

31971L0250

12.7.1971

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

L 155/13

PIERWSZA DYREKTYWA KOMISJI
z dnia 15 czerwca 1971 r.
ustanawiająca wspólnotowe metody analizy do celów urzędowej kontroli pasz

(71/250/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

uwzględniając dyrektywę Rady z dnia 20 lipca 1970 r. w sprawie wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli pasz ⁽¹⁾, w szczególności jej art. 2,

a także mając na uwadze, co następuje:

dyrektywa wymaga, żeby urzędowe kontrole pasz były przeprowadzane wspólnotowymi metodami pobierania próbek i analizy w celu sprawdzenia zgodności z wymaganiami przepisów ustawowych, wykonawczych i administracyjnych, dotyczących jakości i składu pasz;

należy ustanowić najszybciej, jak to jest możliwe, wszystkie niezbędne metody analizy, pierwszym etapem w tym procesie jest ustanowienie metod oznaczania kwasu cyjanowodorowego, wapnia, węglanów, popiołu nieoczyszczonego, popiołu nierozpuszczalnego w HCl, chloru z chlorków, olejku gorzycznego, laktozy, potasu, sodu, cukrów, teobrominy i mocznika oraz oznaczania alkaloidów w łubinie i oszacowania aktywności ureazy w produktach pochodzących z soi;

środki przewidziane w niniejszej dyrektywie są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DYREKTYWĘ:

Artykuł 1

Państwa Członkowskie wymagają, żeby analizy stosowane w ramach urzędowych kontroli pasz do oznaczania kwasu cyjanowodorowego, wapnia, węglanów, popiołu nieoczyszczonego, popiołu nierozpuszczalnego w HCl, chloru z chlorków, olejku gorzycznego, laktozy, potasu, sodu, cukrów, teobrominy i mocznika oraz oznaczania alkaloidów w łubinie i oszacowania aktywności ureazy w produktach uzyskanych z soi były przeprowadzane przy użyciu metod przedstawionych w Załączniku do niniejszej dyrektywy.

Artykuł 2

Państwa Członkowskie najpóźniej do dnia 1 lipca 1972 r. wprowadzają w życie przepisy ustawowe, wykonawcze i administracyjne niezbędne do wykonania niniejszej dyrektywy i niezwłocznie powiadamiają o tym Komisję.

Artykuł 3

Niniejsza dyrektywa skierowana jest do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 15 czerwca 1971 r.

W imieniu Komisji
Franco M. MALFATTI
Przewodniczący

⁽¹⁾ Dz.U. L 170 z 3.8.1970, str. 2.

ZAŁĄCZNIK

METODY ANALIZY SKŁADNIKÓW PASZ

1. WPROWADZENIE

Metody analizy składników pasz są ogólnie stosowane do wszystkich pasz prostych i złożonych. Jednakże pewne pasze ze względu na właściwe dla nich charakterystyki składowe wymagają indywidualnych metod analizy. Przypadki te zostały omówione w opisie metod w części zatytułowanej „Uwagi”.

Jeśli do oznaczenia składnika paszy można użyć dwóch lub większej liczby metod, wybór metody należy do laboratorium badawczego, chyba że ustalono inaczej; jednakże zastosowaną metodę należy wymienić w świadectwie analizy.

Przygotowanie próbki do analizy

Istotne jest, żeby analiza chemiczna była przeprowadzona na *jednorodnej próbce*. Jednakże powinno być możliwe przeprowadzenie pewnych oznaczeń makroskopowych lub mikroskopowych, a także oznaczenie zawartości wilgoci w próbce w takim stanie, w jakim została dostarczona do laboratorium. W celu spełnienia powyższych dwóch wymagań *próbkę należy podzielić na dwie części. Jedną część należy badać w stanie niezmienionym; drugą część należy przygotować do analizy chemicznej w następujący sposób.*

Próbkę podzielić w aparaturze mechanicznej lub ręcznie po starannym wymieszaniu całości na czystej, równej powierzchni. W tym ostatnim przypadku wskazane jest korzystanie z metody ćwiartkowania polegającej na pobieraniu próbek na zmianę z dwóch przeciwległych części. Na koniec należy odważyć do analizy porcję o masie równej w przybliżeniu 100 g i w razie potrzeby rozdrobnić ją tak, aby cała próbka przechodziła przez sito o okrągłych oczkach o średnicy 1 mm. Natychmiast umieścić próbkę w suchym pojemniku ze szczelną uszczelką i zamknąć go.

Jeśli próbka jest bardzo wilgotna, należy ją wstępnie wysuszyć tak, aby zmniejszyć jej wilgotność do zakresu 8-12 %. Próbkę należy suszyć w odpowiedniej temperaturze i odpowiednio długo.

Odczynniki i aparatura

W opisie metod analizy wymienione są tylko specjalne przyrządy lub aparatura, lub przyrządy wymagające specjalnych norm. Nie uznano za konieczne wymienianie całej aparatury lub wszystkich przyrządów, które wchodzą w skład typowego wyposażenia laboratoriów badawczych.

Także, jeśli w związku z rozcieńczaniem lub wymywaniem wymieniana jest *woda*, oznacza ona zawsze *wodę destylowaną*. Podobnie bliżej niesprecyzowane pojęcie *roztworu odczynnika* oznacza *roztwór w wodzie destylowanej*.

Określanie wyników

Wynik podany w świadectwie analizy ma być wartością średnią, uzyskaną co najmniej w dwóch próbach. Z zastrzeżeniem specjalnych przepisów, wynik należy wyrazić jako udział procentowy odniesiony do pierwotnej próbki w takim stanie, w jakim została dostarczona do laboratorium. Wyniku nie wolno podawać z większą liczbą cyfr znaczących, niż pozwala na to dokładność zastosowanej metody analizy.

2. OZNACZANIE KWASU WODOROCCYJANOWEGO

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości kwasu wodorocyjanowego, wolnego i związanego w postaci glikozydów w paszach, w produktach wytwarzanych z nasion lnu, mączki manioku i w szczególności z niektórych gatunków fasoli.

2. Zasada

Próbka stanowi zawiesinę w wodzie. Kwas wodorocyjanowy jest uwalniany poprzez działanie enzymów, porywany podczas destylacji z parą wodną i zbierany w określonej objętości kwaśnego roztworu azotanu srebra. Cyjanek srebra jest oddzielany poprzez filtrowanie, a nadmiar azotanu srebra jest odmiareczkowany roztworem tiocyjanianu amonowego.

3. Odczynniki

- 3.1. Zawiesina słodkich migdałów: rozgnieść 20 blanszowanych słodkich migdałów w 100 ml wody o temperaturze 37-40 °C. Sprawdzić, czy w 10 ml zawiesiny nie ma kwasu wodorocyjanowego, stosując do tego celu sodowy papierik pikrotowy lub przeprowadzając ślełą próbę zgodnie opisem w pkt 5 akapit ostatni.
- 3.2. 10-procentowy roztwór (procent wagowy) octanu sodowego, obojętny dla fenoloftaleiny.
- 3.3. Emulsja przeciwpieniąca (np. silikon).
- 3.4. Kwas azotowy o gęstości 1,40.
- 3.5. Roztwór azotanu srebra: 0,02 N.
- 3.6. Roztwór tiocyjanianu amonowego: 0,02 N.
- 3.7. Nasycony roztwór siarczynu żelazowo-amonowego.
- 3.8. Amoniak o gęstości 0,958.

4. Aparatura

- 4.1. Piec z termostatem nastawionym na 38 °C.
- 4.2. Aparatura do destylacji poprzez porywanie kropelek w parze, wyposażona w skraplacz z zakrzywionym przedłużaczem.
- 4.3. 1000-mililitrowe kolby o płaskim dnie, ze szlifowanymi korkami.
- 4.4. Kąpiel olejowa.
- 4.5. Biureta wyskalowana co 1/20 ml.

5. Procedura

Odważyć 20 g próbki z dokładnością do 5 mg, umieścić w jednolitrowej kolbie z płaskim dnem i dolać 50 ml wody i 10 ml zawiesiny słodkich migdałów (3.1). Zatkać kolbę i wstawić do pieca na 16 godzin w temperaturze 38 °C. Następnie ostudzić do temperatury pokojowej i dolać 80 ml wody, 10 ml roztworu octanu sodowego (3.2) i kroplę emulsji przeciwpieniącej (3.3).

