

PŘÍLOHA V

METODY ZKOUŠENÍ PRO KONTROLU NEŽÁDOUCÍCH LÁTEK V KRMIVECH

A. STANOVENÍ VOLNÉHO A CELKOVÉHO GOSSYPOLU

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu volného a celkového gossypolu a chemicky příbuzných látek v bavlníkových semenech, bavlníkové mouce a bavlníkových pokrutinách a v krmných směsích, které obsahují krmné suroviny, v nichž je obsažen volný a celkový gossypol a chemicky příbuzné látky v koncentraci nad 20 mg/kg.

2. Princip

Gossypol se extrahuje buď za přítomnosti aminopropanolu (3-aminopropan-1-ol) směsí 2-propanolu a hexanu při stanovení volného gossypolu, nebo dimethylformamidem při stanovení celkového gossypolu. Gossypol je reakcí s anilinem převeden na gossypol-dianilin a absorpance roztoku je měřena při 440 nm.

3. Chemikálie

- 3.1 Směs 2-propanolu a hexanu: směs 2-propanolu a *n*-hexanu v poměru 60 + 40.
- 3.2 Rozpouštědlo A: do 1 000 ml odměrné baňky se nalije asi 500 ml směsi 2-propanolu a hexanu (3.1), 2 ml aminopropanolu, 8 ml ledové kyseliny octové a 50 ml vody. Doplní se po značku směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) a promíchá. Rozpouštědlo je stále jeden týden.
- 3.3 Rozpouštědlo B: do 100 ml odměrné baňky se napipetují 2 ml aminopropanolu a 10 ml ledové kyseliny octové. Vychladí se na laboratorní teplotu a doplní se po značku N, N-dimethylformamidem. Rozpouštědlo je stále jeden týden.
- 3.4 Anilin: pokud absorpance anilinu (slepá zkouška) přesáhne 0,022, musí se anilin destilovat přes zinkový prach, přičemž prvních a posledních 10 % frakcí destilátu se odstraní. Při skladování v chladničce v tmavé zábrusové láhvi vydrží tato chemikálie několik měsíců.
- 3.5 Standardní roztok gossypolu A: do 250 ml odměrné baňky se naváží 27,9 mg octanu gossypolu. Rozpustí se a doplní po značku rozpouštědlem A (3.2). Do 250 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml tohoto roztoku a doplní se rozpouštědlem A po značku. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,02 mg gossypolu. Před použitím se nechá hodinu stát při laboratorní teplotě.
- 3.6 Standardní roztok gossypolu B: do 50 ml odměrné baňky se naváží 27,9 mg octanu gossypolu, rozpustí se a doplní po značku rozpouštědlem B (3.3). 1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,5 mg gossypolu.

Standardní roztoky gossypolu A a B jsou stále 24 hodin, pokud jsou chráněny před světlem.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Míchací zařízení: přibližně 35 ot./min.
- 4.2 Spektrofotometr.

5. Postup

5.1 Zkoušený vzorek

Množství zkoušeného vzorku závisí na předpokládaném obsahu gossypolu ve vzorku. Je vhodnější pracovat s malým množstvím zkoušeného vzorku a relativně velkou alikvotní částí filtrátu, aby obsah gossypolu byl dostatečný pro přesné spektrofotometrické měření. Pro stanovení volného gossypolu v bavlníku, bavlníkové mouce a bavlníkových pokrutinách navážka vzorku nepřesáhne 1 g; v krmných směsích může být 5 g. Ve většině případů je vhodný alikvotní podíl filtrátu 10 ml; obsahuje 50–100 µg gossypolu. Pro stanovení celkového gossypolu je navážka 0,5–5 g, tedy 2 ml alikvotní části filtrátu budou obsahovat 40–200 µg gossypolu.

Stanovení se provádí při laboratorní teplotě asi 20 °C.

5.2 Stanovení volného gossypolu

Do širokohrdlé 250 ml baňky, na jejíž dno bylo přidáno drcené sklo, se naváží zkušební vzorek. Do baňky se odpipetuje 50 ml rozpouštědla A (3.2), baňka se uzavře a mixuje po dobu jedné hodiny v míchacím zařízení. Pak se obsah baňky filtruje suchým filtrem do malé širokohrdlé baňky. Během filtrace se filtrační nálevka přikryje hodinovým krycím sklem.

Do dvou 25 ml odměrných baněk (označí se A a B) se odpipetuje stejná alikvotní část filtrátu obsahující 50–100 µg gossypolu. Pokud je třeba, doplní se rozpouštědlem A (3.2) na objem 10 ml. Roztok v baňce A se pak doplní po značku směsí 2-propanolu a hexanu (3.1). Tento roztok se použije jako referenční roztok, proti kterému se měří roztok vzorku.

Do dalších dvou 25 ml odměrných baněk (označí se C a D) se odpipetuje 10 ml rozpouštědla A (3.2). Baňka C se doplní po značku směsí 2-propanolu a hexanu (3.1). Tento roztok se použije jako referenční roztok, proti kterému se měří roztok slepé zkoušky.

Do odměrných baněk B a D se odpipetuje po 2 ml anilinu (3.4). Baňky se zahřívají po dobu 30 minut na vroucí vodní lázni, aby došlo k vybarvení roztoků. Potom se ochladí na laboratorní teplotu, doplní směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) po značku a homogenizují. Nechají se asi jednu hodinu stát.

