

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 a methanol, 95 + 5 (V+V)		
	B: methanol		
Gradient:	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:	asi 33 minut.		

- 9.2 Chromatografie se může měnit podle typu HPLC a náplně kolony. Zvolený systém musí být schopen oddělit tryptofan a vnitřní standard až na základní „baseline“. Navíc je důležité, aby byly degradační produkty dobře odděleny od tryptofanu a vnitřního standardu. Pro kontrolu obsahu nečistot, které by se mohly eluovat ve stejném čase jako vnitřní standard, se provede zkouška hydrolyzátu bez přidaného vnitřního standardu. Je důležité, aby celková doba zkoušky byla dostatečná pro dokonalé vymytí všech degradačních produktů, jinak může docházet v následujících chromatografiích k interferencím.

Chromatografický systém musí v rozsahu měření poskytovat lineární odezvu. Lineární odezva se měří s konstantní (normální) koncentrací vnitřního standardu a různými koncentracemi tryptofanu. Je důležité, aby velikost píků tryptofanu i vnitřního standardu byla v lineárním rozsahu HPLC/fluorescenčního systému. Pokud jsou píky tryptofanu a/nebo vnitřního standardu příliš velké nebo příliš malé, zkouška se zopakuje s jinou navázkou 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.

H. STANOVENÍ OBSAHU TUKU

1. Účel a rozsah

Touto metodou se stanoví obsah tuku v krmivech. Metoda se nevztahuje na zkoušení olejnatých semen a plodin.

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

1.1 *Postup A – přímo extrahovatelné tuky*

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

1.2 *Postup B – celkové tuky*

Tato metoda je použitelná pro krmiva živočišného původu a pro všechny krmné směsi. Používá se pro všechny materiály, z nichž není možné tuk zcela extrahovat bez předchozí hydrolyzy (např. lepky, kvasnice, bramborové proteiny a výrobky, které byly podrobeny zpracování, jako je vytlačování, vločkování a zahřívání).

1.3 *Interpretace výsledků*

Ve všech případech, kdy se dosáhlo postupem B vyššího výsledku než postupem A, je třeba považovat za platnou hodnotu výsledek dosažený postupem B.

2. Princip

2.1 Postup A

Vzorek se extrahuje petroletherem. Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek se vysuší a zváží.

2.2 Postup B

Vzorek se hydrolyzuje za horka s kyselinou chlorovodíkovou. Směs se ochladí a přefiltruje. Zbytek na filtru se promyje a vysuší a dále se pokračuje ve stanovení podle postupu A.

3. Chemikálie

3.1 Petrolether, bod varu: 40–60 °C. Bromové číslo musí být menší než 1 a zbytek po odpaření menší než 2 mg/100 ml.

3.2 Síran sodný, bezvodý.

3.3 Kyselina chlorovodíková, $c = 3 \text{ mol/l}$.

3.4 Filtrační prostředek, např. Kieselguhr, Hyflo-supercel.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Extrakční přístroj. Pokud je opatřen sifonem (typ Soxhlet), rychlost refluxu je taková, aby docházelo k 10 přetokům za hodinu; pokud se jedná o typ bezsifonový, reflux je 10 ml za minutu.

4.2 Extrakční patrony neobsahující látky rozpustné v petroletheru a s porozitou odpovídající požadavkům uvedeným v bodu 4.1.

4.3 Sušárna, buď vakuová s teplotou $75 \pm 3 \text{ °C}$, nebo horkovzdušná s teplotou $100 \pm 3 \text{ °C}$.

5. Postup

5.1 Postup A (viz bod 8.1)

Do extrakční patrony (4.2) se naváží 5 g vzorku s přesností na 1 mg a patrona se uzavře tukuprostou vatou.

Patrona se umístí do extrakčního přístroje (4.1) a extrahuje se šest hodin petroletherem (3.1). Petroletherový extrakt se jímá do suché, předem zvážené baňky s varnými kamínky⁽¹⁾.

Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek v baňce se vysuší 1,5 hodiny v sušárně (4.3). Nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se. Suší se dalších 30 minut, aby se zajistila konstantní hmotnost tuku (rozdíl mezi dvěma následujícími váženými musí být maximálně 1 mg).

5.2 Postup B

Do 400 ml kádinky nebo do 300ml kónické baňky se naváží 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg (viz bod 8.2) a přidá se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a varné kamínky. Kádinka se přikryje hodinovým sklem nebo se kónická baňka napojí na refluxní chladič. Směs se zahřívá k varu na kahanu nebo na topné desce a potom se udržuje v mírném varu jednu hodinu. Během varu se nesmí částičky vzorku usazovat na stěnách nádoby.

Směs se vychladí a přidá se dostatečné množství filtračního prostředku (3.4), aby se zabránilo ztrátám tuku během filtrace. Filtruje se přes zvlhčený dvojitý filtr, který neobsahuje žádný tuk. Zbytek na filtru se promývá studenou vodou, dokud není filtrát neutrální. Proveďte kontrolu, zda filtrát neobsahuje žádný tuk, jinak je nutné před hydrolyzou provést extrakci petroletherem podle postupu A.

⁽¹⁾ Pokud má být vyextrahovaný tuk použit pro další zkoušky kvality, nahradí se varné kamínky skleněnými kuličkami.

Dvojitý filtr se zbytkem po hydrolýze se umístí na hodinové sklo a suší se 1,5 hodiny v sušárně (4.3) při 100 ± 3 °C.

Dvojitý filtr s vysušeným zbytkem se vloží do extrakční patrony (4.2) a utěsní se tukuprostou vatou. Patrona se umístí do extrakčního přístroje (4.1) a dále se postupuje podle druhého a třetího odstavce bodu 5.1.

