

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 čistý 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.

1.2. Postup B – celkový obsah hrubých olejů a tuků

Tato metoda je použitelná pro krmiva živočišného původu a pro všechny krmné směsi. Má se používat pro všechny materiály, z nichž není možné oleje a tuky zcela extrahovat bez předchozí hydrolýzy (např. lepek, kvasnice, bramborové proteiny a produkty, které byly podrobeny zpracování, jako je extruze, vločkování a ohřev).

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. Činidla

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

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

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

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

5. Postup

5.1. Postup A (viz bod 8.1)

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

Patrona se umístí do extrakčního přístroje (bod 4.1) a extrahuje se šest hodin petroletherem (bod 3.1). Petroletherový extrakt se jímá do suché, předem zvážené baňky s úlomky pemzy ^(*).

Rozpouštědlo se oddestiluje, zbytek v baňce se vysuší 1,5 hodiny v sušárně (bod 4.3). Nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se. Suší se dalších 30 minut, aby se zajistila konstantní hmotnost olejů a tuků (úbytek hmotnosti mezi dvěma po sobě následujícími váženími nesmí být větší než 1 mg).

^(*) Pokud má být vyextrahovaný olej nebo tuk použit pro další zkoušky kvality, nahradí se úlomky pemzy skleněnými kuličkami.

5.2. *Postup B*

Do 400 ml kádinky nebo do 300 ml kónické baňky se naváží 2,5 g vzorku s přesností na 1 mg (viz bod 8.2) a přidá se 100 ml kyseliny chlorovodíkové (bod 3.3) a úlomky pemzy. Kádinka se přikryje hodinovým sklem nebo se ke kónické baňce připojí zpětný chladič. Směs se přivede do mírného varu nad malým plamenem nebo na topné desce a udržuje se tak jednu hodinu. Produkt se nesmí usazovat na stěnách nádoby.

Směs se vychladí a přidá se dostatečné množství filtračního prostředku (bod 3.4), aby se zabránilo ztrátám oleje a tuku během filtrace. Filtruje se přes zvlhčený, tukuprostý dvojitý filtrační papír. Zbytek na filtru se promývá studenou vodou, dokud není filtrát neutrální. Provede se kontrola, zda filtrát neobsahuje žádný olej nebo tuk, jinak je nutné před hydrolýzou provést extrakci vzorku petroletherem podle postupu A.

Dvojitý filtrační papír se zbytkem po hydrolýze se umístí na hodinové sklo a suší se 1,5 hodiny ve vzduchové sušárně (bod 4.3) při 100 ± 3 °C.

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

5.3. *Postup A a opětovná extrakce podle postupu B*

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.

To znamená, že po extrakci petroletherem (postup A) se zbytek nebo část zbytku znovu extrahuje kyselinou chlorovodíkovou (postup B). Obsah hrubých olejů a tuků je součtem výsledků postupů A a B.

6. **Vyjádření výsledku**

Hmotnost zbytku se vyjádří jako procento vzorku.

7. **Opakovatelnost**

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u téhož vzorku týměž laborantem nesmí překročit:

- 0,2 % v absolutní hodnotě u obsahu hrubých olejů a tuků nižšího než 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 produktů s vysokým obsahem olejů a tuků, které se obtížně melou nebo u kterých je obtížné odebrat homogenní redukováný zkušební vzorek, se postupuje tímto způsobem:

Naváží se 20 g vzorku s přesností na 1 mg, promíchá se s 10 nebo více gramy bezvodého síranu sodného (bod 3.2). Extrahuje se petroletherem (bod 3.1) podle bodu 5.1. Získaný extrakt se doplní petroletherem (bod 3.1) na objem 500 ml a promíchá. Do malé, suché, předem zvážené baňky s úlomky pemzy 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 olejů a tuků se vypočte jako procento vzorku podle tohoto vzorce:

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

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 některých produktů (např. s nízkým obsahem olejů a tuků) se může hmotnost zkušební vzorku zvýšit.
- 8.3. Krmivo pro zvířata v zájmovém chovu, které má 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. Lze použít i mikrovlnnou sušárnu.

H. STANOVENÍ OBSAHU HRUBÉ VLÁKNINY

1. Účel a oblast použití

Tato metoda umožňuje stanovit v krmivu obsah tukuprostých organických látek, které jsou nerozpustné v roztoku kyseliny a zásady a jsou běžně nazývány hrubá vlákna.

Tato metoda není použitelná v případě lignocelulózy a rostlinného uhlí (příliš jemné částice).

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 hrubé vlákniny ve zkušebním vzorku.

3. Činidla

- 3.1. Kyselina sírová, $c = 0,13 \text{ mol/l}$.
- 3.2. Odpěňovací činidlo (např. n-oktanol).
- 3.3. Filtrační pomůcka (Celite 545 nebo obdobná) žíhaná při 500 °C po čtyři hodiny (bod 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

- 4.1. Zahřívací jednotka pro mineralizaci roztokem kyseliny sírové a hydroxidu draselného, s oporou pro filtrační kelímek (bod 4.2) a vybavená vypouštěcí trubicí s ventilem na vypouštění kapaliny a vakuum, popřípadě stlačený vzduch. Každý den se zařízení před použitím pět minut předeřívá vroucí vodou.
- 4.2. Skleněný filtrační kelímek s porézní vložkou (fritou) ze slinutého skla o velikosti pórů 40–90 μm. Před prvním použitím se kelímek několik minut zahřeje na 500 °C a potom vychladí (bod 8.6).