

- 35 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkových aminokyselin v případě valinu a serinu,
- 40 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny histidinu,
- 50 % vzhledem k vyšší hodnotě u celkové aminokyseliny cyst(e)inu.

F. STANOVENÍ OBSAHU TRYPTOFANU

Metody analýzy, které se mají použít pro stanovení obsahu tryptofanu, jsou:

- EN ISO 13904 Krmiva – Stanovení obsahu tryptofanu,
- metoda analýzy popsaná v bodech 1 až 9 níže.

1. Účel a oblast použití

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. Činidla

- 3.1. Musí být použita dvakrát destilovaná voda nebo voda obdobné jakosti (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)₂·8H₂O nesmí být nadměrně vystavován vzduchu, aby nedocházelo ke vzniku BaCO₃, který by mohl narušovat stanovení) (viz poznámka v bodě 9.3).
- 3.5. Hydroxid sodný.
- 3.6. Kyselina fosforečná, w (w/w) = 85 %.
- 3.7. Kyselina chlorovodíková, ρ₂₀ = 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 (bod 3.5) se rozpustí ve vodě a vodou (bod 3.1) se doplní na 1 litr.
- 3.11. Kyselina chlorovodíková, c = 6 mol/l:
492 ml HCl (bod 3.7) se doplní vodou na 1 litr.
- 3.12. Kyselina chlorovodíková, c = 1 mol/l:
82 ml HCl (bod 3.7) se doplní vodou na 1 litr.

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

4. **Přístroje**

- 4.1. Zařízení pro HPLC se spektrofluorometrickým detektorem.
- 4.2. Kolona pro kapalinovou chromatografii, 125 mm \times 4 mm, C_{18} , náplň 3 μm , nebo obdobná.
- 4.3. pH metr.
- 4.4. Polypropylenová baňka s širokým hrdlem a šroubovacím uzávěrem o objemu 125 ml.
- 4.5. Membránový filtr, 0,45 μm .
- 4.6. Autokláv, 110 (\pm 2) $^\circ\text{C}$, 1,4 (\pm 0,1) bar.
- 4.7. Mechanická třepačka nebo magnetická míchačka.
- 4.8. Ponorný mixér.

5. Postup

5.1. Příprava vzorků

Vzorek se rozemele tak, aby prošel sítím s oky o velikosti 0,5 mm. Vzorky s vysokou vlhkostí se musí před mletím vysušit buď na vzduchu při teplotě nepřesahující 50 °C, nebo mrazovým sušením. Vzorky s vysokým obsahem tuku se před mletím extrahují petroletherem (bod 3.9).

5.2. Stanovení volného tryptofanu (extrakt)

Vhodné množství (1–5 g) připraveného vzorku (bod 5.1) se naváží s přesností na 1 mg do kónické baňky. Přidá se 100,0 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.13) a 5,00 ml koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (bod 3.16). Směs se třepe nebo míchá 60 minut na mechanické třepačce nebo magnetické míchačce (bod 4.7). Sediment se nechá usadit a odpipetuje se 10,0 ml supernatantu do kádinky. Přidá se 5 ml kyseliny fosforečné (bod 3.14). pH se upraví na 3 roztokem hydroxidu sodného (bod 3.10). Přidá se tolik methanolu (bod 3.8), aby jeho koncentrace v konečném objemu 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 má kalibrační standardní roztok (bod 3.17)).

Před nástřikem na kolonu HPLC se přefiltruje několik ml roztoku přes 0,45µm membránový filtr (bod 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 analýzu extraktů tentýž den, extrakty lze skladovat při 5 °C nejdéle tři dny.

5.3. Stanovení celkového tryptofanu (hydrolyzát)

Do polypropylenové baňky (4.4) se naváží 0,1–1 g připraveného vzorku (bod 5.1) s přesností na 0,2 mg. Navážka vzorku musí mít obsah dusíku přibližně 10 mg. Přidá se 8,4 g oktahydrátu hydroxidu barnatého (bod 3.4) a 10 ml vody. Promíchá se ponorným mixérem (bod 4.8) nebo na magnetické míchačce (bod 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 do autoklávu (bod 4.6) s vroucí vodou a nechá se působit pára po dobu 30–60 minut. Potom se autokláv uzavře a směs se autoklávuje 20 hodin při teplotě 110 (± 2) °C.

Před otevřením autoklávu se sníží teplota těsně pod 100 °C. Aby se zabránilo krystalizaci Ba(OH)₂·8H₂O, 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) (bod 3.16). Nádoba se vychladí 15 minut ve vodní lázni s ledem.

Dále se přidá 5 ml kyseliny fosforečné (bod 3.14). Nádoba se ponechá v ledové lázni a za stálého míchání se neutralizuje roztokem kyseliny chlorovodíkové (bod 3.11) a potom se pH upraví na 3,0 roztokem kyseliny chlorovodíkové (bod 3.12). Přidá se tolik methanolu, aby jeho 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 0,45µm membránový filtr (bod 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 analýzu hydrolyzátů tentýž den, hydrolyzáty lze skladovat při 5 °C nejdéle tři dny.

