňka se připojí k chladiči (4.3) a ponoří se do vodní lázně s magnetickým mícháním (4.7). Zahřeje se k varu a vaří se pod refluxem 5 minut. Potom se přes chladič (4.3) přidá 25 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4) a vaří se pod refluxem za míchání pod pomalým proudem dusíku dalších 25 minut. Potom se chladič opláchne asi 20 ml vody a obsah baňky se nechá vychladnout na laboratorní teplotu.

5.3 *Extrakce*

Saponifikovaný roztok se dekantací a propláchnutím celkem 250 ml vody převede kvantitativně do 1 000 ml dělicí nálevky (4.2.3) nebo do extrakčního zařízení (4.8). Saponifikační baňka se opláchne 25 ml ethanolu (3.1) a poté 100 ml petroletheru (3.2) a oba oplachy se převedou do dělicí nálevky nebo do extrakčního zařízení. Konečný poměr vody a ethanolu v kombinovaných roztocích musí být asi 2 : 1. Roztok se 2 minuty intenzivně třepe a potom se nechá 2 minuty stát.

5.3.1 *Extrakce v dělicí nálevce (4.2.3)*

Po rozdělení vrstev (poznámka 7.3) se petroletherová vrstva převede do další dělicí nálevky (4.2.3). Extrakce se opakuje ještě dvakrát se 100 ml petroletheru (3.2) a dvakrát s 50 ml petroletheru (3.2).

Spojené extrakty v dělicí nálevce se dvakrát promyjí mírným kroužením (aby nevznikala emulze) 100 ml vody a potom se opakovaně protřepávají se 100 ml vody, dokud voda nezůstane po přidání roztoku fenolftaleinu (3.7) bezbarvá (obvykle stačí 4 promytí). Promytý extrakt se přefiltruje do 500 ml odměrné baňky (4.2.2) přes suchý skládaný filtr pro oddělování fází (4.4), aby se odstranila suspendovaná voda. Dělicí nálevka se opláchne 50 ml petroletheru (3.2) a ten se přidá přes filtr do téže odměrné baňky. Baňka se petroletherem (3.2) doplní po značku a dobře promíchá.

5.3.2 *Extrakce v extrakčním zařízení (4.8)*

Po rozdělení vrstev (poznámka 7.3) se odstraní zátká z válce (4.8.1) a místo ní se vloží vnitřní zařízení (4.8.2). Spodní strana U-trubice se umístí tak, aby byla právě nad rozhraním. Za použití tlaku dusíku (přiváděného postranním raménkem) se převede horní petroletherová vrstva do 1 000 ml dělicí nálevky (4.2.3). Přidá se 100 ml petroletheru (3.2), válec se zátákuje a důkladně protřepe. Po oddělení vrstev se horní vrstva opět převede stejným způsobem do dělicí nálevky. Extrakce se opakuje s dalšími 100 ml petroletheru (3.2) a pak ještě dvakrát s 50 ml petroletheru (3.2). Po rozdělení fází se vždy horní petroletherová vrstva přidá k předchozí do dělicí nálevky.

Spojené extrakty petroletheru v dělicí nálevce se promyjí, jak je popsáno v bodě 5.3.1, a postupuje se dále podle bodu 5.3.1.

5.4 *Příprava roztoku vzorku pro stanovení HPLC*

Alikvotní část roztoku petroletheru (podle bodu 5.3.1 nebo 5.3.2) se odpipetuje do 250 ml hruškovité baňky (4.2.4). Rozpouštědlo se na vakuové rotační odparce (4.1) odpaří za sníženého tlaku při teplotě do 40 °C téměř do sucha. Atmosférický tlak se obnoví zavedením dusíku (3.10) do baňky a ta se odpojí od rotační odparky. Zbytek rozpouštědla se odpaří pod proudem dusíku (3.10) a odparek se ihned rozpustí ve známém objemu (10–100 ml) methanolu (3.3) (výsledná koncentrace vitamínu A musí být v rozsahu 5–30 µg/ml).

5.5 *Stanovení HPLC*

Vitamin A se separuje na koloně C₁₈ s reverzní fází (4.5.1) a jeho koncentrace se měří UV detektorem (325 nm) nebo fluorescenčním detektorem (excitace: 325 nm, emise: 475 nm) (4.5.2).

Do přístroje se nastříkuje alikvotní část (např. 20 µl) methanolickeho roztoku získaného podle bodu 5.4 a eluuje se mobilní fází (3.9). Průměrná hodnota výšek (ploch) pík se vypočte z několika opakovaných nástřiků téhož vzorku nebo kalibračních roztoků (5.6.2).

Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou doporučené; mohou být použity jiné podmínky za předpokladu, že poskytují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (4.5.1): 250 mm × 4 mm, C₁₈, náplň 5 nebo 10 µm nebo obdobná

Mobilní fáze (3.9): směs methanolu (3.3) a vody, např. 980 + 20 (v + v)

Průtok: 1–2 ml/min

Detektor (4.5.2): UV detektor (325 nm) nebo fluorescenční detektor (excitace: 325 nm / emise: 475 nm).

5.6 *Kalibrace*

5.6.1 Příprava pracovních standardních roztoků

Do 500 ml baňky s plochým dnem nebo kónické baňky (4.2.1) se odpipetuje 20 ml zásobního roztoku vitamínu A (acetát) (3.11.1) nebo 20 ml zásobního roztoku vitamínu A (palmitát) (3.12.1) a hydrolyzuje se podle bodu 5.2, ale bez přidání BHT. Potom se provede extrakce petroletherem (3.2) podle bodu 5.3 a doplní se na 500 ml petroletherem (3.2). 100 ml tohoto extraktu se odpaří na rotační odparce téměř do sucha (viz 5.4), zbylé rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku (3.10) a odparek se rozpustí v 10,0 ml methanolu (3.3). Nominální koncentrace vitamínu A v tomto roztoku je 560 m. j./ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.3. Pracovní standardní roztok musí být připraven čerstvý před použitím.

Do 20 ml odměrné baňky se odpipetují 2,0 ml tohoto pracovního standardního roztoku, baňka se doplní po značku methanolem (3.3) a promíchá. Nominální koncentrace vitamínu A v tomto **zředěném** pracovním standardním roztoku je 56 m. j./ml.

5.6.2 Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do 20 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0, 2,0, 5,0 a 10,0 ml **zředěných** pracovních standardních roztoků, doplní se methanolem (3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace vitamínu A v těchto roztocích jsou 2,8, 5,6, 14,0 a 28,0 m. j./ml.

Do přístroje se opakovaně nastříkuje 20 μ l jednotlivých kalibračních roztoků a stanoví se průměrné hodnoty výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka, přičemž se použijí výsledky UV kontroly (5.6.3.3).

5.6.3 UV standardizace standardních roztoků

5.6.3.1 *Zásobní roztok vitamínu A (acetát)*

Do 50 ml odměrné baňky (4.2.2) se odpipetují 2,0 ml zásobního roztoku vitamínu A (acetát) (3.11.1) a doplní se po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace vitamínu A v tomto roztoku je 56 m. j./ml. Do 25 ml odměrné baňky se odpipetuje 3,0 ml tohoto zředěného roztoku vitamínu A (acetát) a doplní se po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace vitamínu A v tomto roztoku je 6,72 m. j./ml. Na spektrofotometru (4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (3.8) v rozmezí 300–400 nm. Extinkční maximum musí ležet mezi 325 a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

$$\text{m. j. vitamínu A / ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^1 \text{ pro vitamín A acetát} = 1\,530 \text{ při } 326 \text{ nm v 2-propanolu}).$$

5.6.3.2 *Zásobní roztok vitamínu A (palmitát)*

Do 50 ml odměrné baňky (4.2.2) se odpipetují 2,0 ml zásobního roztoku vitamínu A (palmitát) (3.12.1) a doplní se po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace vitamínu A v tomto roztoku je 56 m. j./ml. Do 25 ml odměrné baňky se odpipetuje 3,0 ml tohoto zředěného roztoku vitamínu A (palmitát) a doplní se po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace vitamínu A v tomto roztoku je 6,72 m. j./ml. Na spektrofotometru (4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (3.8) v rozmezí 300–400 nm. Extinkční maximum musí ležet mezi 325 a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

$$\text{m. j. vitamínu A / ml} = E_{326} \times 19,0$$

$$(E_{1\text{ cm}}^1 \text{ pro vitamín A palmitát} = 957 \text{ při } 326 \text{ nm v 2-propanolu}).$$

5.6.3.3 *Pracovní standardní roztok vitamínu A*

Do 50 ml odměrné baňky (4.2.2) se odpipetují 3,0 ml **nezředěného** pracovního standardního roztoku vitamínu A připraveného podle bodu 5.6.1 a doplní se po značku 2-propanolem (3.8). Do 25 ml odměrné baňky se odpipetuje 5,0 ml tohoto roztoku a doplní se po značku 2-propanolem (3.8). Nominální koncentrace vitamínu A v tomto roztoku je 6,72 m. j./ml. Na spektrofotometru (4.6) se proměří UV spektrum tohoto roztoku proti 2-propanolu (3.8) v rozmezí 300–400 nm. Extinkční maximum musí ležet mezi 325 a 327 nm.

