

Metodické postupy laboratorního zkoušení krmiv vydané pro účely výkonu odborného dozoru Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského v návaznosti na zákon č. 91/1996 Sb. o krmivech a vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 222/1996 Sb., kterou se stanoví metody odběru vzorků, metody laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků podléhajících zkáze.

Obsah:

1. Vzorkovací pomůcky – k příloze č. 1 vyhlášky č. 222/1996 Sb.
2. Analytické tolerance
3. Výpočet tolerancí pro hodnocení obsahů doplňkových látek
4. Úprava konečných vzorků – k příloze č. 7 vyhlášky č. 222/1996 Sb.
5. Metodické postupy laboratorního zkoušení – k příloze č. 9 vyhlášky č. 222/1996 Sb.
6. Pokyn ministerstva zemědělství ČR pro organizaci, řízení a kontrolu požární ochrany.

VZORKOVACÍ POMŮCKY

k příloze č. 1 vyhlášky Ministerstva zemědělství České republiky
č. 222/1996 Sb.

VZORKOVACÍ LOPATKA

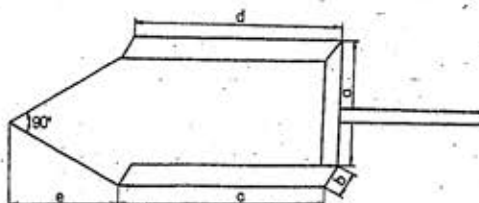
pro odběr dílčích vzorků statickým způsobem, kdy velikost lopatky by měla odpovídat maximální velikosti částic materiálu.

Způsob použití:

- určeno pro vzorkování sypkých materiálů

Sada lopatek pro různou velikost částic materiálu

Označení lopátky číslo	Max. vel. částic mm	Rozměry lopatky mm					Tloušťka materiálu mm	Poměr		Přibližný objem ml
		a	b	c	d	e		a/b	b/c	
1	1	30	15	30	25	12	0,50	1,0	0,50	15
3	3	40	25	40	30	15	0,50	1,0	0,62	40
5	5	50	30	50	40	20	1	1,0	0,60	75
10	10	60	35	60	50	25	1	1,0	0,68	125
15	15	70	40	70	60	30	2	1,0	0,57	200
20	20	80	45	80	70	35	2	1,0	0,58	300
30	30	90	50	90	80	40	2	1,0	0,66	400
40	40	110	65	110	95	50	2	1,0	0,59	700
50	50	150	75	150	130	65	2	1,0	0,50	1 700
75	75	200	100	200	170	80	2	1,0	0,50	4 000
100	100	250	110	250	220	100	2	1,0	0,44	7 000
125	125	300	120	300	250	120	2	1,0	0,40	10 000
150	150	350	140	350	300	140	2	1,0	0,40	16 000

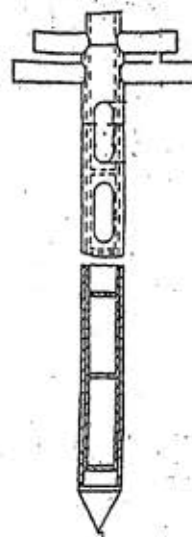


Údržba a čištění:

- po použití je nutné vnitřek i povrch lopatky zbavit zbytků vzorku mechanicky. Pro odběr vzorků musí být lopatka suchá.

DVOUPLÁŠŤOVÝ VZORKOVAČ

pro odběr vzorků sypkých materiálů v provedení pro různou sypnou výšku materiálu, které musí odpovídat účinná výška vzorkovače. Šířka štěrbin musí být nejméně 2,5 násobku maximální velikosti částice.



Použití:

Pro horizontální odběr několika lokálních vzorků sypkých a zrnitých materiálů z jednoho místa.

Funkce:

Vzorkovač se skládá ze dvou soustředných trubíc, těsně do sebe zapadajících s možností otáčení. Vzájemným otáčením trubíc jsou otvory vnitřní trubice odkryty nebo zakryty. Vnitřní trubice je opatřena patry s přepážkami, dělícími vnitřní prostor na několik samostatných prostorů. Obě trubice do sebe zasunuté se zatlačí do materiálu, přičemž podélné otvory vnitřní trubice jsou překryty. Po dosažení požadované hloubky se vnější trubice pootočí tak, aby byly odkryty otvory vnitřní trubice. Po naplnění vzorkovače vnitřní část překryje znova vnější trubice a vzorkovač se vyjme. Vzorkovaný materiál se přesype do vzorkovnice. Tímto způsobem je možno odebírat lokální vzorky z různých hloubek.

Příklady použití: Zrnité a sypké materiály, např. zrní, písek, chemikálie, poplesek.

Údržba a čištění: Po použití je nutno vzorkovač rozebrat, otřít, případně omýt a vysušit.

VZORKOVACÍ KRABICE

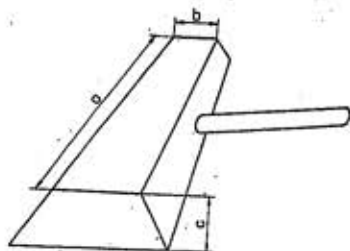
pro odběr dílčích vzorků z proudu materiálu, který nepřesahuje svou šířkou rozměry vzorkovací krabice.

Způsob použití:

- určeno pro vzorkování sypkých materiálů

Sada krabic pro různou velikost částic materiálu

Označení krabice číslo	Max. vel. částic mm	Rozměry krabice mm			Tloušťka materiálu mm	Přibližný objem ml
		a	b	c		
1	20	300	50	150	0,5	2 260
2	20	500	50	150	0,5	3 750
3	50	300	125	150	1	5 625
4	50	600	125	150	1	9 375
5	75	300	188	200	1	11 280
6	75	500	188	200	1	18 800



Údržba a čištění:

- po použití je nutné vnitřek i povrch krabice zbavit zbytků vzorku mechanicky. Pro odběr vzorků musí být krabice suchá.

VZORKOVACÍ KRABICE

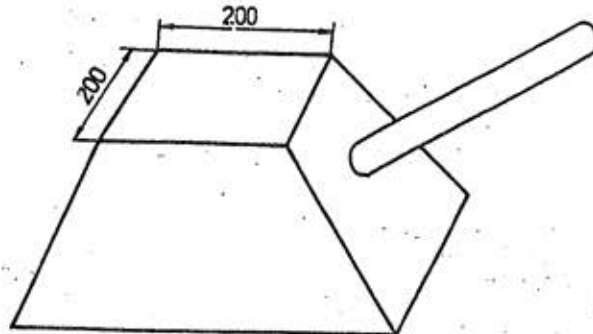
pro odběr průřezového vzorku z proudu krmiva, který přesahuje svou šířkou rozměry vzorkovací krabice nebo maximální velikost částic přesahuje 75 mm.

Rozměry krabice:

- minimální šířka šterbiny 200 mm
- vstupní otvor čtvercového tvaru
- objem nádoby maximálně 8 000 ml

Způsob použití:

- určeno pro vzorkování sypkých materiálů

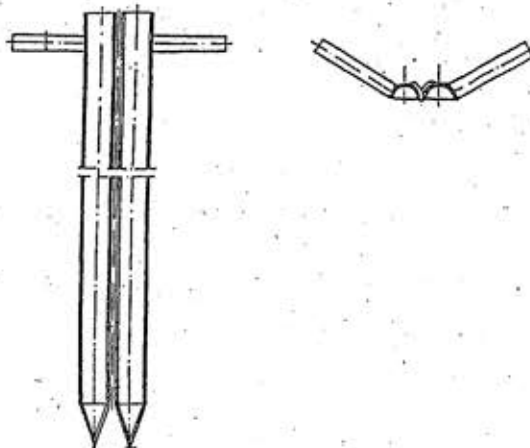


Údržba a čištění:

- po použití je nutné vnitřek i povrch krabice zbavit zbytků vzorku mechanicky. Pro odběr vzorků musí být krabice suchá.

TRUBICOVÝ DÉLENÝ VZORKOVAČ

pro odběr dílčích vzorků pastovitých materiálů



Využití:

Pro odběr past a hustších kalů nebo sypkých či zrnitých materiálů.

Funkce:

Používaný vzorkovač se vtlačí do vzorkovaného materiálu v rozevřeném stavu. Po dosažení potřebné hloubky se pomocí horních rukojetí vzorkovač sevře a vytáhne ven. Materiál se vysype nebo seřže do vzorkovnice.

Příklady použití:

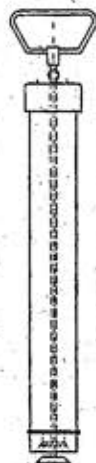
Odběr hustých mořtenských či jiných kalů a pastovitých látek, odběr zrní, odběr sypkých látek.

Údržba a čištění:

Po použití se vzorkovač vytře nebo vymyje a vysuší.

TRUBICOVÝ VZORKOVAČ

se spodním uzávěrem pro odběr kapalin



Využití:

Odběr vod z hlubokých kontrolních vrtů, nádrží, cisteren, odběr kapalin z nádrží a méně přístupných míst. Podle požadavků na odběr lze zvolit materiálové provedení sondy z hlediska zamezení možné kontaminace vzorku.

Funkce:

Sonda se na dvou lankách spouští do odběrového místa. Lanko uzávěru je uvolněno, lanko nosící sondu se po dosažení hladiny nebo potřebné hloubky povolí a po naplnění sondy se tato vytahuje lankem, držícím uzávěr. Po vytáhnutí sondy z vrtu či jiného odběrového místa je vzorek přelit do vzorkovnice.

Příklady použití:

Odběr vod z monitorovacích vrtů, odběr kapalin z nádrží a cisteren či jiných odběrových míst. Podle charakteru odebírané kapaliny je zvoleno materiálové provedení sondy. Možnost odběru i agresivních kapalin podle typu sondy.

Čištění a údržba:

Po odběru je nutno sondu vymýt, vypláchnout a vysušit. V případě potřeby je možno sondu před omytím snadno rozebrat.

TRUBICOVÝ VZORKOVAČ

se spodním uzávěrem pro odběr kapalin z volitelných hloubek



Využití:

Pro odběr kapalin z volitelných hloubek včetně monitorovacích vrtů malých průměrů. Podle charakteru odebíraného média je použit typ sondy.

Funkce:

Nádoba se zátěží u dna je spuštěna do kapaliny na lanku, horní otvor je uzavřen zátkou, na níž je upevněno druhé lanko. Po dosažení potřebné hloubky se zatažením druhého lanka vytáhne z nádoby zátku, nádoba se zaplní kapalinou, poté je vytažena pomocí nosného lanka z kapaliny a odebraný vzorek se přelije do vzorkovnice.

Příklady použití:

Odběr vod z monitorovacích vrtů, odběr kapalin z nádrží a cisteren, odběr z volitelných hloubek.

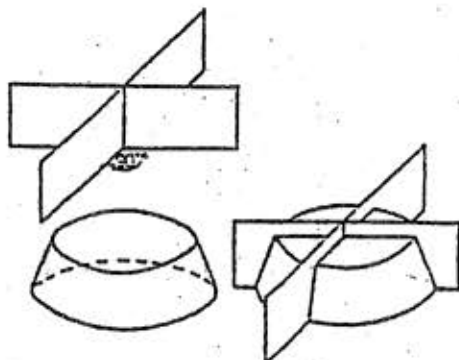
Údržba a čištění:

Po použití se vzorkovač vymyje vodou a vysuší.

DĚLICÍ KŘÍŽ

pro mechanické dělení vzorků sypkých materiálů, případně pastovitých materiálů neroztékavé konzistence.

Rozměry dělicího kříže: 300 × 300 mm, výška 150 mm

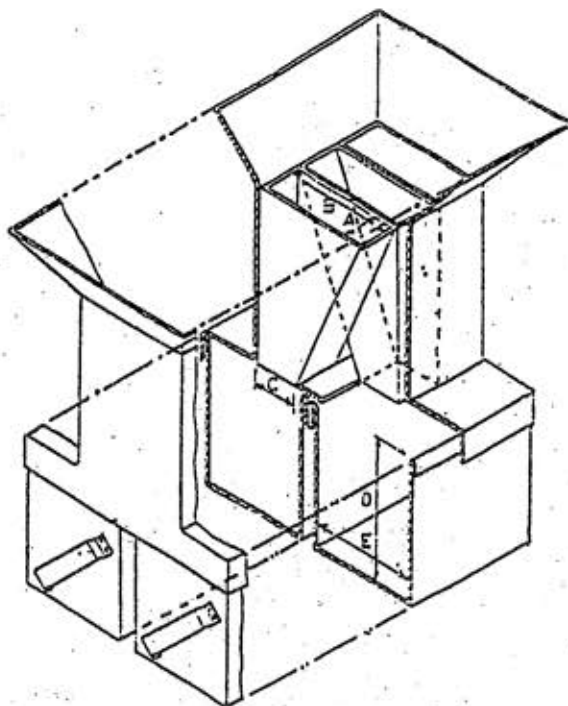


Použití: Pro hrubou homogenizaci sypkých vzorků.

Čištění a údržba: Po použití se kvartovací kříž otře nebo omyje a vysuší.

DĚLIČ VZORKU

je určen pro mechanické dělení vzorků sypkých materiálů



Použití:

Zařízení pro mechanické dělení materiálu k získání průměrného vzorku.

Funkce:

Štěrbínový dělič, který rozděljuje materiál pomocí dělicích přček tak, aby na každou stranu směřovala polovina dávkovaného vzorku při zachování stejného granulometrického poměru. Do spodní části lze vložit výměnná síta různé velikosti ok. Součástí zařízení jsou dvě nádoby pro jímání vzorku.

Údržba a čištění: Dělič je nutno po použití mechanicky očistit nebo důkladně omýt a vysušit.

Cena 4000,— Kč je platná do konce roku 1996.

2. Analytické tolerance pro zkoušení krmiv

Jakostní znak	Deklarovaný obsah	Analytické rozpětí
Vlhkost (voda)	do 15 % nad 15 %	$\pm 0,3$ % abs. ± 2 % rel.
Dusíkaté látky	do 160 g/kg 160 - 320 g/kg nad 320 g/kg	± 4 g/kg $\pm 2,5$ % rel. ± 8 g/kg
Tuk	4 - 100 g/kg 100 - 200 nad 200 g/kg	± 4 g/kg ± 4 % rel. ± 8 g/kg
Vláknina	4 - 100 nad 100 g/kg	± 4 g/kg ± 4 % rel.
Popel	2 - 40 g/kg 40 - 100 g/kg 100 - 150 g/kg 150 - 200 g/kg nad 200 g/kg	± 10 % rel. ± 4 g/kg ± 4 % rel. ± 6 g/kg ± 3 % rel.
Škrob	do 120 g/kg 120 - 200 nad 200 g/kg	± 6 g/kg ± 5 % rel. ± 10 g/kg
Cukr	5 - 250 g/kg 250 - 500 nad 500 g/kg	± 5 g/kg ± 2 % rel. ± 10 g/kg
Fosfor	1,2 - 10 g/kg nad 10 g/kg	$\pm 0,6$ g/kg ± 6 % rel.
Vápník	1 - 5 g/kg 5 - 60 g/kg 60 - 100 g/kg nad 100 g/kg	$\pm 0,5$ g/kg ± 10 % rel. ± 6 g/kg ± 6 % rel.
Hořčík, draslík	2 - 50 g/kg nad 50 g/kg	± 10 % rel. ± 5 g/kg
Sodík	0,4 - 1,6 g/kg 1,6 - 80 g/kg nad 80 g/kg	$\pm 0,2$ g/kg $\pm 12,5$ % rel. ± 10 g/kg
Nerozpustný podíl popele v HCl	3 - 100 g/kg nad 100 g/kg	± 3 g/kg ± 3 % rel.
Chloridy jako NaCl	do 10 g/kg 10 - 50 g/kg nad 50 g/kg	± 1 g/kg ± 10 % rel. ± 5 g/kg

Močovina (krmivo)	2 - 20 g/kg	± 2 g/kg
Močovina (surovina)	20 - 100 g/kg	± 10 % rel.
	100 - 200 g/kg	± 10 g/kg
	nad 200 g/kg	± 5 % rel.
Uhličitany jako CaCO ₃	2 - 25 g/kg	± 2 g/kg
	25 - 100 g/kg	± 8 % rel.
	nad 100 g/kg	± 8 g/kg
Stravitelnost dusíkatých látek	bez rozdílu obsahu	± 2 % rel.
Aminokyseliny	bez rozdílu obsahu	± 10 % rel.
Mastné kyseliny volné	nad 50 g/kg	± 10 % rel.
Kyselost tuku	nad 4 mg KOH/g tuku	± 15 % rel.
Karotenoidy	bez rozdílu obsahu	± 15 % rel.
Měď, kobalt, železo, zinek, mangan	do 5 mg/kg	± 50 % rel.
mez stanovitelnosti nestanovená	5 - 10 mg/kg	± 2,5 mg/kg
	10 - 30 mg/kg	± 25 % rel.
	30 - 50 mg/kg	± 7,5 mg/kg
	nad 50 mg/kg	± 15 % rel.
Jod	bez rozdílu obsahu	± 25 % rel.
Vitamin A	2 000 - 4 000 m.j./kg	1 000 m.j./kg
mez stanovitelnosti 2 000 m.j./kg	4 000 - 100 000 m.j./kg	25 % rel.
	100 000 - 125 000 m.j./kg	25 000 m.j./kg
	125 000 - 375 000 m.j./kg	20 % rel.
	375 000 - 600 000 m.j./kg	75 000 m.j./kg
	600 000 - 800 000 m.j./kg	12,5 % rel.
	800 000 - 1 000 000	100 000 m.j./kg
	nad 1 000 000 m.j./kg	10 % rel.
Vitamin E	do 25 mg/kg	± 40 % rel.
	25 - 50 mg/kg	± 10 mg/kg
	50 - 150 mg/kg	± 20 % rel.
	150 - 200 mg/kg	± 30 mg/kg
	200 - 500 mg/kg	± 15 % rel.
	500 - 750 mg/kg	± 75 mg/kg
	nad 750 mg/kg	± 10 % rel.
Avilamycin, avoparcin, flavo-fosfolipol, monensinát sodný, salinomycinát sodný, tylosin-fosfát, virginiamycin, zink-bacitracin a další antibiotika	0,5 - 25 mg/kg	± 40 % rel.
mez stanovitelnosti 0,5 mg/kg	25 - 50 mg/kg	± 10 mg/kg
	50 - 100 mg/kg	± 20 % rel.
	100 - 200 mg/kg	± 20 mg/kg
	nad 200 mg/kg	± 10 % rel.

Olachindox mez stanoviteľnosti 2 mg/kg	2 - 12 mg/kg 12 - 40 mg/kg 40 - 300 mg/kg 300 - 450 mg/kg 450 - 5 000 mg/kg 5 000 - 10 000 mg/kg nad 10 000 mg/kg	± 50 % rel. ± 6 mg/kg ± 15 % rel. ± 45 mg/kg ± 10 % rel. ± 500 mg/kg ± 5 % rel.
Amprolium mez stanoviteľnosti 20 mg/kg	20 - 100 mg/kg 100 - 5 000 mg/kg 5 000 - 10 000 mg/kg nad 10 000 mg/kg	± 10 mg/kg ± 10 % rel. ± 500 mg/kg ± 5 % rel.
Meticlorpindol mez stanoviteľnosti 40 mg/kg	40 - 100 mg/kg 100 - 300 mg/kg 300 - 450 mg/kg 450 - 5 000 mg/kg	± 15 mg/kg ± 15 % rel. ± 45 mg/kg ± 10 % rel.
Robenidin, dimetridazol mez stanoviteľnosti 4 mg/kg	4 - 10 mg/kg 10 - 25 mg/kg 25 - 50 mg/kg 50 - 5 000 mg/kg 5 000 - 10 000 mg/kg nad 10 000 mg/kg	± 2 mg/kg ± 20 % rel. ± 5 mg/kg ± 10 % rel. ± 500 mg/kg ± 5 % rel.
Methylbenzochát mez stanoviteľnosti 5 mg/kg	5 - 10 mg/kg 10 - 20 mg/kg 20 - 40 mg/kg 40 - 100 mg/kg 100 - 5 000 mg/kg 5 000 - 10 000 mg/kg nad 10 000 mg/kg	± 50 % rel. ± 5 mg/kg ± 25 % rel. ± 10 mg/kg ± 10 % rel. ± 500 mg/kg ± 5 % rel.
Aflatoxin B ₁ mez stanoviteľnosti 1 µg/kg	1 - 4 µg/kg 4 - 10 µg/kg nad 10 µg/kg	± 50 % rel. ± 2 µg/kg ± 20 % rel.
Arsen mez stanoviteľnosti nestano- vena	do 1 mg/kg 1 - 2,5 mg/kg 2,5 - 15 mg/kg 15 - 30 mg/kg nad 30 mg/kg	± 50 % rel. ± 0,5 mg/kg ± 20 % rel. ± 3 mg/kg ± 10 % rel.

Olovo mez stanovitelnosti 1 mg/kg	1 - 3 mg/kg 3 - 5 mg/kg 5 - 10 mg/kg 10 - 20 mg/kg 20 - 40 mg/kg 40 - 60 mg/kg nad 60 mg/kg	± 50 % rel. ± 1,5 mg/kg ± 30 % rel. ± 3 mg/kg ± 15 % rel. ± 6 mg/kg ± 10 % rel.
Kadmium mez stanovitelnosti 0,1 mg/kg	0,10 - 0,20 mg/kg 0,20 - 0,40 mg/kg 0,40 - 1,0 mg/kg 1,0 - 2,5 mg/kg nad 2,5 mg/kg	± 50 % rel. ± 0,10 mg/kg ± 25 % rel. ± 0,25 mg/kg ± 10 % rel.
Chlorované uhlovodíky) pro HCH a HCB mez stanovitelnosti 2 µg/kg, pro ostatní 5 µg/kg	5 - 100 µg/kg 100 - 200 µg/kg nad 200 µg/kg	± 50 % rel. ± 50 µg/kg ± 25 % rel.
Fluor mez stanovitelnosti nestanovená	do 12 mg/kg 12 - 15 mg/kg 15 - 30 mg/kg 30 - 60 mg/kg 60 - 500 mg/kg 500 - 1 000 mg/kg nad 1 000 mg/kg	± 50 % rel. ± 6 mg/kg ± 40 % rel. ± 12 mg/kg ± 20 % rel. ± 100 mg/kg ± 10 % rel.
Gossypol	nad 500 mg/kg	± 20 % rel.
Rtuť mez stanovitelnosti 0,04 mg/kg	0,04 - 0,06 mg/kg 0,06 - 0,10 mg/kg 0,10 - 0,20 mg/kg 0,20 - 0,30 mg/kg nad 0,30 mg/kg	± 50 % rel. ± 0,03 mg/kg ± 30 % rel. ± 0,06 mg/kg ± 20 % rel.
Hořčičná sílice	bez rozdílu obsahu	± 20 % rel.
Druhá čistota	bez rozdílu obsahu	bez tolerance
Škodlivé nečistoty	bez rozdílu obsahu	bez tolerance
Vinylthiooxazolidon	bez rozdílu obsahu	± 20 % rel.
Metabolizovaná energie	bez rozdílu obsahu	± 0,3 MJ/kg

3. Výpočet tolerancí pro hodnocení obsahů doplňkových látek

Podle ustanovení vyhl. č. 194/1996 Sb. § 7, § 9 a § 13 platí pro hodnocení obsahů doplňkových látek v substancích, premixech a krmivech tolerance uvedené v příloze vyhlášky č. 6 (technologické tolerance) s přihlédnutím k analytickým tolerancím použitých metod zkoušení. Celková tolerance pro hodnocení obsahu doplňkových látek tedy vychází z kombinace technologické tolerance podle přílohy č. 6 B a analytické tolerance podle použité metody a zjistí se takto:

1. Pro hodnocení výsledků analýz, kde nalezený obsah je pod deklarovanou hodnotou, se celková tolerance vypočte podle vzorce

$$X = X_1 \cdot (100 : Y)$$

kde X je přípustný minimální obsah doplňkové látky

X_1 je deklarovaný obsah doplňkové látky po odečtení technologické tolerance

Y je analytická tolerance použité metody vyjádřená v 100 % (např. 110 %, 125 % ap.)

2. Pro hodnocení výsledků analýz, kde nalezený obsah je nad deklarovanou hodnotou, se celková tolerance vypočte podle vzorce

$$Z = Z_1 \cdot (100 : Y)$$

kde Z je přípustný maximální obsah doplňkové látky

Z_1 je deklarovaný obsah doplňkové látky po přičtení technologické tolerance

Y je analytická tolerance použité metody vyjádřená v 100 % (např. 105 %, 130 % ap.)

3. V případech, kdy jsou analytické tolerance vyjádřeny v jednotkách (event. v absolutních procentech), je nutné převést takový údaj na relativní procenta vztahená k deklarované hodnotě. V případech, kdy jsou technologické tolerance vyjádřeny v relativních procentech, je nutné takový údaj převést na jednotky, ve kterých je vyjádřena deklarovaná hodnota.

Úprava konečných vzorků k laboratornímu zkoušení

1. Krmiva, doplňkové látky a premixy se upravují podle požadavku na jejich zkoušení. Úprava vzorků se volí podle jejich konzistence, struktury, vlhkosti a obsahu tuku.

2. Konečný vzorek se důkladně promíchá na suché, hladké a čisté podložce. Pak se kvartací po rozprostření do nízké vrstvy a postupným odstraňováním dvou protilehlých částí děleného vzorku nebo pomocí mechanického děliče rozdělí na dva stejné díly. Podle hmotnosti konečného vzorku se dělení na dva stejné díly opakuje tak dlouho, až jeden díl odpovídá hmotnosti, nezbytné pro zkušební vzorek. Hmotnost zkušebního vzorku musí reprezentovat minimálně 100 g sušiny konečného vzorku.

Jestliže hmotnost konečného vzorku nepřesahuje 500 g sušiny vzorku, považuje se celý konečný vzorek za část, ze které bude připraven zkušební vzorek a nemusí být jeho hmotnost redukována.

U konečného vzorku, který nelze dokonale promíchat bez předchozí úpravy velikosti částic, je nutno nejdříve celý vzorek vhodně upravit tak, aby byl velikostí částic stejnorodý. Úpravy se mohou týkat předsušení, odtučnění, rozřezání apod.

3. Konečný vzorek mimo části, která byla vyčleněna jako zkušební vzorek, se uloží do vhodné, čisté, suché, vzduchotěsné uzavíratelné nádoby. Ponechá se bez úpravy a slouží pro smyslové nebo fyzikální zkoušky, případně pro mikroskopické vyšetření apod.

4. Zkušební vzorek se upravuje mletím podle § 8 vyhlášky.

5. Stanovuje-li se obsah původní vlhkosti konečného vzorku, je nutné ihned po otevření obalu vzorku oddělit část pro toto stanovení, nebyla-li již oddělena při vzorkování, a provést potřebnou úpravu.

6. Úprava konečného vzorku předsušením

Jestliže vlhkost konečného vzorku znemožňuje úpravu zkušebního vzorku mletím a nebo byl mletím ovlivněn některý ze sledovaných znaků, upravuje se konečný vzorek předsušením, pokud není v metodách zkoušení uvedeno jinak.

Pracovní postup:

Konečný vzorek se odsype na čistou vysoušecí misku a rozprostře se rovnoměrně po celé ploše tak, aby výška vrstvy byla max. 20 mm. Z konečného vzorku se odebírá takové množství, aby se předsušením získalo asi 200 g předsušeného vzorku.

Misky se vzorkem se suší při teplotě $55 \pm 5^\circ\text{C}$, až do získání pevné dritelné konzistence, přičemž se periodicky vzorek promíchává. Po předsušení se vzorek ponechá na misce vychladnout a asi 12 hodin kondicionovat, do rovnovážné laboratorní vlhkosti. Během sušení i kondicionace nesmí dojít ke ztrátám rozprášením nebo k nežádoucímu znečištění vzorku.

Z takto upraveného konečného vzorku se upraví zkušební vzorek podle postupu, uvedeného v § 8 této vyhlášky.

7. Úprava konečného vzorku odtučněním

U suchých vzorků s relativně vysokým obsahem tuku je nutné před vlastní přípravou provést jejich odtučnění částečnou extrakcí:

7.1 Podstatou tohoto způsobu úpravy je částečné odtučnění vzorku za účelem snížení obsahu tuku. Větší podíl tuku se odextrahuje diethyletherem, petroletherem nebo hexanem a rozbor vzorku se provede v částečně odtučněném vzorku. Obsahy složek, zjištěné rozбором částečně odtučněného vzorku, se přepočtou na obsahy v konečném neodtučněném vzorku.

7.2 K odtučnění vzorku se používá extrakční zařízení v bezpečnostním provedení (Soxhlet apod.).

7.3 Pracovní postup:

Množství konečného vzorku, potřebné k provedení zkoušek, se odváží s přesností nejméně na 0,01 g (m_0) na filtrační papír, umístěný v nálevce. Pod nálevku se umístí extrakční baňka, předem vysušená (1 hod. při 98°C) a po ochlazení v exsíkátoru zvážená s přesností nejméně na 0,001 g. Vzorek v nálevce se asi 3x po sobě promyje za stálého míchání po cca 30 ml extrakčního činidla a extrakty se jímají společně a kvantitativně do podložené extrakční baňky. Potom se vzorek z nálevky vyjme a kvantitativně vysuší volně na vzduchu. Připraví se zkušební vzorek, ze kterého se provedou požadovaná stanovení včetně obsahu sušiny (S_2) a zbytkového tuku (m_3). Stanovené obsahy v % se přepočítají na obsahy v původním konečném vzorku (viz výpočet). Nálevka se ještě nejméně jedenkrát promyje důkladně po stěnách (kvantitativní vymytí tuku) asi 30 ml extrakčního činidla do podložené extrakční baňky, hlavní podíl extrakčního činidla se oddestiluje a zbytek nechá volně odpařit. Extrakt v baňce se vysuší 1 hodinu při 98°C a po ochlazení v exsíkátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_2).

Kromě toho se provede i v původním neodtučněném vzorku stanovení sušiny (S) podle postupu, uvedeném v příloze 9 část 1 této vyhlášky.

7.4 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah tuku v konečném (neodtučněném) vzorku v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = 10^3 \cdot \left(\frac{m_1}{m_0} + \frac{m_3 \cdot S}{m_2 \cdot S_2} - \frac{10^3 \cdot m_1 \cdot m_3}{m_0 \cdot m_2 \cdot S_2} \right)$$

Obsah složky A v konečném (neodtučněném) vzorku v g/kg (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = A \cdot \left(\frac{S}{S_2} - \frac{10^3 \cdot m_1}{m_0 \cdot S_2} \right)$$

kde m_0 je navážka konečného (neodtučněného) vzorku v g
 m hmotnost vyextrahovaného tuku při částečné extrakci v g
 m_2 navážka zkušebního (částečně odtučněného) vzorku v g
 m_3 hmotnost vyextrahovaného tuku ze zkušebního (částečně odtučněného) vzorku v g;
 S_2 obsah sušiny ve zkušebním (částečně odtučněném) vzorku v g/kg;
 S obsah sušiny v konečném (původním) neodtučněném vzorku v g/kg
 A obsah složky A ve zkušebním (částečně odtučněném) vzorku v g/kg.

8. Úprava konečného vzorku předsoušením s nasávací hmotou

8.1 Postup se používá u vzorků řidké konzistence, u kterých vysoký obsah tuku neumožňuje přímé předsoušení. Vzorek se upraví vhodným nasávacím materiálem např. piliny z tvrdého dřeva (nejlépe bukové), předem zanalyzované na obsahy všech složek, které mají být stanoveny.

Podstatou tohoto způsobu úpravy je nasátí tukové složky krmiva do nasávací hmoty, která tuk neobsahuje a tím snížení poměrného zastoupení tuku ve vzorku. Nasávací hmota musí v co nejmenším podílu obsahovat složky, které budou zkoušeny. Pokud bude konečný vzorek dále upravován mletím, nesmí nasávací hmota poškozovat mlecí zařízení (např. písek). Obsahy složek, stanovených ve směsi vzorku a nasávací hmoty musí být přepočítány na obsahy v konečném vzorku.

8.2 Pracovní postup:

Konečný vzorek se odváží v množství 200–400 g s přesností nejméně na 0,1 g (m_0) do předem vysušené (1 hodinu při 55 °C) a po ochlazení se stejnou přesností zvážené misky. Hmotnost odvažovaného vzorku se volí podle odhadnutého obsahu vlhkosti, čím je vzorek vlhčí, tím je přídavek nasávací hmoty vyšší. Vzorek se na misce rozloží tak, aby výška vrstvy byla stejnoměrná asi 20 mm. K tomuto vzorku se naváží se stejnou přesností asi 50 až 150 g (m_1) dobře promíchané nasávací hmoty. Směs se důkladně promíchá skleněnou tyčinkou (kvantitativně) a suší se při 55 ± 5 °C do získání pevné a drtitelné konzistence. Pokud se směs špatně suší, přiváží se další podíl (sečíst s m_1) nasávací hmoty. Množství nasávací hmoty se volí s ohledem na konzistenci materiálu vzorku, zvláště zjevný obsah tukové složky. Nasávací hmotu je nutno přidávat jen v minimálně potřebném množství, protože zvyšujícím množstvím se snižuje přesnost rozboru zejména u složek, které jsou v nasávací hmotě obsaženy ve větším množství vzhledem k očekávanému obsahu (u pilin např. vláknina). Obvykle se postupuje tak, že se zprvu přiváží jen asi 50 g nasávací hmoty a po rozmíchání a občasném promíchání během sušení (vždy kvantitativně tyčinkou) se nechá vzorek předsoušet a teprve, když se směs nadále špatně suší (např. po 12 hod.), se přiváží další podíl a v sušení se pokračuje. Po předsušení se vzorek ponechá při laboratorní teplotě po dobu nejméně 12 hodin (kondicionace) a pak zváží s přesností nejméně na 0,1 g (m_2). Celý vzorek se upraví mletím podle postupu, uvedeného v § 8 této vyhlášky s tím, že je nutné provést rozmletí celé předsušené směsi (homogenizace). Potom se vzorek opět nechá kondicionovat při laboratorní teplotě minimálně 2 hodiny. Tím je připraven zkušební vzorek, ze kterého se provedou potřebné zkoušky.

8.3 Výpočet a vyjádření výsledků:

Obsah složky A v laboratorním (původním) vzorku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{A_2 \cdot m_2 - A_1 \cdot m_1}{m_0}$$

kde m_0 je hmotnost odváženého konečného vzorku v g
 m_1 celková přivážená hmotnost nasávací hmoty v g
 m_2 hmotnost směsi, vysušené při 55 ± 5 °C a kondicionované v g
 A_1 obsah složky A v nasávací hmotě v g/kg
 A_2 obsah složky A ve zkušebním vzorku (předsušené směsi) v g/kg

9. Úprava konečného vzorku mixováním.

Pokud se krmivo zkouší v původním stavu bez předsoušení a má tekutou nebo pastovitou strukturu, provede se úprava vzorku

mixováním. Mixuje se tak dlouho, až nejsou patrné zjevné rozdíly ve velikosti částic nebo v různorodosti materiálu. Konečný vzorek se po rozmíchání ihned převede do odměrného válce a určí jeho objem. Polovina objemu vzorku se převede za stálého míchání zpět do mixéru a krátkodobě se promíchá. Zbytek z odměrného válce se převede do vzorkovnice pro uchování vzorku. Do prázdného odměrného válce se opět převede další rozmíchaná část vzorku a takto se pokračuje až po docílení potřebného množství vzorku ke zkoušení. Tento se pak převede do zkušební nádoby jako zkušební vzorek: Takto upravený vzorek je připraven k předsoušení nebo k vlastnímu zkoušení v původním stavu.

10. Úprava konečného vzorku drcením

Pokud krmivo vykazuje hrudkovitou strukturu nebo je ve formě granulí nebo výlisků, které zabraňují předsoušení nebo mletí, provede se úprava drcením.

11. Úprava konečného vzorku s obsahem močoviny

Pokud krmivo obsahuje více než 5 g močoviny v 1 kg, upravuje se celý nezměněný konečný vzorek mletím podle postupu, uvedeném v § 8 vyhlášky. Zkušební vzorek se získá po promíchání a následně kvartaci vzorku upraveného mletím.

12. Úprava konečného vzorku živočišného nebo rostlinného tuku a oleje

12.1 Zkušební vzorek se získá, je-li to nezbytné, po zahřátí konečného vzorku na vhodnou teplotu. Jestliže to postup zkoušky požaduje, izolují se nerozpustné částice filtrací a voda se odstraní sušením bezvodým síranem sodným (poznámka 13.1). Metoda není použitelná pro emulgované tuky.

12.2 Pracovní postup

12.2.1 Míchání a filtrace

a) Kapalně vzorky čiré, bez sedimentu:

laboratorní vzorek se protřepáním v uzavřené nádobě dokonale zhomogenizuje.

b) Kapalně vzorky zakalené nebo obsahující sediment:

pro zkoušení

- vlhkosti a těkavých látek
- nerozpustných nečistot
- hmotnosti na jednotku objemu (hustoty)
- dalších zkoušek, vyžadujících použití nefiltrovaných nebo nezahřátých vzorků

Nádoba, obsahující konečný vzorek, se intenzivně protřepává, dokud není sediment úplně oddělen od stěn nádoby. Vzorek se ihned přelije do jiné nádoby a zkontroluje se, zda sediment nezůstal na stěnách původní nádoby. V kladném případě, je-li to nutné, jej úplně odstraníme a připojíme jej k hlavní části vzorku.

c) pro všechny další zkoušky (u kterých může být vzorek zahříván) se nádoba obsahující konečný vzorek umístí do sušárny, nastavené na 50 °C, ponechá se v sušárně, dokud vzorek nedosáhne této teploty a potom se postupuje jako u kapalných vzorků čirých bez sedimentu. Není-li vzorek po zahřátí a promíchání úplně čirý, zfiltruje se v sušárně, nastavené na 50 °C, nebo pomocí ohříváné filtrační nálevky. Vzorek se nenechává v sušárně déle než je nezbytné, aby se zabránilo změně tukových složek oxidací nebo polymerací. Filtrát by měl být úplně čirý.

d) pevné vzorky

Pro zkoušky uvedené v bodě 12.2.1.b se konečný vzorek opatrně ohřívá, dokud není dobře mísitelný a důkladně se promíchá, aby byl homogenní. Pro všechna ostatní stanovení se konečný vzorek roztaví v sušárně, nastavené na teplotu nejméně 10 °C nad bodem tání tuku nebo oleje. Jestliže je vzorek po zahřátí úplně čirý, postupuje se jako u kapalných vzorků čirých bez sedimentu. Je-li zakalený nebo obsahuje-li sediment, zfiltruje se při vybrané teplotě v sušárně nebo pomocí vyhřívané filtrační nálevky. Filtrát by měl být zcela čirý.

12.2.2 Sušení

Jestliže promíchaný vzorek ještě obsahuje vlhkost, zvláště v případě kyselých olejů, mastných kyselin a tuhých tuků, měl by být vysušen pro ta stanovení, ve kterých mohou být výsledky ovlivněny přítomností vlhkosti (např. jodové číslo), při zachování nezbytné opatrnosti, aby bylo zabráněno oxidaci. Pro tyto účely se suší část důkladně promíchaného vzorku v sušárně po co nejkratší možnou dobu, při teplotě 10 °C nad bodem tání, nejlépe pod dusíkem po přidání bezvodého síranu sodného v poměru 1 až 2 g na 10 g oleje nebo tuku. Sušení nesmí probíhat při teplotě přesahující 50 °C. Ohřívání vzorek se intenzivně míchá s bezvodým síranem sodným a potom se zfiltruje. Jestliže tuk nebo olej tuhnou při ochlazení, provádí se filtrace v sušárně nebo pomocí vyhřívané filtrační nálevky při přiměřené teplotě, která by neměla přesáhnout 50 °C.

13. Poznámky

13.1 Síran sodný ztrácí své vlastnosti jako vysoušecí prostředek při teplotě nad 32,4 °C. Potom může být nutné sušení za vakua. Tuky, které vyžadují teplotu sušení vyšší než 50 °C, by měly být rozpuštěny v rozpouštědle a potom sušeny.

Příloha č. 9 k vyhlášce č. 222/1996 Sb.

Postupy pro laboratorní zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů

Seznam postupů chemického zkoušení krmiv

Název postupu

1 Vlhkost, těkavé látky

- 1.1 Stanovení vlhkosti v krmivech
- 1.2 Stanovení vlhkosti a těkavých látek v tucích
- 1.3 Stanovení vlhkosti a obsahu těkavých látek v olejnatých semenech

2 Dusíkaté sloučeniny

- 2.1 Stanovení obsahu dusíkatých látek
- 2.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové
- 2.3 Stanovení obsahu bílkovin
- 2.4 Stanovení obsahu aminokyselin
- 2.5 Stanovení obsahu močoviny
- 2.6 Stanovení obsahu amoniaku v rybích moučkách
- 2.7 Stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek (nebílkových dusíkatých látek)
- 2.8 Stanovení aktivity ureázy v produktech s obsahem soji
- 2.9 Ureázový test
- 2.10 Stanovení obsahu biuretu
- 2.11 Stanovení obsahu alimetu (hydroxyanalog methioninu)

3 Tuk

- 3.1 Stanovení obsahu tuku
- 3.2 Stanovení obsahu tuků v olejnatých semenech
- 3.3 Stanovení čísla kyselosti tuku
- 3.4 Stanovení obsahu lecitinu
- 3.5 Stanovení obsahu nerozpustných nečistot
- 3.6 Stanovení obsahu nezmýdelnitelných látek
- 3.7 Stanovení peroxidového čísla

4 Polysacharidy

- 4.1 Stanovení obsahu vlákniny

5 Bezduškaté látky výtahové

- 5.1 Stanovení obsahu škrobu
- 5.2 Stanovení obsahu škrobu – pankreatický postup
- 5.3 Stanovení obsahu cukrů
- 5.4 Stanovení obsahu laktosy
- 5.5 Stanovení obsahu bezduškatých látek výtahových výpočtem
- 5.6 Stanovení obsahu cukrů polarizací
- 5.7 Stanovení obsahu redukujících látek

6 Popel

- 6.1 Stanovení obsahu popele
- 6.2 Stanovení obsahu popele v tucích
- 6.3 Stanovení nerozpustného podílu popele v kyselině chlorovodíkové

7 Makroelementy

- 7.1 Stanovení obsahu celkového fosforu
- 7.2 Stanovení obsahu vápníku
- 7.3 Stanovení obsahu hořčíku
- 7.4 Stanovení obsahu drásíku
- 7.5 Stanovení obsahu sodíku
- 7.6 Stanovení obsahu ve vodě rozpustných chloridů
- 7.7 Stanovení obsahu celkových uhličitánů

- 7.8 Stanovení obsahu SiO_2 , R_2O_3 , CaO a MgO (ve vápencích)
7.9 Stanovení celkového obsahu síry

8 Mikroelementy

- 8.1 Stanovení obsahu mědi, železa, manganu a zinku
8.2 Stanovení obsahu mědi, železa, manganu, a zinku včetně obsahu vápníku, hořčíku, draslíku a sodíku

9 Kyselost

- 9.1 Stanovení volné, vázané a celkové kyselosti vodního výluhu
9.2 Stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích

10 Nežádoucí látky

- 10.1 Stanovení obsahu alkaloidů v lupině
10.2 Stanovení obsahu kyanovodíku
10.3 Stanovení obsahu hořčičného oleje
10.4 Stanovení obsahu theobrominu
10.5 Stanovení obsahu glukosinolatů v řepce
10.6 Stanovení obsahu 5-vinyl-2-thiooxazolidonu (goitrinu)
10.7 Stanovení obsahu kyseliny erukové
10.8 Stanovení obsahu olova a kadmia
10.9 Stanovení obsahu ricinu
10.10 Stanovení obsahu fluoru
10.11 Stanovení obsahu reziduí organochlorových a organofosfátových pesticidů
10.12 Stanovení obsahu hexachlorbenzenu
10.13 Stanovení obsahu dusitanů
10.14 Stanovení obsahu rtuti
10.15 Stanovení obsahu aflatoxinu B2
10.16 Stanovení obsahu arsenu
10.17 Stanovení obsahu gossypolu

11 Zkoušení siláží

- 11.1 Zkoušení jakosti siláží

1.1 Stanovení obsahu vlhkosti v krmivech

1. Účel a rozsah

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/7L.

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení vlhkosti v krmivech a premixech.

Metoda je použitelná pro stanovení vlhkosti všech druhů krmiv s výjimkou mléka a mléčných výrobků, určených k přímému krmení a olejnatých semen. Obsahuje modifikace pro stanovení vlhkosti v krmivech s obsahem močoviny, tuků a olejů, jakož i směsí s obsahem většího podílu minerálních látek s obsahem krystalické vody.

2. Princip

Obsah vlhkosti se stanoví vázkově jako úbytek po vysušení vzorku při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$, u vlhkých nebo zvlášť vyjmenovaných krmiv po předsušení při 50 až 60°C za předepsaných podmínek.

Ve zvláštních případech při vysušení za sníženého tlaku při 80°C .

3. Chemikálie

3.1 Písek mořský

Úprava: Mořský písek se nejprve vyvaří v kyselině chlorovodíkové, zředěné (1 + 3), a potom se propere vodou do negativní reakce na chloridy. Vypraný písek se vysuší po dobu 6 až 8 hod při 103°C , potom přechází 2 hod při 550°C a po vychladnutí se uchovává ve vzorkovnici z neprodyšného materiálu.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Sušárna elektrická atmosférická s automatickou regulací teploty v mezích $\pm 2^\circ\text{C}$, s možností odvětrávání a teploměrem pro hodnoty teplot nejméně do 150°C
4.2 Sušárna elektrická vakuová, umožňující snížení tlaku na 13 kPa, opatřená termostatem, vakuovým čerpadlem, dále buď zařízením pro zavádění horkého vzduchu nebo vloženým desikantem (oxidem vápenatým – 300 g na 20 vzorků) a s teploměrem pro hodnoty teplot nejméně do 100°C
4.3 Vysoušečka zhotovená z nekorodujícího kovu nebo skla s dobře těsnícím víčkem a plochou, která umožňuje rozprostít asi 0,3 g vzorku na 1 cm^2
4.4 Misky vysoušecí s plochým dnem, vhodných velikostí a z materiálů odolných vůči teplotám do 100°C a inertním vůči vlhkosti

5. Postup zkoušky

5.1 Suchá či předsušená krmiva (poznámka 8.1)

5.1.1 Do vysoušečky (4.3), předem včetně víčka vysušené (při 103°C po dobu 30 min) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g, se odváží asi 5 g (m_2) zkušební vzorku se stejnou přesností a vzorek se ve vysoušečce rovnoměrně rozprostře.

5.1.2 Vysoušečka (4.3) se vzorkem se vloží do atmosférické sušárny (4.1), předem vyhřáté na teplotu $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$, odklopí se víčko a od okamžiku, kdy vnitřní prostor sušárny dosáhne opět výše uvedené teploty, se suší po dobu 4 hod.

Krmiva s aditivním obsahem močoviny (poznámka 8.2) se suší po dobu 6 hod. při teplotě $(75 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Vzorky obilovin, obilného šrotu, krupice a mouky se suší při teplotě $(130 \pm 2)^\circ\text{C}$ po dobu 2 hod.

Vysoušečky (4.3) se vkládají do vyhřáté sušárny (4.1) dostatečně rychle, aby nedošlo k většímu poklesu teploty. Do sušárny se vkládá jen takový počet vysoušeček se vzorky, aby na jednu připadlo nejméně asi 1000 cm^3 prostoru. Po uplynutí předepsané doby se vysoušečka (4.3) vyjme ze sušárny, přiklopí víčkem a po vychladnutí v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_3). Po odvážení vysoušečky (4.3) se provede kontrolní test (poznámka 8.3) tak, že vysoušečka (4.3) se vzorkem se vloží opět do sušárny (4.1) vyhřáté na teplotu $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ a suší odklopeným víčkem další 2 hod. Po vyjmutí ze sušárny (4.1) se okamžitě přiklopí víčkem, ochladí v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností.

Jestliže rozdíl mezi předešlým a tímto vážením nepředstavuje více než odpovídá obsahu vlhkosti 0,2 %, stanovení je ukončeno a jako konečná hmotnost se bere hmotnost v prvním vážení (m_3).

Je-li rozdíl mezi oběma váženými vyšší než výše uvedená hodnota, provede se znovu stanovení za sníženého tlaku podle 5.2 (poznámka 8.4).

5.1.3 U krmiv tekutých, pastovitých nebo s vyšším obsahem tuku (nad 80 g/kg) se postupuje následovně: Do vysoušečky (4.3) se odváží nejdrív asi 5 až 10 g mořského písku (3.1) (podle míry mastného vzhledu vzorku), vloží krátká skleněná tyčinka, vysoušečka (4.3) se vysuší (30 min. při 130 °C) v sušárně (4.1) a po ochlazení v exsikátoru se včetně tyčinky zváží s přesností nejméně na 0,001 g.

Do takto připravené vysoušečky (4.3) se odváží asi 10 g (m_2) zkušebního vzorku, s výše uvedenou přesností, vzorek se důkladně promíchá s pískem tak, aby nedošlo ke ztrátám vzorku (ani písku) a předsuší se nejprve 30 minut při 60 °C. Dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2 Krmiva, jejichž vzorky nevyhověly kontrolnímu testu

Do vysoušečky (4.3), předem včetně víčka vysušené (při 130 °C po dobu 30 min) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g se odváží asi 5 g (m_2) zkušebního vzorku se stejnou přesností a vzorek se ve vysoušečce rovnoměrně rozprostře.

Vysoušečka se vzorkem se vloží do vakuové sušárny (4.2), vyhřáté na 80 °C až 85 °C, víčko se odklopí a po uzavření sušárny se sníží tlak na 13 kPa. Vysoušečky (4.3) se vkládají do sušárny (4.2) dostatečně rychle, aby nedošlo k podstatnému snížení teploty v sušárně.

Vzorek se suší buď za přítomnosti horkého, vysušeného vzduchu nebo za přítomnosti desikantu, v množství asi 300 g na 20 vzorků. V druhém z uvedených případů (desikant) se po dosažení předepsaného tlaku odpojí čerpadlo. Od okamžiku, kdy teplota při předepsaném tlaku dosáhne 80 °C až 85 °C, se suší po dobu 4 hodiny. Po uplynutí této doby se snížený tlak vnitřního prostoru sušárny (4.2) pomalu vyrovnává s atmosférickým, po vyrovnání tlaků se sušárna (4.2) otevře, vysoušečka (4.3) se uzavře víčkem a vloží do exsikátoru, kde se ponechá asi 45 min. Potom se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_3) a opět vloží do vakuové sušárny (4.2), vyhřáté na výše uvedenou teplotu. Suší se dalších 30 minut a po ochlazení v exsikátoru se znovu zváží s výše uvedenou přesností. Dosoušení, ochlazování a vážení vysoušečky (4.3) se vzorkem se opakuje tolikrát, pokud dvě po sobě následující vážení nevykazují diferenci menší než odpovídá obsahu vlhkosti 0,2 %. Jako konečná hmotnost vysušeného vzorku (m_3) se bere poslední, po níž již nenastal výše uvedený úbytek hmotnosti.

5.3 Krmiva s obsahem vlhkosti nad 17,0 %, krmné směsi s obsahem nad 13,5 % a všechna lisovaná krmiva

Hermeticky uzavřená část konečného vzorku odebraná zvlášť pro stanovení původního obsahu vlhkosti, popř. přímo konečný vzorek zjevně zvlhlý, se upraví co nejrychleji na zkušební vzorek tak, aby nedošlo k podstatnému úbytku vlhkosti a okamžitě se odvažuje zkušební vzorek.

Z takto upraveného zkušebního vzorku se odváží asi 10 až 100 g (poznámka 8.5) s přesností nejméně na 0,01 g až na 0,1 g (m_0) do misky s plochým dnem (4.4), předem vysušené (při 60 °C až 70 °C) a po ochlazení zvážené s výše uvedenou přesností. Zkušební vzorek se rovnoměrně rozprostře do vrstvy asi 10 mm a suší v atmosférické sušárně (4.1) při teplotě 60 °C až 70 °C do dosažení zdánlivě suché hmoty (obsah vlhkosti 8,0 až 12,0 %).

Potom se miska (4.4) se vzorkem vyjme, ponechá po dobu asi 12 hod volně na vzduchu při teplotě laboratoře za účelem vyrovnání vlhkosti s okolní atmosférou (kondicionace), přičemž se vzorek chrání před rozptýlením či zaprášením nebo přimísením cizích

hmot a pak se zváží s přesností nejméně na 0,01 až 0,1 g (poznámka 8.5) (m_1). Po zvážení se ihned celý vzorek rozeleme a dále se postupuje podle 5.1 této metody.

Zrna obilovin s obsahem vlhkosti vyšším než 17,0 % se odvažují neseleté, pouze hrubě rozmělněné v množství asi 50 g a s přesností nejméně na 0,01 g (m_0) na misku vhodné velikosti (4.4), předem vysušenou při 130 °C po dobu 30 min. a po ochlazení zváženou se stejnou přesností, suší se v sušárně (4.1) při 130 °C po dobu nejméně 5 až 6 min. ve vrstvě asi 0,5 cm, potom se ponechá při laboratorní teplotě 2 h a zváží se s přesností nejméně na 0,01 g (m_1). Po zvážení se celý vzorek rozeleme a dále se postupuje podle 5.1 pouze s tím rozdílem, že se vzorek suší při teplotě (130 ± 2) °C po dobu 2 hod.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vlhkosti v % (X) se vypočítá podle vzorce:

6.1 Bez předsoušení (viz 5.1 a 5.2)

$$X = (m_2 - m_1) \cdot \frac{100}{m_2}$$

6.2 S předsoušením (viz 5.3)

$$X = \left(1 - \frac{m_1 \cdot m_3}{m_0 \cdot m_2} \right) \cdot 100$$

kde m_0 je hmotnost navážky vzorku k předsoušení v g
 m_1 hmotnost navážky předsušeného vzorku po vyrovnání vlhkosti (kondicionaci) v g
 m_2 hmotnost navážky vzorku pro sušení podle 6.1 a 6.2 v g
 m_3 hmotnost navážky vzorku po vysušení podle 6.1 a 6.2 v g

Obsah sušiny v % (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = 100 - X$$

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na desetiny %.

Pokud jsou ostatní složky krmiva stanoveny při rozdílném obsahu vlhkosti, je nutné je přepočítat na obsah vlhkosti v původním vzorku.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí pro všechny obsahy překročit 0,2 %.

8. Poznámky

8.1 Krmiva s vyšším obsahem vlhkosti než 17,0 % krmné směsi s vyšším obsahem vlhkosti než 13,5 % a všechna lisovaná krmiva se zkoušejí podle 5.3. Podle 5.1 se zkoušejí vzorky zdánlivě suché či předsušené.

8.2 Aditivním obsahem močoviny se rozumí obsah nad 5 g/kg.

8.3 Kontrolní test se provádí za účelem zjištění, zda během sušení

vzorku nedochází k nepřiměřeným ztrátám hmoty navíc v důsledku případných chemických reakcí, např. Maillardovy apod.

Zjištění uvedené hodnoty úbytku je důkazem nežádoucích změn. Při kontrolním testu u tučných vzorků se doba sušení zkracuje na 30 min. a úbytek po sušení nemá být vyšší, než odpovídá obsahu vlhkosti 0,1 %.

8.4 Stanovení za sníženého tlaku přichází v úvahu zejména u krmiv, obsahující vyšší obsah sacharosy nebo laktosy než 40 g/kg, jako jsou hydrolyzovatelné produkty, sladové klíčky, sušené bramborové zdrtky, ryby, cukerné roztoky a krmné směsi, obsahující více než 250 g/kg minerálních solí, obsahujících krystalicky vázanou vodu.

8.5 Hmotnost vzorku se volí podle předpokládaného nebo odhadnutého obsahu vlhkosti tak, aby hmotnost předsušeného vzorku byla nejméně 15 g. Přesnost navážky vzorku se snižuje s rostoucí hmotností vzorku až na 0,1 g. Pokud se stanovení vlhkosti spojuje s předsušením vzorku při jeho přípravě, pak se odvažuje takové množství vzorku, aby předsušený vzorek měl hmotnost alespoň 200 g.

1.2 Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v tučích

1. Účel a rozsah

Tato metoda určuje postup stanovení vlhkosti a těkavých látek v tučích.

2. Princip

Obsah vlhkosti a těkavých látek se odpaří sušením při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ a úbytek hmotnosti se stanoví vázkově.

3. Chemikálie

3.1 Písek mořský, suchý, čistý a vyžíhaný nebo křemičitý písek vyvařený v kyselině chlorovodíkové, promytý, vysušený, prosátý a vyžíhaný.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Hliníková vysoušečka, příp. hliníková miska s víčkem

4.2 Sušárna atmosférická s termostatem

5. Postup

Hliníková vysoušečka (4.1) s 15 až 20 g písku (3.1) a krátkou skleněnou tyčinkou se suší při 130°C (asi 30 minut), vloží se do exsikátoru (2.2) a po vychladnutí se přesně zváží. Potom se do ní přesně naváží asi 3 g zkušebního vzorku s přesností na 0,001 g a suší se v sušárně (4.3) při 105°C . Během sušení se obsah misky několikrát promíchá skleněnou tyčinkou.

Úbytek hmotnosti se kontroluje poprvé za 1 h a dále v půlhodinových intervalech až do dosažení konstantní hmotnosti.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vlhkosti a těkavých látek v % (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{100 \cdot m_1}{m}$$

kde m_1 je úbytek hmotnosti v g
 m hmotnost navážky vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na desetiny %.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 2 %	10 % relativních
nad 2 %	0,2 % abs.

1.3 Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v olejnatých semenech

1. Účel a rozsah

Tato metoda určuje postup stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek v olejnatých semenech.

2. Princip

Stanovení obsahu vlhkosti a těkavých látek se provádí buď z materiálu tak, jak byl získán (čistá semena a nečistoty) nebo pokud je to požadováno ze samotných čistých semen, sušením při teplotě $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ v sušárně při atmosférickém tlaku do konstantní hmotnosti, vázkově.

3. Chemikálie

3.1 Písek mořský, suchý, čistý a vyžíhaný nebo křemičitý písek vyvařený v kyselině chlorovodíkové, promytý, vysušený, prosátý a vyžíhaný.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mlýnek mechanický, snadno čistitelný

4.2 Analytické váhy

4.3 Struhadlo mechanické nebo ruční

4.4 Hliníková vysoušečka, nebo hliníková miska s víčkem

4.5 Sušárna atmosférická s termostatem

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

5.1.1 Pro zkoušku se použije vzorek tak, jak byl získán nebo po odstranění nečistot. Pokud se pracuje se vzorkem, ze kterého byly předem odstraněny velké neolejnaté částice, je nutno to zohlednit při výpočtu (viz. 6.2).

V případě semene kopry se vzorek upravuje mechanickým struhadlem celý nebo ručním struhadlem (4.3) v takovém množství, aby byl co nejvíce reprezentativní. Délka částic může být větší než 2 mm, ale nemá být větší než 5 mm. Částice je nutno promíchat a zkoušku provést bez prodloužení.

5.1.2 Semena střední velikosti (podzemnice, sója apod.), kromě semen saflóru (světlice barvířská), slunečnice a bavlínku a s přilehlými vlákny, se vzorek šrotuje v mechanickém mlýnku (4.1), který byl před použitím dobře vyčištěn, tak dlouho dokud hlavní rozměr částic neklesne pod 2 mm. Větší částice (přibližně jedna dvacatina vzorku) se vyřadí, zbytek se pečlivě promíchá a stanovení vlhkosti a těkavých látek se provede bez prodloužení.

5.1.3 Malá semena (len, řepka, konopí apod.) stejně jako semena saflóru, slunečnice či bavlínku se zkouší bez předchozího mletí (v původním stavu).