Podłączyć kolbę do aparatury do destylacji z parą wodną i umieścić w kąpeli olejowej uprzednio podgrzanej do temperatury nieco ponad 100 °C. Przedestylować 200-300 ml cieczy, przepuszczając duży strumień pary przez kolbę i delikatnie podgrzewając kąpiel olejową. Zebrać destylat w kolbie Erlenmeyera osłoniętej przed światłem i zawierającej dokładnie 50 ml 0,02 N roztworu azotanu srebra (3.5) i 1 ml kwasu azotowego (3.4). Upewnić się, czy przedłużacz skraplacza jest zanurzony w roztworze azotanu srebra.

Przebrać zawartość kolby Erlenmeyera do 500-mililitrowej kolby miarowej, uzupełnić do pełnej objętości wodą, zamieszać i przefiltrować. Odlać 250 ml filtratu, dodać około 1 ml roztworu siarczynu żelazowo-amonowego (3.7) i odmiareczkować nadmiar azotanu srebra 0,02 N roztworem tiocyjanianu amonowego (3.6) pobranego z biurety wyskalowanej co 1/20 ml.

W razie potrzeby można przeprowadzić próbę ślełą według tej samej procedury zastosowanej do 10 ml zawiesiny słodkich migdałów (3.1) bez próbki przeznaczonej do analizy.

6. Obliczanie wyników

Jeśli ślepa próba wykaże, że 0,02 N roztwór azotanu srebra został zużyty, należy odjąć jego objętość od objętości zużytej przez destylat z próbki. 1 ml 0,02 N roztworu AgNO_3 odpowiada 0,54 mg HCN. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

Jeśli próbka zawiera dużą ilość siarczków (np. fasola), tworzy się czarny, wytrącony osad siarczku srebra, który jest filtrowany razem z osadem cyjanku srebra. Wytrącanie się osadu powoduje ubytek 0,02 N roztworu azotanu srebra, którego objętość należy odjąć od objętości użytej do obliczenia zawartości HCN. W tym celu należy postępować w następujący sposób:

Potraktować pozostały na filtrze osad 50 ml amoniaku (3.8), aby rozpuścić cyjanek srebra. Wymyć pozostałość rozcieńczonym amoniakiem, a następnie oznaczyć w nim zawartość srebra. Przeliczyć uzyskaną wartość na objętość w ml 0,02 N roztworu azotanu srebra.

Zawartość HCN w próbce można także oznaczyć miareczkując kwaśny amoniakalny filtrat kwasem azotowym.

3. OZNACZANIE WAPNIA

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości wapnia w paszach.

2. Zasada

Wapń jest spopieleny. Popiół jest traktowany kwasem chlorowodorowym, wapń wytrącony w postaci szczawianu wapnia. Wytrącony osad jest rozpuszczany kwasem siarkowym i miareczkowany kwasem szczawiowym, który powstaje wraz z roztworem nadmanganianu potasu.

3. Odczynniki

- 3.1. Czysty kwas chlorowodorowy o gęstości 1,14.
- 3.2. Czysty kwas azotowy o gęstości 1,40.
- 3.3. Czysty kwas siarkowy o gęstości 1,13.
- 3.4. Czysty amoniak o gęstości 0,98.
- 3.5. Zimny, nasycony roztwór czystego szczawianu amonowego.
- 3.6. 30-procentowy (procent wagowy) roztwór czystego kwasu cytrynowego.
- 3.7. 5-procentowy (procent wagowy) roztwór czystego chlorku amonowego.
- 3.8. 0,04-procentowy (procent wagowy) roztwór zieleni bromokrezolowej.
- 3.9. 0,1 N roztwór nadmanganianu potasu.

4. Aparatura

- 4.1. Elektryczny piec mufłowy z cyrkulacją powietrza i termostatem.
- 4.2. Platynowe, kwarcowe lub porcelanowe tygle do spopielenia.
- 4.3. Szklane tygle filtracyjne o porowatości G_4 .

5. Procedura

Odważyć około 5 g próbki (lub więcej w razie potrzeby) z dokładnością do 1 mg. Poddać kalcynację w temperaturze 550 °C i przenieść popiół do 250-mililitrowej zlewki.

Dodać 40 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), 60 ml wody i kilka kropel kwasu azotowego (3.2). Doprowadzić do wrzenia i utrzymywać w temperaturze wrzenia przez 30 minut. Następnie roztwór schłodzić i przelać do 250-mililitrowej kolby miarowej. Przepłukać, uzupełnić wodą do kreski, poddać homogenizacji i przefiltrować.

Za pomocą pipety przenieść do 250-mililitrowej zlewki podwielokrotność zawierającą 10-40 ml wapnia, stosownie do założonej zawartości wapnia. Dodać 1 ml roztworu kwasu cytrynowego (3.6) i 5 ml roztworu chlorku amonowego (3.7).

Uzupełnić wodą do około 100 ml. Doprowadzić do wrzenia, dodać 8-10 kropli roztworu zieleni bromokrezolowej (3.8) i 30 ml ciepłego roztworu szczawianu amonowego (3.5). Jeśli wytrąci się osad, rozpuścić go, dodając kilka kropli kwasu chlorowodorowego (3.1).

Zobojętnić bardzo powoli amoniakiem (3.4), ciągle mieszając, dopóki pH nie osiągnie wartości 4,4-4,6 (tj. wskaźnik zmieni kolor). Wstawić zlewkę do wrzącej wody i pozostawić w niej przez 30 minut, aby wytrącony osad osiadł. Wyjąć zlewkę z kąpeli wodnej, pozostawić na godzinę i przefiltrować zawartość przez tygiel filtracyjny G₄.

Plukać zlewkę i tygiel wodą aż do całkowitego usunięcia nadmiaru szczawianu amonowego (brak chlorku w wodzie przemijającej wskazuje na dostateczne przepłukanie).

Wytrącony osad na filtrze rozpuścić w 50 ml ciepłego kwasu siarkowego (3.3). Wypłukać tygiel ciepłą wodą i uzupełnić filtrat do około 100 ml. Podgrzać do temperatury 70-80 °C i miareczkować kropla po kropli roztworem nadmanganianu potasu (3.9) aż do uzyskania różowego koloru, co będzie trwało około minuty.

6. Obliczanie wyników

1 ml 0,1 N roztworu nadmanganianu potasu odpowiada 2,004 mg wapnia. Uzyskany wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

7.1. W przypadku bardzo małej zawartości wapnia należy postępować w sposób następujący: przefiltrować osad szczawianu wapnia przez filtr papierowy bez popiołu. Po wypłukaniu wysuszyć filtr z popiołem w temperaturze 550 °C w platynowym tyglu. Ponownie rozpuścić pozostałość kilkoma kroplami kwasu siarkowego (3.3), odparować do całkowitego wyschnięcia, ponownie poddać kalcynacji w temperaturze 550 °C i zważyć. Jeśli p jest masą uzyskanego siarczanu wapnia, to zawartość wapnia w podwielokrotności pobranej jako próbka wynosi $p \times 0,2944$.

7.2. Jeśli próbka składa się jedynie z substancji mineralnych, należy rozpuścić ją w kwasie chlorowodorowym bez uprzedniego spopielania. W przypadku produktów takich jak fosforan wapniowo-glinowy, które są trudne do rozpuszczenia w kwasie, przed rozpuszczeniem należy je stopić w procesie alkalicznym w następujący sposób: wymieszać starannie w platynowym tyglu próbkę przeznaczoną do analizy z mieszaniną o masie równej pięciokrotnej masie próbki, składającą się z równych części węglanu potasu i węglanu sodu. Podgrzać dokładnie, dopóki mieszanina nie stopi się całkowicie. Następnie schłodzić i rozpuścić w kwasie chlorowodorowym.

7.3. Jeśli w próbce jest podwyższona zawartość magnezu, należy wytrącić szczawian wapnia po raz drugi.

4. OZNACZANIE WĘGLANÓW

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości węglanów, tradycyjnie wyrażanej jako zawartość węglanu wapnia, w większości pasz.

Jednakże w pewnych wypadkach (np. węglan żelaza) należy stosować szczególną metodę.

2. Zasada

Węglany są rozkładane w kwasie chlorowodorowym; uwalniany dwutlenek węgla zbierany jest w cylindrze miarowym, a jego objętość porównywana z objętością uwolnioną w tych samych warunkach przez znaną ilość czystego węglanu wapnia.