Výpočet obsahu vitamínu A:

$$m. j. \text{ vitamínu A / ml} = E_{325} \times 18,3$$

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

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Koncentrace vitamínu A v extraktu vzorku v m. j./ml se stanoví porovnáním s kalibrační křivkou podle průměrných hodnot výšek (ploch) píků (5.6.2).

Obsah vitamínu A (w) v m. j./kg ve vzorku se vypočte podle následujícího vzorce:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ (m. j./kg)}$$

kde:

c = koncentrace vitamínu A v extraktu vzorku (5.4) v m. j./ml

V_1 = objem extraktu vzorku (5.4) v ml

V_2 = objem alikvotní části podle bodu 5.4 v ml

m = hmotnost zkušební vzorku v gramech.

7. Poznámky

- 7.1 U vzorků s nízkou koncentrací vitamínu A může být užitečné spojit extrakty petroletheru ze dvou saponifikovaných vzorků (navážka: 25 g) do jednoho roztoku vzorku pro stanovení HPLC.
- 7.2 Navážka vzorku pro zkoušku nesmí obsahovat více než 2 g tuku.
- 7.3 Pokud nedojde k rozdělení fází, přidá se asi 10 ml ethanolu (3.1), aby se odstranila emulze.
- 7.4 U oleje z tresčích jater a ostatních čistých tuků se doba saponifikace prodlouží na 45–60 minut.
- 7.5 Místo BHT je možno použít hydrochinon.
- 7.6 Pro separaci izomerů retinolu je možné použít kolonu s normální fází. V tomto případě je však nutné sečíst pro výpočet výšky (plochy) píků všech *cis* a *trans* izomerů.
- 7.7 Místo roztoku askorbátu sodného lze použít asi 150 mg kyseliny askorbové.
- 7.8 Místo roztoku sulfidu sodného lze použít asi 50 mg EDTA.
- 7.9 V případě zkoušky na obsah vitamínu A v mléčných krmných směsích je třeba věnovat zvláštní pozornost:
 - při saponifikaci (5.2): v závislosti na množství tuku ve vzorku může být nutné zvýšit množství roztoku hydroxidu draselného (3.4),
 - při extrakci (5.3): v důsledku přítomnosti emulzí může být nutné upravit poměr 2 : 1 vody a ethanolu.

Pro kontrolu toho, zda použitá metoda zkoušení poskytuje spolehlivé výsledky, pokud jde o tuto specifickou matici (mléčné krmné směsi), se provede zkouška na výtěžnost u dodatečně navážky vzorku. Pokud je výtěžnost nižší než 80 %, výsledek zkoušky je třeba korigovat na výtěžnost.

8. Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku nesmí překročit 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku.

9. **Výsledky kruhových testů⁽¹⁾**

	Premix	Premix krmiva	Minerální koncentrát	Proteinové krmivo	Krmivo pro selata
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
průměr (m. j./kg)	$17,02 \times 10^6$	$1,21 \times 10^6$	537 100	151 800	18 070
s_r (m. j./kg)	$0,51 \times 10^6$	$0,039 \times 10^6$	22 080	12 280	682
r (m. j./kg)	$1,43 \times 10^6$	$0,109 \times 10^6$	61 824	34 384	1 910
CV_r (%)	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
s_R (m. j./kg)	$1,36 \times 10^6$	$0,069 \times 10^6$	46 300	23 060	3 614
R (m. j./kg)	$3,81 \times 10^6$	$0,193 \times 10^6$	129 640	64 568	10 119
CV_R (%)	8,0	6,2	8,6	15	20

- L = počet laboratoří
 n = počet jednotlivých hodnot
 s_r = standardní odchylka opakovatelnosti
 s_R = standardní odchylka reprodukovatelnosti
 r = opakovatelnost
 R = reprodukovatelnost
 CV_r = variační koeficient opakovatelnosti
 CV_R = variační koeficient reprodukovatelnosti

(¹) Provedla pracovní skupina pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

Obrázek 1: Extrakční zařízení (4.8)