5.2 Vlastní stanovení

Hliníková vysoušečka (4.4) se suší v sušárně (4.5) při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ (asi 1/2 h), vloží se do exsikátoru a po vychladnutí se přesně zváží. Potom se do ní přesně naváží buď:

a) asi 5 g nastrohaného vzorku (v případě kopry) nebo rozemletého vzorku (v případě semen střední velikosti s výjimkou semen saflóru, slunečnice či bavlínku s přilehlými vlákny)

b) asi 5 až 10 g celých semen (v případě malých semen a semen saflóru, slunečnice či bavlínku s přilehlými vlákny).

Vzorek se rovnoměrně rozprostře po celém dně misky (4.4) suší se v sušárně (4.5) při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$. Po 3 hodinách sušení (s výjimkou semen bavlínku s přilehlými vlákny, která se suší 12 až 16 hodin) se sušárna otevře, miska (4.4) se vzorkem se ihned uzavře víčkem a vloží do exsikátoru. Jakmile miska (4.4) se vzorkem dosáhne laboratorní teploty, přesně se zváží. Miska bez víčka se znovu vloží do sušárny a celý postup s uzavřením misky (4.4), chlazením a vážením se opakuje po jedné hodině sušení za stejných podmínek. Pokud je rozdíl mezi dvěma váženími menší nebo roven 0,005 g (při navážce 5 g), považuje se stanovení za ukončené. Pokud je rozdíl větší, pokračuje se v sušení.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Obsah vlhkosti a těkavých látek v % (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{100 \cdot m_1}{m}$$

kde m je hmotnost navážky vzorku v g
 m_1 úbytek na hmotnosti v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v % s přesností na jedno desetinné místo.

6.2 Pokud byly ze vzorku před zkouškou odstraněny velké neolejnaté částice (viz. 5.1.1) násobí se výsledek získaný podle 6.1 faktorem F

$$F = \frac{(100 - Y)}{100}$$

kde Y je obsah odstraněných velkých částic (nečistot) ze vzorku, tak jak byl získán v %.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v % s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí být větší než 0,2 %

2.1 Stanovení obsahu dusíkatých látek

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 123, 29/05/72 a L 179, 22/07/93

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dusíkatých látek v krmivech.

Metoda stanovení dusíkatých látek je použitelná pro všechny obsahy ve všech druzích krmiv a nerozlišuje proteinový a neproteinový dusík. Neproteinový dusík je nutno stanovit zvlášť příslušnými metodami. Uzanční faktor pro přepočet obsahu dusíku na dusíkaté látky je „6,25“ (poznámka 8.1)

Za podmínek této metody se nestanoví dusík v dusičnanech, dusitanech, popř. azo- nebo hydrazosloučeninách.

2. Princip

Dusíkaté látky se stanoví titračně alkalimetry (acidimetry) po mineralizaci vzorku horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru převedením na síran amonný, vytěsněním amoniaku hydroxidem sodným a jeho předestilováním do kyseliny sírové (borité).

3. Chemikálie

3.1 Katalyzátory: Oxid měďnatý (CuO) nebo Síran měďnatý, pentahydrát ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

3.2 Indikátory

Směsný: 2,0 g methylové červení a 1,0 g methylenové modři se rozpustí v 1000 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

Methylová červen: 0,30 g methylové červení se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

3.3 Kyselina sírová, konc. ($h = 1,84 \text{ g/ml}$)

3.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ nebo $0,05 \text{ mol/l}$

3.5 Hydroxid sodný, roztok 400 g/l ($h = 1,36 \text{ g/ml}$)

3.6 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$ a $0,1 \text{ mol/l}$

3.7 Kyselina boritá, roztok 4 %

3.8 Síran draselný, pevný

3.9 Sacharosa

3.10 Acetanilid (bod tání 114 °C) s obsahem 10,36 % dusíku, tj. 64,75 % dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce.

3.11 Tryptofan (bod tání 282 °C), s obsahem 13,72 % dusíku, tj. 85,75 % dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce.

Všechny použité chemikálie (mimo acetanilid a tryptofan) i zkušební pomůcky musí být prosté dusíku.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Zařízení mineralizační vhodné konstrukce

4.2 Zařízení destilační vhodné konstrukce (poznámka 8.2)

4.3 Baňky nebo tuby mineralizační vhodné velikosti (baňky se doporučují podle Kjeldahla 500 až 750 ml)

4.4 Papírek pH

4.5 Varná tělíska (pemza granulovaná, střípky skleněné či porcelánové)

4.6 Odpeňovací prostředek (např. parafin či silikonový olej)

5. Postup

Do mineralizační baňky nebo tuby (4.3) se odváží asi 0,5 až 1 g (poznámka 8.3) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 10 g síranu draselného (3.8) a jako katalyzátor (3.1) přiměřeně naváže 0,3 až 0,4 g oxidu měďnatého nebo 0,9 až 1,2 g pentahydrátu síranu měďnatého. Potom se přidá konc. kyselina sírová (3.3) v množství 25 ml, zamíchá a umístí do mineralizačního zařízení (4.1). Baňka se umísťuje nakloněná od 30 do 45°, tuba do mineralizačních bloků, kde je zaručen konstantní ohřev, ve svislé poloze.

Potom se baňka (tuba) (4.3) mírně zahřívá tak, aby se zabránilo vztlínání pěny do hrdla baňky a případnému úniku vzorku z baňky (tuby). Doporučuje se před začátkem zahřívání přidat menší množství odpeňovacího prostředku (4.6). V mírném zahřívání s občasným promícháním se pokračuje tak dlouho, dokud zcela nevymizí pěna a veškerá hmota vzorku je zkarbonizovaná, až v podstatě do ustálení varu kapaliny. Potom se intenzita zahřívání zvýší a seřídí tak, aby výpary kyseliny sírové kondenzovaly poblíže středu hrdla baňky a aby nedocházelo k podstatným změnám v objemu kyseliny i ulpívání částic vzorku na stěnách baňky (tuby). Během mineralizace nesmí docházet k přehřívání stěn baňky, které nejsou ve styku s kapalinou. Provádí-li se zahřívání baňky plamenem, zabránuje se přehřívání stěn baňky umístěním baňky na azbestovou sítku s otvorem, který odpovídá hladině kapaliny v baňce. Jakmile se kapalina stane zcela čistou (může být zabarvena barvou katalyzátoru), pokračuje se v ohřevu od tohoto okamžiku ještě 2 hodiny. Potom se kapalina ponechá téměř zchladnout a opatrně se zředí asi 75 až 100 ml vody (poznámka 8.4). V případě, že po zchladnutí roztok ztuhne, přidá se větší množství vody (250 až 300 ml), částečně zahřeje a promíchává do rozpuštění tuhého zbytku. Nerozpustí-li se ani potom, je nutno stanovení opakovat s větším objemem kyseliny sírové (3.3).

Obsah mineralizační baňky (tuby) (4.3) nebo jeho část, po převedení do odměrné baňky a doplnění na přesně definovaný objem, se kvantitativně převede do destilační baňky, přidá se pár varných tělísek a baňka se umístí do destilačního zařízení (4.2). Do dávkovacího zařízení destilačního přístroje (4.2) se odměří 100 ml vytěšňovacího roztoku (3.5) a nakonec k přestupníku destilačního přístroje (zařízení) se umístí předloha tak, aby konec přestupníku zasahoval asi 10 mm pod hladinu roztoku v předloze. Jako předloha se použije titrační baňka vhodného objemu, do které se přidá přes-

ně 25 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.4) nebo roztoku kyseliny borité (3.7) (poznámka 8.5) a několik kapek indikátoru (3.2), není-li v návodu případně použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Objem předlohy se vhodně zředí vodou a po plynotěsném uzavření destilačního přístroje se z dávkovacího zařízení vypustí opatrně po částech vytěšňovací roztok (3.5) do destilační baňky a její obsah se začne zahřívát. Destiluje se asi 30 minut, čímž objem v předloze dosáhne asi 150 ml, není-li návodem případně použitého destilačního zařízení uvedeno jinak.

Před ukončením destilace se sníží předloha tak, aby konec přestupníku byl nad hladinou kapaliny v předloze a další podíl destilátu se zkouší pH papírkem (4.4), zda ještě nevykazuje alkalickou reakci. Není-li tomu tak, destilace se ukončí a přestupník se i vně opláchnou do předlohy.

V opačném případě (reakce je alkalická) se buď destilace (dělený mineralizát) nebo celé stanovení musí opakovat s prodloužením doby destilace. Stejně tak je nutno destilaci (celé stanovení) opakovat, dojde-li k zalkalizování roztoku v předloze (změna zabarvení indikátoru (3.1)), s přidáním většího objemu kyseliny (3.4 nebo 3.7) do předlohy či snížením navážky vzorku (podílu mineralizátu).

Obsah titrační baňky se titruje ihned po skončení destilace (pokud to dovoluují podmínky instrumentace doporučuje se titrovat již během destilace) odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.6) nebo odměrným roztokem kyseliny sírové (3.4) (poznámka 8.6) téže koncentrace, která byla použita do předlohy, do právě vzniklé změny zabarvení roztoku.

Vedle toho se provede slepá zkouška se všemi použitými chemikáliemi ve stejném množství, jen namísto zkoušeného vzorku se přidá 1,0 g sacharosy (3.9). V případě nálezu dusíku ve slepé zkoušce je nutno jeho množství od zjištěného při analýze vzorku odečíst (viz výpočet). Slepá zkouška se provádí při každé sérii stanovení nebo při změně jakékoliv chemikálie.

Při každé změně chemikálií včetně odměrných roztoků se provádí kontrolní test: stanoví se obsah dusíku v přesně definované sloučenině acetanilidu (3.10) nebo tryptofanu (3.11) s přidavkem 1,0 g sacharosy (3.9) a při zachování stejného pracovního postupu jako u vzorků i za použití stejného množství a stejných chemikálií i pomůcek. Pro snadno mineralizovatelné materiály se volí acetanilid (3.10), pro obtížnější mineralizovatelné tryptofan (3.11). Stanovení probíhá v pořádku je-li shoda v mezích 95 až 105 relat. %

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah dusíkatých látek v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

6.1 přijímání destilátu do kyseliny sírové

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_0 - V_1) \cdot C_1}{m} \quad (\text{poznámka 8.1})$$

6.2 přijímání destilátu do kyseliny borité

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_3 - V_2) \cdot C_2}{m} \quad (\text{poznámka 8.1})$$

kde V_0 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku v ml

V_1 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku v ml

- V_3 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek v ml
 C_1 přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l
 C_2 přesná koncentrace použitého odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l
 m hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku v g
 28,014 látkové množství dusíku, odpovídající použitému odměrnému roztoku kyseliny sírové

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 200 g/kg	2 g/kg
od 201 g/kg do 400 g/kg	1 % relat.
nad 400 g/kg	4 g/kg

8. Poznámky

8.1 Pro zvláštní případy hodnocení, nejde-li o stanovení výživné hodnoty, lze použít speciálních faktorů místo 6,25 a to:

- 5,75 pro obiloviny a mlýnská krmiva
- 6,37 pro mléko a mléčné výrobky
- 6,00 pro živočišné moučky
- 5,61 pro kliš
- 5,55 pro želatinu

Přepočtový faktor je nutno vždy s výsledkem uvést.

8.2 Vhodným zařízením mohou být i automatické či poloautomatické destilační přístroje, pokud splňují podmínky kvantitativního předestilování amoniaku např. Kjeltec, Kjeltex-auto.

8.3 Hmotnost vzorku se volí podle očekávaného obsahu dusíkatých látek tak, aby obsah byl v rozmezí 0,125 až 1,25 g.

8.4 Doporučuje se fedit ještě částečně teplý mineralizát, aby se zabránilo zpětnému vykrystalizování solí, které se hůře rozpouštějí. Zředování se musí provádět velmi opatrně, protože je proti pravidlům zředování roztoků kyselin.

8.5 Jímání destilátu do kyseliny borité je možné jen v případě, že teplota kondenzátu nepřesáhne 25 °C (chlazení) a při obsahu dusíkatých látek větším než 400 g/kg se volí poloviční hmotnost vzorku. Titrace se v tomto případě provádí odměrným roztokem kyseliny sírové.

8.6 Koncentrace kyseliny sírové se volí podle očekávaného obsahu dusíkatých látek ve zkoušeném vzorku a podle toho, zda mineralizát je destilován celý nebo pouze jeho podíl.

2.2 Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 123, 29/05/72

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové v krmivech.

Metoda stanovení je použitelná pro všechny obsahy a všechny druhy krmiv, obsahující tuto složku s výjimkou krmiv s aditivním obsahem močoviny a krmiv minerálních. Metoda nerozlišuje formy proteinového a neproteinového dusíku a má-li být neproteinový dusík vyloučen z výsledku stanovení, musí být jeho obsah stanoven příslušnou metodou samostatně a od stanovení rozpustného dusíku odečten.

I když výsledek tohoto stanovení do jisté míry vyjadřuje míru stravitelnosti krmiva, nemá žádnou přímou spojitost se stravitelností dusíkatých látek „in vivo“.

2. Princip

Dusíkaté látky rozpustné působením pepsinu v kyselině chlorovodíkové se stanoví titračně po 48 hod inkubací vzorku s pepsinem při 40 °C, následně separací od nerozpustné části a určením obsahu dusíkatých látek v rozpustné části metodou podle Kjeldahla.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 7 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,075 \text{ mol/l}$

3.3 Pepsin, s ověřenou aktivitou 100 j./g (poznámka 8.6)

3.4 Pepsin, inkubační roztok

Příprava: 2,00 g pepsinu (3.3) se rozpustí ve 1000 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), předem zahřáté na teplotu 40 °C, a roztok se promíchá. Roztok se připravuje vždy čerstvý

3.5 Diethylether (poznámka 8.1) nebo petrolether (frakce 40 až 60 °C) (poznámka 8.1)

3.6 Katalyzátory: Oxid měďnatý (CuO) nebo síran měďnatý, pentahydrát ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)

3.7 Indikátory:

Směsný: 2,0 g methylové červení a 1,0 g methylenové modři se rozpustí v 1000 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

Methylová červen: 0,30 g methylové červení se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

3.8 Kyselina sírová, koncentrovaná ($\rho = 1,84 \text{ g/ml}$)

3.9 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ a $0,05 \text{ mol/l}$

3.10 Hydroxid sodný, roztok 400 g/l

3.11 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$ a $0,1 \text{ mol/l}$

3.12 Kyselina boritá, roztok 4%

3.13 Síran draselný, pevný

3.14 Sacharosa

3.15 Acetanilid (bod tání 114 °C) s obsahem 10,36 % dusíku, tj. 64,75 % dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce

3.16 Tryptofan (bod tání 282 °C) s obsahem 13,72 % dusíku, tj. 85,75 % dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce

3.17 Odpěňovací prostředek (např. parafin či silikonový olej)

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Termostat s automaticky regulovatelnou teplotou 40 °C nebo lázeň vodní stejných parametrů
- 4.2 Odstředivka laboratorní s odstředivým zrychlením do 5000 G, vybavená kyvetami na 250 ml, nejvhodnější z plastické hmoty
- 4.3 Baňka odměrná na 500 ml se širokým hrdlem (podle Stohlmanna) a zátkou
- 4.4 Zařízení mineralizační vhodné konstrukce (poznámka 8.2)
- 4.5 Zařízení destilační vhodné konstrukce
- 4.6 Baňky nebo tuby mineralizační vhodné velikosti (baňky se doporučují podle Kjeldahla 500 až 750 ml)
- 4.7 Papírek pH nebo lakmusový

Všechny použité chemikálie (mimo acetanilid a tryptofan) i zkušební pomůcky musí být prosté dusíku.

5. Postup

5.1 Krmiva s obsahem tuku do 100 g/kg

Odváží se ($2 \pm 0,001$) g zkušební vzorku do odměrné baňky na 500 ml a přidá se 450 ml inkubačního roztoku pepsinu (3.4), předem zahřátého na teplotu 40 °C (poznámka 8.2). Inkubační roztok pepsinu (3.4) se přidává po částech s průběžným promícháváním a před přidáním posledního přídavku se důkladně promíchá, aby se rozrušila aglomerace zkoušeného vzorku. Posledním přídavkem tohoto roztoku se opláchnou stěny baňky, pak se zkontroluje hodnota pH, která má být nejvýše 1,7 (poznámka 8.3). Baňka se uzavře zátkou, vloží do termostatu nebo vodní lázně (4.1) vyhřáté na 40 °C a při této teplotě nechá inkubovat po dobu 48 hod, přičemž se přibližně vždy po 6, 24 a 32 hod promíchá. Během inkubace musí veškerá hmota zůstat ve styku s roztokem.

Po 48 hodinách inkubace se baňka z termostatu nebo vodní lázně vyjme, přidá se 15 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), obsah se promíchá, vytemperuje na teplotu laboratoře (omezení působení pepsinu), doplní vodou po rysku a promíchá. Potom se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky (poznámka 8.4), přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

V části filtrátu se stanoví dusíkaté látky podle Přílohy 9, část 2.1 Stanovení dusíkatých látek s touto úpravou:

Odpipetuje se 100 až 250 ml filtrátu (poznámka 8.5) do Kjeldahlovy baňky nebo mineralizační tuby, přidá se opatrně kyselina sírová (3.8) a katalyzátor (3.6) a po případě i odpěňovací prostředek (3.17). Po promíchání obsahu se baňka vloží do mineralizačního zařízení (4.4), nejprve se intenzivnějším zahříváním odpaří nadbytečná voda a dále se postupuje stejně jako při mineralizaci vzorku podle Přílohy 9, část 2.1 Stanovení dusíkatých látek, přičemž doba mineralizace od vyčerpání kapaliny se zkracuje na 1 hodinu.

Další postup zkoušky (mineralizace, destilace, titrace, výpočet) se provádí stejně jako při stanovení dusíkatých látek podle Přílohy 9, část 2.1.

Vedle toho se provede slepá zkouška za použití stejného postupu s výjimkou přidání zkoušeného vzorku. Zjištěné množství dusíkatých látek touto zkouškou se od množství celkového zjištěného při stanovení zkoušeného vzorku odečte.

5.2 Krmiva s obsahem tuku nad 100 g/kg

Zkušební vzorek připravený podle 5.1 musí být před inkubací alespoň částečně odtučněn. Odtučnění se provede trojnásobnou dekantací vzorku diethyletherem nebo petroletherem (3.5) po dávkách 10 až 15 ml, přičemž je nutno dbát, aby nedošlo ke ztrátám vzorku. Po posledním odliší diethyletheru (petroletheru) se tento nechá ze vzorku volně odpařit.

Jiný způsob odtučnění lze provést tak, že zkoušený vzorek se odváží na středně hustý filtr a promývá diethyletherem (petroletherem) (3.5) po dávkách, jak výše uvedeno a po odpaření diethyletheru (petroletheru) z filtru se vzorek převede kvantitativně do odměrné baňky.

Dále se postupuje podle 5.1.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

6.1 při jímání destilátu do kyseliny sírové

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_0 - V_1) \cdot C_1}{m}$$

6.2 při jímání destilátu do kyseliny borité

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_3 - V_2) \cdot C_1}{m}$$

kde V_0 je	spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku v ml
V_1	spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek v ml
V_2	spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku v ml
V_3	spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek v ml
C_1	přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l
C_2	přesná koncentrace použitého odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l
m	hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku v g
28,014	látkové množství dusíku, odpovídající použitému odměrnému roztoku kyseliny sírové

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 200 g/kg	4 g/kg
od 201 do 400 g/kg	2 % relat.
nad 400 g/kg	8 g/kg

8. Poznámky

8.1 Diethylether a petrolether jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Inkubační roztok pepsinu se nesmí zahřívát přímo, aby nedošlo k případné jeho inaktivaci.

8.3 V případě potřeby se upraví pH roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.1), což přichází v úvahu zejména u silně alkalických krmiv.

8.4 U krmiv, kde by filtrace probíhala s pravděpodobností obtížně nebo kde by nebylo možno získat zcela čirý roztok (nerozpustné částice procházející filtrem, např. některé druhy kvasnic), se oddělí nerozpustný podíl postupným odstředěním suspenze. Pro stanovení dusíkatých látek se použije supernatant.

8.5 Alikvotní podíl filtrátu se volí s ohledem na předpokládaný obsah dusíkatých látek a koncentrace použitých odměrných roztoků.

8.6 Je možno použít pepsin s komerčně ověřenou aktivitou.

2.3 Stanovení obsahu bílkovin

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení bílkovin v krmivech. Metoda je použitelná pro všechna krmiva organického původu.

2. Princip

Bílkoviny se stanoví titračně metodou podle Barnsteina po jejich oddělení od dusíkatých látek nebílkovinného původu vysrážením mědnatou solí.

3. Chemikálie

3.1 Síran mědnatý, roztok 60 g/l

3.2 Hydroxid sodný, roztok 12 g/l

3.3 Chlorid barnatý, roztok 10 g/l

3.4 Hexakynoželeznan tetradraselný $[K_4Fe(CN)_6]$, roztok 100 g/l

3.5 Katalyzátory: Oxid mědnatý (CuO) nebo
Síran mědnatý, pentahydrát ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

3.6 Indikátory

Směsný: 2,0 g methylové červení a 1,0 g methylenové modři se rozpustí v 1000 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

Methylová červená: 0,30 g methylové červení se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96% a promíchá

3.7 Kyselina sírová, konc. ($\rho = 1,84$ g/ml)

3.8 Kyselina sírová, roztok $c(H_2SO_4) = 0,1$ mol/l a $0,05$ mol/l

3.9 Hydroxid sodný, roztok 400 g/l ($\rho = 1,36$ g/ml)

3.10 Hydroxid sodný, roztok $c(NaOH) = 0,2$ mol/l a $0,1$ mol/l

3.11 Kyselina boritá, roztok 4%

3.12 Síran draselný, pevný

3.13 Sacharosa

3.14 Acetanilid (bod tání $114^\circ C$) s obsahem 10,36 % dusíku, tj. 64,75 % dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce

3.15 Tryptofan (bod tání $282^\circ C$) s obsahem 13,72 % dusíku, tj. 85,75 % dusíkatých látek nebo podle údajů výrobce

Všechny použité chemikálie (mimo acetanilid a tryptofan) i zkušební pomůcky musí být prosté dusíku.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň vodní s termostatem

4.2 Odstředivka laboratorní vhodné konstrukce

4.3 Zařízení mineralizační vhodné konstrukce

4.4 Zařízení destilační vhodné konstrukce

4.5 Baňky nebo tuby mineralizační vhodné velikosti (baňky se doporučují podle Kjeldahla 500 až 750 ml)

4.6 Papírek pH nebo lakmusový

4.7 Varná tělíska (pemza gran., střípky skleněné či porcelánové)

4.8 Odpěňovací prostředek (např. parafin či silikonový olej)

5. Postup

Asi 1 až 2 g zkušební vzorku se odváží s přesností nejméně na 0,001 g do kádinky na 400 ml, přidá 100 ml horké vody a zahřeje k varu. Potom se přidá 25 ml roztoku síranu mědnatého (3.1), přikryje hodinovým sklíčkem a vaří po dobu 2 min. Po skončení varu se za stálého míchání přidává po částech 25 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2), obsah kádinky se zředí 100 ml horké vody, promíchá a po usazení sraženiny se filtruje dekantací přes středně hustý filtr, prostý dusíku. Promývá se opět dekantací horkou vodou i po převedení sraženiny na filtr, až již další podíl filtrátu nedává reakci na měď (roztok 3.4), resp. na sírany (roztok 3.3). Filtrát se dále nepoužije.

U škrobnatých krmiv a krmiv, kde filtrace probíhá velmi obtížně, se pevný podíl odděluje odstředěním (4.2) a promývá opět dekantací horkou vodou do negativní reakce další promývací kapaliny na měď (roztok 3.4) resp. sírany (roztok 3.3). Jiným způsobem usnadnění filtrace je 30 min. zahřívání výluhu na vodní lázni (4.1) při teplotě $60^\circ C$, namísto vaření po dobu 2 minut.

Filtr se sraženinou se převede do mineralizační baňky (4.5), resp. sraženina se převede pomocí dávky kyseliny sírové (3.7) z centrifugační kyvety do mineralizační baňky, při opatrném zředění vodou.

Dále se postupuje podle Přílohy 9, část 2.1 Stanovení dusíkatých látek.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah bílkovin v g/kg (X) se vypočítá jako obsah dusíkatých látek podle vzorce:

6.1 přijímání destilátu do kyseliny sírové

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_0 - V_1)}{m}$$

$$X = \frac{6,25 \cdot 28,014 \cdot (V_3 - V_2) \cdot C_2}{m}$$

- kde V_0 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku v ml
 V_1 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek v ml
 V_2 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku v ml
 V_3 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek v ml
 C_1 přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l
 C_2 přesná koncentrace použitého odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l
 m hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku v g
 28,014 látkové množství dusíku, odpovídající použitému odměrnému roztoku kyseliny sírové

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

2.4 Stanovení obsahu aminokyselin

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 93/012.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu aminokyselin v krmivech.

2. Princip

Volné, nejčastěji přidané aminokyseliny se ze vzorku vyextrahují roztokem kyseliny chlorovodíkové, extrakt se zahustí a obsah aminokyselin se stanoví metodou kapalinové chromatografie.

Vázané aminokyseliny je nejprve nutno uvolnit z bílkovinného řetězce. Peptidová vazba mezi aminokyselinami řetězce bílkoviny se hydrolyzuje vhodným činidlem a jednotlivé aminokyseliny se uvolní do roztoku. Jako hydrolyzační činidlo se používá roztok kyseliny chlorovodíkové pro stanovení těchto aminokyselin: glycin, alanin, serin, threonin, valin, isoleucin, leucin, lysin, arginin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, fenylalanin, tyrosin, histidin a prolin. Cystin (dvě molekuly cysteinu spojené S-S vazbou) a methionin se nejprve oxidují směsí kyseliny mravenčí a peroxidu vodíku za vzniku kyseliny cysteové a methioninsulfonu a teprve poté se řetězec bílkoviny hydrolyzuje. Vzhledem k nestálosti tryptofanu v kyselém prostředí je pro jeho stanovení nutno použít hydrolyzu v alkalickém prostředí hydroxidu barnatého.

Z hydrolyzátu vzorku se odstraní hydrolyzační činidlo, kyselina chlorovodíková odpařením resp. hydroxid barnatý vysrážením jako síran barnatý, a tyto se převedou na definovaný objem.

Obsah aminokyselin se stanoví metodou kapalinové chromatografie a vypočte porovnááním se standardem.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná. ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)
- 3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$, (možno přidat 0,1 % fenolu)
- 3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ s 2 % thiodiglykolu
- 3.4 Hydroxid barnatý oktahydrát ($\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$) s minimálním obsahem CO_2
- 3.5 Peroxid vodíku, roztok 30%
- 3.6 Kyselina mravenčí, 99 $\pm$ 1 %
- 3.7 Kyselina mravenčí, 85 %
- 3.8 Ethylalkohol čistý 96 % (poznámka 8.1)
- 3.9 Isopropylalkohol (poznámka 8.1)
- 3.10 Isopropylalkohol, roztok 12 %
- 3.11 Oktylalkohol čistý (poznámka 8.1)
- 3.12 Standardní směs aminokyselin (od výrobce deklarované jako standardy pro stanovení aminokyselin). Navažují-li se jednotlivé aminokyseliny, suší se v exsikátoru minimálně jeden týden nad oxidem fosforečným.
- 3.13 Kyselina 5-sulfosalicylová, roztok 60 g/l.
- 3.14 Dusík (méně než 10 mg kyslíku/kg) nebo jiný inertní plyn
- 3.15 Thiodiglykol, koncentrovaný.
- 3.16 Thiodiglykol, roztok 0,5 %
- 3.17 Citrát sodný, trihydrát
- 3.18 Fenol
- 3.19 Citronanový „rozpuštěcí“ tlumivý roztok o pH = 2,2
Příprava: 19,61 g citronanu sodného (3.17), 5 ml thiodiglykolu (3.15), 1 g fenolu (3.18) a 16,5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) se rozpustí v 800 ml vody, pH se upraví na 2,2, doplní se do 1 litru a promíchá.
- 3.20 Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), roztok 91 g/l
- 3.21 Hydroxid sodný, roztok 100 g/l
Chemikálie předepsané k jednotlivým způsobům chromatografických stanovení aminokyselin v předepsané čistotě.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Kapalinový chromatograf vybavený tímto příslušenstvím:
 - 4.1.1 Pumpy dávající jak eluční tlumivé roztoky, tak derivatizační činidlo s přesností $\pm 0,5 \%$
 - 4.1.2 Dávkovací zařízení ať manuální či automatické s přesností 2 %
 - 4.1.3 Temperovaný kolonový systém
 - 4.1.4 Detekční systém, pracující s dostatečnou citlivostí a s lineární odezvou na změnu koncentrace aminokyselin v rozsahu běžně používaném

- 4.2 Termostat s automatickou regulací teploty a nucenou cirkulací vzduchu, nerežové těleso, nebo
- 4.3 Autokláv nebo
- 4.4 Topná plotna s automatickou regulací teploty (příkonu)
- 4.5 Odstředivka s rotorem na kyvety 100 a 200 ml
- 4.6 Odparka rotační vakuová
- 4.7 Vývěva olejová nebo vodní s pojistnou láhví
- 4.8 pH metr
- 4.9 Systém s inertním plynem s redukčním ventilem a trojcestným kohoutem na promývání hydrolyzátů plynem
- 4.10 Skleněné nádoby:
- 4.11 Ampule skleněná 150 ml s hrdlem pro zatavení nebo ampule skleněná s teflonovým uzávěrem.
- 4.12 Baňky varné s normalizovaným zábrusem (dále jen NZ) 29/32, 750 ml a 1000 ml s delším hrdlem
- 4.13 Baňky varné s NZ 29/32, 250, 500, 750 ml se zábrusovým uzávěrem s jednocestným kohoutem
- 4.14 Baňky s kulatým dnem NZ 29/32 250, 500, 750 ml
- 4.15 Kelímek teflonový uzavíratelný
- 4.16 Chladič zpětný vzdušný NZ 29/32 délky cca 75 cm
- 4.17 Filtrační nálevka se skleněnou fritou s velikostí pórů 15 až 40 μm
- 4.18 Filtr membránový
- 4.19 Vodní lázeň s termostatem

5. Postup

5.1 Úprava vzorků

Navazuje se vzorek, připravený s následující změnou: vzorek s obsahem vlhkosti vyšším než 10,0 % až 15,0 % (podle druhu materiálu) je nutno předsušit při teplotě, která nepřesáhne 50 °C.

U vzorků s obsahem tuku vyšším než 100 g/kg se provede odtučnění.

5.2 Příprava hydrolyzátů

5.2.1 Hydrolyza v kyselém prostředí

5.2.1.1 Odváží se takové množství vzorku s přesností nejméně na 0,0001 g, aby obsahovalo alespoň 25 mg dusíku.

5.2.1.2 Kyselou hydrolyzu je možno provádět buď v uzavřených skleněných ampulích (4.11) nebo ve varných baňkách s uzávěry s jednocestným kohoutem (4.13) nebo ve varných baňkách bez uzavření (4.12) pod zpětným chladičem (4.16).

5.2.1.3 Navážka vzorku se kvantitativně převede do hydrolyzační baňky nebo ampule (4.11), přidá se dostatečný objem kyseliny chlorovodíkové (3.2), cca 150 až 250 ml na jeden gram navážky vzorku a kroužením se obsah promísí. Přes trojcestný kohout

(4.9), který má na jednu cestu přivedeno vakuum a na druhou inertní plyn (3.14), se suspenze vzorku zbaví střídavým přepínáním vakua a inertního plynu rozpuštěného vzduchu. Při hydrolyze pod zpětným chladičem (4.16) není nutno rozpuštěný vzduch ze vzorku odstraňovat. Varnou baňku (4.14) a skleněnou ampuli s teflonovým uzávěrem (4.11) je možno uzavřít vakuovanou; zatavitelná ampule se na vodní lázni zahřeje na cca 100 °C a hrdlo se zataví. Opatrným kroužením se opláchnou vnitřní stěny nádoby tak, aby na nich neulpěly částice vzorku.

5.2.1.4 Hydrolyzační nádoby se umístí např. do termostatu s nucenou cirkulací vzduchu (4.2) a po dosažení teploty 110 °C až 115 °C probíhá hydrolyza 23 hodin. Při použití varných baňek, uzavřených kohoutem (4.13) se doporučuje uzávěr připevnit „klipsnou“ a v počátečních stadiích, cca 1 hod., přetlak par kyseliny chlorovodíkové opatrně odpouštět.

5.2.1.5 Hydrolyza pod zpětným chladičem (4.16) probíhá na topné plotně (4.4) s takovým příkonem, aby se obsah baňky živě vařil, což odpovídá bodu varu azeotropické směsi voda – kyselina chlorovodíková, cca 110 °C.

5.2.1.6 Adekvátní výtěžky aminokyselin poskytuje také hydrolyza při 145 °C po dobu 4 hod. Tento způsob je vhodné provádět v ampulích (4.11) v autoklávu, z důvodu přetlaku.

5.2.1.7 Po ukončení hydrolyzy se obsah hydrolyzační baňky nebo ampule kvantitativně vodou převede přes filtrační nálevku s fritou S3 (4.17) do odpařovací baňky (4.14) s kulatým dnem. Jemný sediment zanáší fritu a významně se podílí na zpomalení filtrace, s výhodou je možno použít filtraci se sníženým tlakem či filtrovat nejprve čirý supernatant po přirozené sedimentaci a sediment přenést na fritu až při promývání vodou.

5.2.1.8 Filtrát se odpaří na rotační vakuové odparce (4.6) za použití olejové či vodní vývěvy (4.7), (nutno používat promývací láhev s hydroxidem sodným pro olejovou vývěvu a pojistnou láhev pro obě vývěvy) do sirupovité konzistence při teplotě max. 50 °C. Při odpaření do sucha vznikají ztráty jednak rozstříkáním až do trubice odparky a jednak degradací samotných aminokyselin. Sirupovitý odparek se rozmíchá v několika ml isopropanolu (3.10) a znovu odpaří. Toto se opakuje ještě jednou.

5.2.1.9 Odparek se kvantitativně převede do definovaného objemu tlumivým roztokem o pH 2,2 (3.19). Další možná úprava vzorku závisí na použitém chromatografickém postupu.

5.2.2 Oxidativní hydrolyza

5.2.2.1 Sirné aminokyseliny se oxidují směsí peroxidu vodíku (3.5) a kyseliny mravenčí (3.6) (1 + 19) nebo peroxidu vodíku (3.5) a kyseliny mravenčí (3.7) (1 + 9). Směs se po smísení nechá stát při pokojové teplotě 2 hodiny a poté se umístí do chladničky při teplotě 0 °C na dobu 15 minut.

5.2.2.2 Vzorek navážený s přesností 0,0001 g, který obsahuje alespoň 25 mg dusíku, se kvantitativně převede do varné baňky (4.12), přidá se 15 ml oxidační směsi (viz 5.2.2.1) a po opatrném rozmíchání se umístí do chladničky při teplotě 0 °C až 4 °C na dobu 16 hod. Po této době se buď

- a) přidá přebytek kyseliny chlorovodíkové nebo
- b) se přebytek oxidační směsi odstraní buď za vakua nebo lyofilizací.

5.2.2.3 K oxidovanému vzorku se přidá nejprve opatrně 1 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a po vysumění dalších 100–150 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Hydrolyza probíhá pod zpětným chladičem (4.16) při teplotě 110 °C po dobu 23 hodin. Dále se postupuje podle 5.2.1.7.

5.2.2.4 K oxidovanému vzorku se přidá 60 ml ledové deionisované vody. Na rotační vakuové odparce se obsah zahustí do sirupovité konzistence při teplotě max. 30 °C. Baňka se propláchne cca 30 minut inertním plynem (3.14), přidá se 20 ml vody a znovu se odpaří do sirupovité konzistence. Odparek se za tepla rozpustí ve 100–150 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a kvantitativně se dalším podílem této kyseliny převede do hydrolyzační nádoby tak, aby objem kyseliny odpovídal obsahu uvedenému v 5.2.1.7. K odstranění pění lze přidat oktylalkohol (3.11). Další postup hydrolyzy je totožný s postupem popsaným v 5.2.1.7.

5.2.2.5 K oxidovanému vzorku se přidá 60 ml ledové deionisované vody. Suspense se namrazí na stěny baňky a vysuší mrazovou sublimací. Lyofilisát se rozpustí v malém objemu kyseliny chlorovodíkové (5.2) a kvantitativně převede do hydrolyzační nádoby tak, aby objem kyseliny (5.2) odpovídal uvedenému v 5.2.1.7. Další postup kyselé hydrolyzy je totožný s postupem uvedeným v 5.2.1.7.

5.2.3 Hydrolyza v alkalickém prostředí

Hydrolyza v alkalickém prostředí pro stanovení tryptofanu se provádí v uzavíratelných nádobách, jejichž konstrukce umožňuje zvýšení vnitřního tlaku při zahřevu. S výhodou se používají teflonové kelímky (4.15) opatřené perforovatelným septem.

Do nádoby se odváží 0,2 až 0,4 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,0001 g a smíchá se 4 g hydroxidu barnatého (3.4), přidají se 4 ml vody a po uzavření se umístí do vroucí vodní lázně (4.19) na 10 minut. Poté se obsah nádoby 2 až 3krát promyje inertním plynem (3.14) (pomocí připojeného vakua, pozor na pění, nutno používat pomalé změny tlaku) a hydrolyzuje se při teplotě 110 °C po dobu 17 hodin. Po ukončení hydrolyzy se nádoby umístí do teplé vody, aby obsah zůstal stále tekutý, při chlazení rychle tuhne. Před otevřením je nezbytné opatrně perforovat septum injekční jehlou nebo pootevřít kohout, aby došlo k vyrovnání tlaku. Po otevření se ke vzorku přidají 2 ml thiodiglykolu (3.15) a přibližně 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2), aby pH dosáhlo hodnoty cca 2. Celý obsah hydrolyzační nádoby se kvantitativně převede horkým roztokem thiodiglykolu (3.16), (max. 15 ml), do 50 ml odměrné baňky, přidá se 25 ml roztoku síranu sodného (3.20). Po vychlazení na teplotu 20 °C se objem doplní vodou po rysku, promíchá a sraženina síranu barnatého se nechá sedimentovat, poté se odstředí při 1 000 G po dobu 30 minut. Čirý supernatant je možno použít přímo k dávkování pro vlastní chromatografické stanovení.

5.2.4 Extrakce volných aminokyselin

Do kuželové baňky se odváží 1 až 3 gramy zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,0001 g a extrahuje se 100,0 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) třepáním nebo mícháním po dobu 1 hod. Poté se suspence nechá sedimentovat nebo se pevný podíl odfiltruje.

K 10 ml čirého supernatantu nebo filtrátu se ve 100 ml baňce za stálého míchání přidá 5 ml roztoku kyseliny sulfosalicylové (3.13) a po 5 minutách se sraženina bílkovin odstraní centrifugací při 15 000 G po dobu 15 minut nebo odfiltruje membránovým filtrem (4.18).

Supernatant nebo filtrát se kvantitativně převede do odměrné baňky definovaného objemu, pH se upraví roztokem hydroxidu sodného (3.21) na hodnotu 2,2 a doplní po rysku a promíchá.

Obsah aminokyselin se stanoví chromatograficky.

5.3 Chromatografické stanovení aminokyselin

Obsah jednotlivých aminokyselin se stanoví metodou kapalínové chromatografie podle návodu ke konkrétnímu kapalinovému chromatografu (4.1) a za podmínek, odpovídajících použité koloně

(4.1.3). Každý vzorek se analyzuje dvakrát a v případě relativní odchylky větší než 5 % se stanovení opakuje.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Výpočet obsahu jednotlivých aminokyselin se provede z poměru ploch pík vzorku a standardu o známé koncentraci při zohlednění ředění vzorku při přípravě. Při používání vnitřního standardu, např. norleucinu nebo methioninsulfoxidu či další ninhydrinpozitivní látky v přírodním materiálu se nevyskytující a s retenčním časem odlišným od stanovovaných aminokyselin, se nejprve plochy pík korigují na plochu píku vnitřního standardu. Plocha píku se vypočte jako násobek výšky a šířky v polovině výšky nebo se určí planimetrickou metodou nebo integrací pomocí integrátoru.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se jako:

g aminokyseliny/16 g dusíku s přesností na 0,1 g/16 g N
g aminokyselin/100 g aminokyselin s přesností na 0,1 g/100 aminokyselin
g aminokyseliny na 1 000 g (1 kg) sušiny vzorku s přesností na celé jednotky

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními, prováděnými na stejném vzorku musí být maximálně 5 % relat.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol, propylalkohol a oktylalkohol nebezpečnými hořavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s koncentrovanými roztoky je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

2.5 Stanovení obsahu močoviny

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení močoviny v krmivech s aditivním obsahem této látky.

2. Princip

Močovina se stanoví po vyčištění vodního výluhu vzorku Carresovými činidly a odfiltrování nerozpustného zbytku, reakcí s p-dimethylaminobenzaldehydem-spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm.

3. Chemikálie

3.1 p-Dimethylaminobenzaldehyd (dále jen DMAB), roztok
Příprava: 1,6 g DMAB se rozpustí v 100 ml ethylalkoholu, přidá se 10 ml konc. kyseliny chlorovodíkové a promíchá
Skladovatelnost tohoto roztoku je nejvýše 15 dní

3.2 Carresovo činidlo I, roztok

Příprava: 21,90 g dihydrátu octanu zinečnatého (CH_3CO_2)₂Zn · 2 H₂O se rozpustí asi ve 30 až 50 ml vody, přidají se 3 ml ledové kyseliny octové (CH_3COOH), doplní vodou na objem 100 ml a promíchá

3.3 Carresovo činidlo II, roztok

Příprava: 10,60 g trihydrátu hexakysanoželeznatanu tetradra-selného $[K_4Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$ se rozpustí v 50 ml vody, doplní vodou na 100 ml a promíchá

3.4 Močovina, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží přesně 0,100 g močoviny, rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 1 mg močoviny.

3.5 Uhlí aktivní, které neabsorbuje močovinu (musí být ověřeno)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 420 nm a kyvetou o optické délce 10 mm

4.2 Míchací zařízení s frekvencí otáčení asi 35 až 40 otáček za minutu

4.3 Lázeň vodní s automatickou regulací teploty při 20 °C

4.4 Zkumavky o rozměrech 160 mm × 16 mm se zabroušenou zátkou.

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady nejméně 6 odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 1,0; 2,0; 3,0; (4,0); 5,0; 7,0; 9,0 a 10,0 ml základního standardního roztoku močoviny (3.4), každá z baněk se doplní vodou po rysku a promíchá. Tyto zředěnější standardní roztoky odpovídají obsahům 10,0; 20,0; 30,0; (40,0); 50,0; 70,0; (90,0) a 100,0 µg močoviny v 1 ml.

5.1.2 Do sady nejméně 6 zkumavek se odpipetuje z každého zředěnějšího standardního roztoku po 5 ml, dále se do každé zkumavky odpipetuje 5 ml DMAB (3.1), promíchá a ponechá na vodní lázni (4.3) 15 minut při teplotě 20 °C.

Koncentrace v jednotlivých zkumavkách je 5 až 50 µg močoviny v 1 ml.

5.1.3 U takto připravených roztoků se změří absorbance v 10 mm kyvetě na spektrofotometru (4.1) při vlnové délce 420 nm proti kompenzačnímu roztoku (u vzorků proti slepému roztoku), který obsahuje 5 ml DMAB + 5 ml vody.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf v µg močoviny/ml.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Odváží se asi 2 g zkušebního vzorku (poznámka 8.1) s přesností nejméně na 0,001 g do odměrné baňky na 500 ml, přidá se 400 ml vody a 1 g aktivního uhlí (3.5). Po promíchání se dále přidá 5 ml Carresova činidla I (3.2) a po opětovném promíchání 5 ml Carresova činidla II (3.3). Potom se odměrná baňka s roztokem umístí na míchací zařízení (4.2) a míchá po dobu 30 minut. Pak se doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Není-li roztok zcela čirý a bezbarvý, stanovení se opakuje s přidáním většího množství aktivního uhlí (3.5) (poznámka 8.2).

Do zkumavky se odpipetuje 5 ml čirého filtrátu, přidá pipetou 5 ml roztoku DMAB (3.1), promíchá a ponechá na vodní lázni (4.3) při teplotě 20 °C po dobu 15 minut.

5.2.2 Souběžně se vzorkem se připraví slepý roztok (blank) stejným způsobem, jak výše uvedeno, s výjimkou přidání roztoku zkoušeného vzorku, místo něhož se přidá stejné množství vody.

5.2.3 Roztok vzorku se po vyjmutí z vodní lázně (4.3) měří, jak je uvedeno v 5.1.3 proti slepému roztoku.

Z kalibračního grafu se zjistí koncentrace močoviny v µg/ml.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah močoviny v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot F}{100 \cdot m}$$

kde C je koncentrace močoviny zjištěná z kalibračního grafu v µg/ml

m navážka zkušebního vzorku v g

F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují požadavky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Při obsahu močoviny ve vzorku větším než 30 g/kg se navážka zkušebního vzorku snižuje na 1 g nebo se zkoušený vzorek redukuje ředěním tak, aby koncentrace močoviny ve zkušebním vzorku nebyla vyšší než 50 mg/500 ml.

Při značně nižším obsahu močoviny ve zkoušeném vzorku se hmotnost zkušebního vzorku zvýší, ale tak, aby filtrát roztoku vzorku byl čirý a bezbarvý. Výpočet nutno upravit.

8.2 Přídavek aktivního uhlí by neměl přesáhnout 3 g.

2.6 Stanovení obsahu amoniaku v rybích moučkách

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení amoniaku v rybích moučkách. Je použitelná pro obsahy amoniaku, vyjádřené jako NH_3 do 2 500 mg/kg.

2. Princip

Amoniak se stanoví titračně alkalimetry ve vodním výluhu vzorku po vyčerpání kyselinou trichloroctovou, vytěsnění oxidem hořečnatým a předestilováním do kyseliny sírové.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina trichloroctová, roztok 200 g/l

3.2 Oxid hořečnatý, pevný

3.3 Odpěňovací prostředek (silikonový olej a pod.)

3.4 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$

3.5 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.6 Indikátor methylová červeně

Příprava: 0,30 g methylové červeně se rozpustí ve 100 ml ethylalkoholu 96 %.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mixér nebo míchačka vhodné konstrukce o 35 až 40 ot/min

4.2 Přístroj destilační (pro přehánění vodní parou)

5. Postup

Odváží se asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do baňky mixéru nebo kádinky vhodné konstrukce, přidá se 100 ml vody a mixuje (míchá) po dobu 30 minut. Potom se obsah převede vodou do odměrné baňky na 250 ml, přidá se 50 ml roztoku kyseliny trichloroctové (3.1), doplní vodou po rysku a intenzivně promíchá. Obsah se filtruje suchým skládaným filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Do destilační baňky přístroje (4.2) se odpipetuje alikvotní podíl, podle očekávaného obsahu amoniaku (obvykle 100 ml), zředí vodou asi na 200 ml a těsně před destilací se přidají 2 g oxidu hořečnatého (3.2), pár kapek odpěňovacího prostředku (3.3) (roztok musí být alkalický – zkouška např. pH papírkem) a destilační baňka se připojí k destilačnímu přístroji (4.2). Přestupník přístroje se ponoří do titrační baňky, do které bylo přidáno pipetou přesně 25,0 nebo 50,0 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.4), a to asi 0,5 cm pod hladinu. Pak se zapne destilace a destiluje se tak dlouho, až nadešle asi 150 ml destilátu. Během destilace se dbá, aby se nepřehřívaly stěny baňky. Před skončením destilace se předloha sníží tak, aby přestupník vyčníval nad hladinu a zkouší se reakce dalšího destilátu např. pH papírkem. Není-li alkalická, destilace se ukončí, přestupník se opláchne do předlohy a obsah předlohy se asi 2 minuty povaří (poznámka 8.1). Po ochlazení se do předlohy přidá pár kapek indikátoru methylové červeně (3.6) a titruje se odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.5) do právě vymizelého červeného zabarvení roztoku.

Je-li reakce dalšího destilátu ještě alkalická, je nutno destilaci opakovat s menším alikvotním podílem nebo prodloužit dobu destilace. Vedle toho se provede slepá zkouška se stejným postupem s výjimkou přidání alikvotního podílu filtrátu vzorku, místo kterého se přidá stejný objem vody.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah amoniaku, vyjádřeného jako NH_3 v mg/kg (X), se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{17 \cdot 10^3 \cdot C \cdot V}{m}$$

kde V je rozdíl spotřeb odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku a vzorek v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l

m hmotnost alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, která splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 10 % relativních.

8. Poznámky

8.1 Považení obsahu předlohy před titrací je nutné k rozložení event. zbytku kyseliny trichloroctové na chloroform a oxid uhličitý, které se varem vypudí z roztoku.

2.7 Stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek, vyjádřených jako amoniak, v krmivech.

2. Princip

Vzorek se extrahuje vodou a roztok se vyčechá a filtruje. Těkavé dusíkaté báze jsou uvolněny uhličitěm draselným a pomocí mikrodifuze jímány do roztoku kyseliny borité a stanoveny kyselinou sírovou titračně.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina trichloroctová, roztok 20%

3.2 Směsný indikátor: 33 mg bromkresolové zeleně a 65 mg methylové červeně se rozpustí ve 100 ml 95–96% ethylalkoholu.

3.3 Kyselina boritá, roztok

Příprava: 10 g kyseliny borité se rozpustí v 900 ml vody, přidá se 10 ml indikátoru (3.2) a 0,5 ml 4% roztoku hydroxidu sodného a promíchá se. Doplní se vodou na 1 litr.

3.4 Uhličitěm draselný, nasycený roztok

Příprava: 100 g uhličitěm draselného se rozpustí ve 100 ml horké vody, nechá se vychladnout a zfiltruje se.

3.5 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,01 \text{ mol/l}$

3.6 Glycerín

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Míchačka s cca 35–40 ot/min

4.2 Skleněná nebo plastová Conwayova miska o vnitřním průměru 10 cm

4.3 Mikrobýreta s dělením 1/100 ml

5. Postup

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 10 g zkušebního vzorku

s přesností na 0,001 g, přidá se 100 ml vody a míchá se 30 minut. Přidá se 50 ml kyseliny trichloroctové (3.1), objem se upraví vodou na 200 ml, důkladně se protřepe a filtruje se přes skládaný filtr. Do střední části Conwayovy misky se napipetuje 1 ml kyseliny borité (3.3) a do okolního prstence se napipetuje 1 ml filtrátu (poznámka 8.1).

Rychle se přikápně do prstence s filtrátem roztok uhlíkatu draselného (3.4) a okamžitě se víčko zcela vzduchotěsně uzavře, přičemž k utěsnění se použije malé množství glycerínu (3.7). Opatrným otáčením v horizontální rovině se roztok promíchá. Nechá se inkubovat nejméně 4 hodiny při laboratorní teplotě nebo 1 hodinu při 40 °C. Těkavé dusíkaté báze v kyselině borité se ztitrují odměrným roztokem kyseliny sírové (3.5).

Zároveň se provádí slepý pokus za použití stejného postupu bez přidání filtrátu zkoušeného vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah těkavých dusíkatých látek, vyjádřených jako amoniak v g/kg (X), se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{34,06 \cdot V \cdot C \cdot F}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (3.5) v ml
F zředovací faktor
m hmotnost navážky zkušební vzorku v g
C přesná koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí přesáhnout při obsahu amoniaku:

do 10 g/kg	10 % relat.
rovném nebo vyšším než 10 g/kg	1,0 g/kg

8. Poznámky

8.1 Pokud obsah amoniaku přesáhne 60 g/kg, je nutno filtrát ředit.

2.8 Stanovení aktivity ureázy v produktech s obsahem sóji

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení aktivity ureázy v produktech, ve kterých je obsažena sója.

Metoda je použitelná pro všechny druhy produktů s obsahem sóji a do hodnoty aktivity ureázy 1 mgN/g.min při 30 °C. Pro vyšší obsahy se navážka vzorku redukuje až na 0,05 g.

2. Princip

Aktivita ureázy se stanoví titračně alkalimetry určením množství amoniakálního dusíku, uvolněného z roztoku močoviny 1 g zkoušeného vzorku za 1 minutu při teplotě 30 °C.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, odměrný roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.2 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.3 Tlumivý roztok fosforečnanový

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 4,45 g dihydrodrátu hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), 3,40 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.4 Močovina, roztok 30 g/l v tlumivém roztoku fosforečnanovém o pH = 6,9 až 7,0 (vždy čerstvě připraveném)

4. Přístroje

4.1 pH metr vysoké citlivosti na 0,02 pH s příslušenstvím

4.2 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.3 Lázeň vodní s termostatem, umožňujícím regulaci teploty na 30 °C přesně

4.4 Zkumavky rozměrů 150 mm × 18 mm se zábrusem a zátkou

5. Postup

Do zkumavky se zábrusem (4.4) se odváží asi 0,2 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (poznámka 8.1), přidá se přesně 10 ml roztoku močoviny (3.4), ihned zazátkuje a intenzivně protřepává. Potom se vloží na vodní lázeň (4.3) vytěpovanou přesně na 30 °C a ponechá na lázni 30 minut. Pak se ihned přidá přesně 10 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), ochladí rychle na 20 °C, obsah zkumavky se kvantitativně převede do kádinky tak, že se zkumávka vždy vypláchně dvakrát 5 ml vody. Kádinka se umístí na elektromagnetickou míchačku (4.2), připojí elektrody pH-metru (4.1) a titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.2) do hodnoty pH = 4,7 (V_1).

Vedle toho se provede slepá zkouška tak, že do zkumavky se odváží 0,2 g vzorku s přesností na 0,001 g (zcela shodně jako u stanovení ve vzorku), přidá se přesně 10 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a 10 ml roztoku močoviny (3.4) a směs se rychle ochladí v ledové vodě, kde se ponechá po dobu 30 minut. Při dodržení těchto podmínek se převede obsah kvantitativně do kádinky a titruje za výše uvedených podmínek odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.2) do hodnoty pH = 4,7 (V_2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Aktivita ureázy v jednotkách aktivity (tj. mg amoniakálního dusíku uvolněného 1 g zkoušeného vzorku za 1 minutu při teplotě 30 °C) (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{14 \cdot C \cdot (V_2 - V_1)}{30 \cdot m}$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného při titraci zkoušeného vzorku v ml

- V_2 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného při titraci slepé zkoušky v ml
 m hmotnost navážky zkušební vzorku v g
 C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Materiály, obsahující více než 100 g/kg tuku, musí být nejdříve odtučněny za studena (např. diethyletherem či hexanem).

2.9 Ureázový test

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro zjištění stupně odhořčení sójových výrobků.

2. Princip

Aktivita ureázy se stanoví titračně alkalimetricky určením množství amoniakálního dusíku, uvolněného z roztoku močoviny ureázou z 1 g zkoušeného vzorku za 1 minutu.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,01 \text{ mol/l}$

3.2 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,02 \text{ mol/l}$

3.3 Močovina, roztok 30 g/l

3.4 Indikátor: methylová červená, ethanolický roztok 0.02 % nebo methylová oranž (sodná sůl), roztok 0.02 %

3.5 Glycerin

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Skleněné nebo plastové Conwayovy misky, o vnitřním průměru 10 cm

4.2 Mikrobýreta s dělením 1/100 ml

4.3 Termostat s automaticky regulovatelnou teplotou 30 °C

5. Postup

Do mezikruží Conwayovy misky (4.1) se naváží 0,65 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,001 g. Vzorek se přelije 7 ml roztoku močoviny (3.3) a opatrným kroužením se promíchá. Do střední části Conwayovy misky (4.1) se napipetuje 5 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.1) a přidá se 1 až 2 kapky indikátoru

(3.4). Miska se okamžitě vzduchotěsně uzavře pomocí víčkem, přičemž k utěsnění se použije malé množství glycerínu (3.5) a ponechá se 1 hodinu v klidu stát při teplotě 30 °C.

Po uplynutí této doby se miska otevře a titrací odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.2) se stanoví množství nezreagované kyseliny sírové (3.1).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Aktivita ureázy vyjádřená v množství amoniaku v mg (X) uvolněného z roztoku močoviny za 1 minutu působením 1 g zkoušeného vzorku při teplotě 30 °C se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{34,06 \cdot C \cdot (V_2 - V_1)}{60 \cdot m}$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného (3.2) v ml

V_2 objem odměrného roztoku kyseliny sírové (3.1), pipetovaný do Conwayovy misky v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l

m hmotnost navážky zkušební vzorku v g 1 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (3.1) odpovídá 0,3406 mg amoniaku.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na dvě desetinná místa.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

2.10 Stanovení obsahu biuretu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení biuretu v močovině

2. Princip

Metoda je založená na tvorbě barevného komplexu se síranem měďnatým v přítomnosti roztoku vlnanu sodno-draselného v zásaditém prostředí a spektrofotometrickém měření absorbance vybarveného roztoku při vlnové délce 540 nm.

3. Chemikálie

3.1 Síran měďnatý pentahydrát, roztok

Příprava: 15,0 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ se rozpustí v odměrné baňce o objemu 1000 ml a doplní se po rysku.

3.2 Vlnan sodno-draselný, roztok

Příprava: 50,8 g pentahydrátu vlnanu sodno-draselného a 40,0 g hydroxidu sodného se rozpustí v odměrné baňce o objemu 1000 ml, doplní se po rysku a promíchá.

3.3 Biuret, standardní roztok

Příprava: 2,000 g biuretu, vysušeného 3 hodiny při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$, se rozpustí v odměrné baňce objemu 1000 ml, doplní se po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 540 nm a kyvetou o optické délce 10 mm.

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 a 40,0 ml standardního roztoku biuretu (3.3), což odpovídá 0; 2,0; 10,0; 20,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 a 80,0 mg biuretu. Potom se do každé banky přidá 10 ml roztoku vlnanu sodno-draselného (3.2) a 10 ml roztoku síranu měďnatého (3.1) a směs se nechá 15 minut stát při teplotě $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$. Po této době se roztoky v bankách doplní po rysku, promíchají a změří se jejich absorbance proti roztoku s nulovou koncentrací močoviny.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf v mg biuretu/ml.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do odměrné banky na 200 ml se naváží asi 16 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,0002 g (poznámka 8.1), rozpustí se 50 ml vody, doplní se po rysku, promíchá a zfiltruje přes dvojité skládaný filtr střední hustoty, přičemž první podíl filtrátu se nezahycuje.

Potom se čtyři odměrné banky s objemem 100 ml označí číslicemi I, II, III, a IV. Do odměrné banky I se odpipetuje 10 ml roztoku vlnanu sodno-draselného (3.2), doplní se vodou po rysku a promíchá. Do odměrné banky II se odpipetuje 10 ml roztoku vlnanu sodno-draselného (3.2) a 10 ml roztoku síranu měďnatého (3.1), doplní se vodou po rysku a promíchá. Do odměrné banky III se odpipetuje 50 ml roztoku zkoušeného roztoku, 10 ml roztoku vlnanu sodno-draselného (3.2), doplní se vodou po rysku a promíchá. Do odměrné banky IV se odpipetuje 50 ml roztoku zkoušeného roztoku, 10 ml roztoku vlnanu sodno-draselného (3.2) a 10 ml roztoku síranu měďnatého (3.1), doplní se vodou po rysku a promíchá.

Odměrné banky se nechají stát 15 minut při teplotě $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$. Po této době se změří absorbance roztoku II proti roztoku I (A_1) a absorbance roztoku IV proti roztoku III (A_2).

