

PŘÍLOHA IV

„PŘÍLOHA IV

METODY ANALÝZY PRO KONTROLU OBSAHU POVOLENÝCH DOPLŇKOVÝCH LÁTEK
V KRMIVECH

A) STANOVENÍ OBSAHU VITAMINU A

Obsah vitamínu A se stanoví takto:

- metodou analýzy stanovenou v normě EN 17547 Krmiva: Metody vzorkování a analýz – Stanovení obsahu vitamínu A, E a D ⁽¹⁾ – Metoda využívající extrakci a přečištění na pevné fázi (SPE) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC) nebo
- vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) s UV nebo fluorescenční detekcí, jak je popsáno v bodech 1 až 9 níže.

1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu vitamínu A (retinolu) v krmivech. Vitamin A zahrnuje all-*trans*-retinyl-alkohol a jeho *cis*-izomery, které se stanoví touto metodou. Obsah vitamínu A se vyjadřuje v mezinárodních jednotkách (IU) na kilogram. Jedna IU odpovídá aktivitě 0,300 µg all-*trans*-vitamin-A-alkoholu nebo 0,344 µg all-*trans*-vitamin-A-acetátu nebo 0,550 µg all-*trans*-vitamin-A-palmitátu.

Mez stanovitelnosti je 2 000 IU 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*-vitamin-A-alkoholu a jeho *cis*-izomerů.

3. Činidla

- 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 v bodě 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 v bodě 7.8)
- 3.7. Roztok fenolftaleinu, $c = 2 \text{ g}/100 \text{ ml}$ v ethanolu (bod 3.1)
- 3.8. 2-Propanol
- 3.9. Mobilní fáze pro HPLC: směs methanolu (bod 3.3) a vody, např. 980 + 20 (v + v). Přesný poměr bude určen podle charakteristiky použité kolony.
- 3.10. Dusík, prostý kyslíku

⁽¹⁾ Metoda analýzy stanovená v normě EN 17547 se označuje jako alternativní metoda, která se má použít pro účely úřední kontroly pro stanovení obsahu vitamínu A a E namísto metody popsané pro stanovení obsahu vitamínu A v části A této přílohy a pro stanovení obsahu vitamínu E v části B této přílohy.

- 3.1.1. All-*trans*-vitamin-A-acetát, extra čistý, s ověřenou aktivitou, např. $2,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.1.1.1. Zásobní roztok all-*trans*-vitamin-A-acetátu: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 50 mg vitamin-A-acetátu (bod 3.1.1). Rozpusť se v 2-propanolu (bod 3.8) a doplň se jím po značku. Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 1 400 IU/ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.1.
- 3.1.2. All-*trans*-vitamin-A-palmitát, extra čistý, s ověřenou aktivitou, např. $1,80 \times 10^6$ IU/g
- 3.1.2.1. Zásobní roztok all-*trans*-vitamin-A-palmitát: do 100 ml odměrné baňky se s přesností na 0,1 mg naváží 80 mg vitamin-A-palmitátu (bod 3.1.2). Rozpusť se v 2-propanolu (bod 3.8) a doplň se jím po značku. Nominální koncentrace vitaminu A v roztoku je 1 400 IU/ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.2.
- 3.1.3. 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT) (viz poznámky 7.5)
4. **Přístroje**
- 4.1. Vakuová rotační odparka
- 4.2. Nádobí z tmavého skla
- 4.2.1. Baňky s plochým dnem nebo kónické baňky, 500 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem
- 4.2.2. Odměrné baňky s úzkým hrdlem a skleněnou zábrusovou zátkou, objem 10, 25, 100 a 500 ml
- 4.2.3. Dělicí nálevky, kónické, 1 000 ml, se skleněnou zábrusovou zátkou
- 4.2.4. Hruškovité baňky, 250 ml, se skleněným zábrusovým hrdlem
- 4.3. Allihnův chladič, délka pláště 300 mm, se skleněným zábrusem a s adaptérem na zavádění plynu
- 4.4. Skládaný filtrační papír pro separaci 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 (kritérium účinnosti: 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 magnetickou míchačkou
- 4.8. Extrakční zařízení (viz obrázek 1) sestávající z/ze:
- 4.8.1. Skleněného válce o objemu 1 litr opatřeného skleněným zábrusovým hrdlem a zátkou
- 4.8.2. Vkladatelného zařízení se skleněným zábrusem, s postranním raménkem a nastavitelnou trubičkou, která prochází středem. Nastavitelná trubička má spodní konec vytvarovaný do tvaru U a zúženou výpust na opačné straně tak, aby bylo možné převést horní vrstvu kapaliny z válce do dělicí nálevky.