Na spektrofotometru se měří absorbance roztoku slepé zkoušky (D) proti referenčnímu roztoku (C) a absorbance roztoku vzorku (B) proti referenčnímu roztoku (A) v květách optické délky 10 mm při vlnové délce 440 nm.

Od absorbance vzorku se odečte absorbance slepé zkoušky a rozdíl absorbancí (korigovaná absorbance) je základem výpočtu obsahu volného gossypolu podle odstavce 6.

5.3 Stanovení celkového gossypolu

Do 50 ml odměrné baňky se naváží zkoušený vzorek, který obsahuje 1–5 mg gossypolu a přidá se 10 ml rozpouštědla B (3.3). Do další 50 ml odměrné baňky se přidá přesně 10 ml rozpouštědla B (3.3) pro slepou zkoušku. Obě baňky se zahřívají na vroucí vodní lázni po dobu 30 minut. Potom se ochladí na laboratorní teplotu a obě baňky se doplní po značku směsí 2-propanolu a hexanu (3.1). Homogenizují se a nechají 10–15 minut usadit, poté se obsah filtruje do širokohrdlých baněk.

Do obou 25 ml odměrných baněk se z filtrátu vzorku odpipetuje po 2 ml a z filtrátu slepé zkoušky do obou 25 ml odměrných baněk rovněž po 2 ml. Jedna baňka se vzorkem a jedna se slepou zkouškou se doplní směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) po značku. Tyto roztoky se použijí jako referenční roztoky.

Do druhých dvou baněk se přidají 2 ml anilinu (3.4). Baňky se zahřívají po dobu 30 minut na vroucí vodní lázni, aby došlo k vybarvení roztoků. Potom se ochladí na laboratorní teplotu, doplní směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) po značku a homogenizují. Nechají se jednu hodinu stát.

Absorbance se stanoví podle bodu 5.2 pro volný gossypol. Z těchto hodnot se vypočítá obsah celkového gossypolu podle odstavce 6.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Výsledky mohou být vypočítány ze specifických absorbančních koeficientů (6.1) nebo podle kalibrační křivky (6.2).

6.1 Ze specifických absorbančních koeficientů

Specifické absorbanční koeficienty jsou na základě uvedených podmínek tyto:

$$\text{Volný gossypol: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 625$$

$$\text{Celkový gossypol: } E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 600$$

Obsah volného nebo celkového gossypolu ve vzorku se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ gossypolu} : \frac{E \times 1\,250}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times p \times a}$$

kde:

E = korigovaná absorbance stanovená podle 5.2

p = navážka zkušební vzorku v g

a = alikvotní podíl filtrátu v ml.

6.2 Z kalibrační křivky

6.2.1 Volný gossypol

Připraví se 2 sady pěti 25 ml odměrných baněk. Do každé sady baněk se odpipetuje 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu A (3.5). Doplní se na 10 ml rozpouštědlem A (3.2). Každá sada se doplní o 25 ml odměrnou baňku obsahující pouze 10 ml rozpouštědla A (3.2) (slepá zkouška).

Obsah baněk první sady (včetně baňky pro slepou zkoušku) se doplní na 25 ml směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) (referenční sada).

Do každé baňky druhé sady (včetně baňky pro slepou zkoušku) se přidají 2 ml anilinu (3.4). Baňky se zahřívají po dobu 30 minut na vroucí vodní lázni, aby došlo k vybarvení roztoků. Potom se ochladí na laboratorní teplotu, doplní směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) po značku a homogenizují. Nechají se asi jednu hodinu stát (standardní sada).

Absorbance roztoků standardní sady se stanoví podle bodu 5.2 porovnáním s odpovídajícími roztoky v referenční sadě. Kalibrační křivka se vytvoří vnesením hodnot absorbancí proti odpovídajícím množstvím gossypolu (v µg).

6.2.2 Celkový gossypol

Připraví se šest 50 ml odměrných baněk. Do první baňky se napipetuje 10 ml rozpouštědla B (3.3) a do ostatních 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu B (3.6). Obsah každé baňky se doplní na 10 ml rozpouštědlem B (3.3). Baňky se zahřívají na vroucí vodní lázni po dobu 30 minut. Potom se ochladí na laboratorní teplotu, doplní směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) po značku a homogenizují.

2,0 ml těchto roztoků se přenesou do každé ze dvou sad šesti 25 ml odměrných baněk. Baňky první sady se doplní směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) na 25 ml (referenční sada).

Do každé baňky druhé sady se přidají 2 ml anilinu (3.4). Baňky se zahřívají na vroucí vodní lázni po dobu 30 minut. Potom se ochladí na laboratorní teplotu, doplní se směsí 2-propanolu a hexanu (3.1) po značku a homogenizují. Nechají se asi jednu hodinu stát (standardní sada).

Absorbance roztoků standardní sady se stanoví podle bodu 5.2 porovnáním s odpovídajícími roztoky v referenční sadě. Kalibrační křivka se vytvoří vnesením hodnot absorbancí proti odpovídajícím množstvím gossypolu (v µg).

6.3 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku nesmí překročit:

- 15 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu gossypolu nižšího než 500 ppm,
- 75 ppm absol. u obsahu od 500 ppm do 750 ppm,
- 10 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu nad 750 ppm.