Hodnota A_1 se odečte od A_2 a podle vypočteného rozdílu se určí podle kalibračního grafu množství biuretu v mg.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah biuretu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{200 \cdot m_2}{50 \cdot m}$$

kte m_2 je hmotnost biuretu odečtená z kalibračního grafu v mg
m hmotnost zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují požadavky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 0,3 g/kg.

8. Poznámky

8.1 Při obsahu biuretu vzorku větším než 15 g/kg se hmotnost zkušebního vzorku snižuje na 8 g.

2.11 Stanovení obsahu alimetu (hydroxyanalogu D,L-methioninu)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení alimetu v krmivech.

Pro účely této metody se používá tato definice: Alimet je hydroxyanalogem esenciální aminokyseliny D,L-methioninu. Chemicky se jedná o 2-hydroxy-4-(methylthio) máselnou kyselinu.

2. Princip

Alimet se po extrakci vzorku směsí (voda + acetonitril) a následné hydrolyze stanoví metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (dále jen HPLC) na reverzní fázi s použitím UV detekce.

Alimet se dodává jako 88 %, vztaženo na obsah celkové kyseliny, ovšem prakticky jde o směs mono, di, tri a oligomerů. Přípravou vzorku před nástřikem do HPLC se kvantitativně hydrolyzou oligomery převedou na monomer (dále jen MHA), jehož obsah se stanovuje.

3. Chemikálie

3.1 Methylalkohol čistoty HPLC (poznámka 8.1)

3.2 Acetonitril čistoty HPLC

3.3 Hydroxid draselný, roztok 500 g/l

3.4 Kyselina fosforečná, koncentrovaná ($\rho = 1,69 \text{ g/ml}$)

3.5 Kyselina fosforečná, roztok $c(\text{H}_3\text{PO}_4) = 0,03 \text{ mol/l}$

3.6 Voda destilovaná či deionizovaná, čistoty HPLC

3.7 Hydroxid sodný, roztok 500 g/l

3.8 Extrakční směs: Acetonitril-voda, (10 + 90)

3.9 Mobilní fáze

Příprava: 90 obj. dílů roztoku kyseliny fosforečné (3.5) se smíchá s 10 obj. díly methylalkoholu (3.1) a případně se upraví pH roztokem hydroxidu sodného (3.7) na hodnotu 2,5.

3.10 Alimet, standardní substance (jedná se o tutéž látku používanou pro výrobu krmných směsí)

3.11 Alimet, standardní roztok

Příprava: Do kádinky na 100 ml se odměří asi 30 ml extrakční směsi (3.8) a opatrně přidá takové množství standardní substance alimetu (3.10), aby po kvantitativním převedení do odměrné banky na 100 ml, doplnění extrakční směsí (3.8) po rysku a promíchání, bylo dosaženo stejné koncentrace MHA jako je předpokládáno (deklarované) množství ve zkoušeném vzorku. Z tohoto standardního roztoku se pipetuje na přípravu kalibračních roztoků.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň ultrazvuková nebo třepačka laboratorní

4.2 Odstředivka vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.3 Přístroj pro vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (dále jen přístroj HPLC) s příslušenstvím (čerpadlo, kolona – reverzní fáze C18, 250 × 4,5 – 10 µm, injekční dávkovací zařízení – Rheodyne, UV detektor, popř. i databáze s integračním softwarem, tiskárna či jiné registrační zařízení.

5. Postup

5.1 Kalibrace a měření

5.1.1 Příprava kalibračního roztoku

Do zkumavky se odpipetuje 3 ml standardního roztoku alimetu (3.11), přidá se 86 µl roztoku hydroxidu draselného (3.3) a protřepe. Potom se přidá 86 µl roztoku kyseliny fosforečné (3.5) a znovu protřepe. Pokud je třeba, roztok se odstředí (4.2) při 2 000 otáček/minutu po dobu asi 5 minut a supernatant se filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se nastříkuje do přístroje HPLC (4.3).

5.1.2 Měření

Pracovní podmínky:

Teplota kolony	teplota okolí
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min.
Detekce	UV, vlnová délka 214 nm
Injektovaný objem	20 µl
Retenční čas	16 min. (při použití popsané kolony)

Po ekvilibraci kolony přístroje HPLC (4.3) se nastříkuje kalibrační roztok i roztok zkoušeného vzorku dvakrát, přičemž odezvy po sobě jdoucích nástřiků musí být v toleranci nejvýše 2 % a bázi odezvy je plocha píku. Z každého nástřiku se pořídí chromatografický záznam.

Porovnáním odezev kalibračního roztoku, jeho koncentrace a roztoku zkoušeného vzorku se zjistí koncentrace monoméru hydroxyanalogu alimetu (MHA) (poznámka 8.2).

5.2 Vlastní provedení (poznámka 8.3)

Odváží se takové množství dobře zhomogenizovaného zkušební vzorku, aby po extrakci ve 100 ml extrakční směsi (3.8) bylo dosaženo koncentrace mezi 30 až 50 µg MHA v 1 ml. Navážka zkušební vzorku by neměla poklesnout pod 1 g u premixů a pod 10 g u krmných směsí. Proto je nutno potřebné extrakty na požadovanou koncentraci případně naředit. Navážka vzorku se převede do kuželové baňky, přidá 100 ml extrakční směsi (3.8) a vytřepává v ultrazvukové lázni nebo na mechanické třepačce (4.1) asi 10 minut, nechá se usadit a do zkumavky se pipetuje 3 ml čirého roztoku.

Dále se postupuje podle 5.1.1 s výjimkou přidání standardního roztoku alimetu a 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah alimetu vyjádřeného jako monomér hydroxyanalogu

(MHA) v mg/g (X) se vypočítá podle vzorce (poznámka 8.2):

$$X = \frac{C \cdot F}{10^3 \cdot m}$$

kde C je koncentrace MHA zjištěná porovnáním odezev kalibračního roztoku a roztoku zkoušeného vzorku v g/ml
F faktor ředění
m navážka zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/g.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Methylnalkohol je nebezpečnou hořlavinou I. třídy a nebezpečným jedem, proto je nutné při jakékoli manipulaci s ním zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Je-li součástí chromatografické sestavy integrační a výpočtové software, vypočítá se výsledek přímo z naměřených koncentrací.

8.3 Při zkoušení krmných směsí je nutno před každým dalším nástřikem zajistit, aby z kolony dále nevycházely složky, jejichž retenční časy jsou někdy dvojnásobně až trojnásobně vyšší než retenční čas MHA. Zmíněné složky mohou zapříčinit distorzi následného chromatogramu. Vyčištění kolony lze zajistit buď dostatečně časovým odstupem mezi jednotlivými nástřiky, nebo propláchnutím kolony směsí acetonitril-voda (3.8).

3.1 Stanovení obsahu tuku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení tuku (hexanového, petroletherového a diethyletherového extraktu) v krmivech, není vhodná pro stanovení tuku v olejninách.

2. Princip

Tuk se stanoví vázkově buď přímou extrakcí vzorku příslušným extrakčním činidlem, nebo po předběžné hydrolýze ve vzorku kyselinou chlorovodíkovou, následným oddestilováním extrakčního činidla a vysušením vyextrahovaného tuku.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční činidla (poznámka 8.1)

3.1.1 n-Hexan nebo petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml

3.1.2 Diethylether bez obsahu peroxidů, zbytkem po odpaření nejvýše 1 mg/100 ml

3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$

3.5 Dusičnan stříbrný, roztok 10 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Přístroj extrakční podle Soxhleta, nejméně s 10 refluxními cykly za 1 hod nebo podle Twisselmana s průtokem nejméně 10 ml za min. (poznámka 8.2)

4.2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení

4.3 Patrony nebo tuby extrakční, tukuprosté, velikosti podle použitého extrakčního přístroje

4.4 Sušárna elektrická s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou

4.5 Baňka extrakční se zábrusem, obsahu 250 ml

4.6 Filtrační drť (např. Hydro-supercel)

4.7 Pemza zrnitá, tukuprostá

4.8 Vata obvazová, odtučněná

4.9 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Přímá extrakce

5.1.1 Do extrakční patrony (tuby) (4.3) se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (poznámka 8.3) a shora utěsní obvazovou vatou (4.8). Patrona (tuba) (4.3) se vzorkem se vloží do sušárny (4.4) a předsuší po dobu 2 hod. při teplotě 95 °C až 98 °C.

5.1.2 Extrakční patrona (tuba) (4.3) vloží do střední části extrakčního přístroje (4.1), tato část se nasadí na extrakční baňku (4.5), předem vysušenou (30 min. při 95 °C až 98 °C) a po ochlazení v exsikátoru zváženou s výše uvedenou přesností. Do baňky (4.5) se přidá potřebné množství extrakčního činidla (poznámka 8.4), baňka (4.5) se umístí na vyhřívací zařízení (4.2), napojí se na extraktor (4.1) a extrahuje se po dobu 6 hodin. Rychlost extrakce se upraví tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně k 10 přetokům extrakčního činidla (3.1), je-li použit diskontinuální extraktor (Soxhlet), nebo minimálně 3 až 5 kapek kondenzujícího extrakčního činidla za sekundu, byl-li použit kontinuální průtokový extraktor (Twisselmann). Po této době se extrakce přeruší, oddestiluje se převážná část extrakčního činidla, zbytek se nechá volně nebo na vodní lázni (4.9) odpařit, baňka s extraktem se vysuší v sušárně (4.4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu 1, 5 hod. a po ochlazení v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g. Potom se baňka s extraktem vloží zpět do sušárny (4.4) a při výše uvedené teplotě se suší ještě 30 minut, ochladí se v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností. Rozdíl mezi prvním a následujícím vážením by neměly být větší než 1 mg. V negativním případě (rozdíl je vyšší) je nutné sušení a vážení opakovat až bude docíleno výše uvedeného rozdílu.

5.1.3 U krmiv s obsahem močoviny nebo cukrů se odvážený vzorek převede na tukuprostý nebo odtučněný filtr, umístěný ve filtrační nálevce a vzorek se postupně promyje asi 100 ml vody, teplé asi 50 °C. Filtr s promývaným vzorkem se vysuší v sušárně (4.4) při

95 °C až 98 °C za nejméně 3 hod, potom se vloží do extrakční tuby (patrony) (4.3), utěsní smotkem obvazové vaty (4.8) a dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2 Extrakce po hydrolyze (poznámka 8.5)

Odváží se asi 2,5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g nejlépe do kádinky na 400 ml, přidá se 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.4), několik zrnek pemzy (4.7), kádinka se přikryje hodinovým sklíčkem a zahřeje k mírnému varu. Při tomto mírném varu se vaří asi 1 hod. za občasného zamíchání (asi celkem 6×), zejména se dbá na to, aby částičky vzorku neuplávaly na stěnách kádinky a byly ve styku s roztokem. Potom se obsah zředí vodou, ochladí a filtruje přes navlhčený dvojité středně hustý filtr (tukuprostý). Doporučuje se před filtrací přidat drť (4.6). Pevná část vzorku na filtru se promývá vodou až do negativní reakce dalšího filtrátu na chloridy (s roztokem dusičnanu stříbrného (3.5) již netvoří zákal). Filtr s pevným zbytkem se vysuší např. na hodinovém sklíčku v sušárně (4.4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu nejméně 3 hod., po vysušení se převede do extrakční patrony (tuby) (4.3) a dále se postupuje podle 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah tuku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 10^3 \cdot \frac{m_2 - m_1}{m_0}$$

kde m_0 je hmotnost zkušební vzorku v g

m_1 hmotnost prázdné extrakční baňky v g

m_2 hmotnost extrakční baňky s extraktem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

V protokolu musí být uvedeno použité extrakční činidlo.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit pro obsah:

do 50 g/kg	2 g/kg
od 51 do 100 g/kg	4 % relat.
nad 100 g/kg	4 g/kg

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečnými hořlavými I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Pro stanovení tuku je možno použít i extrakčních poloautomatických přístrojů, pokud poskytují výsledky zcela srovnatelné v mezích opakovatelnosti s uvedenou metodou.

8.3 Pro velmi nízké obsahy tuku v krmivu se navažuje úměrně více, např. 10 g.

8.4 Množství extrakčního činidla se volí takové, aby u přístroje diskontinuálně průtokového Soxhlet docházelo ke spolehlivému přetékání kondenzátu extrakčního činidla.

U kontinuálně průtokového přístroje (Twisselmann) se volí přibližně 50 až 100 ml.

Při stanovení tuku ve vzorku úsušku nebo s vyšším obsahem podílem úsušku, se nedoporučuje používat jako extrakční činidlo diethylether, protože vykazuje vyšší výsledky než hexan či petrolether vlivem současně extrakce rostlinných pigmentů (chlorofyl aj).

8.5 Předběžná hydrolýza musí být provedena u živočišných krmiv, glutenu, sušených brambor, kvasnic nebo výpalků, odpadu z výroby sušenek, chleba, kuchyňských odpadků, mléčných krmiv (minimálně s obsahem 40 % mléka) a krmných směsí obohacených tukem. U saponifikovaných (stabilizovaných) tuků se k hydrolýze použije 6 mol/l kyselina chlorovodíková a roztok po hydrolýze se před filtrací vychladí v ledničce asi na 4 °C.

3.2 Stanovení obsahu tuku v olejnatých semenech

Do této metody byla zapracována doporučení ISO TC34 569/1979

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení tuku (hexanového nebo petroletherového extraktu) v olejnatých semenech.

2. Princip

Tuk („olej“) se stanoví vážkově po extrakci vzorku hexanem nebo petroletherem na vhodném zařízení, oddestilování rozpouštědla, vysušení vyextrahovaného tuku vzorku.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční činidlo n-hexan nebo petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)

3.2 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná

3.3 Plyn inertní (dusík, oxid uhličitý)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Extrakční zařízení, vhodné konstrukce, s extrakčními baňkami o objemu 200 až 500 ml

4.2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení

4.3 Patrony nebo tuby extrakční, tukuproté, velikosti podle použitého extrakčního přístroje

4.4 Sušárna elektrická vakuová s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou

4.5 Vata obvazová, odtučněná

4.6 Pro bavlníková semena s přilehlými vlákny je požadováno další zařízení:

4.6.1 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automatickou regulací teploty (130 ± 2) °C

4.6.2 Sušárna elektrická atmosférická s odvětráváním a automa-

ticky regulovatelnou teplotou, schopná vyhřát vzorek na teplotu 115 °C během 30 minut

4.6.3 Miska kovová s plochým dnem o průměru 100 mm a výšce přibližně 40 mm (tzv. vysoušečka)

4.6.4 Keramická porézní nádoba, cylindrická o vnitřním průměru 68 mm, vnějším průměru 80 mm, výškou 85 mm a tloušťkou stěn i základny 6 mm

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

5.1.1 Pro zkoušku se použije vzorek tak, jak byl získán nebo po odstranění nečistot (poznámka 8.4). Pokud se pracuje se vzorkem, ze kterého byly předem odstraněny velké neolejnaté částice, je nutno to zohlednit při výpočtu (viz. 6.4).

5.1.2 V případě semene kopry se vzorek upravuje mechanickým struhadlem celý nebo ručním struhadlem v takovém množství, aby byl co nejvíce reprezentativní. Délka částic může být větší než 2 mm, ale nemá být větší než 5 mm. Částice je nutno promíchat a zkoušku provést bez prodlíní.

5.1.3 Semena střední velikosti (podzemnice, sója apod.), kromě bavlníku a s přilehlými vlákny, se vzorek šrotuje v mechanickém mlýnku, který byl před použitím dobře vyčištěn, tak dlouho, dokud hlavní rozměr částic neklesne pod 2 mm. Větší částice (přibližně jedna dvacitina vzorku) se vyřadí, zbytek se pečlivě promíchá a stanovení se provede bez prodlíní.

5.1.4 Bavlníková semena s přilehlými vlákny

Do vysoušecí misky (4.6.3) se naváží přibližně 60 g vzorku s přesností 1 mg tak, jak byl získán. Miska se semeny se vloží do sušárny (4.6.1), předem vyhřáté na (130 ± 2) °C a vzorek se nechá při této teplotě sušit 2 hodiny. Poté se miska vyjme ze sušárny a nechá se vychladnout na vzduchu asi 30 minut. Vysušená semena se přemístí do porézní keramické nádoby (4.6.4), jejíž vnitřní stěny byly předem pomocí pipety zvlhčeny 1,5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2). Je třeba dbát na to, aby se kyselina úplně vstřebala a nevytvářela na stěnách ulpívající kapky. Potom se nádoba přikryje hodinovým sklem a vloží do sušárny (4.6.2) a zahřeje se během 30 minut na teplotu 115 °C a při této se udržuje dalších 30 minut. Poté se keramická nádoba (4.6.4) vyjme ze sušárny a nechá zchladit na vzduchu 1 hodinu.

Semena se zváží s přesností 1 mg, rozemelou se na mechanickém mlýnku jako v odstavci 5.1.3.

5.1.5 Malá semena (len, řepka, konopí, čočka apod.) se zkouší bez předchozího mletí (v původním stavu).

5.2 Vlastní stanovení přímou extrakcí

5.2.1 U materiálů uvedených v 5.1.2, 5.1.3 a 5.1.4 se do extrakční patrony (tuby) (4.3) odváží asi 10 g vzorku s přesností 1 mg a shora se utěsní obvazovou vatou (poznámka 8.2). Navážka malých semen se nejprve rozdrtí v mechanickém mikrodrtiči nebo v mlýnku, přičemž je třeba dát pozor, aby byla rozdrcena všechna semena. Rozdrcená semena se přenesou kvantitativně do extrakční patrony (tuby) (4.3), nejlépe pomocí špachtle a vatového tamponu, namočeného do použitého extrakčního činidla (3.1). Tímto tamponem se také vytře miska mikrodrtiče nebo mlýnku a shora se s ním utěsní extrakční patrona (tuba) (poznámka 8.2).

Pokud obsah těkavých látek (vlhkost) přesahuje 10 %, vloží se patrona (tuba) se vzorkem do sušárny (4.4) a předsuší se při teplotě 80 °C tak, aby se obsah těkavých látek snížil pod 10 %.

5.2.2 První extrakce

Extrakční patrona (tuba) (4.3) se vzorkem se vloží do střední části extrakčního přístroje (4.1), tato část se nasadí na extrakční baňku A, předem vysušenou (30 min. při 80 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážena s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky A se přidá potřebné množství extrakčního činidla (3.1), baňka se umístí na vyhřívací zařízení (4.2), napojí se na extraktor (4.1) a extrahuje se po dobu 4 hodin. Rychlost extrakce se upraví tak, aby během jedné hodiny došlo nejméně k 10 přetokům extrakčního činidla, je-li použit diskontinuální extraktor nebo minimálně 3 až 5 kapek kondenzujícího extrakčního činidla za sekundu, byl-li použit kontinuální průtokový extraktor. Po této době se extrakce přeruší, extrakční zařízení se nechá vychladnout, vyjme se patrona (tuba) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla.

5.2.3 Druhá extrakce

Druhá a další extrakce se provádí se vzorkem po první extrakci.

Vzorek se z patrony (tuby) (4.3) vysype do mikrodrtiče a rozdrtí se co možná nejmenší (poznámka 8.3). Takto upravený vzorek se kvantitativně vsype zpět do patrony (tuby) (4.3) a ta se opět vloží do extrakčního zařízení (4.1) a extrahuje další dvě hodiny. K tomu účelu se použije stejná extrakční baňka A, obsahující první část extraktu. Po dvou hodinách se extrakce přeruší, extrakční zařízení (4.1) se nechá vychladnout, opět se vyjme patrona (tuba) (4.3) a v proudu vzduchu se nechá odpařit většina rozpouštědla. Opakuje se drcení jako po první extrakci.

5.2.4 Třetí extrakce

Vzorek se po druhé extrakci a následném drcení vloží zpět do extrakční patrony (tuby) (4.3) a tato se vloží zpět do extrakčního zařízení (4.1). K zařízení se připojí extrakční baňka B, předem vysušená (30 min. při 80 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážena s výše uvedenou přesností. Do extrakční baňky B se přidá potřebné množství extrakčního činidla, baňka se umístí na vyhřívací zařízení (4.2), napojí se na extraktor a extrahuje po dobu 2 hodin.

5.2.5 Odstranění extrakčního činidla a vážení tuku

Větší část rozpouštědla z extrakčních baněk A a B se odpaří na vyhřívacím zařízení (4.2), poslední stopy extrakčního činidla se odstraní v sušárně (4.4) při teplotě 95 °C až 98 °C po dobu 1,5 hod. Extrakční činidlo je možno odstranit také proudem vzduchu nebo lépe inertním plynem (3.3), zaváděného do baněk po krátkých intervalech anebo snížením tlaku v baňkách.

Baňky s vyextrahovaným tukem („olejem“) se nechají vychladnout v exsikátoru po dobu nejméně 1 hodinu a potom se zváží s přesností nejméně na 0,001 g. Potom se baňky s extraktem vloží zpět do sušárny (4.4) a při výše uvedené teplotě se suší ještě 10 minut, ochladí se v exsikátoru a opět zváží s výše uvedenou přesností. Pro obě baňky platí, že rozdíl mezi dvěma váženími by neměl být větší než 10 mg. V negativním případě (rozdíl je vyšší) je nutné sušení a vážení opakovat až bude docíleno výše uvedeného rozdílu.

Pokud hmotnost výtěžku v baňce B nepřekročí 10 mg, extrakce je dokončena. V opačném případě je nutno provést další extrakci po dobu dvě hodiny za stejných podmínek je v předchozích extrakcích s novou extrakční baňkou, dokud množství výtěžku z poslední extrakce není nižší nebo rovno 10 mg.

5.2.6 Stanovení obsahu nečistot

Vyextrahovaný olej má být čistý. Pokud není, je nutno určit obsah nečistot. K tomuto účelu se rozpustí olej v rozpouštědle použitým k extrakci, zfiltruje se přes filtrační papír, předem vysušený při (103 ± 2) °C do konstantní hmotnosti a zvážen s přesností 1 mg.

Filtr se ještě několikrát promyje čistým rozpouštědlem (3.1), aby se zcela odstranil vyextrahovaný tuk („olej“). Filtr se vysuší při (103 ± 2) °C do konstantní hmotnosti a zváží s přesností 1 mg. K chlazení a vážení se použije vhodná nádoba opatřená víčkem.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Stanovení obsahu tuku („oleje“) v semeni tak, jak bylo zkoušeno

Obsah oleje (tuku) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 10^3 \cdot \frac{m_1}{m_0}$$

kde m_0 je hmotnost zkušebního vzorku v g

m_1 součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg. Pokud není splněna podmínka opakovatelnosti, opakuje se zkouška ve dvou jiných navážkách vzorku. Pokud i v tomto případě přesáhne rozdíl 0,4 g na 100 g vzorku, bere se za výsledek aritmetický průměr všech čtyř uskutečněných zkoušek.

V protokolu musí být uvedeno použité extrakční činidlo.

6.2 Stanovení oleje při odděleném rozboru čistých semen a nečistot

Vzorec uvedený v 6.1 lze použít také pro výpočet obsahu oleje jak čistých semen tak i nečistot, tzn. když byla čistá semena a nečistoty zkoušena odděleně. V tomto případě se obsah oleje v g/kg (Y) vypočte podle vzorce:

$$Y = H_1 - \frac{P \cdot (H_1 - H_2)}{10^3}$$

kde P je obsah nečistot ve zkoušených semenech v g/kg

H_1 obsah oleje v čistých semenech v g/kg

H_2 obsah oleje v nečistotách v g/kg

6.3 Stanovení obsahu oleje v bavlníkových semenech s přilehlými vlákny

Obsah oleje (tuku) v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = 10^3 \cdot \frac{m_1 \cdot m_2}{m_0 \cdot m_2}$$

kde m_0 je hmotnost zkušebního vzorku v g

m_1 součet hmotností vyextrahovaného tuku v baňkách A a B po sušení v g

m_2 hmotnost zkušebního vzorku (asi 60 g) před přípravou podle 5.1.4 v g

m_3 hmotnost stejného zkušebního vzorku po provedené přípravě podle 5.1.4 a před drcením v g

6.4 Stanovení obsahu tuku („oleje“) v případech, kdy byly velké neolejnaté částice odděleny před zkouškou

Obsah oleje (tuku) v g/kg (U) se vypočítá podle vzorce:

$$U = X \cdot \frac{10^3 - N}{10^3}$$

kde X je obsah tuku v semeni podle 6.1

N obsah velkých neolejnatých nečistot předem oddělených ze zkoušeného semene v g/kg

6.5 Stanovení obsahu tuku („oleje“) v podzemnici olejné

Obsah oleje (tuku) v g/kg (V) se vypočítá podle vzorce:

$$V = (H_1 - H_2) \cdot \frac{J + I_0 + I_1}{10^3}$$

kde J je obsah jemných částic zkušebního vzorku v g/kg

I_0 obsah olejnatých nečistot v g/kg

I_1 obsah neolejnatých nečistot v g/kg

H_1 obsah oleje v čistých semenech v g/kg

H_2 obsah oleje v nečistotách v g/kg

6.6 Stanovení obsahu oleje, korigovaného na sušinu

Obsah oleje (tuku) korigovaný na sušinu v g/kg (W) se vypočítá podle vzorce:

$$W = X \cdot \frac{100}{100 - S}$$

kde X je obsah oleje (tuku) v g/kg v semenech, tak jak byl získán podle 6.1

S obsah vlhkosti a těkavých látek v %

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu 4 g/kg.

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Olejnatá semena mohou být zkoušena odděleně takto:

a) čistá semena a nečistoty

b) u podzemnice olejné čistá semena, celkové množství jemných částic, neolejnaté nečistoty a olejnaté nečistoty.

8.3 V laboratořích, které neprovádí pravidelně rozborů olejnatých semen a kde není mikrodrtič dostupný, může být mikrodrcení nahrazeno roztřením na prášek tloučkem v třecí misce.

Po čtyřech hodinách extrakce podle 5.1.2 se vyprázdní obsah tuby do třecí misky a přidá se přibližně 10 g písku, který byl předem promytý kyselinou chlorovodíkovou (3.2) a následně vysušen. Vzorek semene spolu s pískem se potom roztírá tloučkem co nejjemněji a dále se pokračuje ve zkoušce podle odstavce 5.1.3. Protože je ruční drcení méně účinné než mechanické v mikrodrtiči, je množství oleje získané v baňce B, která obsahuje výsledek třetí extrakce, téměř vždy vyšší než 10 mg (zejména v případě semen, která se těžko extrahují, jako např. kopra). Proto je důležité provádět za sebou následující extrakce, dokud množství extrahovaného oleje z poslední extrakce není nižší než 10 mg, což může být více než 5 extrakcí.

Drcení v třecí misce nemůže být většinou použito v případě ví-

cenásobného rozboru, protože únava pracovníka laboratoře brání uspokojivému rozdrcení více vzorků a extrakce oleje z hrubě rozdrceného vzorku nemůže být dokonalá.

8.4 Pokud je požadováno určení obsahu oleje z čistých semen, zkouší se tato semena odděleně od nečistot a postupuje se přitom jako u semen tak, jak byla získána. Pro určení obsahu oleje v nečistotách se provede zkouška stejným způsobem jako pro čistá semena. Avšak v tomto případě:

a) zkušební navážka má být použita v množství 2–10 g

b) provádí se pouze jedna extrakce a to po dobu 4 hodin, kdy eventuální chyba vzniklá při stanovení obsahu oleje v původním olejnatém semeni je zanedbatelná.

8.5 Slupky slunečnicových semen obsahují určité množství vosků, které jsou také vyextrahovány hexanem podle shora uvedených postupů, pokud je zkouška provedena na neopracovaných semenech. Zkoušení semen slunečnice beze slupky nemůže být brán v úvahu zejména pro změny v hmotnosti, způsobené různým obsahem vlhkosti v jádře slunečnice během odstraňování slupky.

Průmyslově je olej častěji získáván ze slunečnicových semen, z nichž byly slupky odstraněny, buďto částečně nebo úplně. Proto je běžné nebrat v úvahu vosky ze slupek extrahované hexanem.

8.6 Pro stanovení tuku je možno použít i extrakčních poloautomatických přístrojů, pokud poskytují výsledky zcela srovnatelné v mezích opakovatelnosti s uvedenou metodou.

8.7 Množství extrakčního činidla se volí takové, aby u přístroje diskontinuálně průtokového docházelo ke spolehlivému přetékání kondenzátu extrakčního činidla.

U kontinuálně průtokového přístroje se volí přibližně 50 až 100 ml.

3.3 Stanovení čísla kyselosti tuku

1. Účel a rozsah

S ohledem na původ krmiva a podle způsobu, jakým byl tuk z krmiva vyextrahován, jsou uvedeny dvě základní metody stanovení.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení čísla kyselosti tuku v krmivech.

2. Princip

Číslo kyselosti tuku se stanoví titračně alkalimetry, po rozpuštění tukového extraktu získaného bez hydrolyzy vzorku resp. tuku samotného ve směsi extrakčního činidla—ethylalkohol.

3. Chemikálie

3.1 Extrakční činidlo (poznámka 8.1)

3.1.1 n-Hexan nebo petrolether, obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml nebo

3.1.2 Diethylether bez obsahu peroxidů a zbytku po odpaření nejvýše 1 mg/100 ml

3.2 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$ nebo $0,05 \text{ mol/l}$

3.3 Směs ethylalkohol-extrakční činidlo (poznámka 8.1)
Příprava: Smísením obou látek v poměru 1 + 1 a zneutralizováním směsí odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) na indikátor fenolftalein (3.4). Neutralizace se provádí těsně před použitím.

3.4 Indikátor acidobazický, fenolftalein
Příprava: 1,0 g fenolftaleinu se rozpustí v odměrné baňce na 100 ml v 80 ml 96% ethylalkoholu, doplní vodou po rysku a promíchá. 10 ml tohoto roztoku se odpipetuje do 100 ml odměrné baňky, doplní 96 % ethylalkoholem po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Přístroj extrakční Soxhlet nebo Twisselmann (poznámka 8.2)

4.2 Zařízení vyhřívací v bezpečnostním provedení

4.2 Patrony nebo tuby extrakční

4.3 Sušárna elektrická s automaticky regulovatelnou teplotou a s odvětráváním a teploměrem nejméně do 150 °C.

4.4 Baňka extrakční se zábrusem

4.5 Miska třecí porcelánová

4.6 Písek křemičitý, tukuprostý

4.7 Vata obvazová, odtučněná

4.8 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Tuk vyextrahovaný podle Přílohy 9, část 3.1 Stanovení obsahu tuku (poznámka 8.3 a 8.4) po vychladnutí a zvážení (m), s přesností nejméně na 0,001 g, resp. tuk jako takový odvážený se stejnou přesností (m), se v extrakční baňce (4.4) mírně zahřeje a obsah se rozpustí v 25 ml směsi ethylalkohol-extrakční činidlo (3.3). Po přidání pár kapek indikátoru fenolftaleinu (3.4) se titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) do právě vzniklého růžového zabarvení roztoku, které vydrží alespoň 1 minutu.

Při vyšší spotřebě odměrného roztoku hydroxidu draselného (3.2) než 15 ml (o koncentraci 0,1 mol/l) je nutno na každý další spotřebovaný ml odměrného roztoku (3.2) přidat pětinašobné množství směsi ethylalkohol-extrakční činidlo (3.3), aby se zabránilo hydrolyze vznikajícího mydla.

5.2 U vzorků mléčných krmných směsí se postupuje následovně:

Asi 10 g zkušebního vzorku se odváží s přesností nejméně na 0,001 g do třecí misky (4.5), obsah se mírně zvlhčí vodou a s postupně přidávanými přípravky vody po 1 až 10 ml se rozetře na hustou kaši. Potom se přidá asi 10 g jemného křemičitého písku (4.6) a obsah třecí misky (4.5) se kvantitativně vytřídá s postupnými přídávky extrakčního činidla (3.1) (3 × 50 ml), přičemž po každé přídávce se obsah vytřídá po dobu asi dvou minut. Po důkladném rozetření se extrakt filtruje řídkým filtrem do předem vysušené (1 hod. při 95 °C až 98 °C), v exsikátoru ochlazené a s přesností nejméně na 0,001 g zvážené extrakční baňky (4.4). Suspense se promyje několikrát použitým extrakčním činidlem (3.1) do téže extrakční baňky (4.4) a nakonec se převážná část extrakčního činidla (3.1) opatrně oddestiluje, zbytek se nechá odpařit buď volně nebo na vroucí lázni (4.8). Baňka se extraktem se vysuší při teplotě

95 °C až 98 °C v sušárně (4.3) do konstantní hmotnosti (jednu až dvě hodiny) ochladí v exsikátoru a zváží s přesností nejméně na 0,001 g.

Dále se postupuje podle odstavce 5.1.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Číslo kyselosti tuku v mg KOH na 1 g tuku (X) nebo v mmol na 1 g tuku (Y) se vypočítá podle vzorců:

$$X = \frac{V \cdot C \cdot 56,11}{m}$$

$$Y = \frac{V \cdot C}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu draselného v ml.

C přesná koncentrace použitého odměrného roztoku hydroxidu draselného v mol/l

m hmotnost vyextrahovaného tuku v g nebo při navážce vzorku tuku hmotnost zkušebního vzorku v g (poznámka 8.4)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností do hodnoty 10 mg KOH/1 g na celá čísla, resp. do hodnoty 0,2 mmol/ g na dvě desetinná místa a nad tuto hodnotu na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku pro hodnoty větší než 4 mg KOH/g (resp. 0,07 mmol/g) nesmí překročit 15 % relativních.

8. Poznámky

8.1 n-Hexan, petrolether, diethylether i ethylalkohol jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné přísně dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Pro stanovení (extrakci) tuku je možné použít extrakčního poloautomatického přístroje, pokud poskytuje zcela srovnatelné výsledky stanovení tuku v mezích opakovatelnosti (tuku) s postupem uvedeným v Příloze 9, část 3.1 Stanovení obsahu tuku.

8.3 Tuk vyextrahovaný po předběžné hydrolyze nelze ke stanovení čísla kyselosti tuku použít, je nutné provést přímou extrakci vzorku i za cenu, že nebude kvantitativní – výsledek se vyjadřuje bez ohledu na hmotnost zkušebního vzorku jen na hmotnost vyextrahovaného tuku. S ohledem na nižší výtěžnost vyextrahovaného tuku přímou extrakcí je vhodnější volit vyšší navážku vzorku (bez vážení).

8.4 Při stanovení čísla kyselosti tuku v samotném (např. krmném) tuku se vzorek přímo odvažuje do vhodné baňky v množství asi 0,2 až 0,5 g s přesností nejméně na 0,001 g a dále se postupuje jak uvedeno v této metodě.

3.4 Stanovení obsahu lecithinu

1. Účel a rozsah

Metoda je určena na stanovení obsahu lecithinu v technických a potravinářských produktech.

2. Princip

Stanoví se obsah látek rozpustných v acetonu, obsah látek nerozpustných v benzenu nebo toluenu a obsah vody s těkavými látkami a jejich součet se odečte od 100.

3. Chemikálie

3.1 Petrolether obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)

3.2 Aceton

3.3 Benzen nebo toluen (poznámka 8.1 a 8.2)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Odstředivka (elektrická nebo ruční) s nádobkami se značkou objemu 50 ml

4.2 Skleněný filtrační kelímek

4.3 Sušárna elektrická s termostatem

4.4 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Stanovení látek rozpustných v acetonu

Vzorek se zahřeje na 60 °C a důkladně se promíchá. Naváží se přesně asi 2 g do vytvářené odstředivkové nádoby se značkou 50 ml (4.1) a s tyčinkou (poznámka 8.3).

Po přidání 3 ml petroletheru (3.1) se směs dobře promíchá (míchá se asi 15 minut), přidá se 15 ml acetonu (3.2), znovu se promíchá a vloží se do misky s ledovou vodou. Přidává se aceton (3.2), ochlazený na 0–5 °C, za důkladného míchání až ke značce 50 ml. Po vyjmutí tyčinky se nádoba vloží na 15 min. do ledové vodní lázně a potom se její obsah odstřeďuje 10 min. dostatečnou rychlostí, až se roztok zcela vyjasní. Acetonový roztok se dekantuje do vysušené a zvážené kádinky na 250 ml.

Odstředivková nádoba (4.1) se znovu doplní acetonem (3.2) ke značce 50 ml za důkladného míchání a znovu se opakuje chlazení, odstřeďování a dekantace. Potom se aceton (3.2) na vodní lázni odpaří a zbytek rozpouštědla (3.2) se odstraní proudem čistého horkého vzduchu. Sušení se provádí při 105 °C a po vychladnutí v exsikátoru se váží. Vážení se opakuje, dokud se nedosáhne konstantní hmotnosti.

5.2 Stanovení látek nerozpustných v benzenu nebo toluenu

Naváží se 10 g dobře promíchaného vzorku do kuželovité baňky na 250 ml, přidá se 100 ml benzenu nebo toluenu (3.3) a protřepává se do rozpouštění. Potom se filtruje skleněným filtračním kelím-

kem (4.2), předem vysušeným 1 hodinu při 105 °C a zváženým s přesností 1 mg. Je-li filtrace obtížná, zmenší se navážka vzorku. Místo skleněného kelímku (4.2) lze použít papírového filtru, také předem vysušeného při uvedené teplotě a zváženého s přesností 1 mg.

Kuželovitá baňka se 2krát vypláchne vždy 25 ml benzenem (3.3) a zbytek v kelímku (4.2) se zároveň promyje. Kelímek (4.2) se vloží do sušárny (4.3) a suší se 1 hodinu při 105 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek zváží s uvedenou přesností.

5.3 Stanovení vody a těkavých látek

Provádí se podle Přílohy 9, metoda 3.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Obsah látek rozpustných v acetonu v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot a}{m}$$

kde a je hmotnost extraktu v g
m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

6.2 Obsah látek nerozpustných v benzenu v g/kg (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = \frac{10^3 \cdot b}{m}$$

kde b je hmotnost nerozpustného zbytku v g,
m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g.

6.3 Obsah lecithinu v g/kg (A) se vypočte podle vzorce:

$$A = 1000 - \{X + Y + (10 \cdot Z)\}$$

kde X je množství látek rozpustných v acetonu v g/kg
Y množství látek nerozpustných v benzenu v g/kg
Z množství vody a těkavých látek v %

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 10 g/kg

8. Poznámky

8.1 Aceton, benzen, petrolether a toluen jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Doporučuje se používat méně toxický toluen, s ohledem na karcinogenní účinky benzenem.

8.3 U většiny lecithinů lze místo odstředivkové nádoby použít kádinky a vyluhovat i dekantovat bez odstřeďování za použití filtrace.

3.5 Stanovení obsahu nerozpustných nečistot

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu nerozpustných nečistot v živočišných a rostlinných tucích nebo olejích.

Nerozpustné nečistoty a cizí látky, stanovené za podmínek specifikovaných v této metodě, zahrnují mechanické nečistoty, minerální látky, cukry, dusíkaté látky, různé pryskyřice, vápenatá mýdla, oxidované mastné kyseliny, laktony mastných kyselin a (částečně) alkalická mýdla, mastné kyseliny obsahující hydroxylovou skupinu a jejich glyceridy (poznámka 8.1).

2. Princip

Nerozpustné nečistoty se stanoví rozpouštěním vzorku v přebytečném n-hexanu nebo petroletheru nebo diethyletheru filtrační získaného roztoku a zvážením vysušeného filtru s nerozpustnými nečistotami.

3. Chemikálie

3.1 Petrolether nebo n-hexan, destilující v rozsahu 30 až 60 °C, s bromovým číslem menším než 1. Pro obě rozpouštědla by odparek neměl přesáhnout 0,002 g na 100 ml (poznámka 8.2).

3.2 Diethylether bez obsahu peroxidů, zbytkem po odpaření nejvýše 1 mg/100 ml

3.3 Křemelina čištěná, vyžíhaná; ztráta při 900 °C (červený žár) 0,2 %

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Elektrická sušárna s možností nastavení (103 ± 2) °C

4.2 Kónická baňka na 250 ml se skleněnou zabroušenou zátkou

4.3 Filtrační papír neobsahující popel, (maximální obsah popela 0,01 %), zadržovací schopnost 98 % pro částice velikosti větší než 2,5 mm nebo ekvivalentní skleněný filtr o průměru 120 mm a kovová (nejlépe hliníková) nebo skleněná nádoba s dobře těsnícím víkem. (Alternativa k 4.5 pro všechny produkty kromě kyselých olejů.)

4.4 Skleněný filtrační kelímek P16 (velikost pórů 10 až 16 μm), průměr 40 mm, objem 50 ml a odsávačka. (Alternativa k 4.3 pro všechny produkty včetně kyselých olejů.)

4.5 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

5. Postup

Do kónické baňky (4.2) se naváží, s přesností 0,01 g, přibližně 20 g zkušebního vzorku.

Vysuší se filtrační papír (4.3) a nádoba s víčkem nebo filtrační kelímek (4.4) v sušárně (4.1) nastavené na 103 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží s přesností na 0,001 g.

Do baňky obsahující navážený vzorek se přidá 200 ml n-hexanu nebo petroletheru (3.1) nebo diethyletheru (3.2), baňka se zazátkuje a protřepe. Pro ricinový olej může být množství rozpouštědla zvýšeno, aby bylo usnadněno stanovení. Baňka se nechá stát při 20 °C po dobu 30 min.

Obsah baňky se zfiltruje přes vysušený a zvážený filtrační papír (4.3) ve vhodné nálevce, nebo přes filtrační kelímek (4.4). Je-li to nutné, lze použít vakua (4.5). Filtrační papír (4.3) nebo kelímek (4.4) se promyje malým množstvím stejného rozpouštědla, jaké bylo použito na rozpouštění vzorku, ale ve větším množství než je nutné, aby konečný filtrát neobsahoval tuk nebo olej. V případě, že jsou na filtru zachyceny nerozpuštěné tuky, ohřeje se rozpouštědlo na teplotu max. 60 °C.

Jestliže byl použit filtrační papír (4.3), nechá se po jeho vyjmutí z nálevky odpařit na vzduchu ve vhodné nádobě většina rozpouštědla, a potom se dokonale odstraní v sušárně (4.1) při 103 °C. Po vyjmutí ze sušárny (4.1) se nádoba uzavře víkem, nechá se vychladnout v exsikátoru a zváží se s přesností na 0,001 g.

Jestliže je k filtraci použit kelímek (4.4), nechá se většina zbytkového rozpouštědla odpařit na vzduchu a odstranění rozpouštědla se dokončí v sušárně (4.1) při 103 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek zváží s přesností na 0,001 g.

Jestliže je požadováno stanovení obsahu organických nečistot, je nutné použít předem vysušený a zvážený filtrační papír (4.3), který neobsahuje popel. V tomto případě by měl být filtrační papír (4.3) obsahující nerozpustné nečistoty spálen a vypočtená hmotnost popela by měla být odečtena od nerozpustných nečistot.

Jestliže se analyzují kyselé oleje, pokryje se skleněný kelímek křemelinou (3.3) podle následujícího postupu. Ve 100 ml skleněné kádince se připraví suspenze obsahující 2 g křemeliny (3.2) a přibližně 30 ml petroletheru (3.1). Směs se nalije do filtračního kelímku (4.4) při odsávání (4.5), aby vznikla vrstva křemeliny na skleněném filtru. Připravený suchý skleněný filtrační kelímek se vloží na 1 hodinu do sušárny (4.1) při teplotě 103 °C. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek zváží s přesností na 0,001 g.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Obsah nerozpustných nečistot vyjádřený v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_2 - m_1)}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

m_1 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a filtračním papírem nebo filtračního kelímku v g

m_2 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a filtračním papírem, obsahující vysušené nečistoty nebo filtračního kelímku s vysušenými nečistotami v g.

6.2 Obsah organických nečistot vyjádřený v g/kg (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = \frac{10^3 \cdot (m_2 - m_3)}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

m_2 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a filtračním papírem, obsahující vysušené nečistoty nebo filtračního kelímku s vysušenými nečistotami v g.

m_3 hmotnost vysušené nádoby s víčkem a spáleným filtračním papírem s nečistotami nebo filtračního kelímku s spálenými nečistotami v g.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 3,0 g/kg	0,2 g/kg nerozpustných nečistot
nad 3,0 g/kg	0,5 g/kg nerozpustných nečistot

8. Poznámky

8.1 V případě, že není žádoucí zahrnout mýdla (zejména vápenatá mýdla) do nerozpustných nečistot, je nezbytné použít jiné rozpouštědlo a postup. V tomto případě by měla být metoda odsouhlasena smluvními stranami.

8.2 n-Hexan, petrolether i diethylether jsou nebezpečnými hořlavými I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

3.6 Stanovení obsahu nezmýdelnitelných látek

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje postup pro stanovení nezmýdelnitelného podílu v živočišných a rostlinných tucích a olejích extrakcí diethyletherem.

Metoda není použitelná pro vosky a dává přibližné výsledky pro určité tuky s vyšším obsahem nezmýdelnitelného podílu, např. pro tuky pocházející z mořských živočichů.

2. Princip

Tuk nebo olej se zmýdelní varem s ethanolickým roztokem hydroxidu draselného pod zpětným chladičem. Nezmýdelnitelný podíl se vyextrahuje z roztoku mýdla diethyletherem a po oddestilování rozpouštědla a vysušení se zváží zbytek (poznámka 8.6).

3. Chemikálie

3.1 Diethylether, čerstvě předestilovaný, bez peroxidů a odparku (poznámka 8.1)

3.2 Aceton (poznámka 8.1)

3.3 Hydroxid draselný, ethanolický roztok KOH

Příprava: 60 g hydroxidu draselného se rozpustí v 50 ml vody a doplní se do 1000 ml 96% ethylalkoholem. Roztok by měl být bezbarvý nebo slámově žlutý.

3.4 Hydroxid draselný, vodný roztok $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.5 Fenolfalein: ethanolický (96%) roztok, $c = 10 \text{ g/l}$

3.6 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.7 Ethylalkohol, roztok 65%, předem zneutralizovaný do slabě růžového zabarvení v přítomnosti fenolfaleinu (3.5) jako indikátoru (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Baňka s kulatým dnem se zábrusem na 250 ml nebo Baňka s rovným dnem na 500 ml

4.2 Zpětný chladič se zábrusem vhodným k připojení k baňce (4.1)

4.3 Dělicí nálevky na 500 ml s kohoutem s polytetrafluorethylenovou (teflonovou) zátkou

4.4 Vodní lázeň s termostatem

4.5 Sušárna s termostatem

5. Postup

5.1 Asi 5 g zkušební vzorku se naváží s přesností nejméně 0,01 g do baňky (4.1), přidá se 50 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3) a několik varných kamínků. Zpětný chladič (4.2) se připojí k baňce a obsah se vaří mírně 1 hodinu. Po přerušení ohřevu se horní částí chladiče přidá 100 ml vody a obsah baňky se promíchá kruhovým pohybem (poznámka 8.2).

Roztok se po ochlazení převede do 500 ml dělicí nálevky (4.3). Baňka a varné kamínky se několikrát propláchnou diethyletherem (3.1). Celkem se použije 100 ml diethyletheru a tento roztok se přeleje do dělicí nálevky. Po zazátkování se důkladně protřepe po dobu 1 minuty za občasných uvolnění tlaku obrácením dělicí nálevky a opatrným otevřením kohoutu. Obsah se nechá stát, dokud nedojde k úplnému rozdělení na dvě vrstvy. Potom se spodní vrstva kvantitativně převede do druhé dělicí nálevky. Jestliže dojde k vytvoření emulze, rozrazí se přidávkou malého množství ethylalkoholu, koncentrovaného hydroxidu draselného nebo roztoku chloridu sodného.

Vodně ethanolický roztok mýdla se extrahuje ještě dvakrát, po každé stejným způsobem 100 ml diethyletheru (poznámka 8.3). Všechny tři extrakty se spojí do jedné dělicí nálevky, obsahující 40 ml vody. Etherové extrakty se promyjí mírným kroužením dělicí nálevkou (poznámka 8.4).

Po úplném oddělení se spodní vodná vrstva vypustí. Etherový roztok se promyje ještě dvakrát 40 ml vody pomocí silného třepání a vodná vrstva se po každém promytí odpustí. Při každém odpouštění promývací vodné vrstvy se nechají v dělicí nálevce 2 ml a obsah nálevky se promíchá kroužením kolem osy. Potom se vyčká několik minut, dokud se zbylá vodná vrstva nespojí. Po jejím vypuštění se uzavře kohout, jakmile se etherový roztok dotkne otvoru v kohoutu. Následně se etherový roztok promyje 40 ml roztoku hydroxidu draselného (3.4), 40 ml vody, znovu 40 ml roztoku hydroxidu draselného a potom nejméně dvakrát 40 ml vody.

V promývání se pokračuje dokud promývací voda již nedává růžové zabarvení po přidání kapky roztoku fenolfaleinu (3.5). Potom se etherový roztok kvantitativně převede co nejrychleji horním otvorem dělicí nálevky do 250 ml baňky (4.3), předem vysušené při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ v sušárně (4.5), ochlazené a zvážené s přesností na 0,1 mg. Rozpouštědlo se odpaří na vroucí vodní lázni (4.4) (poznámka 8.5). Po přidávce 5 ml acetonu (3.2) se dokonale odpaří těkavé rozpouštědlo v mírném proudě vzduchu, při otáčení baňky šikmo ponořené do vroucí vodní lázně.

Zbytek se suší v sušárně (4.5) při $(103 \pm 2)^\circ\text{C}$ po dobu 15 minut v baňce umístěné v téměř vodorovné poloze. Po ochlazení v exsikátoru se baňka zváží s přesností na 0,1 mg. Sušení se opakuje dokud ztráta hmotnosti mezi dvěma následnými váženími není menší než 1,5 mg.

Jestliže není dosaženo konstantní hmotnosti po třech opakováních sušení, je nezmýdelnitelný podíl pravděpodobně znečištěn a stanovení by se mělo opakovat.

Jestliže je požadována korekce na obsah volných mastných kyselin, rozpustí se zbytek po zvážení ve 4 ml diethyletheru (3.1), přidá se 20 ml ethylalkoholu (3.7). Roztok se ztitruje standardním odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.6) do stejného ko-

nečného zabarvení. Hmotnost volných mastných kyselin se vypočte jako kyselina olejová a hmotnost zbytku se upraví o tuto hodnotu.

5.2 Slepý pokus

Slepý pokus se provede za stejných podmínek, se stejným množstvím všech činidel, ale vynechá se navážka vzorku. Jestliže zbytek je větší než 1,5 mg, je třeba ověřit postup a použítá činidla.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah nezmýdelnitelného podílu, vyjádřený v g/kg (X), se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_1 - m_2 - m_3)}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušební vzorku v g,

m_1 hmotnost zbytku v g,

m_2 hmotnost zbytku získaného při slepém pokusu v g,

m_3 případně hmotnost volných mastných kyselin v g (K), která se rovná:

$$K = 2,8 \cdot C \cdot V$$

kde V je objem odměrného roztoku hydroxidu draselného (3.6) použitého při titraci v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného (3.6) v mol/l.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na celé jednotky

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu nezmýdelnitelného podílu do:

50 g/kg	0,5 g/kg
100 g/kg	1 g/kg

8. Poznámky

8.1 Aceton, diethylether a ethylalkohol jsou nebezpečnými hořavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Jestliže extrakce nezmýdelnitelných látek je prováděna s ohledem na další stanovení tokoferolů, je nezbytný přísádek pyrogallolu a extrakce by měla být rychle ukončena (asi během 30 min).

8.3 Pro dokonalejší extrakci se extrahuje třikrát a všechny čtyři extrakty se spojí.

8.4 Prudké třepání v tomto stadiu může způsobit vznik emulze.

8.5 Jestliže je k dispozici rotační vakuová odparka, lze ji použít, zvláště jestliže bude nezmýdelnitelný podíl dále analyzován.

8.6 Nezmýdelnitelný podíl zahrnuje přírodní lipidy, jako jsou steroidy, vyšší uhlovodíky a alkoholy, alifatické a terpenické alkoholy, ale také cizí organické látky extrahované rozpouštědlem a netěkavé při 103 °C (např. minerální oleje).

3.7 Stanovení peroxidového čísla

Do této metody byla zapracována doporučení ISO TC34 3968-1977

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení peroxidového čísla v živočišných a rostlinných tucích a olejích.

Peroxidové číslo je definováno jako množství látek ve vzorku, vyjádřené v milimolech aktivního kyslíku na kg, které oxidují jodid draselný za předepsaných podmínek.

2. Princip

Peroxidové číslo se určí reakcí chloroformového extraktu vzorku s jodidem draselným v roztoku kyseliny octové a chloroformu a následnou titrací uvolněného jodu odměrným roztokem thiosíranu sodného.

3. Chemikálie

3.1 Chloroform, zbavený kyslíku proudem čistého a suchého inertního plynu.

3.2 Kyselina octová ledová, zbavená kyslíku proudem čistého a suchého inertního plynu.

3.3 Jodid draselný, čerstvě připravený nasycený vodný roztok neobsahující jód a jodičnany (poznámka 8.1).

3.4 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,005 \text{ mol/l}$ nebo 0,001 mol/l, standardizovaný těsně před použitím.

3.5 Roztok škrobu: 5 g rozpustného škrobu se promíchá ve 30 ml vody, tato směs se přidá do 1000 ml vařící vody a vaří se 3 minuty.

Žádné činidlo (ani voda), použité ke stanovení, by nemělo obsahovat rozpuštěný kyslík.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Baňka na 250 ml se zábrusem, opatřená zátkou, předem vysušená a naplněná čistým, suchým inertním plynem (dusík, nebo lépe oxid uhličitý)

4.2 Skleněná váženka vhodné velikosti podle množství vzorku

4.3 Byreta na 10 ml, dělená po 0,02 ml

Všechna pomůcky musí být zbaveny redukčních a oxidačních látek, zábrusy nesmí být mazány tukem.

5. Postup

Stanovení by mělo být prováděno v rozptýleném denním světle nebo při umělém osvětlení.

5.1 Zkušební vzorek

Do baňky (4.1) se naváží vzorek s přesností na 0,001 g podle předpokládaných hodnot peroxidového čísla uvedených v následující tabulce. Vzorek může být navážen ve skleněné váženice (4.2), jestliže baňka nemůže být zvážena přímo.

Předpokládané peroxidové číslo v mmol/kg	Navážka vzorku v g
0–6	5,0–2,0
6–10	2,0–1,2
10–15	1,2–0,8
15–25	0,8–0,5
25–45	0,5–0,3

5.2 Vlastní stanovení

V případě, že byl vzorek navážen do váženky (4.2), vloží se váženka obsahující vzorek do baňky (4.1). Přidá se 10 ml chloroformu (5.1) a vzorek se rychle rozpustí zamícháním. Pak se přidá 15 ml kyseliny octové (3.2), potom 1 ml roztoku jodidu draselného (3.3), baňka (4.1) se ihned uzavře, 1 minutu míchá a ponechá stát přesně 5 minut ve tmě při teplotě 15 až 25 °C. Přidá se přibližně 75 ml vody, baňkou se prudce zamíchá a po přidávku několika kapek škrobového roztoku (3.5), jako indikátoru, se titruje uvolněný jód odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.4) při použití koncentrace 0,001 mol/l roztoku pro předpokládané peroxidové číslo do 12, nebo roztokem koncentrace 0,005 mol/l pro předpokládané peroxidové číslo větší než 12.

5.3 Slepý pokus

Spolu s vlastním stanovením se provádí slepý pokus. Jestliže výsledky slepého pokusu přesáhnou 0,1 ml roztoku thiosíranu sodného o koncentraci 0,005 mol/l (3.4), je třeba stanovení opakovat s jinými chemikáliemi.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Peroxidové číslo, vyjádřené v milimolech aktivního kyslíku (1/2 O₂) na 1 kg vzorku (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot C \cdot (V_2 - V_1)}{m}$$

kde V₁ je spotřeba odměrného roztoku thiosíranu sodného, použitého při titraci slepého pokusu v ml
V₂ spotřeba roztoku thiosíranu sodného, použitého při titraci vzorku
C koncentrace použitého roztoku thiosíranu sodného v mol/l
m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednu desetinu mmol/kg

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí přesáhnout při hodnotě
do 0,5 mmol/kg 0,1 mmol/kg
od 0,5 do 3 mmol/kg 0,2 mmol/kg
od 3 do 6 mmol/kg 0,5 mmol/kg
větší než 6 mmol/kg 1,0 mmol/kg

8. Poznámky

8.1 Je nutno se přesvědčit, že roztok je nasycený podle přítomnosti nerozpuštěných krystalů. Roztok je nutno skladovat ve tmě. Před použitím je nutno ověřit účinnost přidáním 2 kapek škrobového roztoku (3.5) k 0,5 ml roztoku jodidu draselného ve 30 ml

roztoku kyselina octová–chloroform (3:2). Jestliže k vymizení modrého zabarvení je třeba více než jedné kapky roztoku thiosíranu sodného o koncentraci 5 mmol/l, je nutno připravit čerstvý roztok.

8.2 Peroxidové číslo může být také vyjádřeno v mikrogramech aktivního kyslíku na g pomocí přepočítávacího faktoru: 1 milimol/kg = 16 mikrogramů/g

4.1 Stanovení obsahu vlákniny

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 83, 30/07/73 a L 344, 26/11/92

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dvě modifikace metody, pro manuální provedení a pro instrumentální pomocí hydrolyzačních automatických zařízení. Metody jsou použitelné pro všechna krmiva, kde obsah vlákniny je vyšší než 10 g/kg.

2. Princip

Vláknina se stanoví vážkově jako nehydrolyzovatelný zbytek vzorku po 30 minutové hydrolyze v roztoku kyseliny sírové, separaci pevného zbytku, následující hydrolyze roztokem hydroxidu draselného a po odečtení popela tohoto zbytku.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina sírová, roztok c(H₂SO₄) = (0,128 ± 0,05) mol/l

3.2 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 0,23 mol/l

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 0,5 mol/l

3.4 Aceton nebo ethylalkohol (poznámka 8.1)

3.5 Odpěňovací činidlo: např. oktylalkohol (poznámka 8.1)

3.6 Extrakční činidlo: n-Hexan, diethylether či petrolether s bodem varu 40 °C až 60 °C (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Sušárna laboratorní s regulovatelnou teplotou, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsahy teplot nejméně do 150 °C

4.2 Pec muflová s automatickou regulací teploty s možností odvětrávání a teploměrem pro rozsahy teplot nejméně do 650 °C

4.3 Nádobka hydrolyzační obsahu asi 600 ml s možností připojení na vhodné refluxní zařízení (vodný zpětný chladič) (poznámka 8.2) nebo nádobka hydrolyzační obsahu asi 600 ml (kádinka) s vyznačeným objemem na 200 ml

4.4 Váříč elektrický nebo topná deska s možností regulace zahřívání

4.5 Kefímek filtrační křemenný či skleněný s porézní vložkou (fritou) hustoty S1 nebo kefímek filtrační porcelánový

- 4.6 Miska spalovací, platinová (Pt-Ir), porcelánová nebo křemenná
- 4.7 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku
- 4.8 Nálevka filtrační podle Büchnera
- 4.9 Síto mlynářské (UHELON)
- 4.10 Papírky indikátorové
- 4.11 Pro instrumentální modifikaci navíc
- 4.11.1 Přístroj hydrolyzační pro digesti vzorků kyselinou sírovou a hydroxidem draselným, opatřenou zařízením pro filtraci křemennými či skleněnými filtračními kelímky za sníženého tlaku a vyhřívacím zařízením (horká jednotka) a příslušenstvím (filtrační kelímky a pod.)
- 4.11.2 Přístroj extrakční s filtračním zařízením (studená jednotka)

5. Postup

5.1 Manuální metoda

5.1.1 Do hydrolyzační nádoby (4.3) se odváží přesně 3,000 g zkušební vzorku (m_0).

5.1.2 Obsahuje-li vzorek více než 10 g/kg tuku, odtuční se přímo v hydrolyzační nádobce dekantací několikanásobným přidávkem extrakčního činidla (3.6) (poznámka 8.3).