3. Odczynniki

3.1. Kwas chlorowodorowy czysty o gęstości 1,10.

3.2. Czysty węglan wapnia.

3.3. W przybliżeniu 0,1 N kwas siarkowy zabarwiony na czerwono metylem.

4. Aparatura

Aparatura Scheiblera-Dietriecha (patrz schemat) lub aparatura równoważna.

5. Procedura

W zależności od zawartości węglanu w próbce odważyć porcję próbki w następujący sposób:

0,5 g w przypadku produktów zawierających 50-100% węglanów, wyrażonych zawartością węglanu wapniowego;

1 g w przypadku produktów zawierających od 40 do 50 % węglanów, wyrażonych zawartością węglanu wapniowego;

2-3 g w przypadku innych produktów.

Umieścić próbkę w specjalnej kolbie (4) aparatury, wyposażonej w małą rurkę z nietłukącego się materiału, zawierającą 10 ml kwasu chlorowodorowego (3.1) i połączyć kolbę z aparaturą. Odkręcić trójdrogowy kurek (5) tak, żeby rurka (1) miała połączenie z otoczeniem. Za pomocą przesuwnej rurki (2) wypełnionej zabarwionym kwasem siarkowym (3.3), połączonej z rurką miarową (1) ustawić poziom cieczy na znaku zerowym. Odkręcić kurek (5) w celu połączenia rurek (1) i (3), a następnie sprawdzić, czy poziom jest na zerze.

Wypuszczać powoli kwas chlorowodorowy (3.1) na próbkę, przechylając kolbę (4). Wyrównać ciśnienie, opuszczając rurkę (2). Potrząsać kolbą (4), dopóki nie ustanie wydzielanie dwutlenku węgla.

Przywrócić ciśnienie, ustalając taki sam poziom cieczy w rurkach (1) i (2). Po kilku minutach, po ustaleniu się objętości gazu, dokonać odczytu.

W tych samych warunkach przeprowadzić próbę kontrolną, poddając próbce 0,5 g węglanu wapniowego (3.2).

6. Obliczanie wyników

Zawartość węglanów w gramach, wyrażona jako udział procentowy węglanu wapniowego w próbce, obliczana jest z następujących wzorów:

$$\frac{V \times 100}{T \times 2P}$$

gdzie:

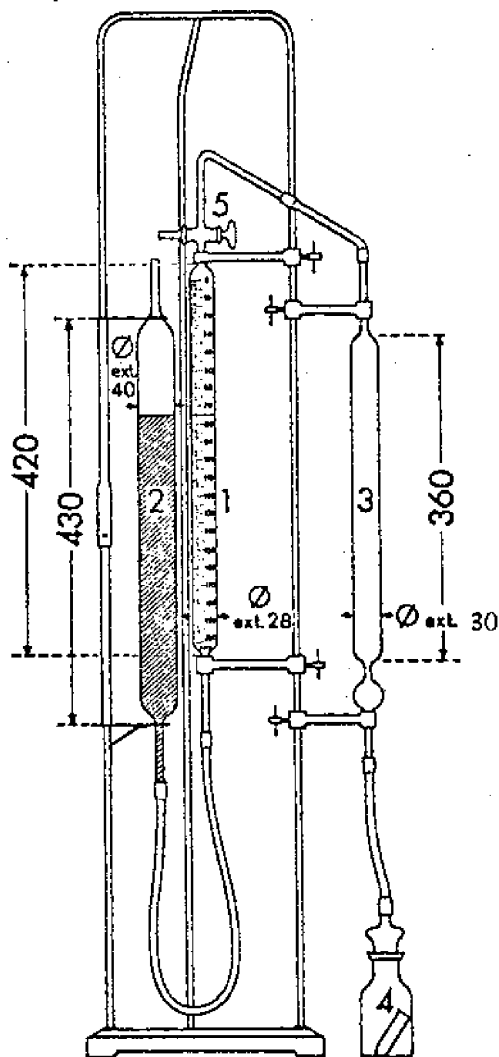
V = objętość CO₂, w ml, wydzielona przez porcję próbki.

T = objętość CO₂, w ml, wydzielona przez 0,5 g czystego CaCO₃.

P = masa porcji próbki, w gramach.

7. Uwagi

- 7.1. Jeśli porcja próbki waży ponad 2 g, najpierw należy wlać do kolby (4) 15 ml destylowanej wody i wymieszać przed rozpoczęciem próby. W próbie kontrolnej należy użyć tej samej objętości wody.
- 7.2. Jeśli objętość użytej aparatury różni się od objętości aparatury Scheiblera-Dietricha, należy odpowiednio dopasować porcje pobrane z próbki i z substancji kontrolnej, jak również obliczyć wyniki.

APARATURA SCHEIBLERA-DIETRICH A DO OZNACZANIA CO₂

Skala 1:8
(wymiary w mm)

5. OZNACZANIE NIEOCZYSZCZONEGO POPIOŁU

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości nieoczyszczonego popiołu w paszach.

2. Zasada

Próbka jest spopielenia w temperaturze 550 °C; pozostałość jest ważona.

3. Odczynniki

20-procentowy (procent wagowy) roztwór azotanu amonowego.

4. Aparatura

4.1. Płyta grzejna.

4.2. Piec muflowy z termostatem.

4.3. Tygłe do spopielenia wykonane z platyny lub stopu platyny i złota (10 % Pt, 90 % Au), prostokątne (60 × 40 × 25 mm) lub okrągłe (średnica: 60-75 mm, wysokość: 20-25 mm).

5. Procedura

Z dokładnością do 1 mg odważyć 5 g próbki (2,5 g w przypadku produktów wykazujących tendencję do pęcznienia) i umieścić w tyglu do spopielenia, który został wcześniej wyprażony i wytarowany. Umieścić tygiel na płycie grzejnej i stopniowo podgrzewać do momentu zwęglenia się substancji. Wstawić tygiel do pieca muflowego nastawionego na temperaturę 550 °C ± 5 °C. Trzymać w tej temperaturze do momentu uzyskania białego, jasnoszarego lub czerwonego popiołu, który wydaje się pozbawiony cząstek zawierających węgiel. Umieścić tygiel w suszarce, pozostawić do ostygnięcia i natychmiast zważyć.

6. Obliczanie wyników

Obliczyć masę pozostałości, odejmując tarę.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

7.1. Popiół *substancji trudnych do spopielenia* należy poddać wstępnemu spopieleniu, co najmniej przez 3 godziny, następnie ostudzić i dodać kilka kropli 20-procentowego roztworu azotanu amonowego (trzeba to robić ostrożnie, aby uniknąć rozproszenia lub zbrylenia). Po wysuszeniu w piecu kontynuować kalcynację. W razie potrzeby powtórzyć operację aż do całkowitego spopielenia.

7.2. W przypadku substancji odpornych na obróbkę opisaną w ppkt 7.1 należy postępować w następujący sposób: po spopieleniu przez 3 godziny wrzucić popiół do ciepłej wody i przefiltrować przez mały filtr pozbawiony popiołu. Spopielić filtr wraz z zawartością w pierwotnym tyglu. Umieścić filtrat w ochłodzonym tyglu, odparować do całkowitego wysuszenia, spopielić i zważyć.

7.3. W przypadku *olejów i tłuszczów* należy dokładnie odważyć próbkę o masie około 25 g w tyglu o odpowiednich wymiarach. Zwęglić substancję, podpalając ją wraz z paskiem pozbawionego popiołu filtra papierowego. Po spaleniu zwiżyć niewielką ilością wody. Wysuszyć i spopielić zgodnie z opisem w pkt 5.

6. OZNACZANIE POPIOŁU NIEROZPUSZCZALNEGO W KWASIE CHLOROWODOROWYM

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości w paszach substancji mineralnych, które nie rozpuszczają się w kwasie chlorowodorowym. W zależności od właściwości próbki można stosować dwie metody.

- 1.1. *Metoda A*: stosowana do prostych pasz organicznych i do większości pasz złożonych;
- 1.2. *Metoda B*: stosowana do związków i mieszanek mineralnych, jak również do złożonych pasz, w których zawartość substancji nierozpuszczalnych w kwasie chlorowodorowym, określona według metody A, jest większa niż 1 %.

