

## 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  $\mu\text{m}$ . 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 naváží 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 ( $\pm$ 2) minut k varu a intenzivně se vaří přesně 30 minut.

Otevře se vypouštěcí ventil (4.1) a kyselina sírová se odsaje za použití vakua přes filtrační kelímek a zbytek se promyje asi třikrát 30 ml horké vody, vždy po úplném odsátí kapaliny z kelímku.

Vypouštěcí ventil se uzavře, přidá se 150 ml vroucího roztoku hydroxidu draselného (3.7) do spojené hydrolyzační nádoby a filtračního kelímku a přidá se několik kapek oděňovacího činidla (3.2). Kapalina se přivede během 5 ( $\pm 2$ ) minut k varu a intenzivně se vaří přesně 30 minut. Potom se zopakuje filtrace a promývání jako po varu s kyselinou sírovou.

Po skončení promývání a odsávání se odpojí filtrační kelímek se svým obsahem a připojí se ke studené extrakční jednotce (4.6). Za použití vakua se promyje zbytek ve filtračním kelímku třikrát 25 ml acetonu (3.4), promývá se vždy do úplného odsátí acetonu.

Filtrační kelímek se vysuší do konstantní hmotnosti v sušárně při teplotě 130 °C. Po každém vysušení a ochlazení v exsikátoru se vždy rychle zváží. Filtrační kelímek se vloží do muflové pece a spaluje při 475–500 °C nejméně 30 minut do konstantní hmotnosti (úbytek hmotnosti mezi dvěma váženími nesmí být větší než 2 mg).

Po každém spalování a ochlazení nejprve v peci a potom v exsikátoru se zváží.

Provede se slepá zkouška bez zkoušeného vzorku. Úbytek hmotnosti po spalování nesmí být větší než 4 mg.

## 6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah vlákniny jako procento vzorku se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$X = \frac{(m_0 - m_1) \times 100}{m}$$

kde:

m = hmotnost vzorku v g

m<sub>0</sub> = úbytek hmotnosti po spálení při vlastním stanovení v g

m<sub>1</sub> = úbytek hmotnosti po spálení při slepé zkoušce v g.

## 7. Opakovatelnost

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

— 0,6 % v absolutní hodnotě u obsahu vlákniny nižšího než 10 %,

— 6 % relat. z hodnoty vyššího výsledku u obsahu vlákniny 10 % a více.

## 8. Poznámky

8.1 Krmiva, která obsahují více než 10 % tuku, musí být před zkouškou odtučněna petroletherem (3.5). Filtrační kelímek (4.2) s obsahem se připojí ke studené extrakční jednotce (4.6) a zbytek se promyje třikrát 30 ml petroletheru za použití vakua až do úplného odsátí. Potom se kelímek připojí k zahřívací jednotce (4.1) a pokračuje se podle bodu 5.

8.2 Krmiva obsahující tuk, který nelze přímo extrahovat petroletherem (3.5), musí být odtučněna podle bodu 8.1 a potom ještě jednou po varu s kyselinou. Po varu s kyselinou a následném promytí se filtrační kelímek s obsahem připojí ke studené extrakční jednotce (4.6) a promyje se třikrát 30 ml acetonu a následně třikrát 30 ml petroletheru. Odsaje se do sucha za použití vakua a pokračuje se ve zkoušce podle bodu 5 od přidání hydroxidu draselného.

- 8.3 Pokud krmivo obsahuje více než 5 % uhličitánů vyjádřených jako uhličitán vápenatý, připojí se filtrační kelímek (4.2) s naváženým vzorkem k zahřívací jednotce (4.1). Vzorek se promyje třikrát 30 ml kyseliny chlorovodíkové (3.6). Po každém přidání kyseliny se filtruje po minutové prodlevě. Nakonec se promyje 30 ml vody a pokračuje se podle bodu 5.
- 8.4 Pokud se používá přístroj, u kterého je několik filtračních kelímků připojeno k jedné zahřívací jednotce, neprovádí se obě paralelní stanovení u téhož vzorku ve stejné sérii.
- 8.5 Pokud je po varu s kyselinou nebo louhem obtížné roztok přefiltrovat, použije se stlačený vzduch z vypouštěcího ventilu zahřívací jednotky a potom se pokračuje ve filtraci.
- 8.6 Teplota spalování nesmí přesáhnout 500 °C, aby se prodloužila životnost skleněných filtračních kelímků. Během zahřívání a ochlazování nesmí být kelímky vystaveny nadměrnému teplotnímu šoku.

## J. STANOVENÍ OBSAHU CUKRŮ

### 1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu redukujících cukrů a veškerých cukrů po inverzi vyjádřených jako glukóza nebo sacharóza s použitím faktoru 0,95. Je použitelná pro krmné směsi. Pro ostatní krmiva jsou používány zvláštní metody. Je-li to nutné, může být obsah laktózy zjištěn zvlášť a potom zahrnut do celkového výsledku.

### 2. Princip

Cukry se vyextrahují zředěným ethanolem. Extrakt se vyčechí Carrezovými činidly I a II. Ethanol se odstraní a množství cukru před a po inverzi se stanoví metodou podle Luff-Schorla.

### 3. Chemikálie

- 3.1 Ethanol, 40% roztok (v/v), hustota: 0,948 g/ml při 20 °C, neutralizovaný na fenolftalein.
- 3.2 Carrezovo činidlo I: ve vodě se rozpustí 21,9 g octanu zinečnatého  $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$  a 3 g ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na 100 ml.
- 3.3 Carrezovo činidlo II: ve vodě se rozpustí 10,6 g kyanoželeznanu draselného (ferrokyanidu draselného)  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ . Doplní se vodou na 100 ml.
- 3.4 Methyloranž, 0,1% roztok (w/v).
- 3.5 Kyselina chlorovodíková 4 mol/l.
- 3.6 Kyselina chlorovodíková 0,1 mol/l.
- 3.7 Roztok hydroxidu sodného, 0,1 mol/l.
- 3.8 Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného míchání se nalije roztok kyseliny citrónové (3.8.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.8.3). Přidá se roztok síranu měďnatého (3.8.1) a doplní se vodou na 1 litr. Nechá se přes noc usadit a pak se přefiltruje.

Zkontroluje se koncentrace takto získaného činidla (Cu – 0,05 mol/l;  $Na_2CO_3$  – 1 mol/l), viz poslední odstavce bodu 5.4. pH tohoto roztoku je přibližně 9,4.

- 3.8.1 Roztok síranu měďnatého: ve 100 ml vody se rozpustí 25 g síranu měďnatého ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) prostého železa.