5. Postup

Poznámka: Vitamin A je citlivý na (UV) světlo a oxidaci. Všechny úkony se provádí bez přístupu světla (používá se nádobí z tmavého skla nebo se skleněné nádoby 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 rozemele tak, aby prošel sítím s oky o velikosti 1 mm a aby během přípravy nedošlo k jeho zahřátí. Mletí musí být provedeno bezprostředně před vážením a saponifikací, jinak může dojít ke ztrátám vitamínu A. Pokud je rozdělení velikosti částic přiměřené (např. premixy a doplňkové látky), vzorek (vzorky) se nemele (nemelou).

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 (bod 4.2.1). V případě nízkých koncentrací lze hmotnost vzorku zvýšit, aby byl v navážce vzorku dostatek částic. Za intenzivního míchání se přidá 130 ml ethanolu (bod 3.1), přibližně 100 mg BHT (bod 3.13), 2 ml roztoku askorbátu sodného (bod 3.5) a 2 ml roztoku sulfidu sodného (bod 3.6). Baňka se připojí k chladiči (bod 4.3) a ponoří se do vodní lázně s magnetickou míchačkou (bod 4.7). Zahřeje se k varu a vaří se pod refluxem 5 minut. Potom se přes chladič (bod 4.3) přidá 25 ml roztoku hydroxidu draselného (bod 3.4) a vaří se pod refluxem za míchání pod pomalým proudem dusíku dalších 25 minut. Potom se chladič opláchne přibližně 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 (bod 4.2.3) nebo do extrakčního zařízení (bod 4.8). Saponifikační baňka se postupně opláchne 25 ml ethanolu (bod 3.1) a 100 ml petroletheru (bod 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 dvě minuty intenzivně třepe a potom se nechá dvě minuty stát.

5.3.1. Extrakce v dělicí nálevce (bod 4.2.3)

Po separaci vrstev (viz poznámka v bodě 7.3) se petroletherová vrstva převede do další dělicí nálevky (bod 4.2.3). Extrakce se opakuje dvakrát se 100 ml petroletheru (bod 3.2) a dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 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 fenoltaleinu (bod 3.7) bezbarvá (obvykle stačí čtyři promytí). Promytý extrakt se přefiltruje do 500 ml odměrné baňky (bod 4.2.2) přes suchý skládaný filtr pro separaci fází (bod 4.4), aby se odstranila suspendovaná voda. Dělicí nálevka a filtr se opláchne 50 ml petroletheru (bod 3.2). Baňka se petroletherem (bod 3.2) doplní po značku a důkladně promíchá.

5.3.2. Extrakce v extrakčním zařízení (bod 4.8)

Po separaci vrstev (viz poznámka 7.3) se ze skleněného válce (bod 4.8.1) odstraní zátka a místo ní se vloží vkladatelé zařízení se skleněným zábrusem (bod 4.8.2). Spodní strana nastavitelné U-trubičky 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 (bod 4.2.3). Přidá se 100 ml petroletheru (bod 3.2), skleněný válec se zazátkuje a důkladně protřepe. Po separaci vrstev se horní vrstva opět převede stejným způsobem do dělicí nálevky. Extrakce se opakuje s dalšími 100 ml petroletheru (bod 3.2) a pak ještě dvakrát s 50 ml petroletheru (bod 3.2). Horní petroletherová vrstva se vždy 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 popisu v uvedeném bodě.

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 (bod 4.2.4). Rozpouštědlo se na rotační odparce (bod 4.1) odpaří za sníženého tlaku při teplotě vodní lázně nepřekračující 40 °C téměř do sucha. Atmosférický tlak se obnoví zavedením dusíku (bod 3.10) do baňky a ta se odpojí od rotační odparky. Zbytek rozpouštědla se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.10) a odparek se ihned rozpustí ve známém objemu (10–100 ml) methanolu (bod 3.3) (výsledná koncentrace vitamínu A musí být v rozsahu 5–30 IU/ml).

5.5. Stanovení pomocí HPLC

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

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

Podmínky HPLC

Následující podmínky jsou doporučeny; lze použít i jiné podmínky, pokud zajišťují rovnocenné výsledky.

Kolona pro kapalinovou chromatografii (bod 4.5.1):	250 mm × 4 mm, C ₁₈ , náplň 5 nebo 10 µm, nebo obdobná
Mobilní fáze (bod 3.9):	směs methanolu (bod 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 (bod 4.2.1) se odpipetuje 20 ml zásobního roztoku vitamin-A-acetátu (bod 3.11.1) nebo 20 ml zásobního roztoku vitamin-A-palmitátu (bod 3.12.1) a hydrolyzuje se podle bodu 5.2, ale bez přidání BHT. Potom se provede extrakce petroletherem (bod 3.2) podle bodu 5.3 a doplní se na 500 ml petroletherem (bod 3.2). 100 ml tohoto extraktu se odpaří na rotační odparce téměř do sucha (viz 5.4), zbylé rozpouštědlo se odpaří pod proudem dusíku (bod 3.10) a odparek se rozpustí v 10,0 ml methanolu (bod 3.3). Nominální koncentrace vitamínu A v roztoku je 560 IU/ml. Přesný obsah se stanoví podle bodu 5.6.3.3. Pracovní standardní roztok se připravuje před použitím čerstvý.