2. Zasada

- 2.1. *Metoda A*: próbka jest spopielana; popiół jest gotowany w kwasie chlorowodorowym, a nierozpuszczalna pozostałość filtrowana i ważona.
- 2.2. *Metoda B*: próbka jest traktowana kwasem chlorowodorowym. Roztwór jest filtrowany, pozostałość spopielana, a uzyskany popiół poddawany obróbce zgodnie z metodą A.

3. Odczynniki

- 3.1. 3 N kwas chlorowodorowy.
- 3.2. 20-procentowy roztwór (udział wagowy) kwasu trójchlorooctowego.
- 3.3. 1-procentowy roztwór (udział wagowy) kwasu trójchlorooctowego.

4. Aparatura

- 4.1. Płyta grzejna.
- 4.2. Elektryczny piec muflowy z termostatem.
- 4.3. Tygły do spopielania wykonane z platyny lub stopu platyny i złota (10 % Pt, 90 % Au) prostokątne (60 × 40 × 25 mm) lub okrągłe (średnica: 60-75 mm, wysokość: 20-25 mm).

5. Procedura

5.1. *Metoda A*

Spopielić próbkę za pomocą metody opisanej w oznaczaniu nieoczyszczonego popiołu. Można także użyć popiołu, który uzyskano z tamtej analizy.

Zmżyć popiół do zlewki o pojemności 250-400 ml, dodając 75 ml 3 N kwasu chlorowodorowego (3.1). Ciecz doprowadzić powoli do wrzenia i gotować delikatnie przez 15 minut. Przefiltrować gorący roztwór przez filtr papierowy pozbawiony popiołu, a pozostałość wymywać gorącą wodą, dopóki reakcja z kwasem przestanie być widoczna. Wysuszyć filtr zawierający pozostałość i spopielić go w wytarowanym tygłu w temperaturze nie niższej niż 550 °C i nie wyższej niż 700 °C. Ochłodzić w ekzykatorze i zważyć.

5.2. *Metoda B*

Odważyć 5 g próbki z dokładnością do 1 mg i wsypać do zlewki o pojemności 250-400 ml. Następnie dodawać kolejno 25 ml wody i 25 ml 3 N kwasu chlorowodorowego (3.1), wymieszać i odczekać, aż przestanie pęcić się. Dodać kolejne 50 ml 3 N kwasu chlorowodorowego (3.1). Odczekać, aż ustanie wydzielanie gazu, następnie wstawić zlewkę do wrzącej wody i pozostawić w niej na 15 minut lub, w razie potrzeby, na dłużej w celu dokładnego shydrolizowania ewentualnej skrobi.

Przefiltrować ciepłą zawartość zlewki przez filtr bez popiołu i przemyć filtr w 50 ml ciepłej wody (patrz pkt 7). Włożyć filtr zawierający pozostałość do tygla do spopielenia, wysuszyć go i spopielić w temperaturze nie niższej niż 550 °C i nie wyższej niż 700 °C. Zmyć popiół do zlewki o pojemności 250-400 ml, dodając 75 ml 3 N kwasu chlorowodorowego (3.1); kontynuować czynności opisane w ppkt 5.1 akapit drugi.

6. Obliczanie wyników

Obliczyć masę pozostałości, odejmując tarę. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

Jeśli filtrowanie okaże się trudne, należy ponowić analizę, zastępując 50 ml 3 N kwasu chlorowodorowego (3.1) 50 ml 20-procentowego kwasu trójchlorooctowego (3.2) i przemywając filtr ciepłym roztworem 1-procentowego kwasu trójchlorooctowego (3.3).

7. OZNACZANIE CHLORU Z CHLORKÓW

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości chloru w chlorkach rozpuszczalnych w wodzie, tradycyjnie wyrażanej zawartością chlorku sodu. Metodę tę stosuje się do wszystkich pasz.

2. Zasada

Chlorki są rozpuszczane w wodzie. Jeśli produkt zawiera substancję organiczną, jest on oczyszczany. Roztwór jest nieznacznie zakwaszany kwasem azotowym, a chlorki wytrącane w postaci chlorku srebra za pomocą roztworu azotanu srebra. Nadmiar azotanu srebra jest miareczkowany roztworem tiocyjanianu amonowego metodą Volharda.

3. Odczynniki

- 3.1. 0,1 N roztwór tiocyjanianu amonowego.
- 3.2. 0,1 N roztwór azotanu srebra.
- 3.3. Nasycony roztwór siarczanu żelazowo-amonowego.
- 3.4. Kwas azotowy o gęstości 1,38.
- 3.5. Czysty eter etylowy.
- 3.6. Czysty aceton.
- 3.7. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynkowego $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g kwasu octowego lodowatego. Uzupelnąć wodą do 100 ml.
- 3.8. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupelnąć wodą do 100 ml.
- 3.9. Czysty węgiel aktywny, bez chlorków i nieabsorbujący ich.

4. Aparatura

Mieszarka (bębnowa): około 35-40 obr/min.

5. Procedura

5.1. Przygotowanie roztworu

Zależnie od rodzaju próbki przygotować roztwór według ppkt 5.1.1, 5.1.2 lub 5.1.3.

Jednocześnie przeprowadzić próbę ślepą bez próbki przeznaczonej do analizy.

5.1.1. *Próbki niezawierające substancji organicznej*

Z dokładnością do 1 mg odważyć próbkę o masie nie większej niż 10 g, zawierającą nie więcej niż 3 g chloru w postaci chlorków. Próbkę umieścić w kolbie miarowej o pojemności 500 ml, dolać 400 ml wody o temperaturze około 20 °C. Mieszać przez 30 minut w mieszarce bębnowej, uzupełnić do pierwotnej objętości, poddać homogenizacji i przefiltrować.

5.1.2. *Próbki zawierające substancję organiczną, z wyjątkiem produktów wymienionych w ppkt 5.1.3*

Z dokładnością do 1 mg odważyć próbkę o masie około 5 g i razem z 1 g aktywnego węgla włożyć do kolby miarowej o pojemności 500 ml. Dolać 400 ml wody o temperaturze około 20 °C i 5 ml roztworu Carreza I (3.7). Następnie wymieszać, dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.8). Mieszać przez 30 minut w mieszarce bębnowej, uzupełnić do pełnej objętości, poddać homogenizacji i przefiltrować.

5.1.3. *Pasze gotowane, makuchy i mączka lniana, produkty bogate w mączkę lnianą i inne produkty bogate w substancje kleiste lub koloidalne (np. skrobia dekstrynowana)*

Przygotować roztwór zgodnie z ppkt 5.1.2, lecz nie filtrować go. Przełać sklarowany płyn (w razie potrzeby odwirować), odlać 100 ml cieczy sklarowanej nad osadem i przenieść do kolby miarowej o pojemności 200 ml. Wymieszać z acetonem (3.6) i uzupełnić tym rozpuszczalnikiem do pełnej objętości. Poddać homogenizacji i przefiltrować.

5.2. *Miareczkowanie*

Za pomocą pipety przenieść do kolby Erlenmayera 25-100 ml filtratu (zależnie od założonej zawartości chloru) uzyskanego zgodnie z opisem w ppkt 5.1.1, 5.1.2 lub 5.1.3. Podwielokrotność nie może zawierać więcej niż 150 mg chloru (Cl). W razie potrzeby rozcieńczyć wodą, aby otrzymać objętość nie mniejszą niż 50 ml, dodać 5 ml kwasu azotowego (3.4), 20 ml nasyconego roztworu siarczanu żelazowo-amonowego (3.3) i 2 krople roztworu tiocyjanianu amonowego (3.1) przeniesionego za pomocą biurety wypełnionej do znaku zerowego. Za pomocą biurety przenieść roztwór azotanu srebra (3.2) w taki sposób, aby uzyskać dodatkowo 5 ml. Dodać 5 ml eteru etylowego (3.5) i mocno potrząsnąć, aby skoagulować osad.

Nadmiar azotanu srebra odmiareczkować roztworem tiocyjanianu amonowego (3.1), dopóki przez jedną minutę nie będzie utrzymywało się rudawo-brązowe zabarwienie.

6. **Obliczanie wyników**

Zawartość wagową chloru p, wyrażoną zawartością chlorku sodu, występującą w filtracie pobranym do miareczkowania, oblicza się z następującego wzoru:

$$p = 5,845 (V_1 - V_2) \text{ mg}$$

gdzie:

V_1 = objętość (ml) dodanego 0,1 N roztworu azotanu srebra,

V_2 = objętość (ml) 0,1 N roztworu tiocyjanianu amonowego użytego do miareczkowania,

Jeśli ślepa próba wykaże, że 0,1 N roztwór azotanu srebra został zużyty, należy odjąć jego objętość od objętości ($V_1 - V_2$).