6. Vyjádření výsledku

Hmotnost zbytku po extrakci se vyjádří jako % tuku ve vzorku.

7. Opakovatelnost

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

- 0,2 % v absolutní hodnotě u obsahu tuku do 5 %,
- 4,0 % relat. z hodnoty nejvyššího výsledku u obsahu 5–10 %,
- 0,4 % v absolutní hodnotě u obsahu nad 10 %.

8. Poznámky

8.1 U výrobků s vysokým obsahem tuků, které se obtížně melou nebo u kterých je obtížné odebrat homogenní redukováný vzorek, se postupuje následujícím způsobem:

Naváží se 20 g vzorku s přesností na 1 mg, promíchá se s 10 nebo více gramy bezvodého síranu sodného (3.2). Extrahuje se petroletherem (3.1) podle bodu 5.1. Získaný extrakt se doplní petroletherem (3.1) na objem 500 ml a promíchá. Do malé, suché, předem zvažené baňky s varnými kamínky se odměří 50 ml tohoto roztoku. Rozpouštědlo se oddestiluje a po vysušení se postupuje podle posledního odstavce bodu 5.1.

Ze zbytku po extrakci v patroně se odstraní veškeré rozpouštědlo a zbytek se umele tak, aby prošel sítím s oky 1 mm. Potom se vrátí do extrakční patrony (síran sodný se již nepřidává) a postupuje se podle druhého a třetího odstavce bodu 5.1.

Obsah tuku se vypočítá jako procento ze vzorku podle následujícího vzorce:

$$(10m_1 + m_2) \times 5$$

kde:

m_1 = hmotnost zbytku po první extrakci v gramech (aliquotní části extraktu)

m_2 = hmotnost zbytku po druhé extrakci v gramech.

8.2 U výrobků s nízkým obsahem tuku se může zvýšit navážka vzorku na 5 g.

8.3 Krmiva pro domácí zvířata, která mají vysoký obsah vody, je třeba před hydrolýzou a extrakcí podle postupu B smíchat s bezvodým síranem sodným.

8.4 V bodě 5.2 může být účinnější při promývání filtračního zbytku použít horkou vodu místo studené.

8.5 U některých krmiv může být zapotřebí prodloužit dobu sušení nad 1,5 hod. Je však třeba zamezit přílišnému vysušení, které může vést k nižším výsledkům. Je možno použít i mikrovlnnou sušárnu.

8.6 Předextrakce podle postupu A před hydrolýzou a další extrakce podle postupu B se doporučuje u krmiv s obsahem tuku nad 15 %. Do jisté míry to závisí na druhu krmiva a druhu tuku v krmivu.

I. STANOVENÍ OBSAHU VLÁKNINY

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit v krmivu organické látky, které neobsahují tuk, jsou nerozpustné v roztoku kyseliny a louhu a jsou běžně nazývány vláknina.

2. Princip

Vzorek se v případě potřeby odtuční a působí se na něj postupně vroucím roztokem kyseliny sírové a hydroxidu draselného o přesně stanovené koncentraci. Zbytek se oddělí filtrací přes skleněný filtrační kelímek, promyje, vysuší, zváží a spálí při teplotě 475–500 °C. Úbytek váhy po spálení odpovídá obsahu vlákniny ve zkoušeném vzorku.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina sírová, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.

3.2 Odpěňovací činidlo (např. n-oktanol).

3.3 Filtrační pomůcka (Celit 545 nebo obdobná) žíhaná při 500 °C po 4 hodiny (8.6).

3.4 Aceton.

3.5 Petrolether, bod varu 40–60 °C.

3.6 Kyselina chlorovodíková, $c = 0,5 \text{ mol/l}$.

3.7 Roztok hydroxidu draselného, $c = 0,23 \text{ mol/l}$.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Zahřívací jednotka pro hydrolyzu roztokem kyseliny sírové a hydroxidu draselného, s oporou pro filtrační kelímky (4.2) a vybavená vypouštěcím potrubím s kouhoutem na vypouštění tekutiny a vakuum, popřípadě stlačený vzduch. Každý den se zařízení před použitím pět minut přehřívá s vroucí vodou.

4.2 Skleněný filtrační kelímek s porézní vložkou (fritou) o velikosti pórů 40–90 μm . Před prvním použitím se kelímek několik minut zahřeje na 500 °C a potom vychladí (8.6).

4.3 Hydrolyzační nádobka o obsahu nejméně 270 ml s refluxním chladičem, vhodná pro vaření.

4.4 Laboratorní sušárna s regulací teploty.

4.5 Muflová pec s regulací teploty.

4.6 Extrakční jednotka s oporou pro filtrační kelímky (4.2) vybavená vypouštěcím potrubím s kouhoutem na vakuum a vypouštěné tekutiny.

4.7 Spojovací kroužky pro spojení zahřívací jednotky (4.1), filtračních kelímků (4.2) a hydrolyzační nádobky (4.3) a pro připojení kelímků ke studené extrakční jednotce (4.6).

5. Postup

Do filtračního kelímku (4.2) se naváže 1 g upraveného vzorku s přesností na 1 mg (viz poznámky 8.1, 8.2 a 8.3) a přidá se 1 g filtrační pomůcky (3.3).

Filtrační kelímek (4.2) se připojí k zahřívací jednotce (4.1) a poté k hydrolyzační nádobce (4.3). Do spojené hydrolyzační nádobky a filtračního kelímku se nalije 150 ml vroucího roztoku kyseliny sírové (3.1) a v případě potřeby se přidá několik kapek odpěňovacího činidla (3.2).

Zahřeje se během 5 (± 2) minut k varu a intenzivně se vaří přesně 30 minut.