5.1.3 Obsahuje-li krmivo více než 20 g/kg vápníku, přidá se opatrně za účelem odstranění případných uhličitánů 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) a odstaví se asi na 5 minut. Potom se obsah promyje studenou vodou dekantací tak, aby pevná část vzorku zůstala beze ztrát v původní nádobce. Promývací kapalina se dále nepoužije; jen v případě, že obsahuje zbytky pevného podílu, filtruje se přes porcelánový kelímek (4.5), který se potom kvantitativně vypláchne do původní kádinky.

5.1.4 Pokud se odtučňování nebo odstraňování uhličitánů neprovádí nebo po jejich provedení (v tom případě se zkušební vzorek vysuší) se přidá 200 ml roztoku kyseliny sírové (3.1), nasadí refluxní zařízení (poznámka 8.2) a obsah nádoby se dostatečně rychle zahřeje k varu (poznámka 8.4). Je-li třeba zabránit nežádoucímu pění a utajení varu, přidá se pár kapek odpěňovacího činidla (3.5) a varné kuličky či střípky. Od okamžiku, kdy se začne obsah hydrolyzační nádoby vařit, se vaří za konstantního objemu přesně 30 minut. Potom se vhodným způsobem, např. přes chladič, přidá 50 ml studené vody, chladič se sejme a obsah hydrolyzační nádoby se filtruje za sníženého tlaku přes Büchnerovu nálevku (4.8) s vloženým středně hustým filtrem podloženým mlynářským sítem (4.9). Vlastní filtrace se provede tak, že nejprve se filtrační nálevka naplní vodou, filtr se upraví tak, aby zakrýval otvory nálevky, asi po jedné minutě se voda odsaje a obsah hydrolyzační nádoby (4.3) se promývá dekantací horkou vodou a dekantací kapalina se vždy po usazení pevného podílu slévá na filtrační nálevku. Promývání a filtrace se provádí tak, aby co nejméně pevného podílu přišlo na filtr v nálevce. Promývá se do negativní reakce dalšího podílu filtrátu na kyselinu indikátorovým papírkem (4.10). Případný pevný podíl na filtru se vysuší acetonem (3.4) nebo ethylalkoholem (3.4) a kvantitativně převede do původní hydrolyzační nádoby (4.3) pomocí horkého roztoku hydroxidu draselného (3.2) (poznámka 8.5) v množství 200 ml. Potom se přidá odpěňovací činidlo (3.5), nádoba se opatří refluxním zařízením (poznámka 8.2) a opět zahřeje dostatečně rychle k varu. Od okamžiku počátku varu se vaří opět přesně 30 minut, potom se var

přeruší přidáním 50 ml studené vody, např. opatrně přes chladič, chladič zařízení se odpojí a obsah hydrolyzační nádoby se filtruje za sníženého tlaku přes filtrační kelímek (4.5) (poznámka 8.6). Nezhydrolyzovaný podíl se promyje nejprve 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.1), potom malým množstvím horkého roztoku kyseliny sírové (3.1) a nakonec horkou vodou do neutrální reakce dalšího podílu filtrátu na kyselinu. Po promytí nezhydrolyzovaného podílu acetonem (3.4) nebo ethylalkoholem (3.4) a následujícím volným vysušením se filtrační kelímek (4.5) vysuší v sušárně (4.1) při teplotě 130 °C po dobu 2 hod. Po ochlazení v exsikátoru se kelímek zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_1). Pak se kelímek vloží do muflové pece (4.2), vyhřáté na teplotu (550 ± 20) °C a spaluje 2 hodiny (poznámka 8.7), ochladí se v exsikátoru a opět zváží se stejnou přesností (m_2).

5.2 Instrumentální metoda

Do filtračního kelímku (4.5) hydrolyzačního přístroje (4.11.1) se odváží přesně 1,000 g zkušební vzorku (m_0) a je-li třeba odtučnit se na extrakčním přístroji (studené jednotce) (4.11.2) tak, jak uvedeno v 5.1.2. (poznámka 8.3). Je-li třeba odstranění uhličitánů (viz 5.1.3) odstraní se v tomto odstavci popsaným způsobem.

Pokud se odtučňování nebo odstraňování uhličitánů neprovádí nebo po jejich provedení (v tomto případě se zkušební vzorek vysuší) se kelímek (4.5) se zkušebním vzorkem vloží do hydrolyzačního přístroje (4.11.1) a přiklopí se k těsnícímu válci s chladičem. Přidá se 150 ml horkého roztoku kyseliny sírové (3.1) a pár kapek odpěňovacího činidla (3.5), obsah se dostatečně rychle zahřeje k varu a intenzivně se vaří po dobu 30 minut. Potom se otevře odpouštěcí ventil, obsah kapaliny se za použití sníženého tlaku (4.7) přes filtrační kelímek (4.5) odpustí a pevný podíl se promyje asi třikrát 30 ml horké vody, vždy po úplném odpuštění kapaliny z kelímku. Po uzavření a utěsnění se přidá 150 ml horkého roztoku hydroxidu draselného (3.2), dostatečně rychle se obsah zahřeje k varu (je-li třeba přidá se ještě odpěňovací činidlo (3.5)) a vaří se intenzivně po dobu 30 minut. Potom se opět otevře odpouštěcí ventil, kapalina se přes filtrační kelímek (4.5) odpustí a pevný podíl se promývá, jak je uvedeno výše po kyselé hydrolyze. Po vyjmutí kelímku se tento umístí do extrakčního přístroje (studené jednotky) (4.11.2) se promyje třikrát 25 ml acetonu (3.4) tak, že další dávka se vždy přidá až po odečtení předešlé.

Potom se kelímek vyjme, vysuší nejdříve volně a pak v sušárně (4.1) při teplotě 130 °C do konstantní hmotnosti. Po každém vysušení a ochlazení v exsikátoru se vždy rychle zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_1). Pokud se hmotnost filtračního kelímku (4.5) se zbytkem již podstatně nemění kelímek (4.5) se vloží do muflové pece (4.2), vyhřáté na teplotu 475 °C až 500 °C a spaluje po dobu nejméně 30 minut (poznámka 8.7). Potom se filtrační kelímek (4.5) ochladí v exsikátoru a opět odváží se stejnou přesností (m_2).

Vedle toho se provede slepá zkouška se stejným množstvím přidávaných chemikálií jako u zkoušeného vzorku, mimo tento zkoušený vzorek. Případný pozitivní nález (větší než 4 mg) se od výsledku obsahu vlákniny odečte.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah vlákniny v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot (m_1 - m_2)}{m_0}$$

kde m_1 je hmotnost filtračního kelímku nebo filtru s vysušeným hydrolyzovatelným zbytkem v g

m_2 hmotnost filtračního kelímku s popelem nezhydrolyzovatelného zbytku nebo hmotnost popele nezhydro-

lyzovatelného zbytku ve spalovací misce v g
 m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou sou-
běžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovat-
elnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

U výsledku stanovení je nutno uvést, zda byl získán metodou
manuální a nebo instrumentální.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na
stejném vzorku nesmí překročit při obsahu vlákniny:

do 100 g/kg	4 g/kg
nad 100 g/kg	4 % rel.

8. Poznámky

8.1 Aceton, n-hexan, diethylether, petrolether a oktylalkohol jsou
nebezpečnými hořavinami I. třídy, je nezbytné při jakékoli ma-
nipulaci s nimi dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Jako refluxní zařízení se použije např. i baňka vhodné velikos-
ti s kulatým dnem, naplněná asi 450 ml ledové vody popř. i kous-
kem ledu, umístěná při vaření na vrcholu nádoby ve které je pro-
váděna hydrolyza.

8.3 Uvedeným způsobem se sice nemusí odstranit veškerý tuk, ale
jeho obsah se sníží na takovou hranici, která již při stanovení ne-
vadí.

Je-li obsah tuku ve vzorku příliš vysoký nebo je-li obsažen v kr-
mivech, které přímou extrakcí nelze odtučnit (mléčné krmné smě-
si, kvasnice apod.), je nutno provést buď předběžnou extrakci
resp. odtučnění po kyselé hydrolyze.

8.4 Je možné přidat přímo i horký roztok kyseliny sírové (3.1) a-
však v případě, že jsou přítomny ve vzorku uhličitany a nebylo pro-
vedeno jejich předběžné odstranění (viz 5.1.3), nastane vzpěnění
roztoku a možné ztráty vzorku. Nejvhodnějším způsobem je volit
kompromis, tj. přidávat poněkud teplejší roztok kyseliny po čás-
tech a roztok dostatečně rychle zahřát k varu.

8.5 Uvedený způsob je vhodný pro hydrolyzační přístroje, kde
roztok hydroxidu draselného se pouze přidává; pro manuální ma-
nipulaci je dost nebezpečný. V tomto případě je výhodnější pře-
vedení pevného podílu vzorku z filtru pomocí přesně 100 ml horké
vody a po jeho převedení se k obsahu v hydrolyzační nádobce při-
dá přesně 100 ml horkého roztoku hydroxidu draselného dvojnás-
obné koncentrace (0,46 mol/l).

8.6 Filtraci je možno provést i přes analytický filtr prostou filtrací;
filtr však musí být předem vysušen, ochlazen v exsikátoru
a zvážen s přesností nejméně na 0,001 g a jeho hmotnost se musí
od hmotnosti vysušeného nezhydrolyzovatelného zbytku (m_1)
odečíst. Spalování filtru s nezhydrolyzovaným zbytkem se provede
v předem vysušené (1 hod. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru
zvážené spalovací misky s přesností nejméně na 0,001 g, jejíž
hmotnost je nutné rovněž po spálení nezhydrolyzovaného zbytku
odečíst.

8.7 Skleněné filtrační kelímky je nutné při spalování nezhydroly-
zovaného zbytku vkládat i vyjímát z muflové pece alespoň částečně
vychladlé, jinak kelímek praskne. Pro křemenné a porcelánové ke-
límký toto omezení neplatí.

5.1 Stanovení obsahu škrobu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená
v Official Journal of the European Communities no. L 123, 29/
/05/72

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového ob-
sahu škrobu v krmivech včetně krmných směsí.

Pro stanovení obsahu škrobu v bramborách, výrobcích z bram-
bor a krmiv s vysokým obsahem laktosy jsou uvedeny příslušné
modifikace.

Metody nelze použít pro krmiva s relativně vysokým obsahem
polymerů fruktosy, konkrétně pro krmiva, obsahující řepné řízky
a bulvy, skrojky, jakož i zdrtky těchto plodin, kvasnice a krmiva
bohatá na inulin.

2. Princip

Škrob se stanoví polarimetricky po hydrolyze vzorku kyselinou
chlorovodíkovou a odstranění bílkovin Carresovými činidly, změ-
řením optické otáčivosti a provedením korekce na opticky aktivní
látky rozpustné ve směsi ethylalkohol-voda.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková roztok (HCl) = 7 mol/l

3.2 Kyselina chlorovodíková 0,4215 % ($c = 0,116$ mol/l)

3.3 Kyselina chlorovodíková 1,128 % ($c = 0,312$ mol/l) (kon-
centrace musí být stanovena titačně 0,1 mol/l odměrným roz-
tokem hydroxidu sodného na indikátor 0,1% roztok methylo-
vé oranže v 96% ethylalkoholu — na 10 ml spotřeba 30,94 ml
přesně 0,1 mol/l odměrného roztoku hydroxidu sodného)

3.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 5$ mol/l

3.5 Carresovo činidlo I

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se odváží 21,9 g dihy-
drátu octanu zinečnatého $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}]$, přidá 3 ml
ledové kyseliny octové ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), asi 50 ml vody, rozpustí,
doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Carresovo činidlo II

Příprava: 10,6 g trihydrátu hexakyanoželeznatodu draselného
 $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}]$ se odváží do odměrné baňky na 100 ml,
po rozpuštění ve vodě se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 Ethylalkohol, roztok 40 % (objemově) a zneutralizovaný na
indikátor fenolftalein

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Polarimetr vhodné konstrukce, s trubicí o délce 200 mm

4.2 Lázeň vodní s termostatem

4.3 Baňka varná se zábrusem, na 250 ml

4.4 Baňka odměrná Kohlrauschova, na 100 ml

4.5 Chladič vodní zpětný, se zábrusem

5. Pracovní postup

5.1 Stanovení celkové optické otáčivosti

5.1.1 Do (Kohlrauschovy) odměrné baňky se zábrusem (4.4) o objemu 100 ml se odváží přesně 2,500 g zkušebního vzorku, přidá se 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3) (poznámka 8.1 a 8.2), obsah se promíchá, dalšími 25 ml téže kyseliny (3.3) se opláchnou případně ulpělé zbytky vzorku na stěnách baňky, baňka se promíchá a vloží do vroucí vodní lázně (4.2). Během prvních 3 minut se baňkou ve vroucí vodní lázni krouží (poznámka 8.3), aniž by se z lázně vyjímala a po 15 minutách se baňka z vroucí vodní lázně (4.2) vyjme. Přidá se asi 30 ml vody, obsah baňky se rychle ochladí na laboratorní teplotu.

5.1.2 K obsahu odměrné baňky se přidá 5 ml Carresova činidla I (3.5), obsah baňky se po dobu 1 minut promíchává, dále se přidá 5 ml Carresova činidla II (3.6) a znovu se 1 minutu promíchává. Potom se baňka vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Obsah se filtruje suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Jestliže filtrát není zcela čirý, opakuje se přidání Carresových činidel I (3.5) a II (3.6) v dvojnásobném množství.

Čirý filtrát se převede do polarizační trubice a na polarimetru (4.1) se změří optická otáčivost.

5.2 Stanovení optické otáčivosti frakce rozpustné v 40% ethylalkoholu (korekce na obsah opticky aktivních látek)

5.2.1 Do (Kohlrauschovy) odměrné baňky se zábrusem (4.4) o objemu 100 ml se odváží přesně 5,000 g zkušebního vzorku, přidá se 80 ml roztoku ethylalkoholu (3.7) baňka se uzatkuje a obsah se nechá vyluhovat po dobu 1 hod. při laboratorní teplotě za občasných intenzivních promíchávání a to vždy po 10 min., aby vzorek byl dostatečně prosycen ethylalkoholem (poznámka 8.4). Po uplynutí této doby se obsah baňky doplní roztokem ethylalkoholu (3.7) po rysku a promíchá co nejdůkladněji. Filtruje se suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.2.2 Do varné baňky (4.3) se odpipetuje 50 ml tohoto filtrátu, přidá se přesně 2,1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) (poznámka 8.2), obsah baňky se promíchá, na baňku se nasadí zpětný chladič (4.5) a baňka se vloží do vroucí lázně (4.2) na 15 minut (poznámka 8.3). Po této době se baňka vyjme, sejme se zpětný chladič, který se vypláchne vodou do baňky, baňka s roztokem se vytemperuje, obsah převede do odměrné baňky na 100 ml a dále se postupuje podle 5.1.2.

5.2.3 Při zkoušení brambor nebo produktů z brambor se při stanovení korekce na obsah opticky aktivních látek postupuje následovně:

Do odměrné baňky na 250 ml se odváží přesně 12,500 g zkušebního vzorku, obsah baňky se doplní po rysku a promíchá. Baňka se ponechá stát při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. za občasných promíchávání. Potom se obsah baňky filtruje suchým skládaným řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Přesně 50 ml tohoto filtrátu se odpipetuje do varné baňky na 250 ml a dále se postupuje podle 5.2.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah škrobu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot 10^4 \cdot (P - P_0)}{P_m}$$

kde P je úhel otáčení, zjištěný postupem podle 5.1;
 P_0 úhel otáčení, zjištěný postupem podle 5.2
 P_m měrná otáčivost čistého škrobu ve $^\circ \cdot \text{dm}^2/\text{kg}$

Pro jednotlivé druhy škrobu platí následující číselné hodnoty P_m :

185,9 pro rýžový;
195,4 pro bramborový;
84,6 pro kukuričiny;
182,7 pro pšeničiny;
181,5 pro ječny;
181,3 pro ovesny;
184,0 pro ostatní, výše neuvedené, nebo složená krmiva;

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně uvedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

nižší než 400 g/kg	4 g/kg
vyšší než 400 g/kg	1 % relat.

8. Poznámky:

8.1 Jestliže vzorek obsahuje více než 60 g/kg uhličitánů, vyjádřených jako CaCO_3 , musí být předem rozrušen přibližně ekvivalentním množstvím (přídavkem) roztoku kyseliny sírové (3.4).

8.2 Pro stanovení optické otáčivosti v bramborách nebo výrobcích z brambor se použije roztok kyseliny chlorovodíkové (3.2), ostatní postup je stejný.

8.3 Množství vody ve vodní lázni musí být dostatečně velké, aby voda zůstala vroucí i při manipulaci (míchání) s baňkou.

8.4 Obsahuje-li vzorek vysoký obsah laktosy, jako např. práškové nebo sbírané mléko, spojí se Kohlrauschova baňka (4.4) po přidání ethylalkoholu (3.7) se zpětným vodním chladičem (4.5) nebo vhodným refluxním zařízením a obsah baňky se nejprve vyluhuje po dobu 30 minut na vodní lázni při teplotě 50 °C a teprve potom se po vytemperování doplní roztokem ethylalkoholu (3.7) po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Dále se postupuje podle 5.2.2.

5.2 Stanovení škrobu – pankreatická metoda

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 108, 22/04/74

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení škrobu a výše molekulárních degradačních produktů škrobu v krmivech obsahujících řepné řízky, skrojky, rajčatovou pastu, sušené kvasnice a krmiva bohatá na inulin nebo lůj. Stanovení škrobu v těchto materiálech se provádí pouze tehdy, jestliže mikroskopické vyšetření vzorku prokáže přítomnost dostatečného množství škrobu.

2. Princip

Cukry přítomné ve vzorku se extrahují ethylalkoholem. Škrob v extrakčním zbytku se rozloží pankreatinem, vzniklé cukry se hydrolyzují kyselinou chlorovodíkovou a vzniklá glukosa se stanoví Luff-Schoorlova metodou. Obsah škrobu se získá vynásobením množství glukosy konstantním faktorem.

3. Chemikálie

- 3.1 Ethylalkohol, roztok 90 % zneutralizovaný na fenolftalein (poznámka 8.1)
- 3.2 Amylalkohol (pentan-1-ol) (poznámka 8.1)
- 3.3 Toluén (poznámka 8.1)
- 3.4 Tlumivý roztok
Příprava: 9,078 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4) a 11,876 g dihydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se rozpustí ve vodě a celkový objem se upraví na 1 ltr.
- 3.5 Chlorid sodný, roztok $c(\text{NaCl}) = 0.2 \text{ mol/l}$
- 3.6 Carresův roztok I
Příprava: 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] se rozpustí ve vodě, přidají se 3 ml ledové kyseliny octové, doplní se na objem 100 ml a promíchá
- 3.7 Carresův roztok II
Příprava: 10,6 g trihydrátu hexakvanoželeznatého draselného [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] se rozpustí ve vodě, doplní se na objem 100 ml a promíchá.
- 3.8 Kyselina chlorovodíková, roztok 25%
- 3.9 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = \text{asi } 8 \text{ mol/l}$
- 3.10 Hydroxid sodný, roztok $c(\text{NaOH}) = \text{asi } 10 \text{ mol/l}$
- 3.11 Methylová oranž, roztok 0.1 %
- 3.12 Pankreatin, prášková forma (poznámka 8.2)
Uchovává se v uzavřené láhvi, v temnu a suchu
- 3.13 Luff-Schoorlovo činidlo
- 3.13.1 Síran měďnatý pentahydrát ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), roztok
Příprava: 25 g síranu měďnatého se rozpustí ve 100 ml vody a promíchá.
- 3.13.2 Kyselina citrónová monohydrát ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), roztok
Příprava: 50 g kyseliny citrónové se rozpustí v 50 ml vody a promíchá.
- 3.13.3 Uhličitan sodný bezvodý Na_2CO_3 , roztok
Příprava: 143,8 g uhličitanu sodného se rozpustí v asi 300 ml teplé vody, nechá se vychladnout a promíchá.
Za stálého míchání se nalije roztok kyseliny citrónové (3.13.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.13.3), přidá se roztok síranu měďnatého (3.13.1) a doplní se vodou do litru. Roztok se nechá přes noc usadit. Zkontroluje se koncentrace roztoku ($\text{Cu } 0,1 \text{ mol/l}$, $\text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ } 2 \text{ mol/l}$) a pH roztoku (9,4)
- 3.14 Varné kamínky (vyvařené v HCl, vyprané ve vodě a usušené)
- 3.15 Jodid draselný, roztok 30%
- 3.16 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 \text{ mol/l}$
- 3.17 Thiošfran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,05 \text{ mol/l}$
- 3.18 Škrob, roztok
Příprava: 5 g rozpustného škrobu se rozmíchá v 30 ml studené vody a nalije se do 1 litru vroucí vody. Vaří se 3 minuty, nechá se vychladnout. Může se přidat 10 mg jodidu rtuťnatého jako konzervace.

4. Přístroje

- 4.1 Extraktor sestávající z:
- 4.1.1 Širokohrdlé 500 ml kónické baňky
- 4.1.2 Zpětného chladiče, připojeného zátkou ke kónické baňce
- 4.1.3 Háčku
- 4.1.4 Kovového kontejneru

4.1.5 Filtračního kelímku pro rychlou filtraci, max. velikost porů 90–150 μm , tj. porosita 1, objem asi 30 ml

4.1.6 Filtračních papírů vhodných do filtračního kelímku

4.2 Termostat, nastavitelný na 38 °C

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

Vzorek se upraví tak, aby prošel sítím 0,5 mm

5.2 Extrakce

Do filtračního kelímku (4.1.5) s vloženým papírovým filtrem (4.1.6), předem namočeným ethylalkoholem (3.1) se navází asi 2 g zkušebního vzorku, s přesností nejméně 0,001 g. Filtrační kelímek (4.1.5) se upevní do kovového kontejneru (4.1.4), zavěšeného na háčku (4.1.3) osičky a celý chladič (4.1.2) se připojí ke kónické baňce (4.1.1) ve které je nalit ethylalkohol (3.1). Výška osičky se upraví tak, aby se dno kelímku právě dotýkalo hladiny ethylalkoholu a v této pozici se zajistí kolíčkem. Extraktor se umístí na vroucí vodní lázeň a ethanol se uvede do varu a vaří se 3 hodiny. Potom se nechá vychladnout a osička s háčkem (4.1.3) se vytáhne co nejvýše. Baňka (4.1.1) se odzátkuje a kelímek (4.1.5) se vyjme z kontejneru.

5.3 Zcukření (sacharifikace) a hydrolysa

Filtrační kelímek (4.1.5) se umístí na odsávačku a odsaje se do sucha. Zbytek na filtru se přenesení do hmoždíře a jemně se rozdrtí. Rozdrcená hmota se převede kvantitativně asi 60 ml vody do 200 ml odměrné baňky se zábrusovým uzávěrem a přidá se několik kapek amylakoholu (3.2). K baňce se připojí zpětný chladič a obsah baňky se zahřeje k varu a vaří se 1 hodinu. Potom se nechá vychladnout, chladič se odpojí a přidá se 25 ml tlumivého roztoku (3.4), 250 mg pankreatinu (3.12), 2, 5 ml chloridu sodného (3.5) a 10 kapek toluenu (3.3). Směs se 2 minuty protřepává a potom se umístí do termostatu (4.2) nastaveného na 38 °C a ponechá se zde za občasných míchání 21 hodin. Po této době se nechá vychladnout, přidá se 5 ml Carresova roztoku I (3.6), minutu se míchá, potom se přidá 5 ml Carresova roztoku II (3.7), opět se minutu míchá. Nakonec se objem upraví vodou po rysku, promíchá se a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml filtrátu (nebo 100 ml filtrátu do 200 ml odměrky), přidá se několik kapek indikátoru (3.11) a okyslí se roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.9) do barevné změny indikátoru (zčervená). Přidá se dalších 6,25 ml kyseliny chlorovodíkové (3.9) (nebo 12,5 ml v případě pipetování 100 ml filtrátu), baňka se připojí na zpětný chladič, obsah baňky se uvede do varu a vaří se 1 hodinu. Nechá se vychladnout a zneutralizuje se roztokem hydroxidu draselného (3.10) do barevné změny indikátoru (zežloutnutí). Potom se slabě okyslí malým přídatkem roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.8), doplní se vodou po rysku a promíchá. Stanovení glukosy se provede podle 5.4.

5.4 Stanovení glukosy podle Luff-Schoorla

Do 300 ml kónické baňky se zábrusem se odpipetuje přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.13), pipetou se přidá 25 ml filtrátu (max. obsah glukosy 60 mg), získaného podle odstavce 5.3, dva varné kamínky (3.14) a baňka se vloží do varného hnízda vhodného průměru a připojí ke zpětnému chladiči. Roztok se uvede během 2 minut do varu a vaří se od počátku varu přesně 10 minut.

Okamžitě se vychladí studenou vodou a asi po 5 minutách se provede titrace následujícím způsobem: přidá se 10 ml roztoku jodidu draselného (3.15) a 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.16) (pomalu a opatrně vzhledem k prudkému pění). Roztok se titruje odměrným roztokem thiošfranu sodného (3.17) do žluté barvy. Potom se

přidá škrobový indikátor (3.18) a titruje se do právě vzniklého odbarvení roztoku.

Vedle toho se provede slepý pokus se stejnými chemikáliemi ve stejných množstvích a stejným postupem jak je uvedeno v odstavci 5.3 a 5.4 bez přidání zkoušeného vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah glukosy ve vzorku v mg se zjistí z tabulky uvedené v Příloze 9, část 5.3 Stanovení obsahu cukrů a to z rozdílu spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného (3.17) při titraci zkoušeného roztoku a slepého pokusu.

Obsah škrobu v g/kg (X) ve vzorku se vypočte podle vzorce:

$$X = 7,2 \cdot (m_1 - m_2)$$

kde m_1 je množství glukosy ve vzorku v mg
 m_2 množství glukosy ve slepém pokusu v mg

7. Opakovatelnost

Zatím není stanovena

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol, amylalkohol a toluen jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Pankreatin

Fyzikální vlastnosti: žlutobílý amorfní prášek

Obsah glukosy: viz odstavce 5.2

Kontrola na spotřebu jódu: 62,5 mg pankreatinu se rozmíchá v 50 ml vody, 25–30 °C teplé, přidá se 1 ml odměrného roztoku 0,1 mol/l roztoku jódu a míchá se 2 minuty. Titruje se 0,1 mol/l odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.17) na škrobový indikátor (3.18) – spotřeba nesmí být vyšší než 0,5 ml

Kontrola amylolytické aktivity: 100 ml škrobového roztoku (3.18) se rozmíchá v 5 ml tlumivého roztoku (3.4), přidá se 0,5 ml roztoku chloridu sodného (3.5) a 62,5 mg pankreatinu (3.12). Směs se zahřeje na 25–30 °C a 2 minuty se míchá. Přidá se 1 ml roztoku 0,1 mol/l jódu. Modré zbarvení roztoku musí zmizet do 15 minut od přidání roztoku jódu.

8.3 Pokud je vzorku zároveň obsažen dextrinový škrob a laktosa mohou být výsledky vyšší o 5–30 g/kg. V takové případě se skutečný obsah škrobu stanoví takto:

- Stanoví se obsah redukujících cukrů v ethanolickém extraktu, získaném podle odstavce 5.2 a vyjádří se jako glukosa
- Stanoví se obsah ve vodě rozpustných redukujících cukrů a vyjádří se jako glukosa
- Odečte se hodnota a) od b) a násobí se faktorem 0,9
- Odečte se hodnota c) od obsahu škrobu stanoveného podle metody na stanovení škrobu a vypočteného podle odstavce 6.

8.4 Množství glukosy ve slepém pokusu je obvykle 0,25 mg a nesmí být vyšší než 0,5 mg.

5.3 Stanovení obsahu cukrů

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení cukrů v krmivech a je použitelná pro všechna krmiva, včetně krmných směsí a pro všechny obsahy cukrů.

2. Princip

Cukry se stanoví titračně jodometricky postupem podle Luff-Schoorla po jejich extrakci 40 % ethylalkoholem, vyčefení Carresovými činidly a po odpaření ethylalkoholu. Přímou redukující cukry se stanoví přímo, směs přímo redukujících a neredukujících po hydrolyze a obsah neredukujících cukrů se určí z jejich rozdílu, výpočtem.

3. Chemikálie

- Ethylalkohol 40 % (objemově), zneutralizovaný na indikátor fenolftalein
- Ethylalkohol 80 % (objemově), zneutralizovaný na indikátor fenolftalein
- Carresovo činidlo I
Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2 H_2O]$, přidá se 3 ml ledové kyseliny octové, asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.
- Carresovo činidlo II.
Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexakynoželeznatého draselného $[K_4Fe(CN)_6 \cdot 3 H_2O]$, přidá se asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.
- Indikátor methylová oranž, roztok 1 g/l
- Kyselina chlorovodíková, roztok $c(HCl) = 4 \text{ mol/l}$
- Kyselina chlorovodíková, roztok $c(HCl) = 0,1 \text{ mol/l}$
- Kyselina sírová, roztok $c(H_2SO_4) = 3 \text{ mol/l}$
- Hydroxid sodný, roztok $c(NaOH) = 0,1 \text{ mol/l}$
- Luff-Schoorlovo činidlo
Příprava: 25,0 g pentahydrátu síranu měďnatého $(CuSO_4 \cdot 5 H_2O)$ se rozpustí ve 100 ml vody a promíchá (roztok a). 50,0 g monohydrátu kyseliny citrónové $(C_6H_8O_7 \cdot H_2O)$ se rozpustí v 50 ml vody a promíchá (roztok b). 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) se rozpustí ve 300 ml horké vody, ochladí a promíchá (roztok c). Do roztoku c) se za neustálého míchání přidá roztok b) potom roztok a). Vzniklá směs se vytemperuje, doplní vodou na objem 1 000 ml a je-li třeba filtruje suchým řídkým filtrem do suché nádoby.
Koncentrace mědi v tomto roztoku je přibližně 0,1 mol/l, uhličitanu sodného cca 2 mol/l a pH roztoku by mělo být přibližně 9,4.
- Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(Na_2S_2O_3) = 0,1 \text{ mol/l}$
- Škrob, roztok 5 g/l
Příprava: Směs 5 g rozpustného škrobu v 30 ml vody se přidá do 970 ml horké vody, zahřeje k varu a vaří se 3 minuty. Po ochlazení se přidá asi 10 mg jodidu rtuťnatého (HgI_2) , jako stabilizátoru.
- Jodid draselný, roztok 300 g/l (vždy čerstvý)
- Isopentylalkohol (3-methylbutan-1-ol)
- Pemza granulovaná (vyvařená v kyselině chlorovodíkové, promytá vodou a vysušená)

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Třepačka (rotační) s 35 až 40 ot/min
- 4.2 Lázeň vodní s termostatem
- 4.3 Chladič zpětný, vodní se zábrusem
- 4.4 Baňka varná se zábrusem a kulatým dnem na 250 ml

5. Postup

Do odměrné baňky na 250 ml se odváží asi 2,5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 200 ml ethylalkoholu (3.1), baňka se uzavře zátkou a extrahuje na třepačce (4.1) při laboratorní teplotě po dobu 1 hod. Potom se k obsahu v baňce přidá 5 ml Carresova činidla I (3.3), promíchá se asi 1 min, dále se přidá 5 ml Carresova činidla II (3.4) a opět promíchá 1 min. Po vytemperování se doplní ethylalkoholem (3.1) po rysku, promíchá a filtruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do kádinky na 600 ml se odpipetuje 200 ml, kádinka se umístí na vroucí vodní lázeň (4.2) a obsah se odpaří asi na poloviční objem za účelem odstranění většiny ethylalkoholu. Obsah kádinky se pak převede horkou vodou do odměrné baňky na 200 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Je-li třeba, přefiltruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobný roztok).

Tento roztok se použije jak pro stanovení přímo redukujících cukrů, tak i cukrů po hydrolyze.

5.1 Stanovení přímo redukujících cukrů

Ze zásobního roztoku vzorku se odpipetuje do varné baňky (4.4) 25 ml (poznámka 8.1), dále se připipetuje přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.10), přidá se pár granulí pemzy (3.15), varná baňka (4.4) se spojí se zpětným chladičem (4.3), obsah se během 2 minut uvede do mírného varu a vaří se po dobu 10 minut. Potom se var přeruší, zpětný chladič (4.3) se sejme z baňky (4.4) a opláchne do baňky. Obsah baňky se rychle ochladí tekoucí studenou obyčejnou vodou, přidá se 10 ml roztoku jodidu draselného (3.13) a okamžitě nato po kapkách (poznámka 8.2) 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.8) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.11) až do právě vzniklého matně žlutého zabarvení roztoku. Potom se přidají asi 3 ml škrobového roztoku (3.12), čímž se roztok zbarví modře a dotitruje se do vymizení tohoto zabarvení, které se již neobjeví po dobu 1 minuty.

Se stanovením ve vzorku se provede současně slepá zkouška: Do titrační baňky na 250 ml se odpipetuje přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.10) a 25 ml vody, přidá se 10 ml roztoku jodidu draselného (3.13), 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.8) a titruje se jak uvedeno výše. Slepá zkouška se provede dvojmo a vypočte se aritmetický průměr.

5.2 Stanovení redukujících cukrů po hydrolyze

Ze zásobního roztoku, připraveného podle odstavce 5, se do odměrné baňky na 100 ml odpipetuje 50 ml tohoto roztoku, přidá se pár kapek indikátoru methylové oranže (3.5), potom opatrně po částech a za neustálého míchání, jako při titraci, roztok kyseliny chlorovodíkové (3.6) do právě vzniklého trvale červeného zabarvení.

Pak se k obsahu baňky přidá 15 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.7), baňka se vloží do vroucí vodní lázně (4.2) a ponechá tam přesně 30 minut. Potom se rychle ochladí pod proudem tekoucí studené vody na 20 °C, přidá se 15 ml roztoku hydroxidu sodného (3.9), doplní vodou po rysku a promíchá. Z tohoto roztoku se odpipetuje 25 ml do varné baňky (4.4) na 250 ml a dále se postupuje podle 5.1.

U krmiv bohatých na melasu nebo takových, která nejsou zcela homogenní se odvažuje vzorek o hmotnosti 20 g s přesností nejméně na 0,001 g do odměrné baňky na 1 000 ml, přidá se asi 500 ml vody a nechá promíchávat na třepačce po dobu 1 hod. Carresova činidla se přidávají, jak je uvedeno v odstavci 5, ale ve čtyřnásobném množství (po 20 ml), baňka se doplní po rysku ethylalkoholem (3.2) a promíchá.

Dále se postupuje podle odstavce 5, počínaje odpipetováním části a odpařením ethylalkoholu.

U melasy přímo a krmiv bohatých na cukry, ale většinou bez obsahu škrobu (např. sušené nevyslazené řepné řízky a pod.) se odvažuje asi 5 g vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do 250 ml odměrné baňky, přidá se 200 ml vody a promíchává se na třepačce (4.1) po dobu 1 hod, je-li třeba, i déle. Přidají se Carresova činidla, jak uvedeno v odstavci 5, doplní se po rysku vodou a promíchá.

Dále se postupuje podle odstavce 5, počínaje odpipetováním části a odpařením (je-li třeba s ohledem na objem, ethylalkohol tam není).

Při stanovení včetně neredukujících cukrů se postupuje podle odstavce 5.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah přímo redukujících cukrů (X) nebo redukujících cukrů po hydrolyze (Y) v g/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X(Y) = \frac{m_1}{m_2}$$

Obsah neredukujících cukrů, vyjádřený jako obsah sacharosy v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = (Y - X) \cdot 0,95 \quad (\text{poznámka 8.3})$$

kde m_1 je množství příslušného přímo redukujícího (redukujícího) cukru po hydrolyze) v mg, zjištěného z tabulky 1 na základě rozdílu spotřeb odměrného roztoku thiosíranu sodného v ml při titraci zkoušeného vzorku a slepé zkoušky;

m_2 hmotnost alikvotního podílu navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Obsah redukujících cukrů v alikvotním podílu nesmí být vyšší než 60 mg. Roztok musí zůstat po 10 minutách varu s Luff-Schoorlovým činidlem jasně modrý. V opačném případě je nutno odpipetovat menší alikvotní podíl zásobního roztoku, který se upraví na objem 25 ml vodou nebo se přizpůsobí navážka zkušebního vzorku.

8.2 Při prvních přidávcích kyseliny roztok silně pění. Doporučuje se přidat 1 ml isopentylalkoholu (3.14), již před vařením s Luff-Schoorlovým činidlem. Kyselinu je nutno přidávat po kapkách do té doby, dokud roztok nenabude světle hnědé barvy, pak je možné přidat zbývající objem.

8.3 Za předpokladu vyjádření X a Y jako glukosa (fruktosa).

TABULKA I

Tabulka 1 Množství jednotlivých cukrů odpovídajících spotřebě odměrného roztoku

Platí pro přidávky 25 ml Luff-Schoorlova činidla, odměrný roztok thiosíranu sodného přesně 0,1 mol/l, dvouminutové zahřívání a 10 minutové vaření

Objem odměr.roztoku spotřeba (ml)	Glukosa Fruktosa Invert (mg)		Laktosa (mg)		Maltosa (mg)	
1	2,4	diference	3,6	diference	3,9	diference
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9
3	7,2	2,4	11,0	3,7	11,7	3,9
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	3,9
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	4,0
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	3,9
7	17,2	2,5	25,8	3,7	27,5	4,0
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0
9	22,4	2,6	33,2	3,7	35,5	4,0
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0
11	27,6	2,6	40,8	3,8	43,5	4,0
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,0
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1
14	35,7	2,7	52,2	3,8	55,7	4,1
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1
16	41,3	2,8	59,9	3,9	63,9	4,1
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,1
18	47,1	2,9	67,7	3,9	72,2	4,2
19	50,0	2,9	71,7	4,0	76,5	4,3
20	53,0	3,0	75,7	4,0	80,9	4,4
21	56,0	3,0	79,8	4,1	85,4	4,5
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6
23	62,2	3,1	88,0	4,1	94,6	4,6

5.4 Stanovení obsahu laktosy

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení laktosy v krmivech. Metoda je použitelná pro krmiva, obsahující více než 5 g laktosy v 1 kg.

2. Princip

Laktosa spolu s ostatními cukry se vyextrahuje ze vzorku vodou, extrakt se vystaví fermentačnímu účinku kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které ponechají laktosu v nezměněném stavu. Po vyčerpání Carresovými činidly se laktosa stanoví titračně jodometricky podle Luff-Schoorla.

3. Chemikálie

3.1 Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*, suspense

Příprava: 25 g čerstvého droždí se dokonale rozmíchá ve 100 ml vody. Připravenou suspensi je možné uchovávat nejvýše po dobu 1 týdne v chladničce.

3.2 Luff-Schoorlovo činidlo

Příprava: 25,0 g pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) se rozpustí ve 100 ml vody a promíchá (roztok a) 50,0 g monohydrátu kyseliny citrónové ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) se rozpustí v 50 ml vody a promíchá (roztok b) 143,8 g bezvodého uhličitánu sodného (Na_2CO_3) se rozpustí v asi 300 ml horké vody, ochladí a promíchá (roztok c) Do roztoku c) se za neustálého míchání přidá roztok b) a potom roztok a). Vzniklá směs se vytemperuje, doplní vodou na objem 1 000 ml, promíchá a filtruje řídkým filtrem do suché kádinky.

Koncentrace mědi je přibližně 0,1 mol/l, uhličitánu sodného asi 2 mol/l a pH roztoku by mělo být přibližně 9,4.

3.3 Carresovo činidlo I

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého [$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$], přidá 3 ml ledové kyseliny octové ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$), asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.4 Carresovo činidlo II

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexanokyanoželeznatého draselného [$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$], přidá se asi 50 ml vody a po rozpuštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.5 Pemza granulovaná (vyvařená v HCl, promytá vodou a vysušená)

3.6 Jodid draselný nebo jodid sodný, roztok 300 g/l

3.7 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 3 \text{ mol/l}$

3.8 Thioisíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.9 Škrob, roztok 5 g/l

Příprava: Ke směsi 5 g škrobu rozpustného ve vodě se 30 ml vody se přidá do 970 ml horké vody, zahřeje k varu a vaří 3 minuty. Po ochlazení se přidá asi 10 mg jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň vodní s termostatem

4.2 Termostat s regulací teploty pro 38 °C až 40 °C

5. Postup

Do odměrné baňky na 100 ml se odváží asi 1 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 25 ml až 30 ml vody, baňka se vloží na 30 minut do vroucí vodní lázně (4.1). Potom se ochladí na teplotu přibližně 35 °C, přidá 5 ml suspence kvasinek

(3.1) (poznámka 8.1), obsah baňky se promíchá a vloží do termostatu (4.2) o teplotě 38 °C až 40 °C na 2 hod. Pak se ochladí na teplotu 20 °C, přidá 2,5 ml Carresova činidla I (3.3), asi 30 sekund se promíchává, dále se přidá 2,5 ml Carresova činidla II (3.4), opět se promíchává 30 sekund, obsah baňky se doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Do varné baňky s kulatým dnem a zábrusem obsahu 250 ml, se odpipetuje přesně 25 ml filtrátu (poznámka 8.2), přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.2), přidá se pár zrnkem pemzy (3.5), varná baňka se spojí se zpětným chladičem, obsah se uvede za 2 minuty do mírného varu a za občasných promíchání se při tomto mírném varu zahřívá 10 minut. Po přerušení varu se zpětný chladič sejme, opláchne do baňky a obsah baňky se okamžitě a rychle ochladí pod tekoucí studenou vodou. Titruje se nejdříve po 5 minutách. Těsně před titrací se přidá 10 ml roztoku jodidu draselného (sodného) (3.6) a okamžitě nato po kapkách (poznámka 8.3) 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.7) a titruje se odměrným roztokem thioisíranu sodného (3.8) do právě vzniklého matně žlutého zabarvení, přidá se 3 ml roztoku škrobu (3.9), čímž se roztok zbarví modře, a dotitruje se do právě vymizení modrého zabarvení roztoku, které se již znovu neobjeví po dobu 1 minuty.

Současně se provede slepý pokus. Do titrační baňky na 250 ml se odpipetuje postupně přesně 25 ml Luff-Schoorlova činidla (3.2), 5 ml suspence kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (3.1), 25 ml vody, 10 ml roztoku jodidu draselného (sodného) (3.6) a 25 ml roztoku kyseliny sírové (3.7) (bez zahřívání a vaření). Titruje se, jak uvedeno výše. Slepý pokus se provede nejméně dvojmo a k výpočtu se bere průměr těchto spotřeb.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah laktosy v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_2}{m_1}$$

kde m_1 je hmotnost alikvotního podílu navážky zkušebního vzorku v g

m_2 množství laktosy odpovídající rozdílu spotřeb odměrného roztoku thioisíranu sodného na vzorek a slepý pokus v mg (viz tabulka 1);

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Obsahuje-li vzorek více než 400 g/kg zkvasitelných cukrů, v 1 kg krmiva, přidá se 10 ml kvasničné suspence (3.1) (i v případě slepého pokusu)

8.2 Odpipetovaný podíl by měl být max. 25 ml a obsahovat max. 80 mg laktosy, nejlépe v rozmezí 40 až 80 mg. Je-li toto množství menší, je třeba upravit navážku zkušebního vzorku, při menším odpipetovaném podílu se objem doplní na 25 ml vodou.

8.3 Při prvních přidávcích kyseliny roztok silně pění. K jeho vyloučení nebo omezení je proto možné již před zahříváním s Luff-Schoorlovým činidlem přidat k roztoku 1 ml izopentanolu. Kyselinu je nutno přidávat po kapkách do té doby, dokud roztok nenabude světle hnědé barvy, pak teprve je možné přidat zbývající podíl kyseliny.

TABULKA II

Tabulka 1 Množství laktosy odpovídající spotřebě odměrného roztoku

Platí pro přidavek 25 ml Luff-Schoorlova činidla, odměrný roztok thiosíranu sodného přesně 0,1 mol/l, dvouminutové zahřívání a 10 min. vaření.

Objem odměrného roztoku (spotřeba)	Odpovídající množství laktosy v mg	Diference
1	3,6	
2	7,3	3,7
3	11,0	3,7
4	14,7	3,7
5	18,4	3,7
6	22,1	3,7
7	25,8	3,7
8	29,5	3,7
9	33,2	3,7
10	37,0	3,8
11	40,8	3,8
12	44,6	3,8
13	48,4	3,8
14	52,2	3,8
15	56,0	3,8
16	59,9	3,9
17	63,8	3,9
18	67,7	3,9
19	71,7	4,0
20	75,7	4,0
21	79,8	4,1
22	83,9	4,1
23	88,0	4,1

5.5 Stanovení obsahu bezdusíkatých látek výťažkových

1. Účel a rozsah

Tato metoda uvádí způsob výpočtu obsahu bezdusíkatých látek výťažkových z výsledků stanovení základních složek krmiv, vlhkosti, dusíkatých látek ($N \times 6,25$), tuku, popele a vlákniny (močoviny a amoniaku).

2. Princip

Obsah bezdusíkatých látek výťažkových se stanoví nepřímým výpočtem, pomocí zjištěných obsahů základních složek krmiv stanovených objektivními zkušebními metodami podle Přílohy 9 jako zbytek do 1 000 g/kg.

Obsahuje-li zkoušené krmivo nezanedbatelný obsah močoviny nebo amoniakálního dusíku je výpočet obsahu bezdusíkatých látek výťažkových zvlášť modifikovaný.

3. Postup

Ve vzorku krmiva se stanoví obsahy vlhkosti, dusíkatých látek, tuku, popele a vlákniny (popřípadě i močoviny a amoniakálního dusíku, jsou-li přítomny) podle dílčích metod uvedených v Příloze 9.

4. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah bezdusíkatých látek výťažkových v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

4.1 U krmiv bez obsahu močoviny a amoniakálního dusíku (poznámka 6.1)

$$X = 1000 - (A + B + C + D + E)$$

4.2 U krmiv s nezanedbatelným obsahem močoviny a amoniakálního dusíku (poznámka 6.1)

$$X = 1000 - (A + B_1 + C + D + E + F + G)$$

- kde A je obsah vlhkosti v g/kg;
B obsah dusíkatých látek v g/kg;
B₁ obsah dusíkatých látek nativního původu v g/kg (viz 4.3);
C obsah tuku v g/kg;
D obsah popele v g/kg;
E obsah vlákniny v g/kg;
F obsah močoviny v g/kg;
G obsah amoniakálního dusíku, vyjádřeného jako NH₃ v g/kg (poznámka 6.2);

4.3 Výpočet obsahu dusíkatých látek nativního původu

Obsah dusíkatých látek nativního (přirozeného) původu v g/kg (B₁) se vypočítá podle vzorce:

$$B_1 = B - 2,9125 \cdot F - 5,1406 \cdot G$$

5. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

6. Poznámky

6.1 Nezanedbatelný obsah močoviny se rozumí nad 5 g/kg; obdobně i amoniakálního dusíku jako NH₃.

6.2 Vyjádření amoniakálního dusíku jako NH₃ není zcela správné, protože dusík jako NH₃ se jako stálá složka v tomto obsahu nevyskytuje; toto vyjádření je aproximací. Se stoupajícím obsahem amoniakálního dusíku roste i chyba stanovení bezdusíkatých látek výťažkových, proto při známém složení sloučeniny, v níž je amoniakální dusík přítomen je správnější jej vyjadřovat v této formě (NH₄⁺ apod.).

5.6 Stanovení obsahu cukrů polarimetricky

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu cukrů polarimetricky v krmném cukru, melase a mléce.

2. Princip

Pro stanovení cukrů se využívá jejich schopnosti otáčet rovinu polarizovaného světla úměrně druhu a obsahu cukru v roztoku.

3. Chemikálie

- 3.1 Suché číidlo na vysazené řízky
Příprava: Promíchá se jeden díl jemně třeného vápna s 25 díly rozetřeného neutrálního octanu olovnatého
- 3.2 Herlesovo činidlo I
Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 340 g dusičnanu olovnatého Pb(NO₃)₂, rozpustí ve vodě, doplní po rysku a promíchá
- 3.3 Herlesovo činidlo II
Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 32 g hydroxidu draselného (KOH), rozpustí, doplní po rysku a promíchá.
- 3.4 Zásaditý octan olovnatý, pevný
- 3.5 Křemelina
- 3.7 Kyselina octová, ledová
- 3.8 Fenolftalein, roztok indikátoru
- 3.9 Zásaditý octan olovnatý, základní roztok
Příprava: Naváží se 600 g octanu olovnatého (3.4) a 200 g oxidu olovnatého, rozetře se ve 100 ml vody, zakryje hodi novým sklem a na vodní lázni se za občasného zamíchání zahřívá tak dlouho, až zmizí barva oxidu. Přidá se asi 1 900 ml horké vody tak, aby hustota roztoku byla 1,235–1,240 g . cm⁻³. Roztok se promíchá a nechá ustát.
- 3.10 Zásaditý octan olovnatý, zředěný roztok
Příprava: Na 10 l vody se přidá 150 ml základního roztoku (3.9).
- 3.11 Kyselina chlorovodíková, roztok
Příprava: 170 ml 37% kyseliny chlorovodíkové se zředí vodou na 1 l.
- 3.12 Hexakynoželeznan draselný trihydrát, roztok
Příprava: Naváží se 15 g hexakynoželeznanu draselného [K₄Fe(CN)₆ · 3 H₂O], rozpustí se ve vodě, doplní v odměrné baňce na 100 ml po rysku a promíchá.
- 3.13 Síran zinečnatý heptahydrát, roztok
Příprava: Naváží se 30 g síranu zinečnatého (ZnSO₄ · 7 H₂O), rozpustí se ve vodě, doplní v odměrné baňce na 100 ml po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Cukrovarnický polarimetr vhodné konstrukce, s trubicí o délce 200 mm
- 4.2 Lázeň vodní s termostatem

5.1 Rafinovaný cukr

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 2n množství zkušebního vzorku (poznámka 8.1) s přesností nejméně 0,002 g, rozpustí se ve vodě a doplní po rysku a promíchá. K roztoku se přidá 0,1–0,7 g zásaditého octanu olovnatého (3.4) a 0,5 g křemeliny (3.5). Po promíchání se filtruje zakrytým filtrem. První podíl filtrátu se odlije a další se polarizuje při 20 °C v polarizační trubici délky 200 mm. Hodnota odečtená na polarimetru udává přímo obsah sacharosy v %.

5.2 Surový a rafinovaný cukr

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 2n množství zkušebního vzorku (poznámka 8.1) s přesností nejméně 0,002 g, rozpustí se ve vodě, doplní po rysku a promíchá. K roztoku se přidá 40 ml Herlesova roztoku I (3.2), promíchá se mírným kroužením, přidá se dalších 40 ml Herlesova roztoku II (3.3) a znovu se promíchá. Vyčefený roztok se doplní vodou téměř po rysku a ponechá se nejméně 30 minut stát. Potom se doplní po rysku, promíchá a filtruje. První podíl filtrátu se odlije a další se polarizuje při 20 °C v polarizační trubici délky 200 mm. Hodnota odečtená na polarimetru (4.1) udává přímo obsah sacharosy v %.

5.3 Melasa – přímá polarizace

Do odměrné baňky na 200 ml se naváží 4n množství melasy 1:1 (poznámka 8.1) s přesností nejméně 0,002 g, zneutralizuje se kyselinou octovou (3.7) na fenoltalein (3.8) a případná pěna se odstraní diethyletherem. Potom se k roztoku přidá 40 ml Herlesova roztoku I (3.2), promíchá se mírným kroužením, přidá se dalších 40 ml Herlesova roztoku II (3.3) a znovu se promíchá. Vyčefený roztok se doplní vodou téměř po rysku a ponechá se nejméně 30 minut stát. Potom se doplní po rysku, promíchá a filtruje. První podíl filtrátu se odlije a další se polarizuje při 20 °C v polarizační trubici délky 200 mm. Hodnota odečtená na polarimetru (4.1) udává přímo obsah sacharosy v % (poznámka 8.2).

5.3.1 Melasa – polarizace po inverzi (hydrolýze)

Z filtrátu, získaného při stanovení přímé polarizace se odpipetuje 50 ml do 100 ml baňky, doplní vodou po rysku a polarizuje. Výsledek se vynásobí dvěma.

Do další 100 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml filtrátu, připraveného podle 5.3, přidá se 30 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.11) a vloží se do vodní lázně 70 °C teplé. Teplota uvnitř baňky (kontrola teploměrem) se udržuje přesně 5 minut na hodnotě 67–69 °C. Potom se baňka rychle ochladí na 20 °C, teploměr se vyjme a opláchne vodu do baňky a obsah se doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Je-li roztok příliš tmavý, odbarví se před doplněním po rysku přidáním 0,2 g aktivního uhlí. Polarizuje se až po 20 minutách od doplnění roztoku (poznámka 8.3).

5.4 Cukrovarské řízky čerstvé

Asi 0,5 kg cukrovarnických řízků se protlačí lisem (poznámka 8.5). Prvních 50 ml šťávy se odlije a dalších 100 ml se čefí v misce asi 0,7 g zásaditého octanu olovnatého (3.4) případně suchým práškovým čířidlem (3.1). Po promíchání se zfiltruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se polarizuje v polarizační trubici 400 mm dlouhé.

5.5 Mléko

Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 50 g zkušebního vzorku mléka s přesností nejméně 0,005 g, přidá se 5 ml roztoku hexakyanofosforu draselného (3.12), promíchá, přidá 5 ml roztoku síranu zinečnatého a opět důkladně promíchá. Baňka se doplní vodou po rysku a po promíchání filtruje suchým skládaným filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se polarizuje po vytemperování na 20 °C v polarizační trubici délky 200 mm při 20 °C.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Stanovení cukru v rafinovaném cukru

Obsah sacharosy v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = 10 \cdot S$$

kde S je přímý polarimetrický nálezn podle odstavce 5.1

6.2 Stanovení cukru v surovém a rafinovaném cukru

Obsah sacharosy v g/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = 10 \cdot S$$

kde S je přímý polarimetrický nálezn podle odstavce 5.2

6.3 Stanovení cukru v melase přímo

Obsah sacharosy v g/kg (Z_1) se vypočítá podle vzorce:

$$Z_1 = 10 \cdot S$$

kde S je přímý polarimetrický nálezn podle odstavce 5.3

6.3.1 Stanovení cukru v melase po inverzi

Obsah sacharosy v g/kg (Z_2) se vypočítá podle vzorce:

$$Z_2 = \frac{100 \cdot (P - I)}{143,5 - 0,5 \cdot t} \cdot 10$$

kde P je zdvojnásobený přímý polarimetrický nálezn (podle odstavce 5.3.1)

I zdvojnásobený polarimetrický nálezn po inverzi (podle odstavce 5.3.1) (poznámka 8.4)

t teplota zinvertovaného roztoku při polarizaci ve °C

6.4 Stanovení cukru v čerstvých cukrovarnických řízcích

Obsah sacharosy v g/kg (Q) se vypočítá podle vzorce:

$$Q = 0,13 \cdot 10 \cdot S$$

kde S je přímý polarimetrický nálezn podle odstavce 5.4

6.5 Stanovení cukru v mléce

Obsah laktosy v g/kg (W_1) nebo bezvodé laktosy (W_2) se vypočítá podle vzorce:

$$W_1 = \frac{100 \cdot K_1 \cdot p \cdot F}{m}$$

nebo

$$W_2 = \frac{100 \cdot K_2 \cdot p \cdot F}{m}$$

kde K_1 je přepočtový koeficient:

0,9518 pro polarimetrický nálezn ve stupních kruhových

0,32299 pro polarimetrický nálezn ve stupních Ventzkeho

0,3295 pro polarimetrický nálezn v mezinárodních stupních

K_2 přepočtový koeficient:

0,9042 pro polarimetrický nálezn ve stupních kruhových

0,3134 pro polarimetrický nálezn ve stupních Ventzkeho

0,3130 pro polarimetrický nálezn v mezinárodních stupních

p	hodnota odečtená na polarimetru
m	hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
F	faktor pro objemovou korekci na sraženinu (poznámka 8.6)

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně uvedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku pro všechny obsahy nesmí překročit 1 g/kg.

8. Poznámky:

8.1 Normálním množstvím (1n) při navažování cukrovarnických produktů pro zkoušky se rozumí 26,026 g produktu, pokud se pracuje s polarimetrem se stupnicí Ventzkeho nebo 26,000 g, pokud se pracuje s polarimetrem se mezinárodní stupnicí sacharimetrickou.

8.2 Na výskyt a množství rafinosy v melase je možno usuzovat dle výsledků mezi přímou polarizací a stanovením dle Clergeta.

8.3 Používá se trubice opatřené teploměrem, aby bylo možno odečíst teplotu.

8.4 Protože hodnota I je vždy záporná, přičítá se absolutní hodnota I k P

8.5 Při sušině řízku nad 10% je třeba cukr stanovit buď horkou nebo studenou digestí.

Horká digestce: Do baňky se odváží 4n množství rozsekaných a promíchaných řízků s přesností nejméně 1 g, přidá se přesně 300 ml zásaditého octanu olovnatého (3.10). Baňka se uzavře a digeruje 30 minut ve vodní lázni při 80–85 °C pod zpětným chladičem. Poté se baňka ochladí, obsah se protřepe a filtruje suchým skládaným filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se polarizuje v trubici 400 mm dlouhé. Polarimetrický nálezy vydělený dvěma udává přímo množství cukru ve vyslazených řízcích v %.

Studená digestce: Odvážené, s přesností nejméně 1 g, 4n množství rozsekaných a promíchaných řízků se vloží do nádoby mixéru, přidá se přesně 300 ml zásaditého octanu olovnatého (3.10) a mixuje se 3 minuty. Poté se obsah zfiltruje suchým skládaným filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Filtrát se polarizuje v trubici 400 mm dlouhé. Polarimetrický nálezy vydělený dvěma udává přímo množství cukru ve vyslazených řízcích v %.

8.6 Vzorce jsou stanoveny podle specifické otáčivosti monohydrátu laktosy 52,53 kruhových stupňů při 20 °C.

Při stanovení laktosy v mléce jiného složení (ověč, buvolí apod.) nebo v mléčných výrobcích se zjistí objem sraženiny a faktor F se vypočte podle vzorce:

$$F = \frac{V - v}{m}$$

kde V je objem, na který bylo navážené množství zředěno
v se vypočte podle vzorce:

$$v = \frac{\text{navážka} \cdot (1,08 \cdot \% \text{tuku} + 1,55 \cdot \% \text{bílkovin})}{100}$$

5.7 Stanovení redukujících látek v cukru a melase

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení redukujících látek v cukru a melase a je použitelná pro surový cukr, afinovaný cukr a řepnou melasu.

2. Princip

Cukerný roztok se považí s Ofnerovým roztokem a vyloučený oxid měďný se stanoví jodometrickou titrací.

3. Chemikálie

3.1 Octan olovnatý zásaditý

3.2 Ofnerovo činidlo Příprava: Naváží se 5,0 g pentahydrátu síranu měďnatého, 10 g uhlíkatu sodného, 300 g vinanu sodno-draselného a 50 g hydrogenfosforečnanu sodného do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí se ve vodě a potom se vloží na 2 hodiny do vroucí vodní lázně. Po uplynutí této doby se roztok ochladí, doplní vodou po rysku a promíchá. Přidá se trochu aktivního uhlí, promíchá a filtruje (4.5) přes filtrační kelímek (4.6).

Roztok se uchovává ve tmavé láhvi se skleněnou nebo gumovou zátkou ve tmě (poznámka 8.1).