7. **Uwagi**

7.1. Miareczkowanie można także przeprowadzać metodą potencjometryczną.

7.2. W przypadku produktów o bardzo dużej zawartości olejów i tłuszczów, najpierw należy je odtłuścić eterem etylowym lub lekką ropą naftową.

7.3. W przypadku mączki rybnej miareczkowanie można przeprowadzić metodą Mohra.

8. OZNACZANIE OLEJKU GORCZYCZNEGO

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości olejku gorczycznego w makuchach sporządzonych z gatunków *Brassica* i *Sinapis* oraz w złożonych paszach, zawierających makuchy sporządzone z powyższych gatunków. Zawartość olejku gorczycznego wyrażona jest zawartością izotiocyanianu allilu, który można wyekstrahować za pomocą pary.

2. Zasada

Próbka stanowi zawiesinę w wodzie. Olejek gorczyczny jest uwalniany przez działanie enzymów, ekstrahowany podczas destylacji z etanolem i zbierany w rozcieńczonym amoniaku. Ciepły roztwór jest traktowany określoną objętością roztworu azotanu srebra, a następnie chłodzony i filtrowany. Nadmiar azotanu srebra jest miareczkowany roztworem tiocyanianu amonowego.

3. Odczynniki

- 3.1. Gorczyca jasna (*Sinapis alba*).
- 3.2. 95-96-procentowy etanol (procent wagowy).
- 3.3. Emulsja przeciwpieniąca (np. silikon).
- 3.4. Amoniak o gęstości 0,958.
- 3.5. 0,1 N roztwór azotanu srebra.
- 3.6. 0,1 N roztwór tiocyanianu amonowego.
- 3.7. Kwas azotowy o gęstości 1,40.
- 3.8. Nasycony roztwór siarczanu żelazowo-amonowego.

4. Aparatura

- 4.1. 500-mililitrowe kolby o płaskim dnie, ze szlifowanymi korkami szklanymi.
- 4.2. Aparatura do destylacji wyposażona w skraplacz oraz w urządzenie zapobiegające porywaniu kropelek.

5. Procedura

Z dokładnością do 1 mg odważyć 10 g próbki, umieścić w 500-mililitrowej kolbie z płaskim dnem i dodać 2 g drobno zmielonej gorczycy jasnej (3.1) (źródło zaczynu) i 200 ml wody o temperaturze 20 °C. Zatkać kolbę i pozostawić na około 2 godziny w temperaturze 20 °C, często potrząsając. Następnie dodać 40 ml etanolu (3.2) i kroplę emulsji przeciwpieniącej (3.3). Przedestyłować około 150 ml roztworu i zebrać destylat w 250-mililitrowej kolbie miarowej zawierającej 20 ml amoniaku (3.4), upewniając się, czy koniec skraplacza jest zanurzony w cieczy. Dodać do roztworu amoniaku 50 ml 0,1 N roztworu azotanu srebra (3.5) (lub więcej w razie potrzeby). Nad kolbą miarową umieścić mały lejek i podgrzewać mieszaninę nad wrzącą wodą przez godzinę. Pozostawić do ostygnięcia, uzupełnić wodą do pełnej objętości, zamieszać i przefiltrować. Odląć 100 ml czystego filtratu, dodać 5 ml kwasu azotowego (3.7) i w przybliżeniu 5 ml roztworu siarczanu żelazowo-amonowego (3.8). Odmiareczkować nadmiar azotanu srebra na powrocie 0,1 N roztworem tiocyanianu amonowego (3.6).

Przeprowadzić ślełą próbę według tej samej procedury, biorąc do próby 2 g drobno zmielonej jasnej gorczycy, nie naruszając próbki przeznaczonej do analizy.

6. Obliczanie wyników

Odjąć objętość 0,1 N roztworu azotanu srebra zużytego w ślepej próbie od objętości zużytej przez próbkę w roztworze. Uzyskana wartość jest objętością (w ml) 0,1 N roztworu azotanu srebra zużytego przez olejek gorczyczny zawarty w próbce. 1 ml 0,1 N roztworu AgNO_3 odpowiada 4,956 mg izotiocyanianu allilu. Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

9. OZNACZANIE LAKTOZY

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości laktozy w paszach zawierających ponad 0,5 % laktozy.

2. Zasada

Cukry rozpuszczane są w wodzie. Roztwór jest poddawany fermentacji drożdżowej z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, które nie rozkładają laktozy. Po oczyszczeniu i przefiltrowaniu zawartość laktozy w filtracie oznaczana jest metodą Luffa-Schoorla.

3. Odczynniki

3.1. Zawiesina drożdży *Saccharomyces cerevisiae*: rozproszyc 25 g świeżych drożdży w 100 ml wody. Zawiesinę można przechowywać w lodówce maksymalnie przez tydzień.

3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynkowego $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g kwasu octowego lodowatego. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić wodą do 100 ml.

3.4. Odczynnik Luffa-Schoorla:

Starannie mieszając, wlać roztwór kwasu cytrynowego (3.4.2) do roztworu węgla sodowego (3.4.3). Dodać roztworu siarczanu miedziowego (3.4.1) i uzupełnić wodą do 1 l. Odstawić roztwór na noc do odstania się i przefiltrować. Sprawdzić, czy uzyskany odczynnik jest właściwy (Cu 0,1 N; Na_2CO_3 2 N). Wartość pH roztworu powinna wynosić w przybliżeniu 9,4.

3.4.1. Roztwór siarczanu miedziowego: rozpuścić 25 g czystego siarczanu miedziowego $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, pozbawionego żelaza, w 100 ml wody.

3.4.2. Roztwór kwasu cytrynowego: rozpuścić 50 g czystego kwasu cytrynowego $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ w 50 ml wody.

3.4.3. Roztwór węgla sodowego: Rozpuścić 143,8 g czystego, bezwodnego węgla sodowego w około 300 ml ciepłej wody. Pozostawić do ostygnięcia.

3.5. Granulowany pumeks gotowany w kwasie chlorowodorowym, wypłukany w wodzie i wysuszony.

3.6. 30-procentowy roztwór (procent wagowy) jodku sodowego.

3.7. 6 N kwas siarkowy.

3.8. 0,1 N roztwór tiosiarczanu sodowego.

3.9. Roztwór skrobi: dodać mieszaninę 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody do 1 l wrzącej wody. Gotować przez 3 minuty, pozostawić do ostygnięcia i w razie potrzeby dodać 10 mg jodku rtęciowego jako środka konserwującego.

4. Aparatura

Kąpiel wodna z termostatem nastawionym na temperaturę 38-40 °C.

5. Procedura

Z dokładnością do 1 mg odważyć 1 g próbki i umieścić porcję próbki w 100-mililitrowej kolbie miarowej. Dodać 25-30 g wody. Wstawić kolbę do wrzącej wody na 30 minut, a następnie ostudzić do temperatury około 35 °C. Dodać 5 ml zawiesiny drożdży (3.1) i poddać homogenizacji. Pozostawić kolbę w kąpeli wodnej na 2 godziny w temperaturze 38-40 °C. Ostudzić do temperatury około 20 °C.

Dodać 2,5 ml roztworu Carreza I (3.2) i mieszać przez 30 sekund, następnie dodać 2,5 ml roztworu Carreza II (3.3) i ponownie mieszać przez 30 sekund. Uzupełnić wodą do 100 ml, wymieszać i przefiltrować. Pipetą odmierzyć porcję filtratu nieprzekraczającą 25 ml, która zawiera 40-80 mg laktozy, i przenieść ją do kolby Erlenmeyera o pojemności 300 ml. W razie potrzeby uzupełnić wodą do 25 ml.

Przeprowadzić ślepą próbę według tej samej procedury, biorąc do próby 5 ml zawiesiny drożdży (3.1).