5.4. Stanovení HPLC

Následující podmínky izokratické eluce jsou doporučeny; lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky (viz také poznámky v bodě 9.1 a 9.2):

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.2):	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , náplň 3 μm, nebo obdobná
Teplota kolony:	laboratorní teplota
Mobilní fáze (bod 3.22):	3,00 g kyseliny octové (bod 3.18) + 900 ml vody (bod 3.1) + 50,0 ml roztoku (bod 3.21) 1,1,1-trichlor-2- methyl-2-propanolu (bod 3.19) v methanolu (bod 3.8) (1 g/100 ml). pH se upraví na 5,00 ethanolinem (bod 3.20). Objem se doplní na 1 000 ml vodou (bod 3.1)
Průtok:	1 ml/min
Celková doba zkoušky:	přibližně 34 minut
Detekční vlnová délka:	excitace: 280 nm, emise: 356 nm.
Objem nástřiku:	20 μl

6. Výpočet výsledků

Vypočte se obsah tryptofanu (X) v g na 100 g vzorku.

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

- A = plocha píku vnitřního standardu v kalibračním standardním roztoku (bod 3.17)
- B = plocha píku tryptofanu v extraktu (bod 5.2) nebo hydrolyzátu (bod 5.3)
- V₁ = objem (v ml) (2 ml) koncentrovaného roztoku tryptofanu (bod 3.15) přidaného do kalibračního roztoku (bod 3.17)
- c = koncentrace (v μmol/ml) (= 2,50) tryptofanu v koncentrovaném roztoku tryptofanu (bod 3.15) přidaném do kalibračního roztoku (bod 3.17)
- V₂ = objem (v ml) (= 2,00 ml) koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (bod 3.16) přidaného při extrakci (bod 5.2) (= 5,00 ml) nebo do hydrolyzátu (bod 5.3)
- C = plocha píku vnitřního standardu v extraktu (bod 5.2) nebo hydrolyzátu (bod 5.3)
- D = plocha píku tryptofanu v kalibračním standardním roztoku (bod 3.17)
- V₃ = objem (v ml) (= 2,00 ml) koncentrovaného roztoku vnitřního standardu (bod 3.16) přidaného do kalibračního standardního roztoku (bod 3.17)
- M = hmotnost 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 u téhož vzorku nesmí překročit 10 % relat. z hodnoty nejvyššího výsledku.

8. Výsledky kolaborativní studie

Za účelem certifikace metody pro hydrolyzu byla provedena v EU kolaborativní studie (4. srovnání), během níž byly analyzovány tři vzorky v až 12 laboratořích. U každého vzorku bylo provedeno pět opakovaných analýz. Výsledky jsou uvedeny v této tabulce:

	Vzorek 1 Krmivo pro prasata	Vzorek 2 Krmivo pro prasata s přidaným L-tryptofanem	Vzorek 3 Krmivový koncentrát pro prasata
L	12	12	12
n	50	55	50
Průměr [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 = počet laboratoří, které poskytly výsledky

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

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 %

Za účelem certifikace metody pro extrakci volného tryptofanu byla provedena v EU další kolaborativní studie (3. srovnání), během níž byly analyzovány dva vzorky v až 13 laboratořích. U každého vzorku bylo provedeno pět opakovaných analýz. Výsledky jsou uvedeny v této 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 odlehlých hodnot)
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 %

Za účelem certifikace metody pro hydrolyzu tryptofanu byla provedena v EU další srovnávací studie, během níž byly analyzovány čtyři vzorky v až 7 laboratořích. Výsledky jsou uvedeny níže. U každého vzorku bylo provedeno pět opakovaných analýz.

	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 odlehlých hodnot)
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. Lepší separace tryptofanu a α -methyl-tryptofanu lze dosáhnout za níže uvedených zvláštních podmínek pro chromatografii.

Po izokratické eluci následuje gradientové čištění kolony:

Kolona pro kapalinovou chromatografii:	125 mm × 4 mm, C ₁₈ , náplň 5 μm, nebo obdobná
Teplota kolony:	32 °C
Mobilní fáze:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ /methanol, 95 + 5 (V+V). B: methanol
Gradientový program:	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:	přibližně 33 minut

- 9.2. Chromatografie se může měnit podle typu HPLC a náplně kolony. Zvolený systém musí být schopen separovat tryptofan a vnitřní standard až na základní „baseline“. Navíc je důležité, aby byly od tryptofanu a vnitřního standardu dobře separovány degradační produkty. Pro kontrolu základní „baseline“ na úrovni vnitřního standardu pro nečistoty se provede zkouška hydrolyzátu bez přidaného vnitřního standardu. Je důležité, aby doba zkoušky byla dostatečná pro dokonalou eluci všech degradačních produktů, jinak může docházet v následujících chromatografiích k interferencím vlivem píků pozdní eluce.

Chromatografický systém musí v rozsahu měření poskytovat lineární odezvu. Lineární odezva se měří s konstantní (běžnou) koncentrací vnitřního standardu a různými koncentracemi tryptofanu. Je důležité, aby velikost píků tryptofanu i vnitřního standardu byla v lineárním rozsahu HPLC/fluorescenčního systému. Pokud je (jsou) pík(y) tryptofanu a/nebo vnitřního standardu příliš velký (velké) nebo příliš malý (malé), analýza se zopakuje s jinou velikostí 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.

G. STANOVENÍ OBSAHU HRUBÝCH OLEJŮ A TUKŮ

1. Účel a oblast použití

Touto metodou se stanoví obsah hrubých olejů a tuků v krmivech.

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

Pro stanovení obsahu hrubých olejů a tuků v olejnatých semenech a plodech, jakož i v krmivech, v nichž je obsah hrubých olejů/tuků vyšší než 15 %, se extrakce provádí postupem A a opětovná extrakce postupem B (bod 5.3).

- 1.1. Postup A – přímo extrahovatelné hrubé oleje a tuky

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