3.3 Thiosíran sodný, odměrný roztok $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,01615 \text{ mol/l}$

Příprava: Naváží se 4,0 g pentahydrátu thiosíranu sodného, rozpustí ve vodě, doplní na 500 ml a promíchá.

Přesná koncentrace odměrného roztoku se stanoví na dvojchroman draselný.

3.4 Jód, odměrný roztok $c(\text{I}) = 0,01615 \text{ mol/l}$

Příprava: Naváží se 2,05 g jódu a 10 g jodidu draselného, rozpustí ve vodě a doplní na 500 ml a promíchá.

1 ml tohoto roztoku odpovídá teoreticky 1 mg invertního cukru. Přesná koncentrace odměrného roztoku se kontroluje odměrným roztokem thiosíranu o známé koncentraci.

Roztok se uchovává ve tmavé láhvi se skleněnou zátkou.

3.5 Škrob, roztok 5 g/l

Příprava: Směs 5 g rozpustného škrobu v 30 ml vody se přidá do 970 ml horké vody, zahřeje k varu a vaří se 3 minuty. Po ochlazení se přidá asi 10 mg jodidu rtuťnatého (HgI_2), jako stabilizátor.

3.6 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = \text{asi } 1 \text{ mol/l}$

3.7 Hydrogenfosforečnan sodný, roztok

Příprava: Naváží se 100 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu dvojsodného, rozpustí, doplní na 1 000 ml a promíchá.

3.8 Aktivní uhlí

3.9 Octan olovnatý neutrální, roztok

Příprava: Naváží se 350 g octanu olovnatého, rozpustí ve vodě, doplní na 1 000 ml a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň vodní

4.2 Chladič zpětný, vodní se zábrusem

4.3 Baňka varná se zábrusem a kulatým dnem na 250 ml

4.4 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.5 Filtrační kelímek skleněný s fritou S2

5. Postup

5.1 Surový a rafinovaný cukr

Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 50 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,1 g, rozpustí ve vodě, vyčechá se přidáním asi 0,7–1,4 g zásaditého octanu olovnatého (3.1), doplní po rysku a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Z filtrátu se odměří 160 ml do odměrné baňky na 200 ml, přidá se 15–20 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (3.7) a 1 g aktivního uhlí (3.8), důkladně promíchá, doplní se vodou po rysku, opět promíchá a po 15 minutách stání se filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Z filtrátu se odpipetuje 50 ml do 300 ml kuželové baňky, přidá se 50 ml Ofnerova činidla (3.2) a varné kamínky a zahřívá se tak, aby kapalina začala vřít za 4–5 minut. Roztok se udržuje v mírném varu přesně 5 minut. Po této době se var přeruší, obsah baňky se rychle ochladí tekoucí studenou obyčejnou vodou. Po několika minutách se do ochlazené tekutiny přidá 15 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.6) a ihned potom se přidá přebytek (5–20 ml) roztoku jódu (3.4) a baňka se uzavře zátkou. Obsah baňky se občas zamíchá, po dvou minutách se přidá 5 ml škrobového roztoku (3.5) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.3) do právě vzniklého odbarvení roztoku (poznámka 8.2).

5.2 Řepná melasa

Naváží se 2n množství roztoku melasy 1:1 (poznámka 8.3) s přesností 0,1 g do 200 ml odměrné cukrovarnické baňky, vyčechá se 10 ml neutrálního octanu olovnatého (3.9), doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Do odměrné baňky na 200 ml se odpipetuje 153,7 ml filtrátu, přidá se 20 ml roztoku hydrogenfosforečnanu sodného (3.7), doplní vodou po rysku, promíchá a přelije do kuželové baňky na 300–400 ml. Přidají se asi 4 g aktivního uhlí a několik minut se důkladně protřepává. Suspenze se nechá nejméně 15 minut stát, načež se zfiltruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nepoužije. Z filtrátu se odpipetuje 50 ml do 300 ml kuželové baňky, přidá se 50 ml Ofnerova činidla (3.2) a varné kamínky a zahřívá se tak, aby kapalina začala vřít za 4–5 minut. Roztok udržuje v mírném varu přesně 7 minut, potom se var přeruší, obsah baňky se rychle ochladí tekoucí studenou obyčejnou vodou. Po několika minutách se k ochlazenému roztoku přidá 15 ml kyseliny roztoku chlorovodíkové (3.6) a ihned potom přebytek (5 až 20 ml) roztoku jódu (3.4) a baňka se uzavře zátkou. Obsahem baňky se občas zamíchá, po dvou minutách se přidá 5 ml škrobového roztoku (3.5) a titruje se odměrným roztokem thiosíranu sodného (3.3) do právě vzniklého odbarvení roztoku.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Surový a rafinovaný cukr

Obsah redukujících látek v surovém a rafinovaném cukru (X) v g/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{V_1 - V_2 - 0,02 \cdot V_3}{2 \cdot V_3}$$

kde V_1 je přidané množství odměrného roztoku jódu (3.4) v ml

V_2 přidané množství odměrného roztoku thiosíranu sodného (3.3) v ml

V_3 objem filtrátu, použitého k redukci Ofnerova činidla v ml

6.2 Řepná melasa

Obsah redukujících látek v melase (Y) v g/kg se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{V_1 - V_2 - 0,03 \cdot V_3}{V_3}$$

kde V_1 je přidané množství odměrného roztoku jódu (3.4) v ml

V_2 přidané množství odměrného roztoku thiosíranu sodného (3.3) v ml

V_3 objem filtrátu, použitého k redukci Ofnerova činidla v ml

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Po delším stání se vylučuje z roztoku oxid měďný a je proto nutno pipetovat roztok vždy opatrně syrcu.

8.2 Při vyšším obsahu redukujících látek, než odpovídá 15 ml odměrného roztoku jódu je třeba stanovení opakovat s přiměřeně nižším množstvím pipetovaného filtrátu. Rozdíl do 50 ml se doplní vodou.

8.3 Roztok melasy 1:1 se připraví naředěním melasy 1:1 vodou.

Pokud melasa neobsahuje krystaly cukru, naváží se do baňky 200 g důkladně promíchaného vzorku s přesností 0,1 g, přidá se 200 ml vody a vše se dováží na 400 g. Baňka se vloží do horké vodní lázně a v 5ti minutových intervalech se obsah baňky promíchává. Rozpouštění je dokončeno nejdéle po 25 minutách. Získaný roztok se po ochlazení používá ke zkouškám.

Pokud jsou ve vzorku melasy krystalky přítomny, je nutno zvážít celý vzorek a přidat k němu váhově stejné množství vody. Zahřívání a promíchávání probíhá stejně jako u melasy bez cukru.

K přípravě 1n roztoku melasy se naváží 26,026 g melasy 1:1.

6.1 Stanovení obsahu popela

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení popela v krmivech. Metoda je použitelná pro všechna krmiva obsahující výhradně či převážně organickou složku a pro všechny obsahy.

2. Princip

Popel se stanoví vázkově jako zbytek hmoty po zpopelnění při teplotě 550 °C do konstantní hmotnosti za předepsaných podmínek.

3. Chemikálie

3.1 Dusičnan amonný, roztok 200 g/l

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C.
- 4.2 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.
- 4.3 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická
- 4.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

Pro vzorky druhů krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm² a výškou 35 mm.

4.5 Vodní lázeň

5. Postup

5.1 Suchá či předsušená krmiva (poznámka 8.3)

5.1.1 Odváží se asi 5 g (poznámka 8.1) zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (m_1) do předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru se stejnou přesností zvážené spalovací misky (4.4) (m_0).

5.1.2 Navážka vzorku ve spalovací misce (4.4) se umístí na topnou desku nebo nad plynový kahan (4.3) s mírným plamenem a zahřívá do úplného zuhelnatění vzorku. Potom se spalovací miska (4.4) se vzorkem vloží do muflové pece (4.1), předem vyhřáté na (550 ± 20) °C a vzorek se spaluje při této teplotě po dobu 3 hod. Po uplynutí této doby se spalování přeruší, miska se vzorkem se vyjme a vizuálně posoudí na přítomnost uhlíkatých částic. Jsou-li uhlíkaté částice přítomny, spaluje se za stejných podmínek ještě další 1 hod a kontrola na přítomnost uhlíkatých částic se opakuje. Pokud i poté jsou uhlíkaté částice přítomny, nechá se miska vychladnout, vzorek se zvlhčí několika kapkami roztoku dusičnanu amonného (3.1) (poznámka 8.2), miska se vysuší v sušárně (4.2) při 103 °C do sucha a vloží znovu do muflové pece (4.1) a při teplotě (550 ± 20) °C se spaluje 1 hod. Pokud by ani toto opatření nepomohlo, přidá se k vychladlému popelu horká voda a po zamíchání se filtruje obsah středně hustým filtrem do suché kádinky, tento filtrát se potom kvantitativně převede do původní misky a odpaří do sucha. Filtr s nerozpustným zbytkem se vloží do stejné misky a po vysušení se dále postupuje podle 5.1.2.

5.1.3 Po skončení spalování, nejsou-li uhlíkaté částice přítomny, se spalovací miska (4.4) s popelem ochladí v exsikátoru a rychle se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_2).

5.1.4 Pokud je ještě podezření na přítomnost uhlíkatých částic, provede se další spalování popele vzorku za výše uvedených podmínek ještě po dobu 1 hod. a po vychladnutí v exsikátoru se opět zváží s výše uvedenou přesností. Není-li rozdíl mezi hmotnostmi prvního a druhého vážení větší než 0,01 g je spalování skončeno, v opačném případě se spalování po dobu 1 hod opakuje tak dlouho, až rozdíl mezi hmotnostmi je menší či rovný výše uvedenému.

5.2 Krmné tuky nebo oleje

Do spalovací misky (4.4), předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g (m_0), se odváží asi 25 g zkušební vzorku se stejnou přesností, do

vzorku vloží nastříhané tenké proužky bezpopelného filtru, tyto se zapálí a po vyhoření hlavního podílu tuku či oleje se obsah misky zvlhčí vodou, vysuší a dále se postupuje podle 5.1.2.

5.3 Mléko a tekuté mléčné výrobky

Do spalovací misky (4.4), předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g (m_0), se odváží asi 25 g zkušební vzorku se stejnou přesností. Obsah misky se odpaří na vodní lázni (4.5) a pak vysuší při (103 ± 2) °C v sušárně (4.2). Následuje pomalé zuhelnatění nad mírným plamenem (4.3). Popel se nechá vychladnout a potom se do misky přidá 10 ml horké vody. Rozpustný podíl se odfiltruje přes bezpopelný filtrační papír a promyje malým množstvím horké vody. Filtrát se uschová a filtrační papír se vloží zpět do spalovací misky (4.4), vysuší a vyžihá v muflové peci (4.1) při 500–550 °C do běla. Po vychladnutí se do misky přidá kvantitativně filtrát, který se odpaří do sucha při 130 °C a krátce přezihá při 500–550 °C. Miska se po vychladnutí v exsikátoru rychle zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m_2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah popele v g / kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot (m_2 - m_0)}{m_1 - m_0}$$

kde m_0 je hmotnost prázdné spalovací misky v g
 m_1 hmotnost spalovací misky se zkušebním vzorkem v g
(= $m_0 + m$)
 m_2 hmotnost spalovací misky se spáleným vzorkem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g / kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu

do 30 g/kg	3 g/kg
od 31 do 50 g/kg	10 relat.
od 51 do 200 g/kg	5 g/kg
od 201 do 400 g/kg	2,5 relat.
nad 400 g/kg	10 g/kg

8. Poznámky

8.1 U krmiv, které mají tendenci se nadouvat se odvažuje pouze 2,5 g a používají se misky větších rozměrů.

8.2 Dusičnan amonný se musí přidávat opatrně, aby se zamezilo dispergovatelnosti popele nebo tvoření hrudek)

8.3 Popel ve vzorcích melasy nebo surového cukru se stanovuje konduktometricky,

6.2 Stanovení obsahu popela v tukcích

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje metodu pro stanovení popela, použitelnou pro všechny živočišné a rostlinné tuky a oleje, včetně kyselých tuků.

2. Princip

Popel je anorganický zbytek po zpopelnění za stanovených podmínek. Vzorek tuku se spálí při určené teplotě a získaný zbytek se určí vázkově.

3. Chemikálie

3.1 Peroxid vodíku, roztok 10 % (v/v)

3.2 Uhličitán amonný, pevný

4. Přístroje

4.1 Kelímek (nizký), nebo miska na 50 ml; přednost je dávana křemenným a platinovým

4.2 Vyhřívaná deska nebo kahan

4.3 Muflová pec s možností práce v rozmezí 500 až 600 °C

4.4 Filtrační papír, bezpopelný

4.5 Vodní lázeň s termostatem

4.6 Sušárna elektrická atmosférická s automatickou regulací teploty v mezích ± 2 °C, s možností odvětrávání

5. Postup

5.1 Surové a rafinované tuky a oleje

5.1.1 Nejprve se vyžehne kelímek nebo miska (4.1) v muflové peci (4.3) nastavené na 550 až 650 °C, potom se ochladí v exsíkátoru a zváží s přesností na 1 mg.

S přesností nejméně na 10 mg se do kelímku nebo misky (4.1) naváží přibližně 10 g zkušebního vzorku (poznámka 8.1). Opatrně se zahřívá na vyhřívané desce nebo nad plamenem kahanu (4.2) v digestoři dokud se vzorek nevznítí (poznámka 8.2).

Po ukončení spalování se kelímek nebo miska (4.1) přemístí do muflové pece (4.3) nastavené na 550 až 650 °C. Při této teplotě se udržuje 4 hodiny nebo po kratší dobu, jestliže zbytek neobsahuje uhlík je získán rychleji. Bezuhlíkatý zbytek se vyznačuje objevením popele červenohnědé (za přítomnosti železa), nebo bílé barvy, bez černých částic zůstávajících ve zbytku.

Jestliže vzorek není zbaven uhlíku po 4 hodinách, přidá se několik kapek peroxidu vodíku (3.1), vysuší se na vroucí vodní lázni (4.5) a znovu se zahřívá v muflové peci (4.3), dokud není uhlík odstráněn. Tento postup může být podle potřeby opakován.

Pokud zbytek již neobsahuje uhlík, nechá se miska nebo kelímek se zbytkem ochladit v exsíkátoru a zváží se s přesností na 1 mg.

5.2 Kyselé oleje

5.2.1 Postupuje se podle odstavce 5.1.1, ale v prvním kroku se kelímek nebo miska (4.1) ohřívá při teplotě 500 až 550 °C v muflové peci (4.3). Po skončení spalování se kelímek nebo miska (4.1) nechá vychladnout a zbytek se rozpustí ve vodě. Obsah kelfmku nebo misky se zfiltruje přes filtrační papír (4.4), který neobsahuje popel, do kádinky.

5.2.2 Filtrační papír (4.4) se zbytkem se vloží do kelfmku nebo misky (4.1) a suší se v sušárně (4.6) při 103 ± 2 °C do úplného vysušení. Kelímek nebo miska (4.1) se přemístí na vyhřívanou desku nebo do plamene kahanu (4.2) a opatrně se zahřívá podle bodu 5.1.1, dokud není spalování ukončeno. Potom se zahřívá v muflové peci (4.3) při teplotě 500 až 550 °C, dokud nezmizí částice uhlíku, nebo dokud dochází ke změnám vzhledu zbytku. Jestliže zbytek obsahuje uhlík, postupuje se podle odstavce 5.1.1.

5.2.3 Filtrát získaný podle bodu 5.2.1 se kvantitativně převede do kelfmku (4.1) a na vroucí vodní lázni (4.5) se odpaří do sucha. K odparu se přidá 0,5 až 2 g uhličitánu amonného (3.2) a zbytek se žhívá v muflové peci (4.3) při teplotě 500 až 550 °C. Kelímek nebo miska se zbytkem se nechá vychladnout v exsíkátoru a zváží se s přesností na 1 mg.

6. Výpočet

Obsah popela vyjádřený v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = 1000 \cdot \frac{m_2 - m_1}{m}$$

kde m je hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

m_1 hmotnost prázdného kelfmku, nebo misky v g

m_2 hmotnost kelfmku nebo misky s popelem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou sobě navzájem provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky g/kg. Výsledek menší než 0,1 g/kg se uvádí jako „stopy“.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu popela:

do 1 g/kg	20% relat
nad 1 g/kg	15% relat

8. Poznámky

8.1 Při nižších obsahích popela může být použita větší navážka přidáním 10 g části po počátečním spálení a při vyšších obsahích může být použita nižší navážka. S narůstající navážkou oleje může být použit knot z filtračního papíru, který neobsahuje popel, vložený do oleje a zapálený, zatímco olej je zahříván na vyhřívané desce.

8.2 Počáteční ohřev může být proveden v otvoru muflové pece, jestliže je pec umístěna v digestoři.

6.3 Stanovení podílu popela nerozpustného v kyselině chlorovodíkové

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dva postupy stanovení a to jednak pro jednoduchá organická krmiva a jednak pro minerální, organominerální krmiva a krmiva, obsahující nad 10 mg/kg nerozpustného podílu popela v kyselině chlorovodíkové.

Tyto metody specifikují podmínky pro stanovení nerozpustného podílu popela v kyselině chlorovodíkové. Metody jsou použitelné pro všechny obsahy.

2. Princip

Nerozpustný podíl popela v kyselině chlorovodíkové se stanoví vázkově jako nerozpustná část popela, získaného spalování vzorku podle Přílohy 9, část 6.1 Stanovení popela, v kyselině chlorovodíkové resp. přímo rozpouštěním vzorku v kyselině chlorovodíkové.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$
- 3.2 Kyselina trichloroctová, roztok 200 g/l
- 3.3 Kyselina trichloroctová, roztok 10 g/l

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C.
- 4.2 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.
- 4.3 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická
- 4.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.
Pro vzorky krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm² a výškou 35 mm.
- 4.5 Vodní lázeň s termostatem

5. Postup

5.1 Krmiva s převážně organickou složkou

5.1.1 Popel, získaný při stanovení popela podle Přílohy 9, část 6.1 Stanovení popela, se kvantitativně převede pomocí 75 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) do kádinky na 250 ml nebo 400 ml (podle množství pevného podílu), zahřeje se pod hodinovým sklíčkem na topné desce či vaří (4.3) k varu a mírně se vaří ještě 15 minut.

5.1.2 Ještě horký roztok se filtruje středně hustým, bezpopelným filtrem, zbytek na filtru se promyje 2krát až 3krát 50 ml horké vody do negativní reakce na aciditu (pH papírek). Filtrát se dále pro toto stanovení nepoužije; může se využít pro stanovení makroprvků (viz jejich stanovení). Promytý filtr s pevným podílem se převede do spalovací misky (4.4), předem vyžíhané (30 min. při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 (m₀). Miska s filtrem se vysuší v sušárně (4.2) při teplotě 103 °C po dobu 30 minut a spaluje v muflové peci (4.1) při teplotě 550 °C až 700 °C po dobu 30 minut. Potom se miska vyjme, ochladí v exsikátoru a zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m₂).

5.2 Krmiva s převážně minerální složkou krmiva s obsahem nerozpustného podílu v kyselině chlorovodíkové nad 10 g/kg

Odváží se asi 5 g zkušební vzorku, s přesností nejméně na 0,001 g (m₁) do kádinky na 400 ml, přidá se 25 ml vody; opatrně 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a nechá ustát dokud neustane šumění roztoku (vývoj oxidu uhličitého). Pak se přidá dalších 50 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a po odpěnění roztoku se kádinka s obsahem zahřeje na vroucí vodní lázni (4.5) k varu. Vaří se po dobu nejméně 30 minut až do úplného vyčerení roztoku (zhydrolyzování škrobu).

Dále se postupuje podle 5.1.2

Pokud by filtrace chloridového výluhu probíhala obtížně, je nutno stanovení opakovat s nižší navážkou vzorku stejným postupem, ale s tím rozdílem, že namísto roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) se použije roztok kyseliny trichloroctové (3.2) a filtr se promývá roztokem kyseliny trichloroctové (3.3).

Spaluje se po dobu 3 hod.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah nerozpustného podílu popela v kyselině chlorovodíkové v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot (m_2 - m_0)}{m_1}$$

kde m₀ je hmotnost prázdné spalovací misky v g
m₁ hmotnost navážky zkušební vzorku v g
m₂ hmotnost spalovací misky se spáleným zbytkem v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu

do 10 g/kg	1 g/kg
od 11 do 50 g/kg	10 % rel.
od 51 do 200 g/kg	5 g/kg
od 201 do 400 g/kg	2,5 % rel.
nad 400 g/kg	10 g/kg

7.1 Stanovení obsahu celkového fosforu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 279, 20/12/71

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny dva postupy stanovení, spektrofotometrická včetně modifikace pro minerální a kapalná krmiva a vázková, určená pro vyšší obsahy fosforu.

Tyto metody specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu fosforu v krmivech, včetně minerálních přísad.

Uvedené postupy jsou použitelné pro všechna krmiva organického i minerálního původu a všechny obsahy fosforu.

2. Princip

Fosfor se stanoví z chloridového výluhu popele vzorku nebo po mineralizaci kyselinou sírovou po reakci s molybdatovanadátovým činidlem spektrofotometricky nebo po vysrážení chinolinovým činidlem vázkově.

3. Chemikálie

3.1 Metoda spektrofotometrická

3.1.1 Kyselina chlorovodíková, roztok přibližně $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.1.2 Kyselina dusičná, koncentrovaná (65–68%) ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.1.3 Tetrahydrát heptamolybdenanu amonného $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}]$

3.1.4 Kyselina dusičná, roztoky 8,5%

3.1.5 Kyselina sírová, koncentrovaná ($\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$)

3.1.6 Amoniak, roztok 25 % ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$)

3.1.7 Uhlíčan vápenatý, pevný (fosforu prostý)

3.1.8 Molybdatovanadátové činidlo

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se odváží 100 g tetrahydrátu heptamolybdenanu amonného (3.1.3) rozpustí se asi v 600 ml horké vody, ochladí, přidá 10 ml roztoku amoniaku, promíchá, po vytemperování doplní vodou po rysku a promíchá (roztok I).

Do jiné 1 000 ml odměrné baňky se odváží 2,35 g vanadičnanu amonného (3.1.11), rozpustí se v asi 400 ml horké vody, za stálého míchání se přidá pomalu 20 ml roztoku kyseliny dusičné (3.1.2), vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (roztok II).

V 1 000 ml odměrné baňce se smíchá 200 ml roztoku I, 200 ml roztoku II, 134 ml kyseliny dusičné (3.1.2), promíchá, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

Roztoky I a II jsou stálé, ale smíchaný roztok se připravuje vždy čerstvý.

3.1.9 Fosfor, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží přesně 4,3937 g dihydrogenfosforečnanu draselného (KH_2PO_4), předem vysušeného (při 103 °C, 1 hod.) a v exsikátoru ochlazeného, rozpustí ve vodě, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje teoreticky 1 mg fosforu.

3.1.10 Fosfor, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje přesně 5 ml základního standardního roztoku fosforu (3.1.9), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje teoreticky 0,02 mg fosforu.

Základní standardní roztok se uchovává v nádobce z plastické hmoty na temném a chladném místě, pracovní standardní roztok se připravuje vždy čerstvý.

3.1.11 Vanadičnan amonný NH_4VO_3

3.2 Metoda vázková navíc

3.2.1 Kyselina chlorovodíková, zředěná (1 + 1)

3.2.2 Chinolin (neředěný)

3.2.3 Aceton (poznámka 8.1)

3.2.4 Chinolin-molybdenové činidlo

Příprava: Do kádinky asi na 400 ml se odváží 70 g dihydrátu molybdenanu sodného ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) a rozpustí se ve 150 ml vody (roztok A).

Do kádinky na 1 000 ml se odváží 60 g monohydrátu kyseliny citrónové ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), rozpustí ve 150 ml vody a za ochlazování se opatrně přidá 85 ml kyseliny dusičné (3.1.2) (roztok B).

Do kádinky asi na 400 ml se 100 ml vody se přidá 35 ml kyseliny dusičné (3.1.2), 5 ml chinolinu (3.2.2) a promíchá se (roztok C).

Roztok A se za stálého míchání přidá k roztoku B a k této směsi se přidá opět za stálého míchání postupně roztok C.

Výsledná směs se ponechá 24 hod stát. Potom se filtruje přes skleněný kelímek S_4 bez promývání do odměrné baňky na 1 000 ml, přidá se 280 ml acetonu (3.2.3), doplní po rysku a dobře promíchá.

V případě, že roztok je zakalen, opakuje se filtrace stejným kelímkem. Roztok se přechovává na chladném místě a je stálý 1 měsíc.

3.2.5 Uhlí aktivní, práškové

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Metoda spektrofotometrická

4.1.1 Spektrofotometr vhodné konstrukce pro měření při vlnové délce 430 nm a s příslušenstvím

4.1.2 Lázeň vodní nebo písková

4.1.3 Zkumavky objemu 25 až 30 ml

4.1.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám. Pro vzorky krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm^2 a výškou 35 mm.

4.1.5 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C

4.1.6 Baňka podle Kjeldahla

4.2 Metoda vázková

4.2.1 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.2.2 Kelímek filtrační skleněný S_4

4.2.3 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.

4.2.4 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická

5. Postup

5.1 Metoda spektrofotometrická (poznámka 8.2)

5.1.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1.1 Do pěti odměrných baněk na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 0,0; 5,0; 10,0; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku fosforu (3.1.10), což odpovídá koncentracím fosforu v 50 ml objemu 0,0; 0,1; 0,2; 0,4 a 0,5 mg.

5.1.1.2 Do každé odměrné banky se odpipetuje 10 ml molybdatovanadátového činidla (3.1.8), doplní vodou po rysku a promíchá. Po 10 minutovém stání při laboratorní teplotě se měří absorbance každého roztoku v kvetě optické délky 10 mm při vlnové délce 430 nm proti roztoku s nulovým obsahem fosforu.

5.1.1.3 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajícím koncentracím se sestrojí kalibrační graf. Ve výše uvedených koncentracích je kalibrační graf zcela lineární.

5.1.2 Pracovní postup pro krmiva organického původu, která neobsahují vápenaté nebo hořečnaté hydrogenufosforečnany

5.1.2.1 Do spalovací misky (4.1.4) se odváží asi 2,5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 1 g uhlíkatu vápenatého (3.1.7) (poznámka 8.3) a pečlivě promíchá skleněnou tyčinkou, která se kvantitativně zbaví vzorku do spalovací misky (uhlíkatu vápenatý nevadí). Spalovací miska (4.1.4) se vloží do studené muflové pece (4.1.5) a tato se povolna vyhřeje na teplotu $(550 \pm 20)^\circ\text{C}$. Zpopelňuje se tak dlouho, až se získá bílý nebo světle šedý popel (vizuální posouzení), přičemž přítomnost menšího množství uhlíkatých částic nevadí. Potom se spalovací miska nechá vychladnout, obsah se zvlhčí vodou, převede kvantitativně pomocí vody do kádinky obsahu asi 250 ml a pod sklíčkem se přidá postupně a opatrně tolik roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) až zcela ustane šumění (vývoj oxidu uhlíkatého). Pak se přidá ještě 10 ml roztoku této kyseliny (3.1.1), kádinka se umístí na vyhřívanou vodní lázeň nebo pískovou lázeň (4.1.2) a obsah se odpaří opatrně do sucha (eliminace oxidu křemičitého). Po ochlazení se odparek vylouží 10 ml roztoku kyseliny dusičné (3.1.4), opět se umístí na vodní či pískovou lázeň (4.1.2), roztok se asi 5 minut povaří, aniž by se odpařil k suchu a pomocí horké vody se převede do odměrné banky na 500 ml. Po vytemperování se doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok).

5.1.2.2 Do odměrné banky na 50 ml se odpipetuje, podle očekávaného obsahu fosforu ve zkoušeném vzorku, takové množství zásobního roztoku, aby množství fosforu v něm obsaženého bylo max. 0,4 mg (poznámka 8.4).

Dále se postupuje podle 5.1.1.2.

Množství fosforu se zjistí z kalibračního grafu.

Vedle toho se provede slepá zkouška, za použití stejného pracovního postupu a stejného množství činidel jako u zkoušeného vzorku, pouze místo zásobního roztoku vzorku se přidá voda. Případně zjištěné množství fosforu u slepé zkoušky se od množství zjištěného u zkoušeného vzorku odečte.

5.1.3 Minerální a kapalná krmiva (poznámka 8.2)

Odváží se asi 1 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do 250 ml banky podle Kjeldahla (4.1.6), přidá se 20 ml kyseliny sírové (3.1.5), vzorek se důkladně nechá provlhnout kyselinou tak, aby částičky vzorku neulpěly na stěnách banky, zahřeje se k varu a vaří asi 10 minut. Pak se mírně ochladí, přidají se 2 ml

kyseliny dusičné (3.1.2) a opět se mírně zahřeje. Tento postup se opakuje přidáním poněkud většího množství kyseliny dusičné (3.1.2) až do získání zcela bezbarvého roztoku. Nakonec se roztok ochladí, přidá opatrně menší množství vody, promíchá a takto částečně zředěný roztok se převede horkou vodou kvantitativně do odměrné banky na 500 ml. Po vytemperování se doplní odměrná banka po rysku vodou, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok).

Dále se postupuje podle 5.1.2.2.

5.2 Metoda vážková (pro vyšší obsahy fosforu)

5.2.1 Krmiva organického původu

5.2.1.1 Do spalovací misky (4.1.4) se odváží asi 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g a obsah misky se povolna zpopelní na elektricky vyhřívané desce či plynovém kahanu (4.2.4). Potom se spalovací miska (4.1.4) vloží do muflové pece (4.1.5) vyhřáté na teplotu $(550 \pm 20)^\circ\text{C}$ a spaluje se po dobu 3 hodin. Po uplynutí této doby se miska vyjme, ochladí a spálený vzorek se vizuálně posoudí na přítomnost uhlíkatých částic. Jsou-li ještě přítomny, spaluje se za výše uvedených podmínek ještě 1 hodinu. Po ochlazení se popel mírně zvlhčí vodou a pomocí kyseliny chlorovodíkové (3.2.1) a vody se kvantitativně převede do kádinky na 250 ml. Celkové množství roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) nemá být vyšší než 75 ml. Potom se kádinka přikryje krycím sklíčkem, obsah se uvede do varu a vaří se asi 15 minut. Obsah kádinky se ještě za horka filtruje středně hustým filtrem do odměrné banky na 200 ml, promývá horkou vodou, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok).

5.2.1.2 Zásobní roztok, pokud se ihned nezpracuje, se uchovává v nádobě z plastické hmoty, avšak nejdéle do 10 dnů.

5.2.1.3 Z tohoto zásobního roztoku se do kádinky obsahu asi 400 ml odpipetuje, podle očekávaného obsahu fosforu ve zkoušeném vzorku, takový objem (poznámka 8.4) který obsahuje asi 5 až 10 mg fosforu, přidá se 5 ml kyseliny dusičné (3.1.2) a obsah roztoku pod krycím sklíčkem se mírně vaří 5 min, po ochlazení se upraví přidáním vody asi na 100 ml. Potom se přidá 50 ml chinolin – molybdenového činidla (3.2.4) (stále pod krycím sklíčkem), zahřeje tak, aby do 10 minut nastal mírný var a vaří přesně 1 minutu. Potom se obsah kádinky rychle ochladí pod tekoucí vodou za míchání krouživými pohyby a filtruje za sníženého tlaku (4.2.1) přes filtrační skleněný kelímek (4.2.2), předem vysušený (1 hod. při 250°C nebo 2 hod. při 200°C), ochlazený v exsikátoru a zvážený s přesností nejméně na 0,001 g. Vlastní filtrace se provede tak, že nejprve se slévá roztok nad sraženinu, pak se sraženina promývá dekantací asi 5krát po 25 ml vody a teprve potom se převede na filtr. Filtr se sraženinou se vysuší v sušárně (4.2.3) buď při teplotě 250°C po dobu 1 hodiny, nebo při teplotě 200°C po dobu 2 hodin a po ochlazení v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g.

5.2.2 Krmiva minerálního původu

Odváží se asi 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do kádinky obsahu asi 600 ml, kádinka se přikryje krycím sklíčkem a přidá se postupně 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) za občasných promíchání. Po skončení bouřlivé reakce (šumění) se obsah uvede do mírného varu a vaří při tomto varu 15 minut. Potom se obsah mírně ochladí, podle intenzity zbarvení se přidá úměrné množství aktivního uhlí (3.2.5) a ještě za tepla se obsah kádinky filtruje řídkým filtrem do odměrné banky na 500 ml, přičemž první podíl filtrátu se kvantitativně vrátí zpět na filtr. Promývá se horkou vodou, po vytemperování se obsah banky doplní po rysku a promíchá (zásobní roztok).

Dále se postupuje podle 5.2.1.3.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Metoda spektrofotometrická

Obsah celkového fosforu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot F}{10^3 \cdot m_0} \quad (\text{poznámka 8.5})$$

kde C je množství fosforu zjištěné z kalibračního grafu (po případném odečtu množství fosforu zjištěné při slepé zkoušce) v g/ml;

F faktor ředění
 m_0 hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

6.2 Metoda vázková

Obsah celkového fosforu v g/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{14 \cdot m_1}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.5})$$

kde m_1 je hmotnost vysušené sraženiny v g

m_0 hmotnost alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg pro obsahy do 30 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy nad 30 g/kg fosforu.

7. Opakovatelnost

7.1 Metoda spektrofotometrická

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 50 g/kg 3 % relat.
nad 50 g/kg 0,15 g/kg

7.2 Metoda vázková

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky:

8.1 Aceton je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ní je nutno zachovávat bezpečnostní pravidla.

8.2 Vyšší obsah fosforu, obvykle nad 30 g/kg, se stanovuje vázkově.

8.3 Obsahuje-li zkoušený vzorek vápník nebo hořčík v nezanedbatelném množství není třeba uhličitanu vápenatý přidávat.

8.4 Pokud byl proveden rozklad vzorku způsobem mokré mineralizace kyselinou sírovou, pak by koncentrace této kyseliny v objemu alikvotního podílu neměla přesáhnout 0,15 mol/l. Pipetování zvlášť malých objemů (pod 10 ml), zejména děleními pipetami se neprovádí. Ředění se proto volí postupně a zásadně neděleními pipetami.

8.5 Uvedený vzorec pro výpočet fosforu vyjádřeného v elementární formě (P). Pro jiná vyjádření platí dále uvedené přepočty:

— jako P_2O_5 X · 2,2915

— jako Na_3PO_4 X · 5,2939

7.2 Stanovení obsahu vápníku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Jsou uvedeny čtyři postupy stanovení, titrační manganometrická, atomové absorpční spektrometrie, titrační chelatometrická (pro krmné směsi) a vázková.

Tyto metody specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu vápníku v krmivech, krmných směsích a premixech.

Metody umožňují stanovení vápníku ve všech druzích krmiv od obsahu 0,5 g/kg.

2. Princip

Vápník se stanoví z chloridového výluhu popele vzorku nebo u minerálních krmiv po rozpuštění vzorku v kyselině chlorovodíkové vysrážením šťavelanem amonným z amoniakálního prostředí a po izolaci šťavelanu vápenatého a okyselení titračně manganometricky nebo vázkově jako síran vápenatý nebo přímo po přidání lanthanité soli v kyselém prostředí metodou atomové absorpční spektrometrie (AAS) při vlnové délce 422, 7 nm nebo přímo ze slabě alkalického prostředí titračně chelatometricky (krmné směsi).

3. Chemikálie

3.1 Metoda titrační manganometrická

3.1.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.1.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) =$ přibližně 6 mol/l

3.1.3 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.1.4 Kyselina sírová, roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2 \text{ mol/l}$

3.1.5 Amoniak ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$), roztok 5 %

3.1.6 Šťavelan amonný, roztok 10 g/l

3.1.7 Šťavelan amonný, nasycený roztok při 20 °C

3.1.8 Kyselina citrónová, roztok 300 g/l

3.1.9 Chlorid amonný, roztok 50 g/l

3.1.10 Manganistan draselný, odměrný roztok $c(\text{KMnO}_4) = 0,02 \text{ mol/l}$

3.1.11 Uhličitán draselný, pevný

3.1.12 Uhličitán sodný, pevný

3.1.13 Uhlí aktivní

3.1.14 Indikátor bromkrezolová zeleň, ethanolický roztok 0,4 g/l

3.2 Metoda atomové absorpční spektrometrie

3.2.1 Chlorid lanthanitý, roztok 20 g/l

Příprava: 25 g oxidu lanthanitého se odváží do odměrné baňky na 1000 ml, přidá se 5 ml konc. kyseliny chlorovodíkové, po rozpuštění se přidá malé množství vody, vytmperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.2.2 Vápník, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží přesně 2,497 g uhličitanu vápenatého, předem vysušeného (1 hodinu při 103 °C) a v exsikátoru ochlazeného, rozpustí se v 50 ml 6 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkové, vytmperuje, doplní po rysku vodou a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje teoreticky 1 mg Ca.

3.2.3 Vápník, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku vápníku, přidá se několik kapek konc. kyseliny chlorovodíkové, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje teoreticky 40 µg Ca.

3.2.4 Acetylén (poznámka 8,9)

3.3 Metoda titrační chelatometrická

3.3.1 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 1 mol/l

3.3.2 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 5 mol/l

3.3.3 Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrát, odměrný roztok c(chelaton 3) = 0,05 mol/l

Příprava: 18,61 g chelatonu se rozpustí vodou v odměrné baňce na 1 000 ml, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.3.4 Chlorid vápenatý, odměrný roztok c(CaCl₂) = 0,05 mol/l

3.3.5 Indikátor methylová červen, ethanolický roztok 1 g/l

3.3.6 Indikátor fluorexon, směs s pevným dusičnanem draselným v poměru 1 + 100

3.3.7 Hydroxid draselný, roztok c(KOH) = 2 mol/l

3.3.8 Disodná sůl kyseliny ethylendiaminotetraoctové dihydrát, odměrný roztok c(chelaton 3) = 0,02 mol/l

Příprava: 7,45 g chelatonu se rozpustí vodou v odměrné baňce na 1 000 ml, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.3.9 Kyselina thioglykolová, roztok 10%

3.3.10 Indikátor směsný

Příprava: V třecí misce se utře 1 g fluorexonu, 50 g dusičnanu draselného, 0,2 g thymolftaleinu a 0,2 g murexidu.

3.3.11 Triethanolamin pro chelatometrii, roztok (1+1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Metoda titrační manganometrická a chelatometrická

4.1.1 Lázeň vodní s regulovatelnou teplotou

4.1.2 Kelímek filtrační skleněný s filtrační vložkou o pórizitě S3 a S4

4.1.3 Zařízení pro filtraci za sníženého tlaku

4.1.4 Kelímek nebo miska spalovací (porcelánová, křemenná, platinová)

4.2 Metoda atomové absorpční spektrometrie

4.2.1 Spektrometr atomový absorpční, vybavený pro stanovení vápníku s plamenem vzduch-acetylén

4.2.2 Lázeň písková s regulovatelnou teplotou a teploměrem pro rozmezí teplot do 150 °C

4.2.3 Miska nebo kelímek spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event. Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

Pro vzorky krmiv, které mají sklon ke vzdouvání při karbonizaci se použijí misky s plochou nejméně 30 cm² a výškou 35 mm.

4.2.4 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C

4.2.5 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická

5. Postup zkoušky

5.1 Metoda manganometrická (titrační) a metoda vážková

5.1.1 Krmiva organického původu

5.1.1.1 Do spalovací misky (4.1.4) se odváží asi 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g (m) a vzorek se zpopelní, jak je uvedeno v Příloze 9, část 6.1 Stanovení popele, v muflové peci (4.2.4) při (550 ± 20) °C.

5.1.1.2 Po ochlazení popele se přidá 40 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1.1), mírně zahřívá a pomocí asi 60 ml vody se obsah kvantitativně převede do kádinky na 250 ml. Pak se přidá několik kapek kyseliny dusičné (3.1.3), kádinka se přikryje hodinovým sklíčkem, obsah se zahřeje k mírnému varu a vaří asi 30 minut. Pak se filtruje středně hustým filtrem do odměrné baňky na 250 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok).

5.1.1.3 Jsou-li v roztoku po povaze přítomny uhlíkaté částice, roztok se filtruje, jak je výše uvedeno, promyje roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.1.2), filtr se vrátí do spalovací misky (4.1.4) a spálí v muflové peci (4.2.4) při (550 ± 20) °C až do úplného vymizení uhlíkatých částic (vizuální posuzování) obvykle 3 až 5 hod. Potom se miska s popelem ochladí, přidají se 2 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2) a po zředění horkou vodou se obsah filtruje středně hustým filtrem do téže odměrné baňky. Po promytí filtru horkou vodou se obsah baňky vytemperuje, doplní po rysku vodou a promíchá (zásobní roztok).

5.1.1.4 Do kádinky na 250 ml se odpipetuje alikvotní podíl zásobního roztoku, obsahující podle předpokládaného obsahu asi 10 až 40 mg vápníku, přidá se 1 ml roztoku kyseliny citrónové (3.1.8), 5 ml roztoku chloridu amonného (3.1.9), obsah kádinky se zředí asi na 100 ml vodou, kádinka přiklopí hodinovým sklíčkem a obsah se zahřeje k varu. Pak se přidá asi 8 až 10 kapek roztoku indikátoru bromkrezolové zeleni (3.1.14) a 30 ml horkého nasyceného roztoku šťavelanu amonného (3.1.7). Vznikne-li sraženina, rozpustí se několika kapkami kyseliny chlorovodíkové (3.1.1) a obsah kádinky se pomalu za neustálého míchání neutralizuje roztokem amoniaku (3.1.5) do právě vzniklé změny zabarvení indikátoru (pH 4,4 až pH 4,6) a vzniku sraženiny šťavelanu vápenatého. Kádinka se umístí na vroucí vodní lázeň (4.1.1) na dobu 30 minut a pak ještě na 1 hod nechá stát při laboratorní teplotě.

5.1.1.5 Obsah se filtruje za sníženého tlaku (4.1.3) přes filtrační kelímek (4.1.2) a to tak, že nejprve se slévá roztok nad usazenou sraženinou, sraženina se promývá dekantací roztokem šťavelanu amonného (3.1.6) a nakonec se převede na filtr i sraženina. Tato se důkladně promyje vodou do negativní reakce dalšího filtrátu na šťavelany či chloridy a přímo na filtru se rozpustí (poznámka 8.1) v 50 ml horkého roztoku kyseliny sírové (3.1.4) do titrační baňky či kádinky, kelímek se promyje horkou vodou jímanou do stejné baňky (kádinky) a nakonec se obsah baňky (kádinky) upraví vodou asi na 100 ml. Pak se obsah baňky (kádinky) zahřeje na 70 °C až 80 °C a ihned titruje po kapkách odměrných roztokem manganistanu draselného (3.1.10) do právě vzniklého růžového zabarvení roztoku, které setrvá alespoň 1 minutu.

5.1.1.6 Krmiva obsahující velmi nízké obsahy vápníku se zkouší až do vysrážení šťavelanu vápenatého podle 5.1.1.1 až 5.1.1.4 a pak se sraženina odfiltruje hustým filtrem (papírovým), promyje důkladně vodou do negativní reakce na šťavelany či chloridy, filtr se sraženinou se vysuší, vloží do spalovacího kelímku či misky (4.2.3), předem vysušené (30 minut při 550 °C) a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g, spálí a vyžhívá v muflové peci (4.2.4). Po zchlazení se popel zkropí pár kapkami roztoku kyseliny sírové (3.1.4), odpaří na pískové lázni (4.2.2) do sucha, znovu krátce vyžhívá v muflové peci (4.2.4) při (550 ± 20) °C a po zchlazení v exsikátoru se zváží s přesností nejméně na 0,001 g (m1).

5.1.2 Krmiva minerálního původu

5.1.2.1 Do kádinky na 600 ml se odváží asi 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, vzorek se zvlhčí vodou a za občasného promíchání se přidá postupně 100 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2). Po každém přidání se kádinka přikryje hodinovým sklíčkem. Po zklidnění reakce se obsah kádinky uvede do varu a vaří asi 15 minut. Po částečném zchlazení se přidá podle intenzity zbarvení roztoku aktivní uhlí (3.1.13), promíchá a filtruje řídkým filtrem do podložené odměrné baňky na 500 ml. Filtr se promyje asi 200 ml horké vody, obsah baňky se vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok). Dále se postupuje podle 5.1.1.4.

5.1.2.2. V případě analýzy minerálních krmiv, jakými jsou například hlinitovápennaté fosfáty, které nejsou snadno rozpustné v kyselině chlorovodíkové se postupuje následovně: Navážka vzorku

se smíchá v platinovém kelímku (4.2.3) s pětinasobným množstvím směsi uhlíkatu sodného (3.1.12) a draselného (3.1.11) v poměru 1 + 1, opatrně zahřívá na kahanu (4.2.5) až se směs roztaví. Po krátkém tavení se tavenina nechá vychladnout a opatrně se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1.2), jak je uvedeno v 5.1.2.1. Dále se pak postupuje podle 5.1.2.1.

5.2 Metoda spektrometrická (AAS)

5.2.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.2.1.1 Nejmeně 6 odměrných baněk na 100 ml se diferencovane odpipetuje 0,0 ml; 5,0 ml; 10,0 ml; 15,0 ml; 20,0 ml a 25,0 ml pracovního standardního roztoku vápníku (3.2.3), do každé z baněk se přidá 20 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.2.1), doplní vodou po rysku a promíchá. Takto připravené roztoky odpovídající teoreticky koncentracím 0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10,0 g vápníku v 1 ml (poznámka 8.2).

5.2.1.2 Absorbance každého roztoku se měří na přístroji pro atomovou absorpční spektrometrii (4.2.1) při vlnové délce 422,7 nm za použití plamene acetylénu (3.2.4) – vzduch, příslušně seřízeného. Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací v g/ml se sestrojí kalibrační graf.

5.2.2 Vlastní provedení

5.2.2.1 Zásobní roztok zkoušeného vzorku se připraví podle 5.1.1, s tím rozdílem, že roztok po rozpouštění popela se odpaří na písčové lázni (4.2.2) do sucha, přidají se 2 ml 6 mol/l kyseliny chlorovodíkové (3.1.2), po rozpouštění (čirý roztok) se zředí horkou vodou a filtruje středně hustým filtrem do 250 ml odměrné banky. Po vytemperování se doplní vodou po rysku a promíchá (zásobní roztok pro AAS).

5.2.2.2 Ze zásobního roztoku pro AAS, podle očekávaného obsahu vápníku, se odpipetuje do odměrné banky na 100 ml alikvotní podíl obsahující asi 1 mg vápníku (poznámka 8.3), přidá se 20 ml roztoku chloridu lanthanitého (3.2.1), banka se doplní vodou po rysku a promíchá.

Dále se postupuje podle 5.2.1.1 (sestrojení kalibračního grafu).

5.2.2.3 Z hodnot naměřených absorbancí se z kalibračního grafu zjistí odpovídající koncentrace vápníku.

5.2.2.4 Vedle toho se provede slepá zkouška (blank) stejným způsobem jako u vzorku (od rozpouštění popela) s použitím stejných chemikálií a ve stejném množství jako u vzorku, s výjimkou zkoušeného vzorku. Případně naměřená absorbance resp. její odpovídající koncentrace vápníku se od zjištěné u vzorku odečte.

5.3 Metoda titrační chelatometrická (pro krmné směsi)

Vzorek se zpracuje podle 5.1.1.1 a 5.1.1.2 případně i 5.1.1.3.

5.3.1 Nepřímá chelatometrie

Ze zásobního roztoku se odpipetuje alikvotní podíl (poznámka 8.3 a 8.4) do titrační banky vhodného obsahu, přidá se 50 ml vody, několik kapek indikátoru methylové červení (3.3.5) a obsah se neutralizuje roztokem hydroxidu draselného (3.3.1) do právě vzniklé změny zabarvení indikátoru. Potom se k obsahu titrační banky přidá 5 ml 5 mol/l roztoku hydroxidu draselného (3.3.2), malé množství indikátoru fluorexonu (3.3.6) až vznikne zřetelná fluorescence roztoku a z byřety se odměří přesně 10 až 25 ml odměrného roztoku chelatonu (3.3.3) (poznámka 8.5). Přebytek odměrného roztoku chelatonu se zpětně titruje odměrným roztokem chloridu vápenatého (3.3.4) až do právě vzniklé zelené fluorescence titrovaného roztoku.

5.3.2 Přímá chelatometrie

Ze zásobního roztoku se odpipetuje alikvotní podíl (poznámka 8.7) do titrační banky vhodného obsahu, přidá se 50 ml vody, 0,2 ml kyseliny thioglykolové (3.3.9), promíchá se, přidá se 1 ml roztoku triethanolaminu (3.3.11), promíchá a obsah se neutralizuje roztokem hydroxidu draselného (3.3.7) do právě vzniklé změny zabarvení roztoku. Potom se k obsahu titrační banky přidá 5 ml roztoku hydroxidu draselného (3.3.7) a malé množství směsného indikátoru (3.3.10) až vznikne zřetelná fluorescence roztoku. Za stálého míchání se titruje odměrným roztokem chelatonu 3 (3.3.8) až do vymizení fluorescence titrovaného roztoku (poznámka 8.8).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1. Metoda titrační manganometrická

Obsah vápníku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{20,04 \cdot V \cdot C}{m} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku manganistanu draselného v ml
C přesná koncentrace odměrného roztoku manganistanu draselného v mol/l
m hmotnost alikvotního podílu navážky zkoušeného vzorku v g

6.2 Metoda vážková (jako síran vápenatý)

Obsah vápníku v g/kg (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{294,4 \cdot m_1}{m} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde m_1 je hmotnost vyváženého síranu vápenatého v g
m hmotnost navážky zkoušeného vzorku nebo její alikvotní podíl v g

6.3 Metoda spektrometrická (AAS)

Obsah vápníku v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{C}{10 \cdot m} \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde C je koncentrace vápníku zjištěná z kalibračního grafu (event. po odečtení slepé zkoušky) v g/ml
F faktor ředění zásobního roztoku
m hmotnost alikvotního podílu zkoušeného vzorku v g

6.4 Metoda titrační chelatometrická – nepřímá

Obsah vápníku v g/kg (Q) se vypočítá podle vzorce:

$$Q = \frac{(V_1 C_1 - V_2 \cdot C_2)}{m} \cdot 40,08 \quad (\text{poznámka 8.6})$$

kde V_1 je objem přidaného nadbytku odměrného roztoku chelatonu v ml
 V_2 spotřeba odměrného roztoku chloridu vápenatého v ml
 C_1 přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu v mol/l
 C_2 přesná koncentrace odměrného roztoku chloridu vápenatého v mol/l
m hmotnost navážky alikvotního podílu zkoušeného vzorku v g

Obsah vápníku v g / kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{400,8 \cdot V \cdot C}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 při titraci v ml
C přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu v mol/l
m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností pro obsahy do 20 g/kg na 0,1 g/kg a pro obsahy nad 20 g/kg na celé jednotky g/kg

7. Opakovatelnost

7.1 Manganometrická titrační metoda

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

pod 50 g/kg 1 g/kg
nad 50 g/kg 2 % rel.

7.2 Vážková metoda

Nebyla dosud stanovena.

7.3 Spektrometrická metoda (AAS)

Nebyla dosud stanovena.

7.4 Metoda titrační chelatometrická

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Rozpouštění šfavelanu vápenatého lze provést také tak, že se celý filtrační kelmek vloží do titrační baňky (kádky), ale v tom případě je bezpodmínečně nutné zbavit zbytků roztoku šfavelanu amonného celý kelmek (i vně).

Při vyšších obsazích hořčíku ve zkoušeném vzorku se provede předsrážení šfavelanu vápenatého.

8.2 V případě stanovení vápníku v minerálních krmivech, které jsou bohaté na alkalické kovy se doporučuje rozpouštět a ředit roztokem, který obsahuje sodíkové (draslíkové) ionty v takovém poměru, jako má zkoušený vzorek (matrice = zpřesnění výsledků).

Uvedená série roztoků pro kalibraci je uvedena jako příklad a může být nahrazena jinou, která lépe vyhovuje použitému přístroji.

8.3 Při pipetování značně malých množství zásobního roztoku (např. 1 až 5 ml) se doporučuje ředění provádět postupně s většími objemy roztoku a zásadně nedělenou pipetou (přesnost).

8.4 Alikvotní část zásobního roztoku se volí s ohledem na očekávaný obsah vápníku ve zkoušeném vzorku tak, aby odpovídal spotřebě použitého odměrného roztoku v jedné polovině objemu použité baňky.

8.5 Po přidání odměrného roztoku chelatonu dojde k vymizení fluorescence a roztok nabude růžového zabarvení. V případě, že se

tak nestane, je nutné přidat množství odměrného roztoku chelatonu 3 úměrně zvýšit.

8.6 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu vápníku v elementární formě (Ca). Pro jiná vyjádření platí uvedené přepočty:
— jako CaO $X(Y, Z, Q) \cdot 1,3992$
— jako CaCO_3 $X(Y, Z, Q) \cdot 2,4972$

8.7 Objem alikvotního podílu filtrátu se volí s ohledem na předpokládaný obsah vápníku ve vzorku, obvykle se pohybuje v rozsahu 5–50 ml. Spotřeba chelatonu 3 by neměla přesáhnout 5 ml.

8.8 Fluorescence vymizí alespoň po dobu 1 minuty.

8.9 Acetylén je hořlavým plynem, proto při každé manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

7.3 Stanovení obsahu hořčíku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 83, 30/3/73

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu hořčíku v krmivech a minerálních premixech. Metoda je vhodná zejména pro obsahy do 50 g/kg.

2. Princip

Hořčík se stanoví po mineralizaci vzorku (organická krmiva) nebo přímým rozpouštěním (minerální krmiva) z chloridového výluhu přímo metodou atomové absorpční spektrometrie při vlnové délce 285,2 nm.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 9 \text{ mol/l}$

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,45 \text{ mol/l}$

3.4 Hořčík kovový v páscích či drátkách, jako standardní látka

3.5 Síran hořečnatý heptahydrát ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), jako standardní substance (alternativní)

3.6 Hořčík, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží 1,000 g kovového hořčíku (3.4), dokonale zbaveného oxidů nebo 10,143 g heptahydrátu síranu hořečnatého (3.5), přidá se 80 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), rozpustí, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje teoreticky 1 mg hořčíku.

Roztok se uchovává v nádobce z plastu nejvýše 6 měsíců.

Jako základní standardní roztok je možno použít i komerční roztok s deklarovanou (ověřenou) koncentrací hořčíku.

3.7 Chlorid strontnatý hexahydrát ($\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$) nebo dusičnan strontnatý $[\text{Sr}(\text{NO}_3)_2]$, roztok obsahující 2,5 % Sr

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží 76,08 g hexahydrátu chloridu strontnatého nebo 60,38 g dusičnanu strontnatého, rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.8 Acetylen (poznámka 8.3)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr absorpční atomový vhodných parametrů

4.2 Miska spalovací (platinová, křemenná, porcelánová)

4.3 Pec muflová s termostatem a teploměrem nejméně do 550 °C

4.4 Lázeň vodní s termostatem

4.5 Sušárna elektrická s termostatem a teploměrem nejméně do 105 °C

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do šesti odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetují taková množství základního standardního roztoku hořčiku (3.6), aby koncentrace hořčiku odpovídala parametrům použitého spektrometru (4.1) – podle návodu výrobce přístroje (poznámka 8.1).

5.1.2 Vedle toho se připraví kontrolní roztok tak, že do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje takové množství (např. 50 ml) roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3), aby konečná koncentrace této kyseliny nepřesáhla 0,4 mol/l.

5.1.3 Do každé z odměrných baněk se odpipetuje 10 ml roztoku chloridu (dusičnanu) strontnatého (3.7) a přidá tolik kyseliny chlorovodíkové (3.2), aby výsledná koncentrace této byla cca 0,4 mol/l, přičemž hodnota 0,4 mol/l se nesmí překročit. Pak se baňka doplní vodou po rysku a promíchá. Měří se na přístroji pro atomovou absorpční spektrometrii (4.1), po nastavení optimálních parametrů a nulové hodnoty kontrolním roztokem; při vlnové délce 285,2 nm a za použití plamene acetylen (3.8) – vzduch.

5.1.4 Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Krmiva s převážně organickou složkou

5.2.1.1 Do spalovací misky (4.2) se odváží asi 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, zkušební vzorek se spaluje v muflové peci (4.3) při teplotě 550 °C až do získání popele bez přítomnosti uhlíkatých částic.

5.2.1.2 K vychladlému popelu se přidá 5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1), na vodní lázni (4.4) se odpaří do sucha, vysuší ještě po dobu 1 hod. v sušárně (4.5) při 103 °C (přeměna silikátů na nerozpustnou formu) a vychladlému odparku se přidá 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2). Po rozpuštění za tepla se obsah převede kvantitativně pomocí horké vody do odměrné baňky na 250 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým skládaným, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl (asi 30 ml) filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok).

5.2.1.3 Z tohoto zásobního roztoku se odpipetuje alikvotní podíl

(poznámka 8.1), obsahující množství hořčiku v mezích kalibračního grafu, do odměrné baňky na 100 ml a dále se postupuje podle 5.1.3.

Množství hořčiku se zjistí z kalibračního grafu.

5.2.2 Krmiva s převážně minerální složkou

Postupuje se shodně jako v 5.2.1.1.

5.2.2.1 K vychladlému popelu se přidá dostatečné množství (15 až 30 ml) kyseliny chlorovodíkové (3.1), obsah se na vodní lázni (4.4) odpaří do sucha a ještě vysuší při teplotě 103 °C v sušárně (4.5) za dobu 1 hod. Odparek se po vychladnutí rozpustí v 10 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2) za tepla a po rozpuštění se obsah kvantitativně převede pomocí horké vody do odměrné baňky na 500 ml. Po vytemperování, doplnění po rysku vodou a promíchání se filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu (asi 30 ml) se nezachycuje (zásobní roztok).

Dále se postupuje podle 5.2.1.3.

5.2.3 Krmiva s výlučně minerální složkou

5.2.3.1 Do kádinky o obsahu asi 600 ml se odváží asi 5 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 250 až 300 ml vody, 40 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), uvede se do varu a při mírném varu se udržuje 30 minut. Potom se obsah kádinky kvantitativně převede pomocí horké vody do odměrné baňky na 500 ml, vytemperuje, doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým, skládaným, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu (asi 30 ml) se nezachycuje (zásobní roztok).

Za přítomnosti sloučenin křemíku ve zkoušeném vzorku se zkušební vzorek rozpustí v dostatečném množství (15 až 30 ml) kyseliny chlorovodíkové (3.1). Dále se postupuje podle 5.2.2.1 (odpaření do sucha atd.).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah hořčiku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m} \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde m_1 je množství hořčiku zjištěné z kalibračního grafu v mg
 m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na desetiny g/kg pro obsahy hořčiku do 20 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy hořčiku nad 20 g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit pro všechny obsahy 5 % relat.

8. Poznámky

8.1 Ředění standardního roztoku hořčiku, popř. i zásobních roztoků zkoušeného vzorku, je nutno provádět postupně tak, aby nebylo pipetováno méně než 10 ml a pipety používat výhradně nedělené (přesnost).

8.2 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu hořčíku v elementární formě (Mg). Pro jiná vyjádření platí dále uvedené přepočty:

- jako $\text{MgO} \times 1,658$
- jako $\text{MgCO}_3 \times 3,469$

8.3 Acetylen je hořlavým plynem, proto při každé manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

7.4 Stanovení obsahu draslíku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu draslíku v krmivech.

2. Princip

Draslík se stanoví v chloridovém výluhu po zpopelnění vzorku a za přidavku chloridu cesného a dusičnanu hlinitého k eliminaci vlivu interferujících látek, metodou emisní plamenové spektrometrie.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.3 Chlorid cesný (CsCl), pevný

3.4 Dusičnan hlinitý nonahydrát $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}]$, pevný

3.5 Chlorid draselný (KCl), bezvodý

3.6 Tlumivý roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 50 g chloridu cesného (3.3) a 250 g dusičnanu hlinitého (3.4), rozpustí se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá. Uchovává se v plastických nádobách.