Oznaczyć zawartość laktozy metodą Luffa-Schoorla w następujący sposób: dodać dokładnie 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla (3.4) i 2 granulki pumeksu (3.5). Mieszać ręcznie jednocześnie podgrzewając na wolnym ogniu o średniej wielkości i doprowadzić ciecz do wrzenia w ciągu 2 minut. Natychmiast postawić kolbę Erlenmeyera na siatce drucianej pokrytej azbestem z otworem o średnicy około 6 cm, pod którym pali się ogień. Wielkość płomienia należy regulować w taki sposób, aby podgrzewane było tylko dno kolby. Do kolby Erlenmeyera zamontować chłodnicę zwrotną. Zawartość kolby gotować dokładnie przez 10 minut. Ostudzić natychmiast w zimnej wodzie i po upływie około pięciu minut miareczkować w następujący sposób:

Dodać 10 ml roztworu jodku potasowego (3.6) i natychmiast po tym (ostrożnie ze względu na ryzyko nadmiernego pienienia) dodać 25 ml 6 N kwasu siarkowego (3.7). Miareczkować 0,1 N roztworem tiosiarczanu sodowego (3.8), aż do momentu pojawienia się mętnego żółtego koloru, dodać wskaźnik skrobiowy (3.9) i zakończyć miareczkowanie.

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie dokładnie odmierzonych mieszaniny 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla (3.4) i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasowego (3.6) i 25 ml 6 N kwasu siarkowego (3.7) bez gotowania.

6. Obliczanie wyników

Korzystając z załączonej tabeli, ustalić ilość laktozy w mg, która odpowiada różnicy między wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonej w ml 0,1 N tiosiarczanu sodowego.

Wynik wyrazić jako udział procentowy części bezwodnej laktozy w próbce.

7. Uwagi

W przypadku produktów zawierających ponad 40-procentowego cukru ulegającego fermentacji, należy użyć ponad 5 ml zawiesiny drożdży (3.1).

Tabela wartości dla 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla

objętość 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml), podgrzewanie – 2 min, gotowanie – 10 min

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N	Glukoza, fruktoza, cukry inwertowane $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$		Laktoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		Maltoza $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$		$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N
	ml	mg	różnica	mg	różnica	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

10. OZNACZANIE POTASU

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości potasu w paszach.

2. Zasada

Próbka jest spopieleniana, a popiół rozpuszczany w kwasie chlorowodorowym. Zawartość potasu w roztworze oznaczana jest metodą fotometrii płomieniowej w obecności chlorku cezu i azotanu glinu. Dodanie tych substancji w dużym stopniu eliminuje zakłócenia pochodzące od pierwiastków przeszkadzających.

3. Odczynniki

- 3.1. Czysty kwas chlorowodorowy o gęstości 1,12.
- 3.2. Czysty chlorek cezu.
- 3.3. Azotan glinowy $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ chemicznie czysty.
- 3.4. Czysty, bezwodny chlorek potasowy.
- 3.5. Środek wiążący (substancje przeszkadzające): rozpuścić w wodzie 50 g chlorku cezu (3.2) i 250 g azotanu glinowego (3.3), uzupełnić wodą do 1 l i poddać homogenizacji. Przechowywać w plastikowych butelkach.
- 3.6. Wzorcowy roztwór potasu: rozpuścić w wodzie 1,907 g chlorku potasowego (3.4), dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), uzupełnić wodą do 1 l i poddać homogenizacji. Przechowywać w plastikowych butelkach. 1 ml tego roztworu zawiera 1,00 mg potasu.

4. Aparatura

- 4.1. Platynowe, kwarcowe lub porcelanowe tygły do spopieleniania, w razie potrzeby z pokrywkami.
- 4.2. Elektryczny piec mufłowy z termostatem.
- 4.3. Fotometr płomieniowy.

5. Procedura

5.1. Analiza próbki

Z dokładnością do 10 mg odważyć 10 g próbki, umieścić w tygły i spopielać w temperaturze 450 °C przez 3 godziny. Po ostudzeniu przenieść popiół ilościowo do kolby miarowej o pojemności 500 ml za pomocą wody w ilości 250-300 ml, a następnie 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.1). Po ustaniu wydzielania dwutlenku węgla podgrzać roztwór i utrzymywać w temperaturze około 90 °C przez 2 godziny, od czasu do czasu potrząsając. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej uzupełnić wodą do kreski, wstrząsnąć i przefiltrować. Przebrać podwielokrotność filtratu, zawierającą maksymalnie 1,0 mg potasu, do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Dodać 10,0 ml środka wiążącego (3.5), uzupełnić wodą do kreski i poddać homogenizacji. W przypadku większej zawartości potasu rozcieńczyć analizowany roztwór w odpowiednich proporcjach przed dodaniem środka wiążącego.

Poniższą tabelę podano w charakterze wytycznej dla próbki o masie około 10 g.

Założona zawartość potasu w próbce (% K)	Współczynnik rozcieńczenia	Wymierna porcja roztworu (ml)
do 0,1	—	50
0,1-0,5	—	10
0,5-1,0	—	5
1,0-5,0	1:10	10
5,0-10,0	1:10	5
10,0-20,0	1:20	5

Pomiaru dokonywać metodą fotometrii płomieniowej przy długości fali 768 nm. Wynik obliczyć, posługując się krzywą wzorcowania.

5.2. Krzywa wzorcowania

Nalać dokładnie 10 ml wzorcowego roztworu (3.6) do kolby miarowej o pojemności 250 ml, uzupełnić wodą do kreski i poddać homogenizacji. Nalać do kolb miarowych o pojemności 100 ml dokładnie 5, 10, 15, 20 i 25 ml tego roztworu odpowiadających zawartościom potasu odpowiednio 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 mg. Uzupełnić szereg pustą kolbą miarową niezawierającą wzorcowego roztworu. Do każdej kolby dodać 10 ml środka wiążącego (3.5), uzupełnić wodą do kreski i poddać homogenizacji. Przeprowadzić pomiary zgodnie z ppkt 5.1. Krzywa wzorcowania jest zwykle liniowa do zawartości potasu 1 mg w 100 ml roztworu.

6. Obliczanie wyników

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

Nie zawsze konieczne jest dodawanie środka wiążącego (3.5) w celu eliminacji pierwiastków przeszkadzających.

11. OZNACZANIE SODU

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości sodu w paszach.

2. Zasada

Próbka jest spopielenana, a popiół rozpuszczany w kwasie chlorowodorowym. Zawartość sodu w roztworze oznaczana jest metodą fotometrii płomieniowej w obecności chlorku cezu i azotanu glinu. Dodanie tych substancji w dużym stopniu eliminuje zakłócenia pochodzące od pierwiastków przeszkadzających.

3. Odczynniki

- 3.1. Czysty kwas chlorowodorowy o gęstości 1,12.
- 3.2. Czysty chlorek cezu.
- 3.3. Azotan glinowy $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ chemicznie czysty.
- 3.4. Czysty, bezwodny chlorek potasowy.
- 3.5. Środek wiążący (substancje przeszkadzające): rozpuścić w wodzie 50 g chlorku cezu (3.2) i 250 g azotanu glinowego (3.3), uzupełnić wodą do 1 l i poddać homogenizacji. Przechowywać w plastikowych butelkach.
- 3.6. Wzorcowy roztwór sodu: rozpuścić w wodzie 2,542 g chlorku sodowego (3.4), dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego (3.1), uzupełnić wodą do 1 l i poddać homogenizacji. Przechowywać w plastikowych butelkach. 1 ml tego roztworu zawiera 1,00 mg sodu.

4. Aparatura

- 4.1. Platynowe, kwarcowe lub porcelanowe tygły do spopielenia, w razie potrzeby z pokrywkami.
- 4.2. Elektryczny piec mufłowy z termostatem.
- 4.3. Fotometr płomieniowy.

5. Procedura

5.1. Analiza próbki

Z dokładnością do 10 mg odważyć, zgodnie z ogólnymi zasadami, 10 g próbki, umieścić w tyglu i spopielać w temperaturze 450 °C przez 3 godziny. Unikać przegrzania (zapalenie). Po ostudzeniu przenieść popiół ilościowo do kolby miarowej o pojemności 500 ml, dolewając 250-300 ml wody, a następnie 50 ml kwasu chlorowodorowego (3.1). Po ustaniu wydzielania dwutlenku węgla podgrzać roztwór i utrzymywać w temperaturze około 90 °C przez 2 godziny, od czasu do czasu potrząsając. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej uzupełnić wodą do kreski, wstrząsnąć i przefiltrować. Przełączyć podwielokrotność filtratu, zawierającą maksymalnie 1,0 mg sodu, do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Dodać 10,0 ml środka wiążącego (3.5), uzupełnić wodą do kreski i poddać homogenizacji. W przypadku większej zawartości sodu rozcieńczyć analizowany roztwór w odpowiednich proporcjach przed dodaniem środka wiążącego.