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

5.6.2. Příprava kalibračních roztoků a kalibrační křivky

Do sady 20 ml odměrných baněk se odpipetuje postupně 1,0/2,0/5,0 a 10,0 ml zředěného pracovního standardního roztoku, doplní se methanolem (bod 3.3) po značku a promíchá. Nominální koncentrace vitamínu A v těchto roztocích jsou 2,8/5,6/14,0 a 28,0 IU/ml.

Provede se opakovaný nástřik 20 µl každého kalibračního roztoku a stanoví se průměrná hodnota výšek (ploch) píků. Z průměrných hodnot výšek (ploch) píků se sestrojí kalibrační křivka, přičemž se použijí výsledky UV kontroly (bod 5.6.3.3).

5.6.3. UV standardizace standardních roztoků

5.6.3.1. Zásobní roztok vitamin-A-acetátu

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

Výpočet obsahu vitaminu A:

$$\text{IU vitaminu A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

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

5.6.3.2. Zásobní roztok vitamin-A-palmitátu

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

Výpočet obsahu vitaminu A:

$$\text{IU vitaminu A/ml} = E_{326} \times 19,0$$

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

5.6.3.3. Pracovní standardní roztok vitaminu A

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

Výpočet obsahu vitaminu A:

$$\text{IU vitaminu A/ml} = E_{325} \times 18,30$$

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

6. Výpočet výsledků

Koncentrace vitaminu A v roztoku vzorku v IU/ml se stanoví porovnáním s kalibrační křivkou (bod 5.6.2) podle průměrných hodnot výšek (ploch) píků.

Obsah vitaminu A (w) v IU/kg vzorku se vypočte podle tohoto vzorce:

$$w = \frac{500 \times c \times V_2 \times 1\,000}{V_1 \times m} \text{ [IU/kg]}$$

kde:

c = koncentrace vitaminu A v roztoku vzorku (bod 5.4) v IU/ml

V₁ = objem roztoku vzorku (bod 5.4) v ml

V_2 = objem alikvotní části podle bodu 5.4 v ml

m = hmotnost navážky vzorku v g

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. Hmotnost vzorku pro analýzu nesmí obsahovat více než 2 g tuku.
- 7.3. Pokud nedojde k separaci fází, přidá se přibližně 10 ml ethanolu (bod 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 lze použít hydrochinon.
- 7.6. Pro separaci izomerů retinolu je možné použít běžnou fázovou kolonu. V tomto případě je však pro výpočet nutné sečíst výšky (plochy) píků všech *cis*- a *trans*-izomerů.
- 7.7. Místo roztoku askorbátu sodného lze použít přibližně 150 mg kyseliny askorbové.
- 7.8. Místo roztoku sulfidu sodného lze použít přibližně 50 mg EDTA.
- 7.9. V případě analýzy na obsah vitamínu A v mléčných krmných směsích je třeba věnovat zvláštní pozornost:
- při saponifikaci (bod 5.2): v závislosti na množství tuku ve vzorku může být nutné zvýšit množství roztoku hydroxidu draselného (bod 3.4),
 - při extrakci (bod 5.3): v důsledku přítomnosti emulzí může být nutné upravit poměr vody a ethanolu 2:1.
- Pro kontrolu toho, zda použitá metoda analýzy poskytuje spolehlivé výsledky, pokud jde o tuto specifickou matici (mléčné krmné směsi), se provede zkouška na výtěžnost u dodatečné navážky vzorku. Pokud je výtěžnost nižší než 80 %, výsledek analýzy je třeba korigovat na výtěžnost.

8. Opakovatelnost

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

9. Výsledky kolaborativní studie ⁽²⁾

	Premix	Premix krmiva	Minerální koncentrát	Proteinové krmivo	Krmivo pro selata
L	13	12	13	12	13
n	48	45	47	46	49
průměr [IU/kg]	17,02 x 106	1,21 x 106	537 100	151 800	18 070
sr [IU/kg]	0,51 x 106	0,039 x 106	22 080	12 280	682
r [IU/kg]	1,43 x 106	0,109 x 106	61 824	34 384	1 910
CVr [%]	3,0	3,5	4,1	8,1	3,8
sR [IU/kg]	1,36 x 106	0,069 x 106	46 300	23 060	3 614
R [IU/kg]	3,81 x 106	0,193 x 106	129 640	64 568	10 119

⁽²⁾ Provedla pracovní skupina pro krmiva Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).

CVR [%]	8,0	6,2	8,6	15	20
L:	počet laboratoří				
n:	počet jednotlivých hodnot				
sr:	standardní odchylka opakovatelnosti				
sR:	standardní odchylka reprodukovatelnosti				
r:	opakovatelnost				
R:	reprodukovatelnost				
CVr:	variační koeficient opakovatelnosti				
CVR:	variační koeficient reprodukovatelnosti				

Obrázek 1

Extrakční zařízení (4.8)