3.7 Chlorid draselný, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1000 ml se odváží přesně 1,907 g chloridu draselného (3.5), předem vysušeného po dobu 1 hod. při 105°C a v exsikátoru ochlazeného, přidá se 300 ml vody, po rozpuštění 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 1,0 mg draslíku. Uchovává se v plastických nádobách.

Jako základní standardní roztok je možno použít i komerční roztok s deklarovanou (ověřenou) koncentrací draslíku.

3.8 Chlorid draselný, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.7), doplní vodou po rysku a promíchá. 1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 0,04 mg draslíku. Přípravuje se vždy čerstvý.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr plamenový

4.2 Miska platinová, křemenná či porcelánová (případně opatřená víčky)

4.3 Pec muřlová s termostatem

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku (3.8), což odpovídá koncentracím 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 mg draslíku v 100 ml roztoku. Do každé z baněk se odpipetuje, včetně další prázdné baňky (slepý roztok), 10 ml tlumivého roztoku (3.6) (poznámka 8.1), 8 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplní se vodou po rysku a promíchá.

5.1.2 Na plamenovém spektrometru (4.1) se nastaví potřebné parametry a při vlnové délce 763 nm se obvyklou technikou změří hodnota každého roztoku, při nastavení nulové hodnoty slepým roztokem.

5.1.3 Z naměřených hodnot kalibračních roztoků a jejich odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

5.2.1 Do spalovací misky (4.2) se odváží asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g a zpopelní v muřlové peci (4.3) při teplotě 450°C po dobu 3 hod. Po ochlazení se popel převede pomocí 250 až 300 ml vody a 60 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) do odměrné baňky na 500 ml a za účelem vypuzení oxidu uhličitého se baňka s obsahem zahřeje na vroucí vodní lázni na teplotu 90°C ponechá při této teplotě po dobu 2 hod. Po vytemperování se doplní vodou po rysku a promíchá. Filtruje se suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

5.2.2 Z tohoto filtrátu (zásobní roztok) se odpipetuje alikvotní část, obsahující podle předpokladu max. 1 mg draslíku (viz tabulka 1) do odměrné baňky na 100 ml, přidá se 10 ml tlumivého roztoku (3.6), (poznámka 8.1) doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.1) po rysku a promíchá. Dále se postupuje podle 5.1.2.

Množství draslíku se zjistí z kalibračního grafu.

Obsahuje-li vzorek vyšší obsah draslíku, než je uveden v tabulce 1, zředí se ještě před přidáním tlumivého roztoku (3.6) a použije se takové množství 6 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), aby výsledná koncentrace kyseliny byla asi 0,5 mol/l.

Tabulka 1: Odpipetované podíly při navázce zkušebního vzorku 10 g a zásobního roztoku 500 ml

Očekávaný obsah draslíku g/kg	Zředovací faktor	Alikvotní část zásobního roztoku
do 1,0 50 ml		50 ml
od 1,1 do 5,0		10 ml
od 5,1 do 10,0		5 ml
od 10,1 do 50,0	1:10	10 ml
od 50,1 do 100,0	1:10	5 ml
od 100,1 do 200	1:20	5 ml

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah draslíku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde m_1 je množství draslíku, zjištěné z kalibračního grafu v mg
 m_0 je hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jedno desetinné místo pro obsahy do 20 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy nad 20 g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu

od 2 do 50 g/kg	10 % relat.
nad 50 g/kg	5 g/kg

8. Poznámky

8.1 Tlumivý roztok za účelem eliminace interference rušivých prvků není nutné vždy přidávat. Je nutné si bezpečně ověřit případy ve kterých to není, nebo je třeba.

8.2 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu draslíku v elementární formě (K). Pro vyjádření jako K_2O platí přepočet: X · 1,205

7.5 Stanovení obsahu sodíku

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no.L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu sodíku v krmivech.

2. Podstata zkoušky

Sodík se stanoví v chloridovém výluhu po zpopelnění vzorku a za přítomnosti chloridu cesného a dusičnanu hlinitého k eliminaci vlivu interferujících látek metodou emisní plamenové spektrometrie.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.2 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.3 Chlorid cesný (CsCl), pevný

3.4 Dusičnan hlinitý nonahydrát [$\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$], pevný

3.5 Tlumivý roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 50 g chloridu cesného (3.3) a 250 g dusičnanu hlinitého (3.4), rozpustí

se ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

Uchovává se v plastických nádobkách.

3.6 Chlorid sodný, bezvodý

3.7 Chlorid sodný, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží přesně 2,541 g chloridu sodného, předem vysušeného (1 hod. při 105 °C) a v exsikatoru ochlazeného, přidá se asi 300 ml vody, po rozpuštění 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto základního standardního roztoku obsahuje 1 mg sodíku. Roztok se uchovává v plastických nádobkách.

Jako základní standardní roztok je možno použít i komerční roztok s deklarovanou (ověřenou) koncentrací sodíku.

3.8 Chlorid sodný, pracovní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 250 ml se odpipetuje 10 ml základního standardního roztoku (3.7), doplní vodou po rysku a promíchá.

1 ml tohoto pracovního standardního roztoku obsahuje 0,04 mgmg sodíku. Přípravuje se vždy čerstvě.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr plamenový

4.2 Miska spalovací (platinová, křemenná, porcelánová)

4.3 Pec muflová s termostatem

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do sady odměrných baňek na 100 ml se odpipetuje diferencovaně 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku (3.8), což odpovídá koncentracím 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1,0 mg sodíku ve 100 ml. Do každé z baňek se odpipetuje 10 ml tlumivého roztoku (3.9), 8 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) včetně do další prázdné (slepý roztok), každá z baňek se doplní vodou po rysku a promíchá.

5.1.2 Nastaví se potřebné parametry plamenného spektrometru (4.1) a při vlnové délce 589 nm se obvyklou technikou proměří každý roztok, při nastavení nulové hodnoty slepým roztokem.

5.1.3 Z naměřených hodnot standardů a jim odpovídajících koncentrací se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

Do spalovací misky (4.2) se odváží asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, zpopelní v muflové peci (4.3) při teplotě 450 °C za dobu 3 hod. (poznámka 8.1). Po ochlazení se popel převede pomocí 250 až 300 ml vody a 60 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) do odměrné baňky na 500 ml a za účelem vypuzení oxidu uhličitého se baňka s obsahem zahřeje na vodní lázni na teplotu 90 °C, ponechá při této teplotě asi 2 hod, přičemž se občas promíchá. Po vytemperování a doplnění vodou po rysku se promíchá, filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Z tohoto filtrátu (zásobní roztok) se odpipetuje do odměrné baňky na 100 ml alikvotní část obsahující max. 1 mg sodíku (viz tabulka 1), přidá se 10 ml tlumivého roztoku (3.5), doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) po rysku a promíchá. Dále se postupuje podle 5.1.2.

Množství sodíku se zjistí z kalibračního grafu.

Obsahuje-li vzorek vyšší obsah sodíku, než je uvedeno v tabulce 1, zředí se vhodným způsobem před přidáním tlumivého roztoku (3.5). Při ředění se použije takové množství roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), aby výsledná koncentrace kyseliny byla 0,5 mol/l.

Tabulka 1: Odpietované podíly zásobního roztoku při navážce zkušební vzorku 10 g a zásobního roztoku 500 ml

Očekávaný obsah draslíku g/kg	Zředovací faktor	Alikvotní část zásobního roztoku
do 1,0	—	50
od 1,1 do 5,0	—	10
od 5,1 do 10,0	—	5
od 10,1 do 50,0	1:10	10
nad 50,1	1:20	5

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah sodíku v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.2})$$

kde m_1 je množství draslíku, zjištěné z kalibračního grafu v mg
 m_0 je hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jedno desetinné místo do obsahu 20 g/kg a na celé jednotky g/kg nad obsah 20 g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

od 2 g/kg do 50 g/kg 10 % relat.
 nad 50 g/kg 5 g/kg

8. Poznámky

8.1 Při spalování je nutné zabránit vznícení vzorku. Pro krmiva, obsahující více než 40 g/kg sodíku se spaluje ve spalovací misce opatřené víčkem po dobu 2 hod. Po vychladnutí se přidá trochu vody, pomocí Pt drátku se vytvoří kaše, vysuší se a opět 2 hod spaluje v misce zakryté víčkem. Dále se postupuje, jak uvedeno v 5.2, víčko se opláchne rovněž do odměrné baňky. U krmiv, obsahujících většinou minerální složky, se vzorek nespaluje, ale přímo v 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) rozpouští.

8.2 Uvedený výpočet platí pro vyjádření obsahu sodíku v elementární formě (Na). Pro vyjádření jako NaHCO_3 platí přepočet X : 3,654 a jako Na_2CO_3 platí: X : 2,305

7.6 Stanovení obsahu ve vodě rozpustných chloridů

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení ve vodě rozpustných chloridů v krmivech a minerálních přísadách. Zvláštní modifikace specifikuje podmínky pro stanovení ve vodě rozpustných chloridů v rybích moučkách a v tepelně opracovaných krmivech (výlisky lněných pokrutin či šrotů, slizovitých a koloidních materiálů – např. dextrin a pod.)

Metoda včetně modifikací zahrnuje použití pro všechna krmiva a všechny obsahy.

2. Princip

Chloridy se stanoví z vodního výluhu vzorku nepřímou argentometrickou titrací podle Volharda po vyčechení Carresovými činidly.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina dusičná koncentrovaná ($h = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.2 Dusičnan stříbrný, odměrný roztok $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$

Příprava: 16,989 g dusičnanu stříbrného, předem vysušeného 2 hod při teplotě 150°C a ochlazeného v exsikátoru, se odváží do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

Standardizace tohoto odměrného roztoku se neprovádí.

3.3 Thiokyanatan amonný, odměrný roztok $c(\text{NH}_4\text{SCN}) = 0,1 \text{ mol/l}$

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 7,612 g thiokyanatanu amonného rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

Standardizuje se pomocí odměrného roztoku dusičnanu stříbrného za použití indikace síranem železitoamonným. Koncentrace se vyjádří v mol/l s přesností nejméně na 0,001.

3.4 Síran železitoamonný dodekahydrát $[\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}]$ nasycený roztok (při 20°C), jako indikátor

3.5 Carresovo činidlo I

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $[\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$, přidá se 3 ml ledové kyseliny octové a po rozpouštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Carresovo činidlo II

Příprava: Do odměrné baňky na 100 ml se odváží 10,6 g trihydrátu hexakynoželzatanu draselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}]$, přidá se asi 50 ml vody, po rozpouštění se doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 n-Hexan nebo diethylether (poznámka 8.1)

3.8 Aceton (poznámka 8.1)

3.9 Uhlí aktivní, chloridů prosté a neabsorbující chloridy

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Lázeň písková nebo topná deska

4.2 Třepačka nebo elektromagnetická míchačka vhodné konstrukce

4.3 Odstředivka vhodných parametrů

5. Postup

Do odměrné baňky na 500 ml se odváží asi 10 g zkušebního vzorku (poznámka 8.2) s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se asi 400 ml vody, promíchá, dále přidá 5 ml Carresova činidla I (3.5), opět promíchá, 5 ml Carresova činidla II (3.6) (poznámka 8.3), asi 0,5 až 1 g aktivního uhlí (3.9) a opět důkladně promíchá. Odměrná baňka se zazátkuje, umístí na třepačku nebo elektromagnetickou míchačku (4.2) a protřepává (promíchává) se 30 minut. Pak se obsah baňky doplní vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (zásobní roztok) (poznámka 8.4).

Do titrační baňky či kádinky vhodného objemu se odpipetuje alikvotní podíl zásobního roztoku, obsahující nejvýše 100 mg chloridů, vyjádřených jako chlorid sodný, je-li třeba doplní se na objem 50 ml vodou, přidá 5 ml kyseliny dusičné (3.1), 20 ml roztoku síranu železitoamonného (3.4) jako indikátoru (poznámka 8.5) a promíchá. Před titrací se přidají 2 kapky odměrného roztoku thiokyanatanu amonného (3.3) přímo z byřety, ze které bude titrováno (jsou součástí spotřeby) a za stálého intenzivního promíchávání se přidá přesně z byřety přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.2) a to asi o 5 až 10 ml více, než je ekvivalentní množství chloridů. Těsně před začátkem titrace se ještě přidá 5 ml n-hexanu nebo diethyleteru (3.7) a důkladně znovu promíchá (koagulace sraženiny). Přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.2) (poznámka 8.5) se titruje odměrným roztokem thiokyanatanu amonného (3.3) do právě vzniklého červenohnědého zabarvení roztoku, které vydrží asi 1 minutu (spotřeba V_1).

U vzorků rybích mouček se odvažuje asi 5 g vzorku s přesností nejméně na 0,001 g do kónické baňky, přidá se asi 50 ml horké vody, promíchá, dále přidá přesně 50,0 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.2) a 20 ml kyseliny dusičné (3.1). Baňka se zakryje hodinovým sklíčkem, umístí na pískovou lázeň nebo topnou desku (4.1), uvede do varu a po dobu 15 minut se mírně vaří. Potom se obsah baňky ochladí, hodinové sklíčko se opláchně vodou do baňky, vodou upraví objem asi na 50 ml, přidá 5 ml síranu železitoamonného (3.4) jako indikátoru a titruje se odměrným roztokem thiokyanatanu amonného (3.3) do právě vzniklého červenohnědého zabarvení roztoku, které vydrží alespoň 30 sekund (spotřeba V_1) (poznámka 8.5).

Vedle toho se provede slepá zkouška s použitím stejného množství použitých činidel, zejména přesně stejný přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného, jako při vlastní analýze vzorku (spotřeba V_2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah ve vodě rozpustných chloridů vyjádřených jako chlorid sodný (NaCl) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{(V_2 - V_1) \cdot C \cdot 58,443}{m}$$

kde V_2 je spotřeba odměrného roztoku thiokyanatanu amonného na slepou zkoušku v ml
 V_1 spotřeba odměrného roztoku thiokyanatanu amonného na vlastní vzorek v ml
C přesná koncentrace odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v mol/l
m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,5 g/kg do obsahu 10 g/kg a na 1 g/kg pro obsahy nad 10 g/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu

do 10 g/kg 0,5 g/kg
nad 10 g/kg 5 % relat.
(rybí moučky 10 % relat.)

8. Poznámky

8.1 Aceton, n-hexan a diethylether jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto je nutné při jakékoli manipulaci s nimi dodržovat příslušná bezpečnostní pravidla.

8.2 U krmiv s vyšším obsahem tuku než 50 g/kg se navážka zkušebního vzorku nejdříve odtuční alespoň částečně, promytím diethyletherem nebo n-hexanem dekantací s odlitím extrakčního činidla.

8.3 U minerálních přísad a rybích mouček se Carresova činidla ani aktivní uhlí nepřidávají.

8.4 Vzorky tepelně opracovaných krmiv, líných pokrutin a šrotů či směsí s jejich převážným obsahem popří. koloidní povahy (dextrinový škrob a pod.) se před filtrací odstředí popří. se filtruje dekantací a 100 ml supernatantu nebo dekantátu se odpipetuje do odměrné baňky na 200 ml, doplní acetone (3.8) po značku, promíchá a teprve nyní filtruje, jak v textu uvedeno.

8.5 Titraci lze též provést potenciometricky přímo odměrným roztokem dusičnanu stříbrného do potenciálu ekvivalenčního bodu, indikovaného pomocí stříbrné a merkuro-sulfátové elektrody. Hodnota ekvivalenčního bodu se určí z průběhu titrační křivky při modelovém stanovení chloridů (jako inflexní bod titrační křivky). V tomto případě se neprovádí slepá zkouška, nepřidává se síran železitoamonný a výpočtový vzorec bude:

$$X = \frac{(V_3 - C_1) \cdot C \cdot 58,443}{m}$$

kde V_3 je spotřeba odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v ml

C_1 přesná koncentrace odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v mol/l
m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku

7.7 Stanovení obsahu celkových uhličitánů

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení uhličitánů v krmných směsích. Metodou se stanoví celkové uhličitany, s výjimkou uhličitánů nerozložitelných kyselinou chlorovodíkovou (např. uhličitánů železa) a je použitelná pro obsahy od 5 do 100 g/kg. Navíc umožňuje modifikaci pro vyšší i nižší obsahy při zvláštních kalibračních.

2. Princip

Uhličitany se stanoví po rozkladu vzorku kyselinou chlorovodíkovou a vzniklý oxid uhličitý se změní v kalibrované trubici volumetricky nebo manometricky.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková, roztok c(HCl) = 6 mol/l
- 3.2 Uhličitán vápenatý, srážený, pevný – standardní látka pro kalibraci
- 3.3 Vzorek krmiva pro kalibraci, neobsahující uhličitany (např. obilný šrot a pod.) (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Přístroj nebo zařízení, umožňující kvantitativní rozklad uhličitánů ve vzorku, v uzavřené reakční nádobě s vhodným dávkovacím zařízením a spojené citlivým volumetrem nebo manometrem (vodní sloupec a pod.)

5. Postup

5.1 Sestrojení kalibračního grafu

5.1.1 Do reakční nádoby (poznámka 8.2) přístroje či zařízení pro stanovení uhličitánů (4.1) se odváží 0,20 g uhličitánu vápenatého jako standardní látky, přidá se do 10 g vzorku krmiva pro kalibraci a obsah se promíchá.

5.1.2 Pak se do reakční nádoby přidá 50 ml vody (poznámka 8.3) a obsah se promíchá. Do dávkovacího zařízení přístroje, které bude plynově spojeno s reakční nádobou, se odměří 10 ml (poznámka 8.4) roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1), dávkovací zařízení se připojí k reakční nádobě a tato se připojí k měřicímu zařízení (4.1). Potom se pomalu, ale nepřerušovaně z dávkovacího zařízení přepustí roztok kyseliny chlorovodíkové (3.1) a kohout dávkovacího zařízení se ihned uzavře (poznámka 8.5). Reakční nádobou se intenzivně třepí buď přímo v ruce ale tak, aby se obsah reakční nádoby nezahřival teplem dlaně, nebo vhodným třepacím zařízením, až do okamžiku, kdy dojde k ustálení měřené hodnoty objemu (tlaku). Vyčká se ještě asi 2 minuty a zjistí se naměřená hodnota. Potom se pomalu uvolní uzávěr reakční nádoby za účelem vyrovnání tlaku a nastavení přístroje na nový vzorek.

5.1.3 Stejný postup se provede s navážkami uhličitánu vápenatého (3.2) o hmotnostech 0,50 g; 0,70 g; 0,90 g a 1,00 g (poznámka 8.6), které odpovídají obsahům uhličitánů 50; 70; 90 a 100 g/kg. Každá navážka se doplní do 10,0 g vzorkem krmiva pro kalibraci (3.3).

Z naměřených hodnot (objemu či tlaku) a jim odpovídajících koncentrací odpovídajících obsahů se sestrojí kalibrační graf.

5.2 Vlastní provedení

Do reakční nádoby přístroje či zařízení pro stanovení uhličitánů (4.1) se odváží 10,00 g zkušebního vzorku (poznámka 8.7) a dále se postupuje podle 5.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah veškerých uhličitánů, vyjádřených jako CaCO_3 se zjistí přímo z kalibračního grafu (poznámka 8.8).

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na jednotky g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Aby byl zaručen nulový obsah uhličitánů je nutné provést slepou zkoušku za naprosto stejných podmínek (nezjistí se žádný významný vzrůst objemu či tlaku).

8.2 Pokud není dáno samou konstrukcí přístroje či zařízení, je nutné používat vždy stejné reakční nádoby, a to jak pro kalibraci tak i vlastní provedení stanovení nebo mít k dispozici nádoby, které vůči sobě nevykazují žádné rozdíly. Je nutné předem ověřit.

8.3 Množství přídavku vody se řídí podle obsahu reakční nádoby (pro uvažovaný postup se předpokládá objem reakčních nádobek 200 ml) resp. podle návodu k přístroji nebo zařízení.

8.4 Množství přidané kyseliny může být případně odlišné podle návodu k použitému přístroji či zařízení.

8.5 Uzavření přívodu z dávkovacího zařízení musí být provedeno dostatečně rychle; aby výsledek nebyl zkreslen změnou objemu či tlaku zvětšením reakčního prostoru. Doporučuje se uzavřít přívod dříve než vyteče poslední malý podíl kyseliny. Především je nutno dodržet stejné podmínky při kalibraci i vlastním provedení

8.6 Uvedené kalibrační dávky jsou příkladem a mají být voleny podle návodu přístroje či zařízení pro stanovení uhličitánů i s ohledem na obsahy uhličitánů, které budou stanovovány.

8.7 Uvedená navážka zkušebního vzorku je určena pro krmné směsi, obsahující 20 g/kg až 70 g/kg uhličitánů, vyjádřených jako CaCO_3 za předpokladu, že měřicí zařízení je pro tyto obsahy konstruováno a tuto navážku zkušebních vzorků kalibrováno. Pro vyšší (nižší) obsahy se volí obvykle např. poloviční (dvojnásobná) navážka zkušebního vzorku i kalibrace za těchto podmínek. Pro indikační stanovení vyšších obsahů uhličitánů, než na které je provedena kalibrace se odvažuje polovina (čtvrtina atd.) navážky zkušebního vzorku a doplní se do 10,0 g vzorkem krmiva pro kalibraci. Výsledek se pak vynásobí dvěma (čtyřmi atd.).

8.8 Pro vyjádření obsahu veškerých uhličitánů jako:

NaHCO_3 platí přepočty = $X \cdot 0,8393$,

Na_2CO_3 platí přepočty = $X \cdot 1,059$

MgCO_3 platí přepočty = $X \cdot 0,8424$

kde X je obsah veškerých uhličitánů, vyjádřených jako CaCO_3 .

7.8 Stanovení oxidů křemíku, hliníku, vápníku a hořčíku (ve vápencích)

1. Účel a rozsah

Metoda specifikuje podmínky pro stanovení uvedených oxidů ve vápencích.

2. Princip

Nerozpuštěný zbytek po rozpouštění vzorku v kyselině chlorovodíkové se vytaví s uhličitánem sodným, tavenina se vylouží kyselinou chlorovodíkovou a po spojení s původním filtrátem se odpaří do sucha. Vyloučená sraženina se odfiltruje, spálí, zváží a po odkouření s kyselinou fluorovodíkovou a sírovou znovu zváží. Obsah oxidu křemičitého se určí z rozdílu obou vážení.

Ve filtrátu po stanovení oxidu křemičitého se amoniakem vysráží hydroxidy, které se po odfiltrování a spálení určí vážkově jako oxidy amoniakální skupiny.

Ve filtrátu po stanovení oxidů trojmocných kovů se chelatometrickou titrací stanoví oxid vápenatý a suma oxidů vápenatého a hořečnatého.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková ($h = 1,17 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 1)
- 3.2 Kyselina dusičná ($h = 1,4 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 4)
- 3.3 Uhličitán sodný, bezvodý
- 3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok 1 %
- 3.5 Kyselina sírová ($h = 1,84 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 4)
- 3.6 Kyselina fluorovodíková ($h = 1,128 \text{ g/cm}^3$), roztok 40 %
- 3.7 Tetraboritan disodný, dekahydrát, pevný
- 3.8 Chlorid amonný, pevný
- 3.9 Kyselina dusičná, koncentrovaná ($h = 1,4 \text{ g/cm}^3$)
- 3.10 Amoniak ($h = 0,91 \text{ g/cm}^3$), roztok 10 %, prostý uhličitán
- 3.11 Methylóvá červená, ethanolický roztok 0,5 %
- 3.12 Dusičnan amonný, roztok 1 %, neutralizovaný amoniakem na methylóvou červená
- 3.13 Hydroxid draselný, roztok 20 %
- 3.14 Disodná sůl kyseliny etylendiaminotetraoctové dihydrát, odměrný roztok c(chelaton 3) = 0,05 mol/l
Příprava: 18,62 g chelatonu 3 se rozpustí ve vodě a doplní v odměrné baňce na 1000 ml a promíchá.
- 3.15 Fluorexon, rozetřený s pevným chloridem draselným v poměru (1 + 100)
- 3.16 Tlumivý roztok, pH 10
Příprava: 350 ml 20 % roztoku amoniaku se smíchá s 54 g chloridu amonného (3.8) a doplní se převařenou vodou na 1000 ml
- 3.17 Eriochromčerní T, rozetřená s pevným chloridem draselným v poměru (1 + 100)
- 3.18 Dusičnan sodný, pevný

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Vodní nebo písková lázeň
- 4.2 Sušárna elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C
- 4.3 Muflová pec, elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C
- 4.4 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event Pt-Ir popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

5. Postup

5.1 Stanovení oxidu křemičitého

Do kádinky o objemu 600 ml se naváží asi 1 g zkušební vzorku s přesností 0,001 g, zakryje se hodinovým sklem a pozvolna se přidává 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a opatrně se povaří 10 minut na pískové lázni (4.1). Po mírném ochlazení se přidá 1 ml kyseliny dusičné (3.2) a opět se 5 minut povaří. Objem roztoku se doplní asi na 150 ml, zahřeje se k varu a po ochlazení se zfiltruje hustým filtrem (filtrát A).

Filtr z nerozpuštěným zbytkem se vysuší a spálí ve spalovací misce (4.4). Po vychladnutí se zpopelněný zbytek vytaví s 5 g uhličitánu sodného (3.3) za přidání 0,1 g dusičnanu sodného (3.18). Během tavení se obsah kelímku několikrát promíchá krouživým pohybem. Po skončení tavení se obsah kelímku nechá vychladnout a tavenina se vylouží horkou vodou v kádince. Po rozpouštění taveniny se kelímek vyjme a opláchne teplou vodou do kádinky. Roztok z kádinky se spojí s filtrátem A, zakryje se hodinovým sklem a opatrně se přidá 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) (roztok B). Kelímek se přežhne, zbytky taveniny ulpělé na stěnách se rozpustí v kyselině chlorovodíkové (3.1) a přidají se k roztoku B. Takto získaný roztok se zahřeje, aby se vypudil oxid uhličitý a po opláchnutí hodinového skla se odpařuje na vodní nebo pískové lázni (4.1) do sucha. Odparek se ovlhčí kyselinou chlorovodíkovou (3.1) a opět se odpaří do sucha. Miska s odparkem se vloží do sušárny (4.2), kde se ponechá půl hodiny při teplotě $(110 \pm 2)^\circ\text{C}$. K odparku se ještě za tepla přidá 30 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), nechá se stát 5 až 10 minut na teplém místě, poté se přidá 100 ml horké vody a důkladně se promíchá skleněnou tyčinkou. Po desetiminutovém stání se vyloučená kyselina křemičitá odfiltruje filtrem střední hustoty a filtrát se zachycuje do podstavené kádinky. Zbytek na filtru se promyje nejprve horkou kyselinou chlorovodíkovou (3.4) a potom horkou vodou.

Protože jedním odpařením se zpravidla nevyloučí veškerá kyselina křemičitá kvantitativně, je nutno filtrát znovu odpařit do sucha. Dále se postupuje stejně jako při prvním odpařování. Pro druhou filtraci se použije hustého filtru. Oba filtry s vyloučenou kyselinou křemičitou se vloží do spalovací misky (4.4), vysuší se a spálí v muflové peci (4.3) při teplotě $(1100 \pm 25)^\circ\text{C}$ po dobu 2 hodin. Po vychladnutí v exsikátoru se kelímek zváží. Zíhání a vážení se opakuje, pokud se nedosáhne konstantní hmotnosti. Obsah kelímku se ovlhčí vodou, přidá se 0,5 ml kyseliny sírové (3.5), 15 ml kyseliny fluorovodíkové (3.6) a odkouří se na pískové lázni (4.1) do sucha. Odkouření s kyselinou sírovou a fluorovodíkovou se ještě jednou opakuje. Kelímek se zbytkem se opatrně vyžhne na kahanu a po vychladnutí v exsikátoru se zváží. Rozdíl hmotností před a po odkouřování odpovídá obsahu oxidu křemičitého.

5.1.1 Příprava zásobního roztoku

Zbytek po odkouření se vytaví se směsí 0,5 g uhličitánu sodného (3.3) a 0,1 g tetraboritanu disodného (3.7). Tavenina se rozpustí v 10 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a přidá se k filtrátu po stanovení oxidu křemičitého. Filtrát se převede do 500 ml odměrné baňky, po ochlazení se doplní vodou po rysku a promíchá. Tím se získá zásobní roztok, který se použije pro další stanovení.

5.2 Stanovení oxidů amoniakální skupiny

Ze zásobního roztoku po oddělení kyseliny křemičité se odpipetuje vhodné množství do kádinky. Zahustí se odpařováním na vodní nebo pískové lázni (4.1) na objem 100 ml a přidají se 2 g chloridu amonného (3.8). Roztok se zahřeje k varu, zoxiduje se několika kapkami kyseliny dusičné (3.9) a krátce se povaří. Ještě za tepla se srazí po kapkách roztokem amoniaku (3.10) do změny zbarvení indikátoru methylóvé červené (3.11). Přidají se 3 kapky roztoku amoniaku (3.10) navíc. Roztok se ponechá na teplém místě až se

sraženina dokonale vyloučí a usadí. Zfiltruje se filtrem střední hustoty a promyje horkým roztokem dusičnanu amonného (3.12), filtrát se jímá do kádinky (použije se při stanovení oxidu vápenatého a hořečnatého). Sraženina se přímo na filtru rozpustí 20 ml teplé kyseliny chlorovodíkové (3.1), přičemž se filtrát zachycuje do kádinky, ve které se provádělo srážení amoniakem. Filtr se důkladně promyje teplou vodou a uschová. Filtrát se opět zahustí na objem 100 ml a hydroxidy se znovu vysráží roztokem amoniaku (3.10). Sraženina hydroxidů se zfiltruje filtrem střední hustoty a důkladně promyje teplým roztokem dusičnanu amonného (3.12), až do vymizení reakce na chloridové ionty. Filtrát se jímá do stejné kádinky jako při předchozí filtraci. Filtr se sraženinou s filtrem po prvním srážení se vloží do předem vyžehnané a zvážené spalovací misky (4.4) vysuší se v sušárně (4.2), spálí a vyžehná v muflové peci (4.3) při $(1100 \pm 25)^\circ\text{C}$ do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí v exsikátoru se zváží.

Obsahuje-li vzorek malé množství oxidů amoniakální skupiny, použije se celý objem zásobního roztoku po oddělení oxidu křemičitého. Pro stanovení oxidů amoniakální skupiny, je možno použít též filtrátu po stanovení kyselinou nerozpustného podílu popele.

5.3 Stanovení oxidu vápenatého

Filtrát po stanovení oxidů amoniakální skupiny se doplní na definovaný objem a z něho se odpipetuje alikvotní podíl do vysoké kádinky o obsahu 400 ml, zředí se vodou na 200–250 ml a za míchání se rychle zalkalizuje 20 ml hydroxidu draselného (3.13), uvede se do mírného varu a po vypuzení amoniaku se ochladí. Přidá se malé množství indikátoru fluorexonu (3.15) a titruje se na černém podkladě roztokem chelatonu (3.14) právě do vymizení žlutozelené fluorescence.

5.4 Stanovení oxidu hořečnatého

Filtrát po stanovení oxidů amoniakální skupiny se doplní na definovaný objem a z něho se odpipetuje alikvotní podíl do vysoké kádinky o obsahu 400 ml, zředí se vodou na 200–250 ml a za míchání se rychle zalkalizuje asi 20 ml tlumivého roztoku (3.16) na pH 10. Z byřety se přidá stejný objem roztoku chelatonu (3.14), jaký se spotřeboval na titraci při stanovení oxidu vápenatého. Přidá se malé množství indikátoru eriochromčerní T (3.17) a titruje se roztokem chelatonu z vínově červeného zabarvení do kovově modrého.

6. Výsledek

6.1 Obsah oxidu křemičitého v g/kg (X) se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{10^3 \cdot m - m_1}{m_0}$$

kde m je hmotnost vyžehnaného surového oxidu křemičitého v g
 m_1 hmotnost vyžehnaného zbytku po odkouření v g
 m_0 hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

6.2 Obsah oxidů amoniakální skupiny v g/kg (Y) se vypočte podle vzorce:

$$Y = 10^3 \cdot \frac{m_1}{m_0}$$

kde m_1 je hmotnost vyžehnaných oxidů v g
 m_0 hmotnost alikvotního podílu navážky zkušebního vzorku v g

6.3 Obsah oxidu vápenatého (Z) v g/kg se vypočte podle vzorce:

$$Z = \frac{56,08 \cdot C \cdot V \cdot V_2}{m \cdot V_3}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 v ml
 C přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu 3 v mol/l
 V_2 objem zásobního roztoku v ml
 V_3 objem zásobního roztoku, pipetovaný ke stanovení v ml
 m hmotnost alikvotního podílu navážky zkušebního vzorku v g

6.4 Obsah oxidu hořečnatého (U) v g/kg se vypočte podle vzorce:

$$U = \frac{40,304 \cdot C \cdot V_2 \cdot (V_1 - V)}{m \cdot V_3}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 podle bodu 5.3 v ml
 V_1 spotřeba odměrného roztoku chelatonu 3 podle bodu 5.4 v ml
 C přesná koncentrace odměrného roztoku chelatonu 3 v mol/l
 V_2 objem zásobního roztoku v ml
 V_3 objem zásobního roztoku, pipetovaný ke stanovení v ml
 m hmotnost alikvotního podílu navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou sobě navzájem provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky nebo desetiny g/kg.

7. Opakovatelnost

7.1 Opakovatelnost pro stanovení oxidu křemičitého

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 2 g/kg.

7.2 Opakovatelnost pro stanovení oxidů amoniakální skupiny

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 10 g/kg	0,7 g/kg
od 10,1 do 25 g/kg	1,0 g/kg
od 25,1 do 50 g/kg	1,5 g/kg
od 50,1 do 100 g/kg	2,5 g/kg
nad 100 g/kg	4,0 g/kg

7.3 Opakovatelnost pro stanovení oxidu vápenatého

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 4,5 g/kg.

7.4 Opakovatelnost pro stanovení oxidu hořečnatého

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu

do 10 g/kg	1,5 g/kg
nad 10 g/kg	3 g/kg

7.9 Stanovení celkového obsahu síry

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení celkového obsahu síry v krmivech. Je vhodná pro všechny obsahy síry v krmivech i krmných směsích.

2. Princip

Síra se stanoví vázkově po zpopelnění vzorku s přidavkem dusičnanu hořečnatého a vysrážením jako síran barnatý z chloridového výluhu popele.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)
- 3.2 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$
- 3.3 Amoniak ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$), zředěný (1 + 4)
- 3.4 Chlorid barnatý, roztok 100 g/l
- 3.5 Indikátor acidobázický — Fenolová červen
- Příprava: 0,1 g indikátoru se rozpustí v 50 ml ethylalkoholu za slabého zahřívání a roztok se doplní vodou na 100 ml.
- 3.6 Dusičnan hořečnatý heptahydrát ($\text{Mg}_2\text{NO}_3 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$), roztok ethanolický
- Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 360,0 g dusičnanu hořečnatého, rozpustí se v ethylalkoholu a doplní se jím po rysku a promíchá.
- 3.7 Dusičnan amonný (NH_4NO_3), pevný

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Miska odpařovací porcelánová na 100 ml
- 4.2 Pec muflová elektrická s termostatem, možností odvětrávání a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 600 °C.
- 4.3 Sušárna laboratorní elektrická, s možností odvětrávání, automatickou regulací teploty a teploměrem pro rozsah teplot nejméně do 120 °C.
- 4.4 Kahan plynový s regulací plamene nebo topná deska elektrická
- 4.5 Miska spalovací z platiny nebo ze slitiny Pt-Au event. Pt-IR popř. jiného vhodného materiálu odolného podmínkám metody stanovení a nepodléhající v těchto podmínkách změnám.

5. Postup

Do porcelánové odpařovací misky (4.1) se odváží asi 1 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 10 ml roztoku dusičnanu hořečnatého (3.6) a miska se na 10 minut odstaví. Potom se obsah misky vysuší v sušárně (4.3) při 120 °C a zpopelní v muflové peci (4.2) při teplotě (450 ± 25) °C po dobu 4 hod (poznámka 8.1).

Popel se ovlhčí vodou, přidá 6 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (3.1), výluh se krátce povaří a filtruje se horkou středně hustým filtrem do kádinky 400 ml. Promyje se asi třikrát horkou vodou, filtrát se několik minut povaří, zneutralizuje roztokem amoniaku (3.3) na indikátor fenolovou červen (3.5) do změny zabarvení a potom upraví vodou na objem 200 ml. Tento roztok se zahřeje k varu, přidá se 1 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2), a najednou 30 ml horkého roztoku chloridu barnatého (3.4) (poznámka 8.2).

Po vysrážení se roztok se sraženinou opět na několik minut zahřeje a potom se ponechá stát po několik hodin, nejlépe do druhého dne. Sraženina se filtruje přes bezpopelný hustý filtr (poznámka 8.3) a promývá horkou vodou až již nový přírůstek filtrátu nedává

pozitivní reakci na chloridy. Filtr se sraženinou se vysuší a spálí ve spalovací misce, předem vyžehané a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně na 0,001 g, při teplotě (550 ± 25) °C v muflové peci (4.2). Po spálení a ochlazení v exsikátoru se miska se sraženinou zváží se stejnou přesností.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah síry v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce

$$X = \frac{137,4 \cdot m}{m_0} \quad (\text{poznámka 8.4})$$

kde m je hmotnost vyvážky v g
 m_0 hmotnost navážky zkušební vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na 0,1 g/kg pro obsahy do 30 g/kg a na celé jednotky g/kg pro obsahy nad 30 g/kg síry.

7. Opakovatelnost

Něbyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Pokud se získá šedý vyžeháný zbytek, přidá se po ochlazení ke zbytku krystalek dusičnanu amonného a provede se přezhánání při uvedené teplotě.

8.2 Při obsahu síry do 10 g/kg, postačuje pro vysrážení 30 ml roztoku chloridu barnatého.

8.3 Při filtraci se doporučuje přidat předem rozvařenou drť bezpopelného filtračního papíru.

8.4 Uvedený vzorec platí pro výpočet obsahu síry, vyjádřeného v elementární formě (S). Pro jiná vyjádření platí dále uvedené přepočty: — jako $\text{SO}_2 \cdot X \cdot 1,998$
— jako $\text{SO}_3 \cdot X \cdot 2,498$
— jako $\text{SO}_4 \cdot X \cdot 2,997$

kde X je obsah síry v g/kg.

8.1 Stanovení obsahu mědi, železa, manganu a zinku

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení mědi, železa, manganu a zinku v krmivech a premixech. Uvedenými metodami lze stanovit všechny formy uvedených prvků.

2. Princip

Měď, železo, mangan a zinek se stanoví v krmivech po zpopelnění, rozpuštěním popele vzorku v kyselině chlorovodíkové (minerální premixy přímým rozpouštěním v kyselině chlorovodíkové) a měřením chloridového výluhu metodou atomové absorpční spektrometrie.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 3 \text{ mol/l}$
- 3.2 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 0,3 \text{ mol/l}$
- 3.3 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), zředěná (1 + 20)
- 3.4 Kyselina chlorovodíková ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$), roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$
- 3.5 Acetylen, (poznámka 8.1)
- 3.6 Standardní roztoky mědi, železa, manganu a zinku
Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží pro
- 3.6.1 měď: 3,929 g pentahydrátu síranu měďnatého ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$)
- 3.6.2 železo: 8,635 g dodekahydrátu síranu železitoamonného ($\text{NH}_4\text{FeSO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)
- 3.6.3 mangan: 4,388 g pentahydrátu síranu manganatého ($\text{MnSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ nebo 4,060 g tetrahydrátu síranu manganatého ($\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)
- 3.6.4 zinek: 4,398 g heptahydrátu síranu zinečnatého ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) nebo 1,000 g granulovaného zinku

Navážené soli (kovy) se rozpustí v roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2) a každá z baněk se doplní tímto roztokem po rysku.

Tyto standardní roztoky obsahují teoreticky 1,0 mg příslušného prvku v 1 ml. Skutečný obsah prvků ve standardních roztocích se stanoví chelatometricky.

Roztoky se uchovávají v plastických nádobách.

Jako základní standardní roztoky je možno použít i komerční roztoky s deklarovanou (ověřenou) koncentrací prvku.

- 3.7 Pracovní standardní roztok mědi
Příprava: Standardní roztok mědi se 10 krát zředí kyselinou chlorovodíkovou (3.2)

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Spektrometr absorpční atomový včetně příslušenství
- 4.2 Lázeň vodní
- 4.3 Miska platinová, křemenná či porcelánová (případně opatřené víčky)
- 4.4 Pec muflová s termostatem

5. Postup

5.1 Příprava kalibračních roztoků (poznámka 8.2)

Do sady odměrných baněk na 1 000 ml se diferencovaně odpipetuje:

5.1.1 pro měď

2,5; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 a 25,0 ml pracovního standardního roztoku mědi (3.7), doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 0,25 mg až 2,5 mg mědi v 1000 ml.

5.1.2 pro železo

2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku železa (3.6.2), doplní roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) po rysku a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 2 až 10 mg železa v 1000 ml.

5.1.3 pro mangan

2,0; 4,0; 6,0; 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku manganu (3.6.3), doplní po rysku roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 2 až 10 mg manganu v 1000 ml.

5.1.4 pro zinek

0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 ml standardního roztoku zinku (3.6.4), doplní po rysku roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá. Tyto kalibrační roztoky obsahují 0,5 mg až 2,5 mg zinku v 1000 ml.

5.1.5 Sestrojení kalibračních grafů

Kalibrační roztoky (roztoky zkoušeného vzorku) se proměří na atomovém absorpčním spektrometru (4.1) po nastavení příslušných parametrů podle typu a návodu použitého přístroje za použití plamene acetylénu (3.5) – vzduch. Roztokem s nulovým obsahem stanovovaného prvku (3.2) se přístroj nastaví na nulovou hodnotu a pro jednotlivé prvky se použijí následující vlnové délky:

pro měď	324,8 nm
železo	248,3 nm
mangan	279,5 nm
zinek	213,8 nm

Ze získaných hodnot absorpčních a jim odpovídajících koncentrací se sestaví příslušné kalibrační grafy.

5.2 Vlastní provedení v krmivech

5.2.1 Do spalovací misky (4.3) se odváží, podle předpokládaného obsahu prvků, asi 5 g až 20 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, zpopelní za dostatečného přístupu vzduchu v muflové peci (4.4) při teplotě $(550 \pm 20)^\circ\text{C}$ tak, jak je uvedeno v Příloze 9, část 6.1 Stanovení popele.

5.2.2 Získaný popel se po vychladnutí zvlhčí vodou, vylouží 30 ml roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.1), digeruje na vodní lázni (4.2) (vroucí) po dobu 30 minut a pak filtruje hustým filtrem do podložené odměrné baňky na 200 ml. Zbytek na filtru se důkladně promyje zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (3.3).

5.2.3 Filtr se zbytkem se vysuší, zpopelní za výše uvedených podmínek (asi po dobu 30 minut), obsah spalovací misky se po vychladnutí vylouží 20 ml teplého roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a výluh se filtruje hustým filtrem do téže odměrné baňky. Zbytek na filtru se promyje 5krát teplou zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (3.3). Obsah odměrné baňky se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou po rysku a promíchá. Podle očekávaného obsahu jednotlivých prvků se tento výluh měří buď přímo, nebo po potřebném naředění pomocí roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.2). Dále se postupuje podle 5.1.5..

5.2.4 Naměřené koncentrace příslušného prvku se zjistí z příslušného kalibračního grafu.

5.3 Vlastní provedení v minerálních premixech

Do kádinky vhodného obsahu se odváží 5 g až 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, přidá se 30 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.1) a dále se postupuje podle 5.2.2, 5.2.3 a 5.2.4.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah příslušného prvku (mědi, železa, manganu a zinku) v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce

$$X = \frac{200 \cdot C \cdot F}{m_0}$$

kde C je koncentrace příslušného prvku zjištěná z příslušného kalibračního grafu v mg/l

m_0 hmotnost navážky zkušebního vzorku v g
F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Acetylén ve směsi se vzduchem je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Uvedené koncentrace kalibračních roztoků jsou jako příklad. Konkrétní řešení závisí na použitém přístroji, jeho citlivosti a pod. Při jiných než uvedených koncentracích je nutno upravit výpočtový vzorec.

8.2 Stanovení obsahu mědi, železa, manganu, a zinku včetně obsahu vápníku, hořčíku, draslíku a sodíku

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení mikroprvků železa, mědi, manganu, zinku a makroprvků vápníku, sodíku, draslíku a hořčíku v krmivech.

2. Princip

Vzorek se převede do roztoku kyselinou chlorovodíkovou, pokud je třeba po zpopelnění při $(550 \pm 10)^\circ\text{C}$, případně po odstranění kyslíčnicku křemičitého a uvedené prvky se stanoví, po vhodném naředění, metodou atomové absorpční spektrometrie.

3. Chemikálie

Úvodní poznámky:

Pro přípravu činidel a analytických roztoků se používá voda, která neobsahuje prvky, které jsou stanovovány. Taková voda se získá buď dvojí destilací v borosilikátové nebo křemenné destilační aparatuře nebo dvojitým průchodem přes ionexovou kolonu.

Chemikálie musí minimálně p.a. čistoty a musí být ověřeno, že neobsahují stanovované prvky slepým pokusem. Pokud je třeba musí být použité chemikálie přečištěny.

Kromě standardů uvedených dále mohou být použity obchodní standardy, pokud mají zaručený obsah (atest) a před použitím byly zkontrolovány

3.1 Acetylén (poznámka 8.1)

3.2 Kyselina chlorovodíková (HCl), koncentrovaná ($\rho = 1,17 \text{ g/cm}^3$)

3.3 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 6 \text{ mol/l}$

3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0,3 \text{ mol/l}$

3.5 Dusičnan lanthanitý hexahydrát $[\text{La}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}]$, roztok 133 g/l

Mohou být použity i jiné soli lanthanu, pokud výsledná koncentrace lanthanu v roztoku bude stejná

3.6 Chlorid cesný (CsCl), roztok 100 g/l

Mohou být použity i jiné soli cesia, pokud výsledná koncentrace cesia v roztoku bude stejná.

3.7 Standardní roztoky mědi, železa, manganu a zinku

Příprava: Do odměrné baňky 1000 ml se odměří 100 ml vody, 125 ml kyseliny chlorovodíkové (3.2) a promíchá. Do stejné baňky se naváží:

392,9 mg pentahydrátu síranu měďnatého

$(\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O})$,

702,2 mg hexahydrátu síranu železnatoamonného

$[(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}]$

307,7 mg monohydrátu síranu manganatého

$(\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$

439,8 mg heptahydrátu síranu zinečnatého

$(\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$.

Po rozpuštění solí se baňka doplní vodou po rysku a roztok se promíchá.

Standardní roztok obsahuje 100 μg uvedených prvků v 1 ml.

K přípravě standardního roztoku se mohou použít také obchodní standardy s deklarovanou (ověřenou) koncentrací prvku.

3.8 Pracovní standardní roztoky mědi, železa, manganu a zinku

Příprava: Do odměrné na 100 ml se odpipetuje 20 ml standardního roztoku (3.7), doplní se vodou po rysku a promíchá.

Pracovní standardní roztok obsahuje 20 μg uvedených prvků v 1 ml.

Pracovní standardní roztoky se připravují vždy čerstvě

3.9 Standardní roztoky vápníku, draslíku, hořčíku a sodíku

Příprava: Do odměrné baňky 1000 ml se naváží:

1,907 g chloridu draselného (KCl)

2,028 g heptahydrátu síranu hořečnatého $(\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O})$

2,542 g chloridu sodného (NaCl)

Do kádinky se naváží 2,497 g uhlíkatu vápenatého (CaCO_3) , přidá se pomalu 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a po skončení vývoje kyslíčnicku uhlíčitého se roztok převaří 5 minut na topné desce. Po vychlazení se roztok převede do odměrné baňky s naváženými solemi draslíku, hořčíku a sodíku. Až se soli rozpustí, se baňka doplní kyselinou chlorovodíkovou (3.4) po rysku a roztok se promíchá.

Standardní roztok obsahuje 1 mg vápníku, draslíku a sodíku a 200 μg hořčíku v 1 ml. K přípravě standardního roztoku se mohou použít také obchodní standardy s deklarovanou (ověřenou) koncentrací prvku.

3.10 Pracovní standardní roztoky vápnicku, draslíku, hořčíku a sodíku
Příprava: Do odměrné na 250 ml se odpipetuje 25 ml standardního roztoku (3.9), doplní se kyselinou chlorovodíkovou (3.4) po rysku a promíchá.

Pracovní standardní roztok obsahuje 100 g vápnicku, draslíku a sodíku a 20 g hořčíku v 1 ml.

Pracovní standardní roztoky jsou stále jeden týden a skladují se v polyetylenových lahvích.

3.11 Lanthanocesiový slepý roztok

Příprava: Do odměrné baňky 100 ml se odměří 5 ml roztoku dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml roztoku chloridu cesného, 5 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.3), doplní se vodou po rysku a promíchá.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Veškeré odměrné nádoby (včetně pipet), které se použije při přípravě kalibračních roztoků se musí před použitím opláchnout kyselinou chlorovodíkovou (3.4)

4.2 Platinové, křemíkové nebo porcelánové spalovací kelímky (horní průměr 4–6 cm, spodní průměr 2–2,5 cm, výška asi 5 cm) předem vyvařené v kyselině chlorovodíkové (3.3)

4.3 Elektrická muflová pec s automatickou kontrolou teploty a záznamem

4.4 Skleněné nádoby, borosilikátové, před použitím vyvařené v kyselině chlorovodíkové (3.3)

4.5 Elektrická topná deska nebo plynový kahan

4.6 Vodní lázeň s možností regulace $95 \pm 2^\circ\text{C}$

4.7 Atomový absorpční spektrometr, vhodný pro měření při uvedených vlnových délkách, vybavený plamenem vzduch-acetylen a možností korekce pozadí

5. Postup

5.1 Zjištění přítomnosti organické hmoty

Lžička se vzorkem se vloží do plamene – pokud dojde k táhnutí, vzorek organickou hmotou neobsahuje, pokud dojde ke změně barvy a táhnutí se objeví, vzorek organickou hmotou obsahuje.

5.2 Spalování a příprava roztoku pro analýzu

Do spalovacího kelímku (4.2) se podle předpokládaného obsahu prvků naváží 1–5 g vzorku, s přesností 0,001 g.

Pokud vzorek obsahuje organickou hmotu postupuje se podle odstavce 5.2.1.

Pokud vzorek neobsahuje téměř žádnou nebo žádnou organickou hmotu, postupuje se podle odstavce 5.2.2.

5.2.1 Kelímek se vzorkem se zahřívá na topné desce nebo v plameni plynového kahanu až do úplného zuhelnatění. Během zahřívání je nutno zabránit vzplanutí vzorku. Potom se kelímek vloží do muflové pece (4.3), předehřáté 15 minut na teplotu $(550 \pm 10)^\circ\text{C}$ a při této teplotě se ponechá 3 hodiny. Po vychladnutí se obsah kelímku ovlhčí 2 ml vody. Pokud jsou přítomny uhlíkaté částice, vysuší se kelímek na vodní lázni (4.6) a spaluje se další 2 hodiny při teplotě $(550 \pm 10)^\circ\text{C}$ v muflové peci (4.3). Znovu se nechá vychladnout a přidají se 2 ml vody.

5.2.2 K obsahu kelímku se přidá pomalu a opatrně (možný vývoj kysličníku uhličitý) 10 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3). Potom se za stálého míchání přidává po kapkách další kyselina chlorovodíková (3.3), dokud neustane pění. Roztok se občasného míchání zahřívá až do odpaření téměř do sucha. Zbytek se rozpustí v 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a vzniklý roztok se kvantitativně převede do odměrné baňky o objemu 100 ml. Po vychladnutí se doplní vodou po rysku.

5.3. Slepý pokus

Pro každou měřenou sérii se připraví slepý pokus (roztok) tak, že se provedou operace 5.2, 5.2.1 a 5.2.2 s vyloučením zkušebního vzorku.

5.4 Spektrometrické stanovení mědi, železa, manganu a zinku

5.4.1 Podmínky měření

Atomový absorpční spektrometr se nastaví podle instrukcí výrobce, optimalizuje se pro měření acetylen-vzduch. Měření se provádí při následujících vlnových délkách:

Měď (Cu): 324,8 nm

Železo (Fe): 248,3 nm

Mangan (Mn): 279,5 nm

Zinek (Zn): 213,8 nm

5.4.2 Příprava kalibračních křivek

Z pracovního standardního roztoku (3.8) se připraví naředěním kyselinou chlorovodíkovou (3.4) série kalibračních roztoků s odpovídající koncentrací.

Změří se absorbance kalibračních roztoků proti kyselině chlorovodíkové (3.4) a sestrojí se kalibrační křivka naměřených hodnot proti odpovídajícímu obsahu mědi, železa, manganu a zinku.

5.4.3 Měření zkoušeného roztoku

Absorbance zkoušeného roztoku se měří za stejných podmínek jako absorbance kalibračních roztoků proti slepému pokusu resp. kyselině chlorovodíkové (3.4). Pokud je třeba ředit se zkoušené roztoky kyselinou chlorovodíkovou (3.4), aby se získala absorbance ležící v lineární části kalibrační křivky.

5.5 Spektrometrické stanovení vápnicku, hořčíku, draslíku a sodíku

5.5.1 Podmínky měření

Atomový absorpční spektrometr se nastaví podle instrukcí výrobce, optimalizuje se pro měření acetylen-vzduch. Měření se provádí při následujících vlnových délkách:

Vápník (Ca): 422,6 nm

Hořčík (Mg): 285,2 nm

Draslík (K): 766,5 nm

Sodík (Na): 589,6 nm

5.5.2 Příprava kalibračních křivek

Do odměrných baňek na 100 ml se odpipetuje 5 ml dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml chloridu cesného (3.6), 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a vhodný objem pracovního standardního roztoku (3.10) a doplní se po rysku.

Změří se absorbance kalibračních roztoků proti lanthanocesiovému slepému roztoku (3.11) a sestrojí se kalibrační křivka naměřených hodnot proti odpovídajícímu obsahu vápnicku, hořčíku, draslíku a sodíku.

5.5.3 Měření zkoušeného roztoku

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje 5 ml dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml chloridu cesného (3.6), 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a vhodný objem zkoušeného roztoku a doplní se po rysku.

Také ke slepému pokusu se přidává 5 ml dusičnanu lanthanitého (3.5), 5 ml chloridu cesného (3.6), 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.3) a doplní se na 100 ml.

Absorbance naředěného zkoušeného roztoku se měří za stejných podmínek jako absorbance naředěných kalibračních roztoků proti slepému pokusu, resp. lanthanesiovému slepému roztoku (3.11). Pokud je třeba ředit se zkoušené roztoky lanthanesiovým slepým roztokem (3.11), aby se získala absorbance ležící v lineární části kalibrační křivky.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah jednotlivých prvků v mg/kg nebo g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot F}{m}$$

kde C je koncentrace příslušného prvku, odečtená z kalibračního grafu v mg/l nebo g/l

F faktor ředění

m hmotnost návnásky zkoušeného vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se při obsahu:

10–100 mg/kg s přesností na 1 mg

100 mg/kg – 1 g/kg s přesností na 10 mg

1 g/kg – 10 g/kg s přesností na 100 mg

10 g/kg – 100 g/kg s přesností na 1 g.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit:

pro vápník, železo, draslík, hořčík a mangan $0,11 \cdot X$ mg/kg

pro měď, sodík a zinek $0,15 \cdot X$ mg/kg

kde X je výsledek stanovení.

Uvedená opakovatelnost platí pro obsahy:

vápníku od 1 000–300 000 mg/kg

mědi 15–15 000 mg/kg

železo 2 000–30 000 mg/kg

hořčík 1 000–110 000 mg/kg

mangan 15–15 000 mg/kg

sodík 2 000–250 000 mg/kg

zinek 25–15 000 mg/kg

8. Poznámky

8.1 Acetylen je nebezpečná hořlavina, proto je třeba při jakékoli manipulaci s ním dodržovat bezpečnostní pravidla.

9.1 Stanovení volné, vázané a celkové kyselosti vodního výluhu

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení volné, vázané i celkové kyselosti vodního výluhu. Je použitelná pro všechna krmiva.

2. Princip

Volná kyselost vodního výluhu se stanoví přímo alkalimetrickou titrací vodního výluhu vzorku do hodnoty pH = 8,5 nebo na indikátor fenolftalein.

Vázaná kyselost vodního výluhu se stanoví po uvolnění vazeb vnitřní neutralizace formaldehydem alkalimetrickou titrací do hodnoty pH = 8,5 nebo na indikátor fenolftalein.

Celková kyselost vodního výluhu se určí součtem výsledků volné a vázané kyselosti vodního výluhu.

3. Chemikálie

3.1 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1$ mol/l nebo

3.2 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1$ mol/l (poznámka 8.1)

3.3 Formaldehyd, roztok 10 %

3.4 Thymol, pevný

3.5 Indikátor fenolftalein 0,1 % v ethylalkoholu

3.6 Voda destilovaná, zneutralizovaná na pH = 8,5 nebo na indikátor fenolftalein

4. Přístroje a pomůcky

4.1 pH metr vhodné konstrukce s příslušenstvím (elektrody)

4.2 Míchačka elektromagnetická s míchadlem

5. Postup

5.1 Volná kyselost

Do kádinky na 400 ml se odváží přesně 10,00 g zkoušeného vzorku, pipetou přidá přesně 200 ml vody (3.6), obsah kádinky se promíchá a nechá volně vyluhovat při laboratorní teplotě po dobu 30 minut. Během této doby se obsah kádinky nejméně 3krát promíchá. Pak se obsah kádinky filtruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky (poznámka 8.2), přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Z tohoto filtrátu (supernatantu), který je možno konzervovat zrnkem thymolu (3.4), se odpipetuje 100 ml do kádinky na 250 ml, kádinka se umístí na elektromagnetickou míchačku (4.2), vloží míchadlo a za studena se titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.1) (poznámka 8.1) do pH = 8,5 nebo do právě vzniklého červenofialového zabarvení indikátoru fenolftaleinu (3.5), které vydrží alespoň 30 sekund (spotřeba V_1).

5.2 Vázaná kyselost

Ke ztitrovanému roztoku, podle 5.1, se přidá 5 ml roztoku formaldehydu (3.3), těsně před použitím zneutralizovaného na pH = 8,5 nebo na indikátor fenolftalein, přičemž pH titrovaného roztoku se sníží resp. dojde k odbarvení roztoku.

Z opět naplněné byřety se titruje odměrným roztokem hydroxid draselného (3.1) (poznámka 8.1) do hodnoty pH = 8,5 nebo do právě vzniklého červenofialového zbarvení indikátoru, které vydrží alespoň 30 sekund (spotřeba V_2).