Poniższą tabelę podano w charakterze wytycznej dla próbki o masie około 10 g.

Założona zawartość sodu w próbce (%)	Współczynnik rozcieńczenia	Wymierna porcja roztworu (ml)
do 0,1	—	50
0,1-0,5	—	10
0,5-1,0	—	5
1,0-5,0	1:10	10
5,0-10,0	1:10	5
10,0-20,0	1:20	5

Pomiaru dokonywać metodą fotometrii płomieniowej przy długości fali 768 nm. Wynik obliczyć, posługując się krzywą wzorcowania.

5.2. Krzywa wzorcowania

Nalać dokładnie 10 ml wzorcowego roztworu (3.6) do kolby miarowej o pojemności 250 ml, uzupełnić wodą do kreski i poddać homogenizacji. Nalać do kolb miarowych o pojemności 100 ml dokładnie 5, 10, 15, 20 i 25 ml tego roztworu odpowiadających zawartościom sodu odpowiednio 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 i 1,0 mg. Uzupełnić szereg pustą kolbą miarową niezawierającą wzorcowego roztworu. Do każdej kolby dodać 10 ml środka wiążącego (3.5), uzupełnić wodą do kreski i poddać homogenizacji. Przeprowadzić pomiary zgodnie z ppkt 5.1. Krzywa wzorcowania jest zwykle liniowa do zawartości sodu 1 mg w 100 ml roztworu.

6. Obliczanie wyników

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

- 7.1. W przypadku produktów zawierających ponad 4 % sodu wskazane jest spoielenie substancji przez 2 godziny w tyglu z pokrywką. Po ostudzeniu dolać wody, doprowadzić popiół do zawiesiny za pomocą drutu platynowego, wysuszyć i ponownie spoielać przez 2 godziny w tyglu z pokrywką.
- 7.2. Jeśli próbka zawiera wyłącznie substancje mineralne, należy ją rozpuścić bez uprzedniego spoielenia.

12. OZNACZANIE CUKRU

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości cukrów redukujących i wszystkich cukrów po inwersji, wyrażonych w postaci glukozy lub w stosownych przypadkach sacharozy, poprzez pomnożenie przez współczynnik równy 0,95. Metoda ma zastosowanie do pasz złożonych. Dla innych pasz przewidziane są specjalne metody. W razie potrzeby zawartość laktozy można oznaczyć oddzielnie i uwzględnić przy obliczaniu wyników.

2. Zasada

Cukry ekstrahowane są w rozcieńczonym etanolu; roztwór jest oczyszczany roztworami Carreza I i II. Po wyeliminowaniu etanolu ilości przed inwersją i po inwersji oznaczane są metodą Luffa-Schoorla.

3. Odczynniki

- 3.1. 40-procentowy roztwór (procent objętościowy) o gęstości 0,948 w temperaturze 20 °C; zobojętniony, a następnie sprawdzony fenoloftaleiną.
- 3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynkowego $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g kwasu octowego lodowatego. Uzupełnić wodą do 100 ml.
- 3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić wodą do 100 ml.
- 3.4. 0,1-procentowy roztwór (procent wagowy) oranżu metylowego.
- 3.5. 4 N kwas chlorowodorowy.
- 3.6. 0,1 N kwas chlorowodorowy.
- 3.7. 0,1 N roztwór wodorotlenku sodowego.
- 3.8. Odczynnik Luffa-Schoorla:

Starannie mieszając, wlać roztwór kwasu cytrynowego (3.8.2) do roztworu węglanu sodowego (3.8.3). Dodać roztworu siarczynu miedziowego (3.8.1) i uzupełnić wodą do 1 l. Odstawić roztwór na noc do odstania się i przefiltrować. Sprawdzić, czy uzyskany odczynnik jest właściwy (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2 N). Wartość pH roztworu powinna wynosić w przybliżeniu 9,4.

 - 3.8.1. Roztwór siarczynu miedziowego: rozpuścić 25 g czystego siarczynu miedziowego $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, pozbawionego żelaza, w 100 ml wody.
 - 3.8.2. oztwór kwasu cytrynowego: rozpuścić 50 g czystego kwasu cytrynowego $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ w 50 ml wody.
 - 3.8.3. oztwór węglanu sodowego: rozpuścić 143,8 g czystego, bezwodnego węglanu sodowego w około 300 ml ciepłej wody. Pozostawić do ostygnięcia.
- 3.9. N roztwór tiosiarczynu sodowego.
- 3.10. oztwór skrobi: Dodać mieszaninę 5 g skrobi rozpuszczonej w 30 ml wody do 1 l wrzącej wody. Gotować przez 3 minuty, pozostawić do ostygnięcia i w razie potrzeby dodać 10 mg jodku rtęciowego jako środka konserwującego.
- 3.11. 6 N kwas siarkowy.
- 3.12. 30-procentowy roztwór (procent wagowy) jodku potasowego.
- 3.13. Granulowany pumeks gotowany w kwasie chlorowodorowym, wypłukany w wodzie i wysuszony.
- 3.14. Isopentanol.

4. Aparatura

Mieszarka (bębnowa): około 35-40 obr/min.

5. Procedura

5.1. Ekstrakcja próbek

Z dokładnością do 1 mg odważyć 2,5 g próbki i umieścić porcję próbki w 250-mililitrowej kolbie miarowej. Dodać 200 ml etanolu (3.1) i mieszać w mieszarce bębnowej przez godzinę. Dodać 5 ml roztworu Carreza I (3.2) i mieszać przez minutę, następnie dodać 5 ml roztworu Carreza II (3.3) i ponownie mieszać przez minutę. Uzupełnić do pełnej objętości etanolem (3.1), poddać homogenizacji i przefiltrować. Odlać 200 ml filtratu i odparować do około połowy objętości w celu usunięcia większości etanolu. Pozostałość po odparowaniu przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 200 ml za pomocą ciepłej wody, ostudzić, uzupełnić do pełnej objętości wodą, poddać homogenizacji i w razie potrzeby przefiltrować. Roztwór ten będzie stosowany do oznaczania zawartości cukrów redukujących i całkowitej zawartości cukru po inwersji.

5.2. Oznaczanie cukrów redukujących

Odmierzyć pipetą porcję roztworu nieprzekraczającą 25 ml, która zawiera mniej niż 60 mg cukrów redukujących wyrażonych zawartością glukozy. W razie potrzeby uzupełnić destylowaną wodą do 25 ml i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luffa-Schoorla. Wynik jest wyrażony jako udział procentowy glukozy w próbce.

5.3. Oznaczanie całkowitej zawartości cukru po inwersji

Odmierzyć pipetą 50 ml roztworu i przenieść do 100-mililitrowej kolby miarowej. Dodać kilka kropli roztworu oranżu metylowego (3.4), następnie ostrożnie i ciągle mieszając, dodawać 4 N kwas chlorowodorowy (3.5), dopóki roztwór nie zmieni barwy na zdecydowaną czerwień. Dodać 15 ml 0,1 N kwasu chlorowodorowego (3.6), zanurzyć kolbę w mocno wrzącej wodzie i pozostawić w niej przez 30 minut. Ostudzić gwałtownie do około 20 °C i dodać 15 ml 0,1 N roztworu wodorotlenku sodu (3.7). Uzupełnić wodą do 100 ml i poddać homogenizacji. Odlać nie więcej niż 25 ml zawierających mniej niż 60 mg cukrów redukujących wyrażonych zawartością glukozy. W razie potrzeby uzupełnić destylowaną wodą do 25 ml i oznaczyć zawartość cukrów redukujących metodą Luffa-Schoorla. Wynik jest wyrażony jako udział procentowy glukozy lub w stosownych przypadkach sacharozy przez pomnożenie przez współczynnik równy 0,95.