Obě stanovení musí být provedena během 30 minut, při konzervaci výluhu thymolem tentýž den.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Volná kyselost vodního výluhu v mg KOH/100 g vzorku (X) nebo v mmol/kg vzorku (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{5611 \cdot V_1 \cdot C}{m}$$

$$Y = \frac{1000 \cdot V_1 \cdot C}{m}$$

6.2 Vázaná kyselost vodního výluhu v mg KOH/100 g vzorku (X_1) nebo v mmol/kg vzorku (Y_1) se vypočítá podle vzorce:

$$X_1 = \frac{5611 \cdot V_2 \cdot C}{m}$$

$$Y_1 = \frac{1000 \cdot V_2 \cdot C}{m}$$

6.3 Celková kyselost vodního výluhu v mg KOH/100 g (Z) nebo v mmol/kg vzorku (Z_1) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = X + X_1$$

$$Z_1 = Y + Y_1$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku hydroxid draselného (sodného) při postupu podle 5.1 v ml
 V_2 spotřeba odměrného roztoku hydroxid draselného (sodného) při postupu podle 5.2 v ml
 T přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxid draselného (sodného) mol/l
 m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g (podle přesně dodržené popsané metodiky je to polovina navážky zkušební vzorku)

Přepočet:

$$\text{mg KOH/100 g vzorku} = \text{mmol/kg vzorku} \cdot 5,611$$

$$\text{mmol/kg vzorku} = \frac{\text{mg KOH/100 g vzorku}}{5,611}$$

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se na celé jednotky.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit pro všechny obsahy 15 % relat.

8. Poznámky

8.1 Pro titraci je možno použít i odměrného roztoku hydroxid sodného, avšak vyjádření je vždy v mg KOH, resp. v mmol/kg

8.2 Pro obtížně filtrovatelná krmiva nebo krmiva, jejichž částice se nezachytí filtrací, je možno oddělit výluh odstředěním.

9.2 Stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyselosti vodního výluhu v mléčných krmných směsích. Je použitelná pro všechny druhy i obsahy kyselosti.

2. Princip

Kyselost vodního výluhu se stanoví ve vodním výluhu vzorku přímo alkalimetrickou titrací na indikátor fenolftalein pomocí určení bodu ekvivalence srovnávacím roztokem kobaltnaté soli.

3. Chemikálie

3.1 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.2 Síran kobaltnatý heptahydrát ($\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), srovnávací roztok 50 g/l

3.3 Indikátor fenolftalein, roztok 20 g/l ethylalkoholu 96%

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Třepačka vhodné konstrukce

4.2 Mikrobýreta s dělením po 0,05 ml

5. Postup

Do 200 ml odměrné baňky (se širokým hrdlem) se odváží asi 5 g zkušební vzorku s přesností nejméně na 0,001 g, vzorek se nejprve rozmíchá s malým množstvím vody tak, aby se netvořily hrudky, přidá se asi 100 ml vody a umístí na třepačku (4.1) (poznámka 8.1), po uzátkování baňky se protřepává 10 minut, potom se sejme, doplní vodou po rysku a promíchá. Obsah se filtruje (poznámka 8.2) suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Z tohoto filtrátu se odpipetuje do dvou titračních baněk po 50 ml, do jedné z nich se přidá 1 ml roztoku síranu kobaltnatého (3.2) (srovnávací roztok), do druhé 2 ml indikátoru fenolftaleinu (3.3) a ihned se titruje odměrným roztokem hydroxid sodného (3.1) do právě vzniklého zbarvení, jaké má srovnávací roztok, které potrvá alespoň 30 sekund.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Kyselost vodního výluhu v mmol/kg (X) nebo ve stupních °SH (Y) (poznámka 8.3) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot V \cdot C}{m}$$

$$Y = \frac{1000 \cdot V \cdot C}{2,5 \cdot m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxid sodného v ml
 C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxid sodného v mol/l;
 m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušební vzorku v g

Přepočet: °SH = 2,5 mmol/l

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celá čísla.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Výluh je možné připravit bez vytřepávání na třepačce, jen s občasným zamícháním, ale v tomto případě po dobu 30 minut.

8.2 Filtrace potřebného množství by neměla trvat déle než 10 minut. Jinými způsoby oddělení pevného podílu je nechat tento usadit nebo jej odstředit a pipetovat pečlivě potřebný podíl, aby se nezvýšila hladina.

8.3 V některých současných normách nebo předpisech se uvádí namísto jednotky „SH“ jednotka „2,5 mmol/kg“, která je zcela ekvivalentní.

10.1 Stanovení alkaloidů v lupině

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu alkaloidů v semenech lupiny.

2. Princip

Alkaloidy se vyluhují ze vzorku směsí diethyletheru a chloroformu, extrahují se kyselinou chlorovodíkovou a potom se vysráží kyselinou silikowolframovou. Sraženina se zpopelní a alkaloidy se stanoví jako zbytek po spálení vážkově.

3. Chemikálie

3.1 Diethylether (poznámka 8.1)

3.2 Chloroform

3.3 Hydroxid sodný NaOH, roztok $c(\text{NaOH}) \approx 4 \text{ mol/l}$

3.4 Kyselina chlorovodíková, roztok $c(\text{HCl}) = 0.3 \text{ mol/l}$

3.5 Chlorid sodný, pevný

3.6 Kyselina silikowolframová $\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \cdot x \text{H}_2\text{O}$, roztok 100 g/l

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mechanická míchačka

4.2 Platinové, křemenné, nebo porcelánové spalovací misky

4.3 Elektrická, muflová pec

5. Postup

Odváží se asi 15 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,005 g do dělicí nálevky o obsahu 200 ml, přidá se přesně 100 ml diethyletheru (3.1), 50 ml chloroformu (3.2) a potom pomocí pipety

10 ml roztoku hydroxidu sodného (3.3). Důkladně se protřepe, aby se zabránilo shluknutí vzorku. Po několikerém protřepání se dělicí nálevka nechá stát přes noc. Pokud není supernatant zcela čirý, přidá se několik kapek vody. Chloroform-diethyletherová vrstva se oddělí a zfiltruje se suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky. Z filtrátu se odpipetuje 50 ml do 150 ml dělicí nálevky a přidá se 50 ml diethyletheru (3.1). Extrahuje se 3 x 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.4), po každé extrakci a rozdělení fází se odpustí spodní kyselá vrstva do téže 250 ml kádinky. Ze spojeného kyselého extraktu se odstraní zbytky diethyletheru a chloroformu mírným zahřátím. Přidá se přibližně 1 g chloridu sodného (3.5) a po vychladnutí roztoku se alkaloidy vysráží roztokem kyseliny silikowolframové (3.6). Kádinka se umístí na míchačku (4.1) a míchá se 30 minut. Potom se nechá sraženina přes noc usadit. Zfiltruje se přes bezpopelný filtrační papír, sraženina na filtru se promyje dvakrát 10 ml a dvakrát 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.4). Filtr se sraženinou se umístí se spalovací misky (4.2), předem vyžháné a po ochlazení v exsikátoru zvážené s přesností nejméně 0,001 g a spaluje se v muflové peci (4.3) při 900 °C. Po spálení se miska se zbytkem nechá vychladnout v exsikátoru a zváží se stejnou přesností.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah alkaloidů v lupině v g/kg vzorku (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{2 \cdot m}{m_0}$$

kde m je hmotnost popele v g

m_0 hmotnost alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Diethylether je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

10.2 Stanovení kyseliny kyanovodíkové

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny kyanovodíkové volné i vázané v glukosinolátech v krmivech, zejména v lněném semeni, maniokové mouce a v některých druzích bobů.

2. Princip

Vzorek se rozmíchá ve vodě, kyselina kyanovodíková se uvolní enzymaticky a vodní parou se předestiluje do okyseleného roztoku

dusičnanu stříbrného. Vzniklý kyanid stříbrný se oddělí filtrací a zbylý dusičnan stříbrný se stanoví titračně thiokyanatanem amonným.

3. Chemikálie

3.1 Suspense sladkých mandlí

Příprava: 20 oloupaných mandlí se rozdrtí a rozmíchá ve 100 ml vody 37–40 °C teplé. Proveďte se ověření, že 10 ml suspence neobsahuje žádnou kyselinu kyanovodíkovou, buď pomocí pikrátového papírku nebo se provede slepý pokus podle závěru odstavce 5.

3.2 Octan sodný, roztok 10% zneutralizovaný na indikátor fenolftalein

3.3 Odpěňovací emulze (např. silikonový olej)

3.4 Kyselina dusičná HNO_3 , koncentrovaná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$)

3.5 Dusičnan stříbrný, roztok $c(\text{AgNO}_3) = 0,02 \text{ mol/l}$ Příprava: 3,3978 g dusičnanu stříbrného, předem vysušeného 2 hod. při teplotě 150 °C a ochlazeného v exsikátoru, se odváží do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Thiokyanatan amonný, roztok $c(\text{NH}_4\text{SCN}) = 0,02 \text{ mol/l}$

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 1,5224 g thiokyanatanu amonného (NH_4SCN), rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 Síran železitoamonný dodekahydrát

$[\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2] \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, nasycený roztok

3.8 Amoniak ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$), roztok 10%

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Termostat s regulací teploty

4.2 Destilační přístroj na přehánění vodní parou spojený s chladičem se zahnutým připojeným kusem

4.3 Baňka destilační 1000 ml s plochým dnem s kulatou skleněnou zátkou

4.4 Olejová lázeň

5. Postup

Do destilační baňky (4.3) se naváží asi 20 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,005 g, přidá se 50 ml vody a 10 ml suspence sladkých mandlí (3.1). Baňka se zazátkuje a umístí se na 16 hodin do termostatu (4.1) vyhřátého na 38 °C. Po vyjmutí se baňka ochladí, přidá se 80 ml vody, 10 ml roztoku octanu sodného (3.2) a kapka odpěňovací emulze (3.3).

Baňka se připojí k destilačnímu přístroji (4.2) a upevní se do olejové lázně (4.4) předem vyhřáté na teplotu mírně nad 100 °C. Vydestiluje se 200–300 ml při důkladném prohánění proudem vodní páry a mírném zahřívání olejovou lázní. Destilát se jímá do 50 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) s 1 ml kyseliny dusičné (3.4) v kuželové baňce chráněné před světlem, přičemž konec chladiče musí být ponořen do jímacího roztoku.

Potom se obsah kuželové baňky převede kvantitativně do 500 ml odměrné baňky, doplní po rysku vodou, promíchá a filtruje suchým filtrem střední hustoty do suché kádinky, přičemž se první podíl filtrátu nezachycuje. (poznámka 8.1). Do titrační baňky se odpipetuje 250 ml filtrátu, přidá se asi 1 ml roztoku síranu železitoamonného (3.7) a přebytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného se stanoví titrací odměrným roztokem thiokyanatanu amonného (3.6).

Slepý pokus může být proveden, pokud je třeba, podle stejného postupu, ale bez vlastního vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah kyseliny kyanovodíkové v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{54,06 \cdot (C_1 \cdot V_1 - C_2 \cdot V_2)}{m}$$

kde V_1 je alikvotní objem odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v ml

C_1 přesná koncentrace odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v mol/l

C_2 přesná koncentrace odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

1 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) odpovídá 0,54 mg kyseliny kyanovodíkové (HCN)

Od obsahu kyseliny kyanovodíkové ve vzorku se musí odečíst hodnota slepého pokusu (pokud byl prováděn).

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Pokud vzorek obsahuje velké množství síranů (např. fazole) dochází k tvorbě nerozpustného síranu stříbrného, který je odfiltrován společně s kyanidem stříbrným a tím dochází ke ztrátě odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5).

V takovém případě se postupuje takto:

Na sraženinu na filtru se působí 50 ml roztoku amoniaku (3.8), aby se rozpustil kyanid stříbrný. Dále se filtr promyje zředěným amoniakem a ve filtrátu se stanoví obsah stříbra a přepočte se na dusičnan stříbrný (3.5).

Obsah kyseliny kyanovodíkové ve vzorku může být také stanoven titrací okyseleného amoniakálního filtrátu kyselinou dusičnou.

10.3 Stanovení hořčičného oleje (allylthiokyanát)

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 155, 12/07/71

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu hořčičného oleje ve výliscích rodu Brassica a v krmných směsích, které tyto šroty obsahují. Hořčičný olej se vyjadřuje jako allylthiokyanát, který se uvolní vodní parou.

2. Princip

Vzorek se rozmíchá ve vodě, hořčičný olej se uvolní enzymaticky, vytěsňuje se destilací s ethylalkoholem a jímá se do zředěného roztoku amoniaku. Roztok se nechá reagovat za tepla s odměrným roztokem dusičnanu stříbrného, potom se ochladí a zfiltruje. Přebytkový dusičnan stříbrný se určí zpětnou titrací thiokyanatanem amonným.

3. Chemikálie

3.1 Bílá hořčice (*Sinapis alba*)

3.2 Ethylalkohol, 95–96% (poznámka 8.1)

3.3 Odpěňovací emulze (např. silikonový olej)

3.4 Amoniak ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$), roztok 10%

3.5 Dusičnan stříbrný, odměrný roztok $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$ Příprava: 16,9873 g dusičnanu stříbrného, předem vysušeného 2 hodiny při teplotě 150°C a ochlazeného v exsikatoru, se odváží do odměrné baňky na 1 000 ml, rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.6 Thiokyanatan amonný, odměrný roztok $c(\text{NH}_4\text{SCN}) = 0,1 \text{ mol/l}$ Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 7,612 g thiokyanatanu amonného (NH_4SCN), rozpustí ve vodě, doplní vodou po rysku a promíchá.

3.7 Síran železitoamonný dodekahydrát $[\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2] \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, nasycený roztok při 20°C

3.8 Kyselina dusičná ($\rho = 1,4 \text{ g/cm}^3$), roztok 62–65%

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Baňka destilační 500 ml s plochým dnem

4.2 Destilační zařízení, spojená s chladičem a opatřená ochranou před únikem kapiček.

5. Postup

Do baňky (4.1) se naváží se asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,001 g, přidají se 2 g jemně umleté bílé hořčice (3.1) (zdroj enzymů) a 200 ml vody. Baňka se uzavře a ponechá za častého protřepávání 2 hodiny. Přidá se 40 ml ethylalkoholu (3.2), jedna kapka odpěňovací emulze (3.3), baňka se připojí k destilačnímu zařízení (4.2) a zahájí se destilace. Vydestiluje se asi 150 ml destilátu, který se jímá do 250 ml odměrné baňky, která obsahuje 20 ml roztoku amoniaku (3.4). Při destilaci je třeba dbát na to, aby konec chladiče byl ponořen do kapaliny. Po skončení destilace se přidá k amoniakálnímu destilátu 50 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) (popřípadě i více, pokud je třeba), do hrdla baňky se umístí malý trychtýřek a na vodní lázni se směs zahřívá po dobu 1 hodiny. Nechá se vychladnout, doplní se vodou po rysku, promíchá a filtruje suchým středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Do titrační baňky se odpipetuje 100 ml filtrátu, přidá 5 ml roztoku kyseliny dusičné (3.8) a asi 5 ml roztoku síranu železitoamonného (3.8). Přbytek odměrného roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) se stanoví zpětnou titrací odměrným roztokem thiokyanatanu amonného (3.6).

Současně se provádí slepý pokus za stejných podmínek s vyloučením vzorku.

6. Výsledek

Obsah hořčičného oleje (jako allylisothiokyanát) v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{49,57 \cdot (C_1 \cdot V_1 - C_2 \cdot V_2)}{m}$$

kde V_1 je alikvotní objem odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v ml

V_2 spotřeba odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v ml

C_1 přesná koncentrace odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v mol/l

C_2 přesná koncentrace odměrného roztoku thiokyanatanu amonného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

1 ml odměrného roztoku dusičnanu stříbrného = 4,956 mg allylisothiokyanatu.

Od obsahu hořčičného oleje ve vzorku se musí odečíst hodnota slepého pokusu.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Ethylalkohol je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

10.4 Stanovení theobrominu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 155, 12/07/71.

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu theobrominu v odpadech z výroby kakaa.

2. Princip

Theobromin se extrahuje chloroformem. Extrakt se odpaří do sucha, rozpustí ve vodě a nechá reagovat s roztokem dusičnanu stříbrného a uvolněná kyselina dusičná se stanoví alkalimetrickou titrací.

3. Chemikálie

3.1 Chloroform

3.2 Amoniak, koncentrovaný ($\rho = 0,91 \text{ g/cm}^3$)

3.3 Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), pevný

- 3.4 Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$
 3.5 Dusičnan stříbrný, odměrný roztok $c(\text{AgNO}_3) = 0,1 \text{ mol/l}$
 3.6 Fenolová červeň, ethanolický roztok 1%
 3.7 Petrolether, b.v. 40–60 °C (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Kuželová baňka 500 ml s plochým dnem a se zábrusovou zátokou
 4.2 Destilační přístroj na přehánění vodní parou spojený s chladičem

5. Postup

Do kuželové baňky (4.1) se naváží asi 10 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,01 g, přidá se 270 ml chloroformu (3.1) a 10 ml amoniaku (3.2) (poznámka 8.3). Baňka se uzavře a třepe důkladně 5 minut. Přidá se 12 g bezvodého síranu sodného (3.3), opět se třepe a nechá se do příštího dne usadit. Potom se obsah baňky filtruje do 500 ml kuželové baňky a zbytek na filtru se promyje 100 ml chloroformu (3.1). Rozpouštědlo se oddestiluje a poslední zbytky se odpaří na vodní lázni. Extrakt se znovu rozpustí v 50 ml vody a zahřeje k varu. Vychladí se, zneutralizuje roztokem hydroxidu sodného (3.4) na fenolovou červeň (3.6). Dále se přidá 20 ml roztoku dusičnanu stříbrného (3.5) a uvolněná kyselina dusičná se titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného (3.4) do změny barvy indikátoru (pH 7,4).

6. Výpočet

Obsah theobrominu v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{180 \cdot C \cdot V}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného v ml
 C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu sodného v mol/l
 m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

1 ml odměrného roztoku hydroxidu sodného (3.4) = 18 mg theobrominu

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na jedno desetinné místo.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Velikost navážky vzorku se upraví tak, aby obsah theobrominu ve zkušebním vzorku byl maximálně 80 mg.

8.3 Pokud materiál obsahuje více než 8 % tuku musí být předem odtučněn 6 hodinovou extrakcí petroletherem.

10.5 Stanovení obsahu glukosinolátů v řepce

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení nejdůležitějších glukosinolátů v semeni řepky.

2. Princip

Glukosinoláty se extrahují vřelou vodou z extrahovaného řepkového šrotu za současné inaktivace myrosinázy. Odparek extraktu se silyluje směsí hexamethyldisilazanu a trimethylchlorsilanu v prostředí pyridinu a silylované glukosinoláty se stanoví metodou plynové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 Petrolether, obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)

3.2 Pyridin bezvodý, předestilovaný

3.3 Sinigrin (Kalium myronat – např. Serva kat. č. 35150) roztok 500 mg/100 ml

3.4 Hexamethyldisilazan pro plyn. chromatografii (dále jen HMDS)

3.5 Trimethylchlorsilan pro plyn. chromatografii (dále jen TMCS)

3.6 Dusík žárovkárenský

3.7 3% OV – 1. On Chromosorb W – HP 80/100 mesh

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Přístroj extrakční podle Soxhleta, nejméně s 10 refluxními cykly za 1 hod. nebo podle Twisselmana s průtokem nejméně 10 ml za min. nebo automatický extrakční přístroj Soxtec (poznámka 8.1)

4.2 Plynový chromatograf s příslušenstvím

4.3 Sušárna elektrická s odvětráváním a automaticky regulovatelnou teplotou

4.4 Odstředivka (zkumavková)

4.5 Vysokoobrátkový mlýnek (tříštivý)

4.6 Silylační ampule

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

Jestliže je vzorek semene řepky vlhčí než 7 % je nutno jej vysušit přes noc v sušárně při teplotě 45 °C. Suchý vzorek semene se roztřepe na tříštivém mlýnku (4.5) tak, aby nejméně 50 % vzorku prošlo sítím s oky 0,2 mm.

5.2 Extrakce

5–10 g šrotu řepky se nasype do extrakční patry a extrahuje petroletherem (3.1) po dobu 3 hodin. Vyextrahovaný řepkový šrot (řepková mouka) se nechá volně vysušit na vzduchu v digestoři přes noc.

Do odstředivkové zkumavky se naváží 100 mg odtučněného řepkového šrotu a zkumavka se vloží do vodní lázně teplé 95 °C. Po jedné minutě se do zkumavky přidá 1 ml vařící vody (poznámka 8.2) a zkumavka se volně uzavře zátkou. Po dalších 2 minutách se do zkumavky přidá 1 ml vnitřního standardu sinigrinu (3.3) a extrahuje se dalších 25 minut. Potom se zkumavka ochladí na laboratorní teplotu a odstředí (4.4) po dobu 3 minut při 5000 až 6000 ot./min. Z čirého extraktu se odpipetuje 0,5 ml do kónické silylační ampule (4.6) a odpaří se do sucha při 95 °C proudem vzduchu. Dosuší se 20 minut v sušárně (4.3) při teplotě 103 ± 2 °C.

5.3 Derivatizace

Do silylační ampule (4.6) s odparkem se přidá směs 1 ml pyridinu (3.2), 0,4 ml HMDS (3.4) a 0,2 ml TMCS (3.5) a ampule se uzavře. Silyluje se nejméně 120 min při teplotě 120 °C (poznámka 8.3).

Po skončení silylace se zkumavka ochladí a po otevření se obsah rychle přelije do odstředivkové zkumavky a zazátkuje. Odstředí se při 6 000 ot./min po dobu 7 minut. Vzorék se opatrně dekantuje do vzorkovnice k nástřiku na chromatografickou kolonu.

5.4 Vlastní provedení plynové chromatografie

Obsah glukosinolátů se stanoví metodou plynové chromatografie podle návodu ke konkrétnímu plynovému chromatografu (4.2) a za podmínek, odpovídajících použité koloně.

Kolona: Chromosorb W-HP-80/100 mesh, 3% OV-1

Dusík (3.6): 40 ml / min.

Vodík (3.8): 40 ml / min.

Vzduch: 400 ml / min.

Teplota: termostatu kolon: 232 °C (isotherm.)

nástřikové komory: 270 °C

detektoru: 290 °C

Nástřik: 1–3 µl

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah glukosinolátů v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1 \cdot P_v \cdot 1000}{P_s \cdot m_0}$$

kde m_1 je navážka vnitřního standardu v mg

P_v součet ploch jednotlivých glukosinolátů ve vzorku

P_s plocha píku vnitřního standardu

m_0 hmotnost navážky zkušebního vzorku v mg

Pro přepočet obsahu glukosinolátů v % na obsah glukosinolátů v mol platí vzorec:

$$GSL(\mu\text{mol}) = 24,08 \cdot GSL(\%)$$

Znečištění semeny hořčice se na chromatogramu projeví píkem allylsinolátu a 4-hydroxybenzyl sinolátu. Přítomnost allyl sinolátu se zjistí z nástřiku vzorku bez přidání vnitřního standardu (sinigrin = allylsinolát). Při vyhodnocení vzorku s přidaným vnitřním standardem se musí od plochy píku allyl sinolátu (vnitřní standard + příspěvek znečištění) odečíst plocha daná znečištěním.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se v g/kg s přesností na celé jednotky.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether a vodík jsou nebezpečnými hořlavými I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Přídavek 1 ml vařící vody ke šrotu ve zkumavce se provede tak, aby nedošlo k ochlazení obsahu zkumavky pod 95 °C a aby došlo k dokonalému smočení šrotu ve vodě.

8.3 Silylační činidlo je nutno přidávat jen k jednomu vzorku časově tak, aby byla minimálně vystavena atmosférické vlhkosti.

10.6 Stanovení obsahu 5-vinyl-2-thiooxazolidonu (goitrinu)

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu vinyl-thiooxazolidonu (dále jen VOT) v krmivech.

Metoda stanovení VOT je použitelná pro obsahy od 200 mg/kg.

2. Princip

Ze vzorku krmiva je enzymaticky uvolněn 2-hydroxy-3-butenyl-isothiokyanát, ze kterého vzniká VOT a ten se stanoví metodou plynové nebo vysokotlaké kapalinové chromatografie.

3. Chemikálie

3.1 Petrolether, bod varu 40–60 °C; bromové číslo nižší než 1 (poznámka 8.1)

3.2 Chloroform

3.3 Kyselina citrónová monohydrát, roztok 2,1 g/100 ml

3.4 Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), roztok 35,8 g/500 ml

3.5 Tlumivý roztok pH 7

Příprava: Smíchá se 82,4 ml roztoku hydrogenfosforečnanu disodného (3.4) a 17,6 ml roztoku kyseliny citrónové (3.3)

3.6 Bílá hořčice (*Sinapis alba*), nerozdrcená semena, ne starší než 2 roky

Příprava: Semena se před použitím jemně umelou a extrahují se za studena petroletherem (3.1). Preparovaná mletá hořčice musí obsahovat aktivní thioglukosidasu (myrosinasu) a nesmí obsahovat více než 500 mg VOT/kg

3.7 VOT, standardní látka

3.8 VOT, standardní roztok

Příprava: Do 50 ml odměrné baňky se naváží 25 mg VOT

(3.7) s přesností nejmeně 0,001 g a rozpustí se v chloroformu (3.2). Baňka se doplní chloroformem po rysku a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 500 g VOT

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Laboratorní mlýnek nebo mixér, vhodné konstrukce
- 4.2 Vodní lázeň, nastavitelná na 45 °C
- 4.3 Odstředivka laboratorní s příslušenstvím (kyvety o obsahu 100 ml, uzavratelné zátkou)
- 4.4 Plynový chromatograf s plamenionizačním detektorem. Následující podmínky mohou sloužit jako vodítka
 - 4.4.1 Sloupec: skleněný s vnitřním průměrem 2–6 mm, délka 1,5–2,5 m
 - 4.4.2 Nosný materiál: vypraný v kyselině a silanizovaný – např. Gas Chrom Q nebo Diatomine CLQ, zrnitost 80–100 mesh (150–190 µm) a 100–120 mesh (125–150 µm) (poznámka 8.3)
 - 4.4.3 Stacionární fáze: 5% OV 17 (poznámka 8.2)
 - 4.4.4 Teplota sloupce: 160–175 °C
 - 4.4.5 Nástřikový blok: přímý nástřik do sloupce
 - 4.4.6 Detektor: minimálně 20 °C nad teplotou sloupce
 - 4.4.7 Nosný plyn: dusík, průtok 30 ml/min
- 4.5 Vysokotlaký kapalinový chromatograf
 - 4.5.1 Sloupec: nerezová ocel, vnitřní průměr 4,6 mm, délka 15 cm
 - 4.5.2 Náplň sloupce: křemenný gel, průměrná velikost částic 5 µm např. Partisil 5, Lichrosorb SI 60 nebo Spherisorb 5 (poznámka 8.4)
 - 4.5.3 Mobilní fáze: směs 2,2,4-trimethylpentan-ethylalkohol 4 + 1, rychlost průtoku 1 ml/min
 - 4.5.4 Detektor: UV, pracovní rozsah 255 nm

5. Postup

5.1 Příprava vzorku

Část vzorku se semele tak, aby prošla beze zbytku přes síto 1 mm a aby při mletí nedošlo k zahřátí vzorku. Stanovení se musí provést ihned po semletí.

5.2 Příprava extraktu

Do odstředivací kyvety (4.3) se naváží asi 2 g zkušebního vzorku s přesností nejmeně 0,005 g. Pokud vzorek obsahuje více než 50 g/kg tuku se přidá 25 ml petroletheru (3.1), třepa se asi 2–3 minuty, odstředí se a vrchní vrstva se odlijí. Přidá se dalších 25 ml petroletheru, rozmíchá, protřepe opět 2–3 minuty a znovu odstředí, vrchní vrstva se odlijí a zbylé rozpouštědlo se odstraní proudem vzduchu. K odtučněnému vzorku (nebo původnímu s obsahem tuku nižším než 50 g/kg) v kyvetě se přidá 15 ml tlumivého roztoku (3.5) a 0,2 g bílé hořčice (3.6) navážené s přesností nejmeně 0,01 g. Kyveta se uzavře zátkou a důkladně se protřepe. Potom se kyveta vloží na 90 minut do vodní lázně vyhřáté na 45 °C (4.2).

Po této době se kyveta vyjme a nechá vychladnout. Pipetou se do kyvety přidá 40 ml chloroformu (3.2), kyveta se dobře uzavře a obsah se protřepává 2 minuty. Kyveta se vloží do odstředivky (4.3) a odstředí se tak dlouho, až je kapalina nad sedimentem zcela čirá. Část chloroformové vrstvy se odebere do vysušené, dobře uzavratelné reagenční lahvičky a použije se dále k chromatografické analýze, která se provede bezprostředně.

5.3 Vlastní stanovení

5.3.1 Plynová chromatografie

Do chromatografu se nastříkne 5 µl extraktu, získaného podle odstavce 5.2 a pořídí se chromatografický záznam. Změří se plocha píku VOT a koncentrace VOT v µg/ml v extraktu se stanoví pomocí kalibračního grafu.

5.3.2 Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Na sloupec se nanesou 4 µl extraktu, získaného podle odstavce 5.2 a pořídí se chromatografický záznam. Změří se plocha píku VOT a koncentrace VOT v µg/ml v extraktu se stanoví pomocí kalibračního grafu.

5.4 Kalibrační graf

5.4.1 Plynová chromatografie

Do sady odměrných baněk na 25 ml se napipetuje 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 a 8,0 ml standardního roztoku VOT (3.8), baňky se doplní po rysku chloroformem (3.2) a promíchají. Tyto kalibrační roztoky obsahují 20,0; 40,0; 80,0; 120,0 a 160,0 µg VOT/ml. Do plynového chromatografu se nastříkne vždy 5 µl každého standardu a měří se plochy píků. Kalibrační graf se sestaví vynesáním ploch píků proti koncentracím standardů VOT.

5.4.2 Vysokotlaká kapalinová chromatografie

Kalibrační standardní roztoky se připraví podle odstavce 5.4.1 a na sloupec se nanesou 4 µl z každého z nich. Změří se plochy píků a kalibrační graf se sestaví vynesáním ploch píků proti koncentracím standardů VOT.

5.5 Slepý pokus

Provede se podle odstavce 5.2, avšak bez přidavku zkoušeného vzorku. Při výpočtu se hodnota slepého pokusu odečte od výsledku stanovení.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah VOT v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{40 \cdot C}{m}$$

kde C je koncentrace VOT v µg/ml, zjištěná z kalibračního grafu

m hmotnost navážky zkušebního vzorku v g

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether je nebezpečnou hořlavinou 1. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutno dodržet bezpečnostní pravidla.

8.2 Alternativní stacionární fáze pro plynovou chromatografii je EGSS-X. Některá krmiva však dávají na tomto sloupci za uvedených podmínek rušivé píky.

8.3 Retenční čas při stanovení plynovou chromatografií při 165 °C při použití sloupce:

1. 5% OV 17 na Diatomit CLQ 80-100 mesh je pro VOT 9 minut
2. 1% EGSS-X na Diatomit CLQ 80-100 mesh je pro VOT 8 minut

8.4 Retenční čas pro stanovení vysokotlakou kapalinovou chromatografií při použití sloupce Lichrosorb SI 60 je pro VOT 7,5 minuty.

10.7 Stanovení obsahu kyseliny erukové

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kyseliny erukové ve všech druzích rostlinných tuků a olejů různého stupně čištění. Obsah kyseliny erukové (kyselin cis,trans-11-dokosenové a cis,trans-13-dokosenové) je vyjádřen jako hmotnostní podíl mastných kyselin C 22 : 1 z celého spektra mastných kyselin ve vzorku.

2. Princip

Metoda je založena na převedení triacylglycerolů mastných kyselin na methylestery mastných kyselin a následujícím kvantitativním stanovením pomocí plynové chromatografie po jejich rozdělení na stacionární polární-náplni.

3. Chemikálie

3.1 Dusík žárovkárenský, čistoty 99,99 % nebo jiný inertní plyn

3.2 Vodík elektrolytický, čistoty 99,5 % (poznámka 8.1)

3.3 Tlakový vzduch podle požadavků výrobce chromatografu

3.4 Standardní směs methylesterů mastných kyselin nebo řepkový olej o známém složení mastných kyselin jako referenční materiál

3.5 Methylalkohol (CH_3OH) neobsahující více než 0,5 % vody (poznámka 8.1)

3.6 Petrolether, obsahující převážně uhlovodíky se šesti atomy uhlíku, ze kterých méně než 5 % destiluje pod 50 °C a více než 95 % mezi 50 °C až 70 °C, o bromovém čísle menším než 1 a zbytkem po odpaření nejvýše 2 mg/100 ml (poznámka 8.1)

3.7 Síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), pevný

3.8 Hydroxid draselný; methanolickeý roztok $c(\text{KOH}) = 1 \text{ mol/l}$

3.9 Hydroxid draselný, methanolickeý roztok $c(\text{KOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$

3.10 Kyselina sírová (H_2SO_4), koncentrovaná ($\rho = 1,84 \text{ g/cm}^3$)

3.11 Methylová oranž, roztok 0,5% v methylalkoholu

3.12 Chlorid sodný, nasycený vodný roztok

3.13 Methylalkoholát sodný, roztok

Příprava: 1 g sodíku se rozpustí ve 100 ml methylalkoholu (3.5) a promíchá

3.14 Kyselina chlorovodíková, methanolickeý roztok

Příprava: Plynový chlorovodík uvolněný přikapáváním 37% kyseliny chlorovodíkové do koncentrované kyseliny sírové (3.10) se vysuší probubláváním kyselinou sírovou a jímá se do methylalkoholu (3.5) přes malou obrácenou nálevku, která se právě dotýká hladiny methylalkoholu. Methanolickeý roztok chlorovodíku je stálý a lze jej uchovávat ve tmě ve skleněné láhvi neomezenou dobu.

Místo methanolickeého roztoku chlorovodíku lze použít methanolickeý roztok kyseliny sírové (H_2SO_4) = 0,5 mol/l. Esterifikaci je nutno v tomto případě prodloužit na 30 minut a je vhodné odfiltrovat vzniklou sraženinu, nebo použít magnetického míchadla.

3.15 Methylová červeň, ethanolickeý roztok 10 g/l

3.16 Hexan (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Plynový chromatograf s plamenoionizačním detektorem

4.2 Chromatografická kolona, skleněná nebo kovová, délky 2 až 3,5 m o vnitřním průměru 2 až 4 mm

Náplň kolony: nosič pro plynovou chromatografii kyseliny prahy a silanizovaný, zrnění 0,16 až 0,20 mm s 5 až 10 % zakotvené polární fáze polyesterového typu (např. diethylen glykol ester kyseliny jantarové, ethylen glykol ester kyseliny adipové, ethylen glykol ester kyseliny jantarové, ester butandiol jantarátu, kyanosilikon apod.)

4.3 Dávkovač pro plynovou chromatografii na 1 μl , dělení minimálně po 0,2 μl

4.4 Elektrický vařič nebo písková lázeň,

4.5 Dělicí nálevky na 125 ml

4.6 Destilační banka na 100 ml

4.7 Vodní lázeň

5. Postup

5.1 Příprava methylesterů

Pro přípravu methylesterů mastných kyselin se použije jeden ze tří alternativních postupů:

5.1.1 Methanolýza triacylglycerolů v alkalickém prostředí (poznámka 8.2)

Naváží se 2 g zkušební vzorku s přesností nejméně 0,001 g do destilační banky (4.6), přidá se 20 ml methylalkoholu (3.5), 0,25 ml methanolickeého roztoku hydroxidu draselného (3.8) a varný kamínek. Po promíchání se banka umístí pod zpětný chladič a obsah se uvede k varu na vařiči nebo pískové lázni (4.4). Roztok se po několika minutách vřeší a reakce je ukončena po 10 minutách. Banka se ochladí pod proudem tekoucí vody, obsah se převede do dělicí nálevky (4.5) a banka se vypláchne 20 ml petro-

letheru (3.6) také do dělicí nálevky (4.5). Po přidání 20 ml vody se obsah dělicí nálevky protřepe, nechá několik minut stát pro oddělení vrstev a spodní vrstva se přepustí do druhé dělicí nálevky (4.5), ve které se extrahuje opět 20 ml petroletheru (3.6). Spojené petroletherové extrakty se promyjí 3krát 20 ml vody, petroletherová vrstva se zfiltruje přes bezvodý síran sodný (3.7) do destilační baňky (4.6) a petrolether se oddestiluje.

Pro lepší oddělení vrstev emulze lze přidat k destilované vodě 5 až 10 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.12).

5.1.2 Zmýdlnění s následnou esterifikací za přítomnosti kyseliny sírové (poznámka 8.3)

Do destilační baňky se naváží 2 g vzorku s přesností nejméně 0,001 g a přidá se 25 ml methanolickeho roztoku hydroxidu draselneho (3.9). Obsah baňky se zmýdlnuje varem pod zpětným chladičem za občasného promíchání 30 minut. Po vychladnutí se přidá několik kapek roztoku methylové oranže (3.11) jako indikátoru a obsah baňky se titruje kyselinou sírovou (3.10) do červeného zbarvení. Navíc se přidá 5 kapek kyseliny sírové (3.10) a obsah se znovu vaří 30 minut pod zpětným chladičem. Po ochlazení se přidá 20 ml nasyceného roztoku chloridu sodného (3.12), obsah se převede do dělicí nálevky na 250 ml a baňka se vypláchne do dělicí nálevky 50 ml petroletheru (3.6). Po protřepání a rozdělení se spodní vrstva převede do další dělicí nálevky a extrahuje se znovu 50 ml petroletheru (3.6). Spojené petroletherové extrakty se promyjí 3krát 50 ml vody. Kyselinu sírovou je třeba důkladně vymýt. Její přítomnost se zkouší na methylovou oranž (3.11). Estery se vysuší filtrací přes bezvodý síran sodný (3.7). Petrolether se oddestiluje na vodní lázni (4.7), nebo pomocí vakuové rotační odparky.

5.1.3 Neutralizace volných mastných kyselin a alkalická methanolýza triacylglycerolů s následnou esterifikací mastných kyselin (poznámka 8.4).

Do destilační baňky (4.6) se naváží 2 g zkušebního vzorku s přesností nejméně 0,001 g, přidá se 20 ml roztoku methanolátu sodného (3.13) a varný kamínek. Směs se vaří pod zpětným chladičem 10 minut, potom se ochladí, přidá se 25 ml methanolickeho roztoku kyseliny chlorovodíkové (3.14) a obsah baňky se znovu povaří pod zpětným chladičem 10 minut. Po ochlazení se přidá 15 ml vody, obsah baňky se převede do dělicí nálevky na 250 ml, extrahuje se 30 ml petroletheru (3.6) a po oddělení vrstev se vodní fáze převede do další dělicí nálevky, ve které se extrakce opakuje. Spojené petroletherové extrakty se promyjí 20 ml vody až do neutrální reakce na methylovou červen (3.15). Petroletherový extrakt se vysuší filtrací přes bezvodý síran sodný (3.7) a petrolether se odpaří na vodní lázni (4.7).

5.2 Vlastní provedení

Vzorek methylesteru se naředí hexanem (3.16) na přibližně 10% roztok a do plynového chromatografu (4.1) se nastříkuje 0,1 až 1,0 µl.

Parametry kolony:

náplň:	10% DEGS on 80/100 mesh Chromosorb W AW nebo jiná alternativní
kolona:	3 m × 4 mm – skleněná, kovová
mobilitní fáze:	dusík (3.1) – 40–60 ml/min
detektor:	FID – 50 °C nad teplotu kolony – vodík (3.2) – 30 ml/min.
nástřik:	20 až 50 °C nad teplotou kolony – vzduch 30 ml/min.
kolona:	180–210 °C izotermní analýza
vyhodnocovací zařízení:	integrátor nebo počítač

6. Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Kvalitativní vyhodnocení

Kvalitativní vyhodnocení se provede z retenčních časů standardů čistých methylesterů vyšších mastných kyselin nebo jejich komerčně dodávaných směsí (Supelco, Fluka, Serva).

6.2 Kvantitativní vyhodnocení

Kvantitativní vyhodnocení se provede metodou vnitřní normalizace, plocha jednotlivých identifikovaných mastných kyselin je úměrná jejich procentickému zastoupení v celém jejich spektru konkrétního vzorku. Výpočet je prováděn integrátorem nebo počítačem.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na desetiny % nebo celé g/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Petrolether, methylalkohol, hexan a vodk jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla. Methanol je navíc zvláště nebezpečným jedem.

8.2 Metodu lze používat pouze pro neutrální tuky a oleje.

8.3 Metodu lze používat pro kyselé oleje a tuky a volné mastné kyseliny.

8.4 Metodu lze používat pro kyselé oleje a tuky a mastné kyseliny.

10.8 Stanovení obsahu kadmia a olova

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení kadmia a olova v krmivech. Metoda není vhodná pro minerální premixy, přísady a doplňky.

2. Princip

Vzorek krmiva se mineralizuje na suché cestě (poznámka 9.1) při pomalém nárůstu teploty do 480 °C, popel se rozpustí v kyselině dusičné a jeho výluh se měří metodou plamenné atomové absorpční spektrometrie nebo anodické rozpouštěcí voltametrie s předkoncentrací na visící rtuťové kapkové elektrodě.

3. Chemikálie

3.1 Voda demineralizovaná (dále jen DEMI voda) s měrným odporem min. 14 megaohmů

3.2 Kyselina dusičná, koncentrovaná, čistoty p.p. nebo p.a. redestilovaná v křemenné aparatuře pod bodem varu

3.3 Kyselina dusičná, 2% (mytí skla)

3.4 Kyselina dusičná, roztok $c(\text{HNO}_3) = 1 \text{ mol/l}$

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odměří 70 ml koncentrované kyseliny dusičné (3.2), doplní se po rysku DEMI vodou (3.1) a promíchá.

3.5 Kadmium, standardní roztok o garantované koncentraci 1,0000 g/l

3.6 Olovo, standardní roztok o garantované koncentraci 1,0000 g/l

3.7 Kyselina chlorovodíková, koncentrovaná

3.8 Kyselina chlorovodíková, zředěná (1 + 1)

3.9 Referenční materiál certifikovaný nebo interní, stejného nebo podobného typu (matrice) jako zkoušený vzorek.

3.10 Dusík nebo argon, požadované čistoty 99,9 %

3.11 Tlumivý roztok octanový pH 4,6

Příprava: Do odměrné baňky 1000 ml se odváží 27,22 g trihydrátu octanu sodného ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$), nejvyšší dostupné čistoty, rozpustí ve vodě a promíchá. 98 ml tohoto 0,2 mol/l roztoku se smíchá se 102 ml roztoku kyseliny octové $c(\text{CH}_3\text{COOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$, nejvyšší dostupné čistoty.

3.12 Acetylen (poznámka 9.9)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Spektrometr absorpční atomový s korekcí pozadí

4.2 Deska topná s regulovatelnou teplotou

4.3 Pec muflová s regulovatelnou teplotou

4.4 Pipeta automatická

4.5 Polarografický analyzátor vhodné konstrukce umožňující práci v režimu anodické rozpouštěcí voltametrie s příslušenstvím (statická kapková elektroda, souřadnicový zapisovač nebo výhodnocovací software)

4.6 Mikropipeta

5. Postup

5.1 Mineralizace vzorku.

Do skleněné nebo lépe křemenné kádinky na 50 ml nebo do platinové misky (poznámka 9.1) se naváží přibližně 2 g zkušebního vzorku s přesností 0,001 g. Současně se naváží v přibližně stejném množství paralelně dvakrát referenční materiál (3.9) s podobnou matricí, jako zkoušený vzorek. Do souboru se zařadí ještě nejméně jeden slepý vzorek (viz 5.3.2.2). Kádinky se přikryjí hodinovým sklíčkem, vloží na studenou topnou desku (4.2), jejíž teplota se postupně zvyšuje po 50 °C za hodinu až do teploty 300 °C. Potom se kádinky vloží studené muflové pece (4.3). Nastaví se teplota 300 °C a vzorky se ponechají při této teplotě 1 hod. Dále se teplota zvyšuje o 50 °C za hodinu až do teploty 480 °C. Byl-li vzorek odvážen do platinové misky, vloží se přímo do studené muflové pece (4.3) a teplota se zvyšuje postupně po 50 °C za hodinu až do teploty 480 °C (poznámka 9.2). Při této teplotě se vzorky ponechají minimálně 3 hodiny, nejlépe však přes noc. Barva popela se vizuálně posoudí. Pokud je ještě černá, či tmavě šedá, vloží se vzorky zpět do muflové pece (4.3) a pokračuje se ve spalování.

Je-li již popel světle šedý, přidá se opatrně po stěnách nádoby 1,0 ml (v případě většího množství popela 2,0 ml) koncentrované kyseliny dusičné (3.2) a nádoby se vloží na topnou desku (4.2), která se zahřeje na teplotu nižší, než je bod varu (roztok nesmí vřít) a mineralizáty se odpaří do sucha. Potom se vloží opět do muflové pece (4.3), kde se ponechají při teplotě 480 °C po dobu 1 hod. Po vyjmutí z pece a vychladnutí se přidá podle množství popela přesně 10,0 až 20,0 ml roztoku kyseliny dusičné (3.4), přidané objemy se zaznamenají, obsah nádoby se promíchá krouživým pohybem a ponechá stát po dobu nejméně 2 hod. Během této doby se nádobkou ještě několikrát zamíchá (poznámka 9.3). Mineralizát se chrání proti kontaminaci přechováváním např. v uzavřené dóze. Nakonec se mineralizáty přelijí do nádobek (nejlépe plastových) a uzavřou. Mineralizace i vlastní měření se provádějí ve dvou oddělených stopových laboratořích.

Dále se postupuje podle 5.2.2 nebo podle 5.3.2.

5.2 Metoda plamenné atomové absorpční spektrometrie

5.2.1 Sestrojení kalibračních grafů

5.2.1.1 Příprava kalibračních roztoků pro stanovení kadmia:

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje přesně 5 ml standardního roztoku kadmia (3.5), doplní se roztokem kyseliny dusičné (3.4) po rysku a promíchá. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,050 mg kadmia.

Do sady odměrných baněk na 250 ml se odpipetuje přesně 0,0; 1,0; 2,0; 3,0 a 4,0 ml roztoku kadmia s koncentrací 0,050 mg/ml, doplní se po rysku roztokem kyseliny dusičné (3.4) a promíchá. Tato ředění odpovídají koncentracím 0,0; 0,2; 0,4; 0,6 a 0,8 mg/l kadmia (poznámka 9.4).

Kalibrační roztoky se převedou do plastových nádobek a uzavřou. Uchovávají se při laboratorní teplotě.

5.2.1.2 Příprava kalibračních roztoků pro stanovení olova:

Do odměrné baňky na 100 ml se odpipetuje přesně 25 ml standardního roztoku olova (3.6), doplní se roztokem kyseliny dusičné (3.4) po rysku a promíchá. 1 ml tohoto roztoku obsahuje 0,25 mg olova.

Do sady odměrných baněk na 250 ml se odpipetuje přesně 0,0; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 ml roztoku olova s koncentrací 0,25 mg/ml, doplní po rysku roztokem kyseliny dusičné (3.4) a promíchá. Tato ředění odpovídají koncentracím 0,0; 1,0; 1,5; 2,0 a 2,5 mg/l olova (poznámka 9.4).

Kalibrační roztoky se převedou do plastických nádobek a uzavřou. Uchovávají se při laboratorní teplotě.

5.2.2 Postup zkoušky

Před vlastním měřením se přístroj (4.1) optimalizuje na nejvyšší citlivost stanoveného prvku. Postupuje se podle návodu (manuálu) konkrétního přístroje. Měření se provádí v plameni s nízkým průtokem acetyleny (3.12), s korekcí pozadí, pro kadmium při vlnové délce 228,8 nm, pro olovo při vlnové délce 217,0 nm.

Absorbance každého kalibračního roztoku včetně roztoku s nulovou koncentrací se měří čtyřikrát (čtyři čtení po 1,5 sekundové integraci). Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících hodnot koncentrací kalibračních roztoků se sestaví kalibrační graf (poznámka 9.4). Stejným způsobem se proměří mineralizát zkoušeného vzorku, referenčního materiálu, slepého vzorku a z naměřených hodnot absorbance se zjistí odpovídající koncentrace pomocí kalibračního grafu (poznámka 9.5).

5.3.1 Příprava roztoků pro kalibraci

Vhodným ředěním standardních roztoků kadmia (3.5) a olova (3.6) se připraví pracovní směsný roztok těchto prvků pro vyhodnocování výsledků měření metodou jednoho nebo dvou standardních přídávků (poznámka 9.6).

5.3.2 Postup zkoušky

5.3.2.1 Do polarografické nádoby (4.5) se odpipetuje přesně 3 ml mineralizátu zkoušeného vzorku a přidá 10 ml octanového tlumivého roztoku (3.11). Totéž se provede s mineralizátem referenčního materiálu a slepého vzorku. Po pětiminutovém odstraňování rozpouštěného kyslíku proudem dusíku (3.10) při současném promíchávání roztoku se podle návodu používaného přístroje (4.5) elektrolyticky vyloučí olovo i kadmium za předem definovaných podmínek na visící rtuťové kapkové elektrodě. Poté se tyto prvky anodicky rozpustí při současném časovém záznamu průběhu rozpouštění (poznámka 9.7).

Záznam polarografické křivky se provádí nejméně dvakrát vedle sebe. Potom se k mineralizátu přidá vhodným dávkovačem určité množství směsného roztoku kadmia a olova. Po 1 minutovém promíchávání roztoku a odstraňování kyslíku proudem dusíku (3.10) se opět zaznamená polarografická křivka. Totéž se opakuje s dalším přídávkem stejného množství směsného roztoku olova a kadmia o stejné koncentraci.

K vyhodnocení se použije záznam s dostatečně rozlišenými píky olova a kadmia (poznámka 9.8). Měří se výška píku stanovovaného prvku od upravené základní linie, která prochází inflexním bodem mezi píkem olova a kadmia — tzv. metoda „peak-zero“.

5.3.2.2 Vzhledem k citlivosti použité voltametrické metody se musí ověřit hodnota „slepého vzorku“, kdy se zjistí kontaminace vzorku olovem a kadmium v průběhu mineralizace a rozpouštění, jejich přítomnost v použitých chemikáliích apod. Provádí se celý postup zkoušky bez zkušebního vzorku. Obsah olova a kadmia ve „slepém vzorku“ se opět vyhodnotí přídávkem standardu.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Matematicko-statistické vyhodnocení výsledků

6.1.1 K vyjádření přesnosti kalibračních metod se definují limitní hodnoty, které souvisejí s úrovní koncentrace, pro kterou je signál ještě statisticky významně odlišný od šumu. V souvislosti s vyjádřením přesnosti a citlivosti kalibračních metod se definují tři specifické úrovně signálu, kterými se otestuje dosažená citlivost přístroje a jeho momentální stav výpočtem:

- kritická úroveň y_c
- limita detekce y_D
- limita stanovení y_S

6.1.2 Dále je třeba ověřit správnost výsledků porovnáním změřené a certifikované hodnoty referenčního materiálu.

6.1.3 Kritická úroveň y_c představuje horní mez 95 % intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu pro absorpční rovnou nule.

$$y_c = \bar{y} - b \cdot \bar{x} + t \cdot s \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (1)$$

kde y je aritmetický průměr všech absorbancí (pro voltametrickou metodu výška jednotlivých píků v mm) kalibračních roztoků včetně roztoku s nulovou koncentrací;
 b směrnice kalibračního grafu;
 x aritmetický průměr všech koncentrací kalibračních roztoků;
 x_i jednotlivé koncentrace kalibračních roztoků;
 t kvantil Studentova rozdělení při 95 % hladině významnosti a pro $(n - 2)$ stupňů volnosti;
 n počet všech absorbancí (pro voltametrickou metodu výška jednotlivých píků v mm) v kalibraci;
 s odhad směrodatné odchylky všech absorbancí (pro voltametrickou metodu výška jednotlivých píků v mm) v kalibraci podle vzorce

$$s = \frac{1}{n-1} \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2} \quad (1a)$$

Nad kritickou úrovní y_c lze signál odlišit od šumu.

Koncentrace x_c odpovídající hodnotě kritické úrovně se určí z kalibračního modelu pomocí vztahu:

$$x_c = \frac{y_c - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (2)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

6.1.4 Limita detekce y_D odpovídá hodnotě absorpance (výšce píku), pro kterou je dolní mez 95 % intervalu spolehlivosti predikce signálu z kalibračního modelu rovna y_c .

Pro lineární kalibrační model se používá aproximace ve tvaru:

$$y_d = y_c + t \cdot s \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

Koncentrace odpovídající limitě detekce x_D se pak vypočte podle vztahu:

$$x_D = \frac{y_D - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (4)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

Limita detekce udává absorpaci signálu, která ještě umožňuje detekci koncentrace. Velikost x_D udává minimální koncentraci, kterou lze ještě s 95 % pravděpodobností odlišit od nulové hodnoty. Počítá se ze všech čtyř čtení absorpance každého (i nulového) kalibračního roztoku. Do výpočtu se zahrnují všechna měření kalibračních roztoků v celém průběhu měření (poznámka 9.5).

6.1.5 Limita stanovení y_S je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a rovna číslu C. Pro číslo C se volí obvykle velikost $C = 0,1$.

Pro lineární model se používá vztah ve tvaru:

$$y_s = \frac{s}{C} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

Význam použitých symbolů je uveden u vztahu (1).

Koncentrace odpovídající limitě stanovení se vypočte podle vztahu:

$$x_s = \frac{y_s - \bar{y}}{b} + \bar{x} \quad (6)$$

6.1.6 K výpočtu obsahu příslušného prvku ve zkoušeném vzorku i referenčním materiálu lze přistoupit teprve tehdy, je-li koncentrace příslušného prvku ve změřeném referenčním materiálu nad limitou detekce.

Nejprve se vypočítá absorbance (výška píku) limity detekce pomocí vztahů (1) a (3) a současně koncentrace limity detekce podle vztahu (4). Tato hodnota určuje hranici, od které výsledky měření je možné pokládat za statisticky průkazné. Všechny koncentrace vzorků nacházející se pod touto hodnotou již nelze s 95% pravděpodobností odlišit od nulové hodnoty.

Pro zjištění použitelnosti voltametrické metody se použije metoda dvou standardních přídavek, kde závislost výšky píku na koncentraci je vlastně modifikovaná kalibrační křivka, ze které lze metodami lineární regrese vypočítat směrnici a další parametry. Použijí se vzorce (1) až (4) k určení hodnoty kritické úrovně y_c a limity detekce y_D 7.1. Pouze místo hodnot absorbancí se pro y dosadí výšky jednotlivých píků v mm.

6.2 Výpočet pro metodu atomové absorpční spektrometrie

Obsah kadmia (olova) v mg/kg se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{C \cdot V}{m} \quad (7)$$

kde X je obsah sledovaného prvku v mg/kg
 C koncentrace sledovaného prvku v mg/l
 V objem mineralizátu v ml
 m hmotnost vzorku v g

Vzorky s nižšími koncentracemi než je limita detekce je nutné změřit citlivější metodou, např. ETA AAS nebo voltametricky.

6.3 Výpočet pro voltametrického stanovení

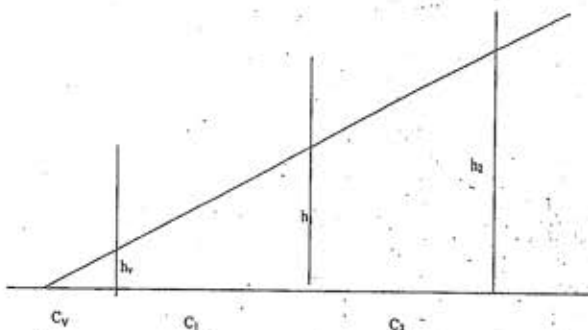
6.3.1 Obsah olova (kadmia) v mg/kg (X) metodou jediného standardního přídávku se vypočte podle vzorce:

$$X = \frac{1000 \cdot V_1 \cdot C_1 \cdot V_2 \cdot h}{m \cdot [(V_3 + V_2) \cdot h_1 - V_3 \cdot h]} \quad (8)$$

kde m je hmotnost zkušební vzorku v g;
 V_1 množství kyseliny (3.4.) použité k rozpouštění popela vzorku v ml;
 V_3 množství roztoku mineralizátu pipetovaného do polarografické nádoby v ml;
 h výška píku příslušného prvku v mm;
 V_2 množství směsného standardu přidaného k roztoku vzorku do polarografické nádoby v ml;
 C_1 koncentrace příslušného prvku v standardním přídávku v mg/ml;
 h_1 výška píku příslušného prvku po přídávku v mm;

6.3.2 Obsah olova (kadmia) metodou dvou standardních přídavek se určí graficky podle příkladu 1.

Příklad 1 Grafické vyhodnocení výsledků obsahu olova a kadmia metodou dvou standardních přídavek:



kde h_v je výška píku Pb (Cd) ve vzorku (mm)
 h_1 výška píku Pb (Cd) po prvním přídávku (mm)
 h_2 výška píku Pb (Cd) po druhém přídávku (mm)
 C_1 koncentrace Pb (Cd) v prvním přídávku (μg/ml)
 C_2 koncentrace Pb (Cd) ve druhém přídávku (μg/ml)
 C_v koncentrace Pb (Cd) ve vzorku (μg/ml)

Od vypočteného obsahu olova (kadmia) určeného metodou dvou standardních přídavek podle (příklad 1), nebo výpočtem podle vzorce (8) je nutno odečíst obsah olova (kadmia) ve „slepém vzorku“.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně prováděných stanovení, který vyhovuje podmínkám 6.1 a vyjadřuje se s přesností na desetiny mg/kg.

7. Závěrečný protokol

Závěrečný protokol musí obsahovat tyto informace:

- limitu detekce
- výsledek analýzy certifikovaného nebo interního referenčního materiálu
- deklarovanou hodnotu certifikovaného nebo interního referenčního materiálu
- výsledky analyzovaných vzorků.

8. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

9. Poznámky

9.1 Pro mineralizaci vzorku lze použít i jiné než popsané způsoby mineralizace. Nejedná se o uznanou metodu. Správnost výsledků se kontroluje interními a certifikovanými referenčními materiály.

9.2 Platíkové misky nemají stejné dno. Přestup tepla u každé misky je jiný. Proto se vkládají do muflové pece již na začátku mineralizace.

9.3 Jinou možností rozpouštění popela vzorku je použití ultrazvukové lázně.

9.4 K sestavení kalibrační křivky se použijí jen ty kalibrační roztoky, jejichž absorbance se nacházejí v lineární oblasti kalibračního grafu.

9.5 Pokud v průběhu měření dojde k výraznému poklesu absorbance kalibračních roztoků, je třeba přístroj zastavit a odstranit příčinu tohoto stavu. Dále je třeba znovu změřit tu část vzorků, které následovaly.

9.6 Pro běžné obsahy kadmia a olova v krmivech vyhovuje koncentrace olova 2 g/ml, koncentrace kadmia 1 g/ml a dávkovaný objem 50 l. Koncentrace kadmia a olova je nutno volit tak, aby nárůst piku vzorku s přidávkem byl zhruba dvojnásobný proti piku samotného vzorku.

9.7 Doporučené parametry měření při použití polarografického analyzátoru PA-4 a statické kapkové elektrody SMDE-1.

- initial potencial - 800 mV
- scan range - 800 až - 100 mV
- clock FSDPP
- operation mode DPP
- program ASV/CSV
- scan rate 20 mV/s
- sensitivity 11-15 (podle skutečného obsahu Cd a Pb)
- RC 100
- filter 0.2 s
- presweep time 7 s
- deposit time 120 s
- systém elektrod 3 elektrodový systém:
 - ref. el. - Ag/AgCl
 - pomocná el. - Pt
 - drop size 80 ms

9.8 Při použití Ag/AgCl referenční elektrody jsou přibližné potenciály piků pro kadmium při 550 mV, pro olovo při 400 mV.

9.9 Acetylen je nebezpečná hořlavina I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s ním je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

10.9 Stanovení obsahu ricinových slupek

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu ricinových slupek

2. Princip

Ricinové slupky se uvolní vyvařením zkušebního vzorku v kyselině a alkalickém prostředí a jejich obsah se stanoví vázkově.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina sírová ($\rho = 1,84$ g/ml), zředěná (1 + 9)
- 3.2 Hydroxid sodný, roztok 5%
- 3.3 Peroxid vodíku, roztok 30%
- 3.4 Kyselina dusičná ($\rho = 1,4$ g/ml), roztok 5%
- 3.5 Kyselina dusičná ($\rho = 1,4$ g/ml), roztok 40%
- 3.6 Chlorid draselný, pevný krystalický

4. Přístroje

- 4.1 Čtvercová miska
- 4.2 Mikroskop
- 4.3 Pinseta

5. Postup

Do 1 000 ml kádinky se naváží 50 až 100 g původního nebo hrubě namletého vzorku s přesností 0,1 g. Přidá se 200 až 600 ml roztoku kyseliny sírové (3.1) a vaří se 3 až 5 minut (poznámka 8.1). Obsah kádinky se dekantuje obyčejnou vodou, aby se odstranil hlavní rozvařený podíl.

Zbytek se pak vaří 3 minuty s 200 až 400 ml roztoku hydroxidu sodného (3.2). Obsah kádinky se slévá na misku (4.1) a opět se dekantuje obyčejnou vodou.

Je-li zbytek tmavý, odbarví se malým množstvím peroxidu vodíku (3.3), případně se ještě povaří s kyselinou dusičnou (3.4) a opět dekantuje vodou.

Ricinové slupky, které jsou tmavě hnědé (kompaktní a štípané) se kvantitativně vyberou pinsetou (4.3) na zvážené sklíčko, vysuší a zváží.

Jeich detailní identifikace se provádí mikroskopicky (4.2) po krátkém povaření s 10 ml kyselinou dusičnou (3.5) za přidavku několika krystalů chloridu draselného (poznámka 8.2).

6. Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah ricinových slupek v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{1,2 \cdot 10^3 \cdot m_2}{m_1}$$

kde m_1 je hmotnost navážky vzorku v g
 m_2 hmotnost ricinových slupek v mg
1,2 přepočítávací koeficient na 20 % ztráty ricinových slupek vyloučením

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na celé jednotky mg/kg.

7. Opakovatelnost

Nebyla dosud stanovena.

8. Poznámky

8.1 Má-li roztok snahu překypět, ochlazuje se vodou ze stříčky.

8.2 Doporučuje se připravit si pro srovnání ricinové slupky, které byly podrobeny stejným operacím jako zkušební vzorek.

10.10 Stanovení obsahu fluoru

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 975.08

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení fluoru v krmivech.

2. Princip

Fluor se stanoví iontově selektivní elektrodou v chloridovém výluhu krmiva.

10.11 Stanovení obsahu reziduí organochlorových a organofosfátových pesticidů

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 970.52

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení aldrinu, dieldrinu, DDT, DDE, TDE, endrinu, heptachloru, hexachlorcyklohexanu a PCB v krmivech.

2. Princip

Rezidua pesticidů a PCB se extrahují z krmiv vhodným rozpouštědlem a v extraktu se stanoví pomocí chromatografických metod (papírová, tenkovrstevná nebo plynová).

10.12 Stanovení obsahu hexachlorbenzenu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 977.19

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení hexachlorbenzenu v tucích.

2. Princip

Hexachlorbenzen se stanoví metodou plynové chromatografie.

10.13 Stanovení obsahu dusitanů

Tato metoda je uvedena v Metoden Buch LUFA 4.10.1

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení dusitanů v krmivech.

2. Princip

Vzorek krmiva se rozmíchá ve zředěném roztoku hydroxidu sodného o pH 8 a vzniklá suspenze se zahřeje na 50 °C. Po vyčištění roztoku sranem zinečnatým se dusitany stanoví ve filtrátu v pufrovaném roztoku fotometricky (diazotace kyselinou sulfanilovou a následná kopulace s N-naftyl-1-etyldiamin dihydrochlorid).

10.14 Stanovení obsahu rtuti

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení rtuti v krmivech.

2. Princip

Rtut' v krmivech se stanoví technikou generování par kovové rtuti s následným zachycením a obohacením na zlatém amalgámu.

3. Chemikálie

3.1 Kyselina dusičná koncentrovaná ($h = 1,4$ g/ml) čistoty p.p.

3.2 Rtut' kovová čistoty min. 99,99 %

3.3 Základní roztok rtuti

Příprava: 1,0000 g rtuti (3.2) se rozpustí ve 30 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se v odměrné baňce na 1000 ml deionizovanou vodou po rysku.

1 ml pracovního roztoku obsahuje 1 mg rtuti.

3.4 Pracovní roztok rtuti pro kalibraci prvního rozsahu

Příprava: Pro kalibraci prvního rozsahu se odpipetuje 5 ml základního roztoku rtuti (3.3) do odměrné baňky na 100 ml, přidá se 1 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se deionizovanou vodou po rysku. (Lze použít i roztok o koncentraci 5 µg rtuti v 1 ml z kalibrace druhého rozsahu.) Z tohoto naředěného roztoku se odpipetuje 0; 1; 2; 4; 6; 8 a 10 ml do odměrných baněk na 100 ml, do každé baňky se přidá 1 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se deionizovanou vodou po rysku.

1 ml pracovního roztoku obsahuje 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 mg rtuti

Roztoky jsou stále při uskladnění ve tmě minimálně 1 měsíc.

3.5 Pracovní roztok rtuti pro kalibraci druhého rozsahu

Příprava: Pro kalibraci druhého rozsahu se odpipetuje 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 a 0,6 ml do odměrných baněk na 100 ml, do každé baňky se přidá 1 ml kyseliny dusičné (3.1) a doplní se deionizovanou vodou po rysku.

1 ml pracovního roztoku obsahuje 1; 2; 3; 4; 5 a 6 µg rtuti

Roztoky jsou stále při uskladnění ve tmě minimálně 1 týden.

3.6 Kyslík (poznámka 8.1)

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Jednouúčelový atomový absorpční spektrometr pro stanovení rtuti (dále jen analyzátor)

Veškeré pomůcky používané při měření je nutno bezprostředně před použitím vyžít v plameni do červeného žáru, aby se odstranila možná kontaminace z okolí.

5. Postup

5.1 Úprava vzorku

Representativní množství konečného vzorku se zhomogenizuje rozetřením v třecí misce. Z tohoto upraveného vzorku se navažuje podle očekávaného obsahu rtuti 0,05 až 0,1 g s přesností 0,0005 g do niklové lodičky analyzátoru.

5.2 Kalibrace analyzátoru

Analyzátor (4.1) se uvede do provozu a nastaví se pracovní parametry podle návodu výrobce.

Při kalibraci je nutno nejprve zrušit hodnoty přecházející kalibrace. Potom se provádí kalibrace v obou rozsazích tak dlouho, až je dosaženo ustálení absorpčního signálu. Rozdíl absorbancí dvou po sobě následujících kalibrací se nesmí lišit o více než 5 % relat.

V průběhu vlastního měření vzorků se kalibrace pravidelně opakuje.

5.3 Vlastní postup zkoušky

Niklová lodička s naváženým vzorkem se vloží do podavače analyzátoru a spustí se měřicí cyklus. U každého vzorku se provedou minimálně tři měření, aby se vyloučila možnost zkreslení výsledku nedokonalým uvolněním rtuti z amalgamu.

6. Výpočet

Obsah rtuti v mg/kg se zjistí odečtením na displeji analyzátoru.

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti, a vyjadřuje se s přesností na desetiny mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit 1,5 % relativních.

10.15 Stanovení obsahu aflatoxinu B₁

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal no. L 102, 15/04/76, L 327, 13/11/92 a L 094, 13/04/94

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení aflatoxinu B₁ v krmivech, včetně těch, která obsahují slupky citrusů. Limit detekce je 1 µg/kg.

2. Princip

Vzorek krmiva se extrahuje chloroformem, získaný extrakt se zfiltruje a přečistí na Florisílové koloně s náplní C₁₈. Konečné rozdělení a stanovení se provede technikou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC), za použití reverzní fáze a postkolonové derivatizace jodem a fluorescenční detekce.

10.16 Stanovení obsahu arsenu

Tato metoda je uvedena v Official Methods of Analysis AOAC 986.15

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení arsenu v krmivech.

2. Princip

Ve vzorku se po rozkladu kyselinou dusičnou v uzavřeném systému stanoví obsah arsenu metodou atomové absorpční spektrometrie s hydridovou technikou.

10.17 Stanovení gossypolu

Do této metody byla zapracována doporučení EU uvedená v Official Journal of the European Communities no. L 123, 29/05/72

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení obsahu volného a celkového gossypolu a chemicky příbuzných sloučenin v koncentraci nad 20 ppm v baviníku a krmných směsích, které baviník obsahují.

2. Princip

Gossypol se extrahuje buď za přítomnosti 3-aminopropan-1-ol (při stanovení volného gossypolu) nebo dimethyformamidu (při stanovení celkového gossypolu). Gossypol je reakcí s anilínem převeden na gossypol-dianilin a absorbance roztoku je měřena při 440 nm.

3. Chemikálie

3.1 Směs propan-2-ol (dále jen propanol) a hexan, roztok (40:60) (poznámka 8.1)

3.2 Rozpouštědlo A

Příprava: Do 1000 ml odměrné baňky se nalije asi 500 ml směsi propanol-hexan (3.1), 2 ml 3-aminopropan-1-olu, 8 ml ledové kyseliny octové a 50 ml vody. Doplní se po rysku směsí propanol-hexan (3.1) a promíchá.

Rozpouštědlo A je stálé jeden týden.

3.3 Rozpouštědlo B

Příprava: Do 100 ml odměrné baňky se napipetují 2 ml 3-aminopropan-1-olu a 10 ml ledové kyseliny octové. Vychladí se na laboratorní teplotu a doplní se po rysku n,n dimethylformamidem a promíchá.

Rozpouštědlo B je stálé jeden týden.

3.4 Anilin

Příprava: Pokud absorbance anilinu (slepý pokus) přesáhne 0,022 musí se anilin destilovat přes zinkový prach, přičemž nejméně prvních 10 % destilované frakce se odlije. Při skladování se v chladničce, v tmavé zbrusové láhvi vydrží tato chemikálie několik měsíců

3.5 Gossypol, standardní roztok A

Příprava: Do 250 ml odměrné baňky se naváží 27.9 mg octanu gossypolu, rozpustí se, doplní po rysku rozpouštědlem A (3.2) a promíchá. Do další 250 ml odměrné baňky se odpipetuje 50 ml standardního roztoku, doplní se rozpouštědlem A (3.2) po rysku a promíchá. Před použitím se nechá hodinu stát při laboratorní teplotě.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0.02 mg gossypolu.

3.6 Gossypol standardní roztok B
Příprava: Do 50 ml odměrné baňky se naváží 27.9 mg octanu gossypolu, rozpustí se, doplní po rysku rozpouštědlem B (3.3) a promíchá.

1 ml tohoto roztoku obsahuje 0.5 mg gossypolu.

Gossypol standardní roztok A a gossypol standardní roztok B jsou stálé 24 hodin, pokud jsou chráněny před světlem.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Třepačka laboratorní nebo mixér přibližně 35 ot/min

4.2 Spektrofotometr s příslušenstvím (kyveta o optické délce 10 mm)

4.3 Lázeň vodní s termostatem

5. Postup

5.1 Zkušební vzorek Navažované množství zkušebního vzorku závisí na předpokládaném obsahu gossypolu. Je vhodnější pracovat s malým množstvím zkušebního vzorku a co největším podílem filtrátu tak, aby obsah gossypolu byl dostatečný pro přesné spektrofotometrické měření.

Pro stanovení volného gossypolu v bavlínku by neměla navážka přesáhnout 1 g, v krmných směsích může být 5 g. Ve většině případů je vhodný podíl filtrátu 10 ml (měl by obsahovat 50–100 µg gossypolu).

Pro stanovení celkového gossypolu by měla být navážka 0.5 až 5 g, takže 2 ml filtrátu by měly obsahovat 40–200 µg gossypolu.

5.2 Sestrojení kalibračního grafu

5.2.1 Volný gossypol

Do dvou řad po pěti odměrných baňkách na 25 ml se odpipetuje diferencovaně 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu A (3.5) a je-li třeba doplní se na přesný objem 10 ml rozpouštědlem A (3.2). Do jedné řady baňek se obsahy doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají. Do druhé řady baňek se odpipetuje přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se po dobu 30 minut zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3), po ochlazení na laboratorní teplotu se doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají. Pak se ponechají jednu hodinu stát.

5.2.1.1 Kalibrační roztoky druhé řady se měří na spektrofotometru (4.2) proti kalibračním roztokům první řady v kyvetách optické délky 10 mm při vlnové délce 440 nm.

Z naměřených hodnot absorbancí a jim odpovídajících koncentrací se sestaví kalibrační graf.

5.2.2 Celkový gossypol

Do pěti odměrných baňek na 50 ml se diferencovaně odpipetuje 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 a 10,0 ml standardního roztoku gossypolu B (3.6), do šesté baňky na 50 ml se odpipetuje 10 ml rozpouštědla B (3.3) a tímtež se doplní je-li třeba kalibrační roztoky přesně na objem 10 ml. Baňky se po dobu 30 minut zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3), po ochlazení na laboratorní teplotu se doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají.

Z každé z těchto odměrných baňek se odpipetuje do dvou řad odměrných baňek na 25 ml vždy po 2 ml těchto roztoků. Jedna řada těchto kalibračních roztoků se doplní směsí propanol–hexan

(3.1) po rysku a obsahy se promíchají. Do druhé řady kalibračních roztoků se přidá přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se po dobu 30 minut zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3), po ochlazení na laboratorní teplotu se doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají. Pak se ponechají stát po dobu jedné hodiny.

Dále se postupuje podle 5.2.1.1.

5.3 Vlastní provedení

5.3.1 Volný gossypol

5.3.1.1 Do širokohrdlé kuželové baňky na 250 ml na jejíž dno bylo přidáno drcené sklo se odváží příslušné množství zkušebního vzorku (viz 5.1). Do této baňky se odpipetuje přesně 50,0 ml rozpouštědla A (3.2), baňka se uzavře a vytřepává nebo mixuje (4.1) po dobu jedné hodiny. Pak se obsah baňky filtruje suchým, středně hustým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. Během filtrace se filtrační nálevka přikryje hodinovým krycím sklem. Do dvou odměrných baňek (označí se A a B) na 25 ml se odpipetuje 2krát přesně stejný objem filtrátu, obsahující s ohledem na očekávaný obsah gossypolu ve zkoušeném vzorku, 50 až 100 µg gossypolu a pokud je třeba, doplní se na rozpouštědlem A (3.2) na objem přesně 10 ml. Roztok v baňce A se pak doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchá (referenční roztok A).

Do dalších dvou odměrných baňek na 25 ml (označí se C a D) se odpipetuje přesně 10 ml rozpouštědla A (3.2). Baňka C se doplní směsí propanol–hexan (3.1) a promíchá (referenční roztok C). Do odměrných baňek B a D se odpipetuje přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se zahřívají po dobu 30 minut na vroucí vodní lázni (4.3) (vybarvení roztoků), ochladí na laboratorní teplotu, doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají. Potom se nechají asi 1 hod. stát.

5.3.1.2 Na spektrofotometru (4.2) se měří absorbance roztoku D proti C (slepý pokus) a absorbance roztoku B proti roztoku A (vzorek) v kyvetách optické délky 10 mm při vlnové délce 440 nm. Od absorbance vzorku se odečte absorbance slepého pokusu a rozdíl absorbancí (korigovaná absorbance = A) je základem výpočtu obsahu volného (celkového) gossypolu. Množství gossypolu se zjistí buď pomocí specifických absorbančních koeficientů (viz 6.1), nebo z kalibračního grafu (viz 6.2).

5.3.2 Celkový gossypol

Do odměrné baňky na 50 ml se odváží takové množství zkušebního vzorku které obsahuje, s ohledem na očekávaný obsah gossypolu ve zkoušeném vzorku, asi 1 až 3 mg gossypolu, přidá se přesně 10 ml rozpouštědla B (3.3) (roztok vzorku). Do další odměrné baňky na 50 ml se přidá přesně 10 ml rozpouštědla B (slepý pokus). Obě baňky se zahřívají na vroucí vodní lázni (4.3) po dobu 30 minut, potom se ochladí na laboratorní teplotu a obě baňky se doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají. Po 10 až 15 minutách (usazení) se obsah baňek filtruje suchým, středně hustým filtrem do suchých kádinek, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje (referenční roztoky).

Do dvou odměrných baňek na 25 ml se z filtrátu roztoku vzorku odpipetuje přesně po 2 ml (označí se A a B) a z filtrátu slepého pokusu do dalších dvou odměrných baňek na 25 ml rovněž po 2 ml (označí se C a D). Roztok v baňkách A a C se doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají. K roztokům v baňkách B a D se přidá přesně po 2 ml anilinu (3.4), baňky se vloží na 30 minut do vroucí vodní lázni (4.3) (vybarvení roztoků), po ochlazení na laboratorní teplotu se doplní směsí propanol–hexan (3.1) po rysku a promíchají. Potom se ponechají asi 1 hodinu stát.

Dále se postupuje podle 5.3.1.2.

6. Výpočet a vyjádření výsledku

6.1 Ze specifických absorbančních koeficientů

Obsah volného gossypolu (X), nebo celkového gossypolu (Y) v g/kg se vypočítá podle vzorců:

$$X = \frac{12\,500 \cdot A}{625 \cdot m \cdot F}$$

$$Y = \frac{12\,500 \cdot A}{600 \cdot m \cdot F}$$

kde A je korigovaná hodnota absorpance roztoku vzorku
m navážka zkušební vzorku v g
F faktor ředění
625 specifický absorbanční koeficient pro volný gossypol ($A^{440\text{ nm}}$)
600 specifický absorbanční koeficient pro celkový gossypol ($A^{440\text{ nm}}$)

6.2 Z kalibračního grafu

Obsah volného (celkového) gossypolu v mg/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1 \cdot F \cdot 1000}{m_0}$$

kde m_1 je množství gossypolu zjištěné z kalibračního grafu v mg
 m_0 navážka zkušební vzorku v g
F faktor ředění

Výsledkem stanovení je aritmetický průměr výsledků dvou souběžně provedených stanovení, které splňují podmínku opakovatelnosti a vyjadřuje se s přesností na celé mg/kg.

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit při obsahu:

do 500 mg/kg	15 % relat.
od 500 do 750 mg/kg	75 mg/kg
nad 750 mg/kg	10 % relat.

8. Poznámky

8.1 Hexan i propanol jsou nebezpečnými hořlavinami 1.třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné zachovávat bezpečnostní pravidla.

11.1 Zkoušení jakosti siláží

1. Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro zkoušení jakosti konzervace silážovaných krmiv. Uvedené metody zkoušení jsou použitelné pro všechny druhy silážovaných krmiv.

2. Princip

Přípravi se základní vodní výluh vzorku siláže a z něho chemickými a fyzikálně-chemickými metodami stanovení se zjišťují jednotlivé jakostní znaky. Ostatní zkoušky se provádějí ze vzorku upraveného podle 5.2.

3. Chemikálie

3.1 Toluén (poznámka 8.1)

3.2 Hydroxid draselný, odměrný roztok $c(\text{KOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$

3.3 Formaldehyd, roztok 200 g/l, čerstvě zneutralizovaný na pH = 8,5 nebo indikátor fenolftalein

3.4 Uhličitan draselný, roztok 20 g/l

3.5 Kyselina boritá, roztok 20 g/l

3.6 Kyselina sírová, odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,025 \text{ mol/l}$

3.7 Glycerin

3.8 Indikátor směsný – methylová červená a metylenová modř Příprava: Smíchají se stejné objemy 0,2% ethanolického roztoku methylové červené a 0,1% ethanolického roztoku methylenové modře, připraveného za slabého zahřívání.

3.9 Chlorid amonný, základní standardní roztok

Příprava: Do odměrné baňky na 1 000 ml se odváží 3,1412 g chloridu amonného, předem vysušeného při 103 °C (2 hodiny) a v exsikátoru ochlazeného, rozpustí se ve vodě, toutéž doplní po rysku a promíchá.

1 ml tohoto standardního roztoku obsahuje 1 mg amoniaku vyjádřeného jako NH_3

3.10 Methylisobutylketon (dále jen „MIBK“) – vnitřní standard Příprava a uchování: MIBK redestilovaný s bezvodým síranem sodným se uchovává na tmavém místě, či v tmavé reagenční láhvi. Je nepřipustné jej míchat do zásoby s oxidačním činidlem síranem ceričitým.

3.11 Síran ceričitý, roztok 100 g/l – oxidační činidlo

Příprava: Do odměrné baňky na 50 ml se odváží 5,0 g tetrahydrátu síranu ceričitého ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$), přidá se 5 ml roztoku kyseliny sírové o koncentraci asi $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 5 \text{ mol/l}$, promíchá, po rozpuštění se doplní vodou po rysku a opět promíchá. Případně vzniklá sraženina po ustání jeden den se odfiltruje středně hustým filtrem. Roztok, který slouží k oxidaci kyseliny mléčné na acetaldehyd, je stálý asi jeden měsíc.

3.12 Síran sodný, bezvodý

3.13 Diethylether (poznámka 8.1)

3.14 Kyselina stearová

3.15 TWEEN-80 (sorbitanová fáze)

3.16 Kyselina fosforečná, min 65 %

3.17 Přednáplň chromatografické kolony – pórovina (křemičitý nosič s 15 % kyseliny fosforečné)

Příprava: 100 g póroviny o zrnitosti 0,10 až 0,20 mm se přelije 15 g kyseliny fosforečné a promíchá. Dobře promíchaná směs se suší při teplotě 110 °C po dobu 3 až 5 hodin. Po vychladnutí se inkrust rozetře a plní do prachovnice. Preparát je silně hygroskopický.

Tato přednáplň tvoří v délce asi 4 cm začátek chromatografické kolony (poznámka 8.2).

3.18 Náplně chromatografické kolony (poznámka 8.3)

- Chromosorb W-AW 80/100s s 10 % SP-1200 a 1 % kyseliny fosforečné
- Separon SDA o zrnitosti 0,125 až 0,20 mm
- Carbopack B-DA se 4 % Carbowax 20 M 80/100
- Chromaton N AW-HMDS s 5 % TWEEN-80 a 10 % kyseliny stearové

Příprava: 10 % g Chromatonu o zrnitosti 0,200 až 0,250 mm se přelije asi 30 ml směsí toluen-diethylether 25 + 5 obsahující 0,5 g TWEEN-80 a 1,0 g kyseliny stearové. Získaná kašovitá hmota se velmi jemně promíchá a jakmile začne tuhnout, dosuší se v digestoři např. infralampou. Konečné dosušení se provede při 120 °C.

3.19 Kyselina chlorovodíková, odměrný roztok $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ připravená izotermickou destilací (poznámka 8.4)

3.20 Kyselina octová, odměrný roztok $c(\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}) = 0,1 \text{ mol/l}$ připravená izotermickou destilací (poznámka 8.4)

3.21 Kyselina e-amino-kapronová

3.22 Kyselina n-kapronová

3.23 Hydroxyethylcelulosa (dále jen „HEC“), roztok 10 g/l nebo

3.24 Polyvinylalkohol (dále jen „PVA“), roztok 10 g/l

3.25 1,1,1-tris-hydroxyaminomethan (dále jen „TRIS“)

3.26 Voda redestilovaná

3.27 Vedoucí elektrolyt

Příprava: Do odměrné baňky na 200 ml se odváží 0,440 g kyseliny e-amino-n-kapronové, pipetou odměří 20 ml odměrného roztoku kyseliny chlorovodíkové a 10 ml roztoku HEC nebo PVA. Odměrná baňka se doplní redestilovanou vodou po rysku a promíchá. Takto upravený elektrolyt se převede do kádinky na 400 ml a malými přídávky kyseliny e-amino-n-kapronové se upraví pomocí pH metru na hodnotu $4,50 \pm 0,02$. Potom se roztok převede do nádoby z plastické hmoty a dobře uzavřený se uchovává v chladničce.

3.28 Koncový elektrolyt

Příprava: Do kádinky na 250 ml se pomocí malé pipety odváží 0,11 až 0,12 g kyseliny n-kapronové, pipetou se odměří 100 ml redestilované vody, kádinka se umístí na elektromagnetickou míchačku, vloží se míchadélko a zapne ohřev. Roztok se za stálého míchání mírně zahřívá až do úplného rozpuštění kyseliny. Po ochlazení na laboratorní teplotu se roztok malými přídávky TRISu pomocí pH metru upraví na $\text{pH} = 7,60 \pm 0,02$. Upravený roztok se převede do nádoby z plastické hmoty a dobře uzavřený se uchovává v chladničce.

4. Přístroje a pomůcky

4.1 Mixér vhodné konstrukce

4.2 pH-metr vhodné konstrukce s příslušenstvím pro potenciometrickou titraci

4.3 Míchačka elektromagnetická s míchadélky

4.4 Byreta na 25 ml, dělená po 0,05 ml

4.5 Misky dle Conweye z vhodného materiálu (sklo, plexisklo apod.), vnitřního průměru 100 mm, průměru vnitřní části 40 mm a hloubky misky 15 mm

4.6 Mikrobýreta na 2 a 5 ml

4.7 Chromatograf plynový s vyhodnocovacími zařízeními

4.8 Kolona chromatografická s parametry

- materiál sklo
- délka 240 cm
- světlost 3 mm
- detekce FID
- nástřik 1 až 2 μl
- nosný plyn dusík
- průtok plynu 35 ml/min
- teplota 175 °C až 188 °C (podle použité náplně)

4.9 Mikrodávkořač na 5 μl

4.10 Mikropipety 10 a 20 μl

4.11 Lahvičky reagenční na 10 ml s upraveným uzávěrem

Úprava: Do šroubového uzávěra lahvičky z plastické hmoty se provrtá otvor o průměru 6 až 8 mm a utěsní se vložením kotoučku silikonové pryže pod jeho uzávěr. Odběr vzorku k nástřiku do kolony se provede mikrodávkořačem přes vzniklé septum.

4.12 Přístroj pro kapilární izotachofóru vhodné konstrukce (dále jen „ITP analyzátor“)

4.13 pH metr vhodné konstrukce s příslušenstvím

4.14 Nádoby z plastické hmoty na 100 a 250 ml

4.15 Konzistometr, přístroj pro měření stlačitelnosti s příslušenstvím

5. Postup

5.1 Odběr vzorků a jejich předání ke zkoušení

Mimo obecné zásady pro odběr vzorků, kdy odebrané vzorky siláží se hermeticky uzavírají do nepropustných obalů z inertních hmot (polyetylén, polyvinylchlorid, sklo apod.) se musí vzorky odebírat za takových teplotních i časových podmínek, aby během transportu do laboratoře, nemohlo dojít ke kvalitativním změnám.

Zápis o odběru vzorku je nutno doplnit o následující údaje:

- způsob a technika sběru porostu na siláž
- datum začátku a ukončení silážování
- délka řezanky
- případně použité konzervační přísady nebo jiná aditiva a jejich dávkování
- způsob stlačování a zakrytí
- smyslové posouzení v místě odběru

5.2 Úprava vzorku pro zkoušení

Vzorek siláže se po příjmu do zkušební laboratoře smyslově posoudí. Po smyslovém posouzení se ihned na nepropustné inertní podložce dokonale promíchá a pořežáním se upraví na velikost částic pod 20 mm. Z takto upraveného vzorku se po opětovném promíchání odebere po množství pro stanovení vlhkosti, jakosti konzervace, event. i pro stanovení výživné hodnoty (pro řízkové siláže i pro stanovení sítelnosti). Pokud ve vyjímáních případech nelze vzorek ihned upravit pro zkoušení, může se uchovat v původním stavu nejvýše po dobu 24 hodin v chladničce při teplotě 3 °C až 5 °C, hermeticky uzavřený v inertním obalu.

5.3 Příprava vodního výluhu siláže (zásobní roztok)

Do nádoby mixéru se odváží ($50 \pm 0,1$) g vzorku upraveného podle 5.2, přidá se přesně 450 ml vody, vloží do mixéru (4.1) a po dobu 4 minut se intenzivně mixuje při vysokých otáčkách. U vzorků siláže ze zavadnuté píce se před vlastní mixací nechá vzorek nasáknout po dobu asi 5 minut přidanou vodou. Po provedené mixaci se suspenze filtruje suchým řídkým filtrem do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje.

Pokud z časových důvodů není možno výluh dále zpracovat (použit pro další stanovení), konzervuje se přidávkou 0,5 ml toluenu (3.1) již před filtrací. V případě, že některé ze stanovení z tohoto výluhu bude provedeno metodou plynové chromatografie, nelze konzervaci použít. Výluh se uchovává v chladničce a to nejdéle do druhého dne.

Celkové množství výluhu se podle obsahu vlhkosti zkoušeného vzorku pohybuje většinou od 475 ml do 490 ml. Odchylka od 500 ml, uvažovaných při výpočtech např. silážních kyselin je, vzhledem k charakteru zkoušeného materiálu a množství zkušebního vzorku pro přípravu výluhu, v podstatě zanedbatelná (poznámka 8.5).

Přesné stanovení celkového množství výluhu siláže v ml (X), po provedeném stanovení obsahu vlhkosti zkoušeného vzorku, se vypočítá podle vzorce:

$$X = 450 + \frac{m \cdot V}{10^3}$$

kde V je obsah vlhkosti zkoušeného vzorku v g/kg
m hmotnost zkušebního vzorku v g

Pro výpočet výsledků silážních kyselin se jako faktor F (faktor ředění) dosadí buď

$$\frac{X}{20} \quad (\text{exaktně}), \text{ nebo}$$

$$\frac{500 \cdot K}{20} \quad (\text{zpřesnění}) \quad (\text{poznámka 8.5})$$

5.4 Stanovení hodnoty pH a formové titrace

Aktivní kyselost se stanoví jako pH vodního výluhu siláže elektrometricky a hodnota formolové titrace se stanoví po ztitrování volné kyselosti a přidání formaldehydu titračně alkalimetry.

5.4.1 Provedení

Do kádinky vhodného objemu se odpipetuje 100 ml filtrátu vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3, vloží se elektrody připojené na pH-metr (4.2) a změří se hodnota pH s přesností nejméně na 0,1 pH.

Potom se kádinka se výluhem umístí na elektromagnetickou míchačku (4.3), vhodí míchačkelo a obsah kádinky se za stálého míchání titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) do hodnoty pH = 8,5. Tato spotřeba se nezaznamenává.

Ke ztitrovanému roztoku se přidá 10 ml čerstvě zneutralizovaného roztoku formaldehydu (3.3), přičemž hodnota pH poklesne, a za stálého míchání se z naplněné byrety opět titruje odměrným roztokem hydroxidu draselného (3.2) do hodnoty pH = 8,5 (spotřeba V).

5.4.2 Výpočet a vyjádření výsledku

Hodnota formolové titrace, vyjádřená jako NH_3 , v g/kg (Z) se vypočítá podle vzorce:

$$Z = \frac{17,03 \cdot V \cdot C}{m}$$

kde V je spotřeba odměrného roztoku hydroxidu draselného v ml

C přesná koncentrace odměrného roztoku hydroxidu draselného v mol/l

m hmotnost navážky alikvotního podílu zkušebního vzorku v g

5.5 Stanovení obsahu amoniaku a výpočet stupně proteolýzy

Amoniak uvolněný ve slabě alkalickém prostředí účinkem uhličitánu draselného se po difúzi v roztoku kyseliny borité stanoví titračně acidimetry.

Stupeň proteolýzy se vypočítá z obsahu amoniaku, hodnoty formolové titrace, vyjádřené jako NH_3 , a obsahu dusíkatých látek, vyjádřených jako dusík.

5.5.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 40,0 a 50 ml základního standardního roztoku chloridu amonného (3.9), což v 10 ml kalibračních roztoků odpovídá koncentracím 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 a 5,0 mg amoniaku vyjádřeného jako NH_3 . Každá z odměrných baněk se doplní po rysku vodou a promíchá. Dále se všechny kalibrační roztoky zpracují podle 5.5.2.

Ze získaných spotřeb odměrného roztoku kyseliny sírové (3.6) na kalibrační roztoky a jim odpovídajících koncentrací amoniaku se sestrojí kalibrační graf.

5.5.2 Vlastní provedení

Do mezikruží misky podle Conweye (4.5) se odpipetuje 10 ml filtrátu vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3, resp. kalibračního roztoku, připraveného podle 5.5.1. Do střední části misky se odpipetuje 3 ml roztoku kyseliny borité (3.5) a do mezikruží k odpipetovanému filtrátu vodního výluhu (kalibračního roztoku) se odpipetuje 1 ml roztoku uhličitánu draselného (3.4), miska se rychle hermeticky uzavře víčkem, přičemž k utěsnění se použije malé množství glycerínu (3.7). Po opatrném promíchání kroužením (obsahy částí misky se nesmějí smíchat) se miska s obsahem ponechá stát při laboratorní teplotě asi 12 hodin, nejlépe přes noc. Potom se miska opatrně otevře, do střední části se přidá indikátor (3.8) a ihned titruje odměrným roztokem kyseliny sírové (3.6) do právě vzniklé barevné změny.

Ze získané spotřeby odměrného roztoku kyseliny sírové se zjistí z kalibračního grafu odpovídající množství amoniaku, vyjádřeného jako NH_3 .

5.5.3 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah amoniaku, vyjádřeného jako NH_3 v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{m_1}{m_0}$$

Stupeň proteolýzy v % (Y) se vypočítá podle vzorce:

$$Y = \frac{5,147 \cdot 10^4 \cdot (X + Z)}{N \cdot S}$$

kde Z je výsledek hodnoty formolové titrace, zjištěné podle 5.4, vyjádřené jako NH_3 v g/kg

m_1 množství amoniaku, vyjádřené jako NH_3 , zjištěné z kalibračního grafu v mg

N obsah dusíkatých látek, stanovených podle přílohy 9, metoda 2.1 a vyjádřených jako dusík v g/kg

S obsah sušiny, stanovený podle přílohy 9, metoda 1.1 v g/kg

m_0 hmotnost alikvotního podílu zkušební vzorku, odebraného ke stanovení v g

5.6 Stanovení obsahu alkoholu

Alkoholy se stanoví z vodního výluhu siláže metodou plynové chromatografie. Uvedeným způsobem lze stanovit i nižší karboxylové kyseliny, aceton a úpravou podmínek i nižší ketony, aldehydy a estery, charakterizující chuťové vlastnosti krmiva.

5.6.1 Provedení

Do reagenční lahvičky (4.11) se odpipetuje 2 ml vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3, přidá se mikropipetou 10 μl MIBK (3.10), uzavře a promíchá. Pokud je nutné přítomnou kyselinu mléčnou převést na acetaldehyd, což se doporučuje s ohledem na prodloužení životnosti chromatografické kolony (poznámka 8.6), přidá se 1 až 2 ml oxidačního činidla roztoku síranu ceričitého (3.11). Po 15 minutách se provede nástřik do předem připravené kolony (4.8) a pořídí se chromatografický záznam (4.7).

Přítomné látky eluují v následujícím pořadí:

1. nízkovroucí estery, ketony a aldehydy ("chuťové látky")
2. acetaldehyd (oxidační produkt kyseliny mléčné)
3. ethylalkohol
4. aceton
5. n-propylalkohol
6. kyselina mravenčí (záznam s detektorem FID málo citlivý)
7. kyselina octová
8. n-butylalkohol
9. kyselina propionová
10. standard MIBK
11. kyselina isomáselná
12. kyselina n-máselná
13. kyselina isovalerová
14. kyselina n-valerová (poznámka 8.7)

5.6.2 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah ethylalkoholu, event. dalších látek se provede metodou vnitřního standardu obvyklou technikou.

5.7 Stanovení obsahu silážních kyselin

Silážní kyseliny se stanoví z připraveného filtrátu vodního výluhu siláže přímo metodou kapilární izotachoforézy způsobem srovnání se standardem.

5.7.1 Sestrojení kalibračního grafu

Do sady odměrných baněk na 100 ml se diferencovaně odpipetuje 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 a 7,0 ml odměrného roztoku kyseliny octové (3.20), což odpovídá koncentracím kalibračních roztoků ve 100 ml 0,5 · 10⁻³ mol/l až 7 · 10⁻³ mol/l, každá z baněk se doplní redestilovanou vodou (3.26) po rysku a promíchá.

Připraví se ITP analyzátor (4.12) pro měření, podle příslušného návodu k němu a jednotlivé kalibrační roztoky (roztoky zkoušeného vzorku) se postupně dávkuje pomocí dávkovací kohoutu na začátek separační kolony do rozhraní mezi vedoucí a koncový elektrolyt. Odezva migrace aniontu kyseliny octové (jednotlivých kyselin) se zaznamenává dvouliniovým zapisovačem nebo jiným vhodným registračním zatříděním.

Tímto způsobem se provádí kalibrace pomocí roztoku kyseliny octové (3.20). Přepočet na ostatní stanovované kyseliny, které se v použitém elektrolytickém systému dělí v pořadí kyselina šťavelová, mravenčí, pyrohroznová, mléčná, jantarová, octová, propionová, kyseliny máselné a valerové je uveden v tabulce 1.

Z naměřených vln lineárního záznamu nebo vzdálenosti piků křivek diferenciálního záznamu a příslušných koncentrací kalibračních roztoků se sestojí graf (poznámka 8.8).

5.7.2 Vlastní provedení

Z filtrátu vodního výluhu siláže, připraveného podle 5.3 se odpipetuje 20,0 ml do odměrné banky na 100 ml, doplní redestilovanou vodou (3.26) po rysku a promíchá. Takto zředěný výluh se dávkuje do ITP analyzátoru (4.12) tak, jak je uvedeno v 5.7.1 a dále se postupuje podle tohoto článku.

Z naměřených hodnot délky vln z lineárního záznamu nebo vzdáleností piků křivek diferenciálního záznamu v mm se zjistí z kalibračního grafu koncentrace odpovídající kyselině octové v mmol/l (C_1).

5.7.3 Výpočet a vyjádření výsledku

Obsah příslušné silážní kyseliny v g/kg (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = \frac{F \cdot M_r \cdot C_1 \cdot C_2}{K_r}$$

kde F je ředění filtrátu vodního výluhu vzorku siláže
 M_r relativní molekulová hmotnost příslušné kyseliny (viz tabulka 1)

C_1 koncentrace v mmol/l zjištěná z kalibračního grafu

C_2 koncentrace odměrného roztoku kyseliny octové v mol/l použité pro sestrojení kalibračního grafu

K_r přepočtový faktor

Protože pro každou kyselinu jsou hodnoty F, M_r , K_r , C konstantní, pak výpočtový vzorec přejde na:

$$X = 10 \cdot C_1 \cdot F_k$$

kde F_k je relativní faktor uvedený pro každou kyselinu v tabulce 1

Poloha zón jednotlivých kyselin se určí pomocí modelové směsi silážních kyselin, protože mimo nich se mohou v záznamu objevit i jiné kyseliny jako např. sírová či fosforečná resp. anionty těchto kyselin. Každá kyselina (aniont kyseliny) má v záznamu vždy stejnou polohu, která pro pracovní soustavu charakterizuje relativní výšku zóny (viz tabulka 1).

Relativní faktor F_K je konstantní, pokud nebyla změněna koncentrace filtrátu vodního výluhu vzorku siláže (např. větším zředěním).

Tabulka 1 Tabelované hodnoty relativní molekulové hmotnosti, relativních faktorů a zón jednotlivých kyselin popř. elektrolytů

Kyselina	M_r	K_r	F_K	Relativní výška zóny
Vedoucí elektrolyt	—	—	—	0
šťavelová	90,036	1,525	0,29520	7,1
mravenčí	46,026	0,885	0,26003	15,3
pyrohroznová	88,062	1,000	0,44031	23,5
mléčná	90,078	1,055	0,42691	41,0
jantarová	118,088	1,260	0,46860	46,5
octová	60,052	1,000	0,30026	60,0
propionová	74,078	1,050	0,35275	78,0
máslaná	88,104	1,000	0,40047	84,0
valerová	102,130	1,150	0,44404	90,5
Koncový elektrolyt	—	—	—	100,0

5.8 Stanovení stupně stlačitelnosti řízkových siláží

Stupeň stlačitelnosti se stanoví po 15 minutovém zatížení definovaného množství vzorku siláže na konzistometru za definovaných podmínek jako rozdíl výšek vrstvy před a po stlačení.

5.8.1 Provedení

Na základní desku, umístěnou na vodorovné ploše konzistometru (4.15) se vloží podložná miska, válec s děrovanou přičkou a skleněný válec. Do tohoto skleněného válce se odváží (250 ± 1) g zkoušeného vzorku siláže, připraveného podle 5.2, zkušební vzorek se rovnoměrně rozvrství po celé ploše děrované přičky, která tvoří dno válce. Výška této vrstvy se zjistí na kalibrované straně válce (d_1). Potom se volně nasadí děrovaný píst s vodící tyčinkou a víčko, které se přichytí pružinami. Vodící tyčinka se přidrží tak, aby píst byl přímo nad zkoušeným vzorkem a nasadí se obě závaží. Pak se vodící tyčinka se závaží uvolní a od tohoto okamžiku se počítá čas. Po 15 minutovém stlačování se proti spodní hraně děrovaného pístu zjistí výška hladiny stlačeného zkoušeného vzorku (poznámka 8.9).

5.8.2 Výpočet a vyjádření výsledku

Stupeň stlačitelnosti siláže v mm (X) se vypočítá podle vzorce:

$$X = d_1 - d_2$$

kde d_1 je výška vrstvy nestlačeného zkušební vzorku v mm s přesností na 0,1 mm

d_2 výška vrstvy zkušební vzorku po stlačení v mm s přesností na 0,1 mm

5.9 Stanovení výživné hodnoty

Výživná hodnota siláže se stanovuje výpočtem z nalezených hodnot obsahu dusíkatých látek (stanovených podle Přílohy 9, část 2.1), popele (stanoveného podle Přílohy 9, část 6.1), vlákniny (stanovené podle Přílohy 9, část 4.1), BNLV (vypočtené podle Přílohy 9, část 5.5) a obsahu vlhkosti — sušiny (stanovené podle Přílohy 9, část 1.1).

U obsahu vlhkosti — sušiny se pro účely přesných bilančních pokusů provádí korekce, vzhledem k úniku těkavých látek za podmínek metody

Obsah korigované sušiny v g/kg siláže se vypočítá podle vzorců: pro siláže do pH = 4,2 (X), od pH = 4,3 do 4,5 (Y) a nad pH = 4,5 (Z)

$$X = S + 0,92 \cdot F + 0,89 \cdot TSK + 0,31 \cdot KM + 0,83 \cdot NH_3 + A$$

$$Y = S + 0,93 \cdot F + 0,93 \cdot TSK + 0,24 \cdot KM + 0,85 \cdot NH_3 + A$$

$$Z = S + 0,98 \cdot F + 0,86 \cdot TSK + 0,15 \cdot KM + 0,93 \cdot NH_3 + A$$

kde S je obsah sušiny v g/kg

F obsah kyseliny mravenčí v g/kg

TSK součet obsahů těkavých silážních kyselin (octové, propionové, máslané) v g/kg

KM obsah kyseliny mléčné v g/kg

A obsah alkoholu v g/kg

NH_3 obsah amoniaku, vyjádřeného jako NH_3 v g/kg

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Výsledkem každého stanovení je aritmetický průměr dvou výsledků souběžně provedených stanovení, které splňují podmínky opakovatelnosti a vyjadřují se s přesností u stanovení:

pH	na 0,05
hodnoty formolové titrace	na 0,1
amoniaku jako NH_3	na celé jednotky
silážních kyselin	na celé jednotky
stlačitelnosti siláží	na 0,1 mm
stupně proteolýzy	na 0,01

7. Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma paralelními stanoveními prováděnými na stejném vzorku nesmí překročit u stanovení:

pH	0,05
hodnoty formolové titrace	0,1
amoniaku jako NH_3	0,1
alkoholu	zatím neuvedena
silážních kyselin	1,0
stlačitelnosti siláží	zatím neuvedena

8. Poznámky

8.1 Toluen a diethylether jsou nebezpečné hořlaviny I. třídy a proto při jakékoli manipulaci s nimi je nutné dodržovat bezpečnostní pravidla.

8.2 Přednáplň je nutno vyměnit asi po 50 provedených stanoveních.

8.3 Jsou uvedeny alternativní možnosti volby a) až d).

8.4 Izotermická destilace se provádí následovně: Do větší prachovnice se zábrusem a širokým hrdlem nebo jiné prostorné nádoby se zábrusem (např. exsíkátor bez náplně) se odlije asi do 1/4 její výšky příslušná kyselina (látky) a vloží do ní menší nádobka do poloviny naplněná redestilovanou vodou. Po uzavření vnější nádoby se nechá stát při laboratorní teplotě asi 14 dní, přičemž dojde k difúzi par kyseliny (látky) do redestilované vody. Po uplynutí této doby se menší nádobka s difundovanou kyselinou (látkou) vyjme a její koncentrace se určí titračně.

Tímto způsobem se připraví příslušná kyselina (látky) velmi značné čistoty a z ní se připravují pomocí redestilované vody potřebné superčisté roztoky.

8.5 Pro určité zpřesnění celkového množství vodního výluhu siláže se 500 ml vynásobí pro siláže koeficientem $K = 0,98$ a pro siláže ze zavadlé píce koeficientem $K = 0,95$.

8.6 Tato oxidační úprava mění přítomnou kyselinu mléčnou na acetaldehyd v první části chromatografického záznamu.

Neprovede-li se oxidace kyseliny mléčné na acetaldehyd, eluuje se kyselina mléčná v některých případech až za kyselinou isovalerovou. Ostatní přítomné látky (alkoholy, aceton, monokarboxylové kyseliny) jsou v uvedeném oxidačním prostředí stále nejméně 2 hodiny.

8.7 Eventuelně přítomná kyselina pyrohroznová se objevuje na chromatografickém záznamu před kyselinou isomáselnou.

8.8 Kalibrační graf má obecnou platnost, pokud nedojde k žádné změně pracovních podmínek. Dodržením pracovních podmínek se rozumí zejména:

a) konstantní příprava a ředění filtrátu vodního výluhu vzorků siláže

- b) použití stejného kapilárního systému a přístroje ITP
- c) stejný způsob dávkování (tj. konstantní množství roztoku zkoušeného vzorku identický dávkovací kohout)
- d) stejný elektrolytický systém (vedoucí a koncový elektrolyt)
- e) konstantní hodnota hnacího proudu
- f) stejný způsob registrace záznamu odezvy kyselin (rychlost chodu zapisovače)
- g) stejný objem při dávkování roztoku vzorku i kalibračního roztoku

8.9 Veškerá odlisovaná šťáva a to jak nad horní vrstvou pístu, tak i na podložní misce se může odměřit kalibrovaným válcem a zjistit objem odlisované šťávy, podle něhož lze usuzovat na fyzikální vlastnosti řízků, především na stupeň poutání vody resp. koloidní vlastnosti vody.

Ing. Jiří Zedník
ředitel odboru krmiv ÚKZÚZ, v. r.

Ministerstva zemědělství České republiky pro organizaci, řízení a kontrolu požární ochrany

Ministerstvo zemědělství jako ústřední orgán státní správy (dále jen Ministerstvo) vydává v souladu s § 15 zákona ČNR č. 133/1985 Sb., o požární ochraně ve znění pozdějších předpisů (dále jen Zákon) a § 7, odst. 1, písmeno a) vyhlášky Ministerstva vnitra č. 21/1996 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona ČNR o požární ochraně (dále jen Vyhláška) pokyn pro organizaci, řízení a kontrolu požární ochrany (dále jen Pokyn).

1. Základní ustanovení

1.1. Pokyn určuje organizační uspořádání a řízení PO v působnosti Ministerstva jako ústředního orgánu státní správy a je závazný pro všechny právnické osoby, které řídí, nebo u kterých je zakladatelem nebo zřizovatelem (dále jen právnické osoby). Toto uspořádání je koncipováno na zásadách nadřazenosti a podřízenosti.

1.2. Pokyn je závazný i pro Ministerstvo jako pro právnickou osobu při plnění povinností ve vztahu k objektům, které vlastní nebo užívá. Tyto úkoly plní útvar, spravující tyto objekty.

1.3. Za plnění povinností na úseku PO odpovídá u právnické osoby statutární orgán.

2. Organizační uspořádání požární ochrany

2.1. Ministerstvo pro plnění povinností ústředního orgánu ve vztahu k právnickým osobám zřizuje funkci hlavního technika požární ochrany a bezpečnosti a ochrany zdraví při práci. Tato funkce je zařazena dle organizačního řádu Ministerstva.

2.2. Právnické osoby zřizují funkci referenta PO (technický pracovník PO) s organizačním začleněním v útvaru vedoucího zaměstnance přímo podřízeného řediteli.

Tuto funkci je možno kumulovat s nejvýše 2 dalšími funkcemi.

2.3. Pracovníci v uvedených funkcích musí mít odbornou způsobilost dle § 11 Zákona.

3. Povinnosti Ministerstva

3.1. Základní povinnosti Ministerstva jsou uvedeny v § 3 Zákona a § 7 Vyhlášky.

Ministerstvo zejména:

- a) stanoví pokynem organizaci a řízení požární ochrany u právnických osob
- b) kontroluje plnění povinností a dodržování předpisů na úseku požární ochrany u právnických osob. Tyto kontroly provádí podle zásad uvedených v § 6a písm. e) Zákona a § 13 a § 18 Vyhlášky.
- c) zpracovává zprávy o stavu požární ochrany zjištěné vlastními kontrolami. Tyto zprávy včetně návrhů opatření předkládá nejmeně jednou za rok ministru jako informaci.
- d) vede přehled o druzích jednotek, jejich početních stavech a základním vybavení u právnických osob
- e) zpracovává zjištěné údaje o požárech a příčinách jejich vzniku u právnických osob

4. Povinnosti právnických osob, které provozují činnosti nebo objekty se zvýšeným požárním nebezpečím

4.1. Povinnosti jsou obsaženy v § 1, 2, 6, 6a, 13, 15, 16, 19, 22, a 73 Zákona a § 1, 2, 3, 5, 8, 15 a 16 vyhlášky. V souladu s těmito povinnostmi právnická osoba dále:

- a) Zpracovává vlastní předpisy pro organizaci, řízení a kontrolu PO podle svých specifických podmínek.
- b) Provádí pravidelnou a prokazatelnou kontrolu dodržování předpisů PO a na jejich základě vydaných zákazů, příkazů a nařízení v rámci vnitřního kontrolního systému.
- c) Vyhodnocuje nedostatky zjištěné při kontrolách a přijímá nápravná opatření. Nejméně jednou ročně projednává na úrovni ředitele souhrnnou zprávu o stavu PO za uplynulý kalendářní rok.
Tuto zprávu zasílají právnické osoby s rozpočtovým a příspěvkovým režimem na Ministerstvo. Ostatní ji zakládají pro potřeby kontrolních orgánů. Na vyžádání jsou povinni ji poskytnout Ministerstvu.
- d) Provádí rozborů vzniklých požárů a přijímá opatření k zamezení jejich opakování.
Právnické osoby s rozpočtovým a příspěvkovým režimem zasílají podle vzoru uvedeného v příloze č. 1 neprodleně hlášení o vzniku požáru na Ministerstvo. Do 30 kalendářních dnů zašlou dále kompletní zprávu s rozбором požáru dle osnovy uváděné v příl. č. 2.
Ostatní právnické osoby zasílají hlášení a zprávu jen při požáru se škodou nad 1 mil. Kč.

e) Určuje organizační a technické podmínky k zajišťování PO v mimopracovní době a době sníženého provozu.

f) Zřizuje požární hlídky a vydává směrnice pro jejich činnost.

g) Provádí školení všech zaměstnanců o PO a odbornou přípravu zaměstnanců zařazených do PO hlídek.

h) Na Ministerstvo zasílají zprávu za uplynulý kalendářní rok o stavu a základním vybavení jednotek PO, pokud je mají zřízeny.

4.2. Základní povinnosti právnických osob, které nespádají do bodu 4.1. jsou obsaženy v § 1, 2, 6a, 19, 22 a 73 Zákona a § 1, 2 a 3 Vyhlášky

5. Povinnosti ředitele, ostatních vedoucích zaměstnanců a zaměstnanců

5.1. Povinnosti ředitele

Ředitel právnické osoby řídí, organizuje a zajišťuje plnění povinností na úseku PO.

V rámci těchto povinností:

- a) Zajistí rozpracování tohoto Pokynu podle specifických podmínek jím řízené právnické osoby ve vlastním vnitroorganizačním předpisu pro organizaci a řízení PO – Zajistí jeho provázanost s organizačním a pracovním řádem a dalšími akty řízení. Zajistí, aby se plnění povinností PO stalo neododdělitelnou součástí plnění všech pracovních úkolů.
- b) Projednává na poradě vedení (ve vazbě na org. strukturu)
 - rozbor stavu PO za kalendářní rok
 - rozbor každého vzniklého požáru
 - výsledky kontrol státního požárního dozoru a kontrol provedených Ministerstvem. Podle výsledků přijímá příslušná opatření.
- c) Stanoví ostatním vedoucím zaměstnancům v rámci jejich odpovědnosti konkrétní povinnosti na úseku PO a kontroluje jejich plnění.
- d) Schvaluje příslušnou dokumentaci PO, zejména uvedenou v § 8, odst. 1 písmeno b, c, d, e Vyhlášky.

5.2. Povinnosti ostatních ved. zaměstnanců
Mimo obecných povinností:

- a) Kontrolují, zda na jimi řízeném pracovišti, úseku, jsou dodržovány předpisy požární ochrany a příslušné zákazy a příkazy vydané na jejich základě. Při porušování postihují příslušné zaměstnance dle pracovních právních předpisů.
- b) Zajišťují, aby po ukončení práce byla pracoviště v požárně nezávadném stavu.
- c) Zajišťují odstraňování požárních závad.
- d) Provádí školení zaměstnanců ve lhůtách dle § 15 odst. 3 Vyhlášky.
- e) Zúčastňují se školení o PO vedoucích zaměstnanců ve lhůtách dle § 15, odst. 4 Vyhlášky.

6. Povinnosti zaměstnanců

- a) Počítat si tak, aby při práci i jiné činnosti nezapříčinili vznik požáru, dodržovat předpisy PO včetně vydaných příkazů a zákazů.
- b) Zpozorovaný požár neprodleně uhasit dostupnými hasebními prostředky, je-li to možné, v opačném případě neprodleně vyhlásit požární poplach dle požárních poplachových směrnic a provést nutná opatření k zamezení jeho šíření. Oznámit vznik každého požáru na pracovišti nadřízenému zaměstnanci.
- c) Znat rozmištění prostředků PO a umět je používat.
- d) Dbát o to, aby pracoviště po ukončení práce bylo v požárně nezávadném stavu.
- e) Neprodleně hlásit nadřízenému zaměstnanci závady PO na pracovišti.
- f) Účastnit se školení zaměstnanců o PO.

7. Referenti PO

7.1. Hlavní technik požární ochrany a bezpečnosti a ochrany zdraví při práci

Hlavní technik Ministerstva plní úkoly v rámci povinností stanovených pro ústřední orgán v § 3 Zákona a § 7 odst. 1 Vyhlášky a v bodě 3 tohoto Pokynu. K zjištění těchto úkolů je oprávněn provádět kontrolu právnických osob a vyžadovat od nich podklady ve smyslu § 7 odst. 1 Vyhlášky. Navrhovat ředitelům nezbytná opatření k odstranění nedostatků a kontrolovat jejich plnění.

7.2. Ref. PO právnické osoby (technický pracovník PO)
Ref. PO je odborným zaměstnancem právnické osoby na úseku PO. Konkrétní úkoly vyplývají ze Zákona a Vyhlášky.

8. Požární hlídky

Právnické osoby zřizují požární hlídky. Podrobnosti upravuje § 13 Zákona a § 16 Vyhlášky. Po dohodě s Ministerstvem je možno tento úkol zajistit jiným technickým způsobem.

9. Dokumentace PO

Právnické osoby jsou povinny zpracovávat a udržovat v souladu se skutečností předepsanou dokumentaci. Podrobnosti upravuje § 8 Vyhlášky.

10. Školení zaměstnanců

10.1. Právnické osoby jsou povinny zabezpečit pravidelné školení zaměstnanců o PO. Druhy, obsah a způsob stanoví § 15 Vyhlášky. Školení se vztahují v přiměřeném rozsahu na osoby v pracovním nebo obdobném poměru k právnické osobě i na fyzické osoby, které se s vědomím právnických osob zdržují na jejich pracovištích.

10.2. Základní zaměření školení o PO zaměstnanců
Tato osnova se dále konkretizuje pro vedoucí zaměstnance a ostatní zaměstnance:

- a) Organizace a řízení požární ochrany, povinnosti vyplývající z předpisů o PO včetně pokynů vydaných ministerstvem.
- b) Dokumentace PO právnické osoby, interní předpisy, posouzení požárního nebezpečí a opatření stanovená na jeho základě.
- c) Požadavky na provoz, údržbu a obsluhu zařízení za sníženého provozu, v případě vzniku požáru, při provádění požárně nebezpečných činností (např. sklizeň a dosoušení obilovin a píce, pálení kletí v lese) atd.
- d) Prevence v požární ochraně ve vazbě na používané technologie, základy chemie hasebních látek a procesu hoření.
- e) Umístění hasebních prostředků na pracovištích včetně zacházení s nimi.

10.3. Právnické osoby, které jsou zařazeny pod bod 4.2, provádějí seznamování zaměstnanců s PO v rámci povinností vyplývajících z § 133 odst. 1, písm. f) s použitím § 273 odst. 1 Zákona práce. Pravidelně a prokazatelně ověřují znalosti.

10.4. Zaměření seznámení zaměstnanců s PO

- a) způsob vyhlášení pož. poplachu a přivolání pomoci
- b) rozmištění hasebních prostředků a zacházení s nimi
- c) únikové cesty a východy, požární evakuační plán
- d) hlavní uzávěry elektřiny, plynu, vody
- e) vydané zakázky a pokyny pro PO.

11. Odborná příprava zaměstnanců zařazených do požárních hlídek

11.1. Právníkové osoby jsou povinny provádět odbornou přípravu zaměstnanců zařazených do požárních hlídek prostřednictvím odborně způsobilé osoby. Podrobnosti upravuje § 16 Vyhlašky.

11.2. Zaměření odborné přípravy

- a) seznámení se směrnicemi pro činnost požárních hlídek, vydaných právníkou osobou
- b) seznámení se s pracovištěm a činností
- c) způsob vyhlášení pož. poplachu a přivolání pomoci
- d) seznámení se s hasicími prostředky

e) nejvhodnější způsob hašení vzhledem ke specifickým zvláštnostem pracovišť nebo činnosti

f) praktický nácvik použití hasebních prostředků.

12. Závěrečná ustanovení

Všechny právníkové osoby uvedou svoji dokumentaci do souladu s tímto pokynem do 3 měsíců od doby platnosti.

Platnost od 1. 3. 1997

Ing. Josef Lux
místopředseda vlády
a ministr zemědělství ČR

Hlášení o požáru (Havárii)

Příloha č. 1

Název organizace:

Sídlo:

Místo vzniku požáru:

Objekt — druh — zařízení:

Vznik požáru: dne hod.

Zničeno (druh a množství skladovaných výrobků, budovy nebo jejich části, dopravní prostředky a pod.)

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Výše způsobené škody:

.....

Příčina požáru:

.....

.....

Vznik požáru hlásil pracovník:

dne hod. na odbor MZe ČR

.....

Pro účely hlášení havárie technických zařízení použijte tento tiskopis.

Osnova rozboru požáru

1. Místo vzniku požáru
2. Popis požárem zničených budov, zařízení, dopravních prostředků atd.
3. Přímá škoda, následná škoda
4. Příčina vzniku požáru
5. Okolnosti mající vliv na šíření požáru
6. Porušení předpisů a norem týkajících se PO
7. Přijatá opatření k zamezení opakování
8. Další okolnosti a poznatky