5.4. Miareczkowanie metodą Luffa-Schoorla

Odmierzyć pipetą 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla (3.8) i przenieść do kolby Erlenmeyera o pojemności 300 ml; dodać dokładnie 25 ml sklarowanego roztworu cukru. Dodać 2 granulki pumeksu (3.13). Mieszać ręcznie, jednocześnie podgrzewając na wolnym ogniu o średniej wielkości i doprowadzić ciecz do wrzenia mniej więcej w ciągu 2 minut. Natychmiast postawić kolbę Erlenmeyera na siatce drucianej pokrytej azbestem z otworem o średnicy około 6 cm, pod którym pali się ogień. Wielkość płomienia należy regulować w taki sposób, aby podgrzewane było tylko dno kolby. Do kolby Erlenmeyera zamontować chłodnicę zwrotną. Zawartość kolby gotować dokładnie przez 10 minut. Ostudzić natychmiast w zimnej wodzie i po upływie około pięciu minut miareczkować w następujący sposób:

Dodać 10 ml roztworu jodku potasowego (3.12) i natychmiast po tym (ostrożnie ze względu na ryzyko nadmiernego pienienia) dodać 25 ml 6 N kwasu siarkowego (3.11). Miareczkować 0,1 N roztworem tiosiarczanu sodowego (3.9), aż do momentu pojawienia się mętnego żółtego koloru, dodać wskaźnika skrobiowego (3.10) i zakończyć miareczkowanie.

Przeprowadzić takie samo miareczkowanie dokładnie odmierzonej mieszaniny 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla (3.8) i 25 ml wody, po dodaniu 10 ml roztworu jodku potasowego (3.12) i 25 ml 6 N kwasu siarkowego (3.11) bez gotowania.

6. Obliczanie wyników

Korzystając z załączonej tabeli, ustalić ilość glukozy w mg, która odpowiada różnicy między wynikami dwóch miareczkowań, wyrażonej w ml 0,1 N tiosiarczanu sodowego.

Wynik wyrazić jako udział procentowy glukozy w próbce.

7. Procedury specjalne

7.1. W przypadku pasz o dużej zawartości melasy oraz innych pasz, które nie są zbyt jednolite, odważyć 20 g, wrzucić do kolby miarowej o pojemności 1 l i dolać 500 ml wody. Mieszać przez godzinę w mieszarce bębnowej. Sklarować za pomocą odczynników Carreza I (3.2) i II (3.3) zgodnie z opisem w ppkt 5.1, jednakże tym razem stosując czterokrotne ilości każdego odczynnika. Uzupełnić do pełnej objętości 80-procentowym etanolem (procent objętościowy).

Poddać homogenizacji i przefiltrować. Usunąć etanol zgodnie z opisem w ppkt 5.1. Jeżeli brak jest skrobi dekstrynowanej, uzupełnić do pełnej objętości destylowaną wodą.

7.2. W przypadku melasy i pasz prostych, które są bogate w cukier i prawie pozbawione skrobi (chleb świętojański, suszona krajanka buraczana itd.) odważyć 5 g, wrzucić do kolby miarowej o pojemności 250 ml i dolać 200 ml destylowanej wody. Mieszać w mieszarce bębnowej przez godzinę lub w razie potrzeby dłużej. Sklarować za pomocą odczynników Carreza I (3.2) i II (3.3) zgodnie z opisem w ppkt 5.1. Uzupełnić do pełnej objętości zimną wodą, poddać homogenizacji i przefiltrować. W celu oznaczenia zawartości całkowitej cukrów postępować dalej zgodnie z ppkt 5.3.

8. Uwagi

- 8.1. Aby zapobiec pienieniu, wskazane jest dodanie (bez względu na objętość) około 1 ml isopentalu (3.14) przed gotowaniem z odczynnikiem Luffa-Schoorla.
- 8.2. Różnica całkowitej zawartości cukrów po inwersji, wyrażona zawartością glukozy i zawartość cukrów redukujących, wyrażona zawartością glukozy pomnożonej przez 0,95 daje zawartość procentową sacharozy.
- 8.3. W celu oznaczenia zawartości cukrów redukujących, bez laktozy, można zastosować dwie metody:
- 8.3.1. W obliczeniach przybliżonych zawartość laktozy ustaloną inną metodą analizy należy pomnożyć przez 0,675 i odjąć uzyskany wynik od zawartości cukrów redukujących.
- 8.3.2. W dokładnych obliczeniach zawartości cukrów redukujących, bez laktozy, w dwóch końcowych oznaczeniach musi być użyta ta sama próbka. Jedna z analiz dotyczy części roztworu uzyskanego w ppkt 5.1, druga analiza dotyczy części roztworu uzyskanego podczas oznaczania laktozy metodą przewidzianą do tego celu (po fermentacji innych rodzajów cukrów i sklarowaniu).

W obu przypadkach zawartość cukru jest oznaczana metodą Luffa-Schoorla i obliczana w mg glukozy. Jedna wartość jest odejmowana od drugiej, a różnica wyrażana jest jako udział procentowy w próbce.

Przykład

Dwie pobrane objętości odpowiadają próbce o masie 250 g dla każdego oznaczenia.

W pierwszym przypadku zużyto 17 ml 0,1 N roztworu tiosiarczanu sodowego odpowiadającego 44,2 mg glukozy; w drugim 11 ml odpowiadającego 27,6 mg glukozy.

Różnica stanowi 16,6 mg glukozy.

A zatem zawartość cukrów redukujących (bez laktozy), obliczonych jako zawartość glukozy wyniesie:

$$\frac{4 \times 16,6}{10} = 6,64 \%$$

Tabela wartości dla 25 ml odczynnika Luffa-Schoorla

objętość 0,1 N Na₂S₂O₃ (ml), podgrzewanie – 2 min, gotowanie – 10 min

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N	Glukoza, fruktoza, cukry inwertowane C ₆ H ₁₂ O ₆		Laktoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Maltoza C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N
	ml	mg	różnica	mg	różnica	mg	
1	2,4	2,4	3,6	3,7	3,9	3,9	1
2	4,8	2,4	7,3	3,7	7,8	3,9	2
3	7,2	2,5	11,0	3,7	11,7	3,9	3
4	9,7	2,5	14,7	3,7	15,6	4,0	4
5	12,2	2,5	18,4	3,7	19,6	3,9	5
6	14,7	2,5	22,1	3,7	23,5	4,0	6
7	17,2	2,6	25,8	3,7	27,5	4,0	7
8	19,8	2,6	29,5	3,7	31,5	4,0	8
9	22,4	2,6	33,2	3,8	35,5	4,0	9
10	25,0	2,6	37,0	3,8	39,5	4,0	10
11	27,6	2,7	40,8	3,8	43,5	4,0	11
12	30,3	2,7	44,6	3,8	47,5	4,1	12
13	33,0	2,7	48,4	3,8	51,6	4,1	13
14	35,7	2,8	52,2	3,8	55,7	4,1	14
15	38,5	2,8	56,0	3,9	59,8	4,1	15
16	41,3	2,9	59,9	3,9	63,9	4,1	16
17	44,2	2,9	63,8	3,9	68,0	4,2	17
18	47,1	2,9	67,7	4,0	72,2	4,3	18
19	50,0	3,0	71,7	4,0	76,5	4,4	19
20	53,0	3,0	75,7	4,1	80,9	4,5	20
21	56,0	3,1	79,8	4,1	85,4	4,6	21
22	59,1	3,1	83,9	4,1	90,0	4,6	22
23	62,2		88,0		94,6		23

13. OZNACZANIE TEOBROMINY

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości teobrominy w produktach ubocznych przetwarzania ziarna kakao-
wego.

2. Zasada

Teobromina ekstrahowana jest chloroformem. Ekstrakt jest odparowywany aż do wysuszenia, rozpuszczany w
wodzie i traktowany określoną ilością roztworu azotanu srebra. Wydzielony kwas azotowy jest miareczkowany
roztworem wodorotlenku sodowego.

3. Odczynniki

- 3.1. Czysty chloroform.
- 3.2. Amoniak o gęstości 0,958.
- 3.3. Czysty, bezwodny siarczan sodowy.
- 3.4. 0,1 N roztwór wodorotlenku sodowego.
- 3.5. 0,1 N roztwór azotanu srebra.
- 3.6. 1-procentowy (procent wagowy) etylowy roztwór czerwieni fenolowej.
- 3.7. Eter etylowy.

4. Aparatura

500-mililitrowe kolby o płaskim dnie ze szlifowanym korkiem szklanym.

5. Procedura

Z dokładnością do 1 mg odważyć próbkę o masie nie większej niż 10 mg zawierającą nie więcej niż 80 mg
teobrominy, umieścić w 500-mililitrowej kolbie o płaskim dnie ze szlifowanym korkiem szklanym i dodać 270 ml
chloroformu (3.1) i 10 ml amoniaku (3.2). Kolbę zatkać i energicznie potrząsać przez 5 minut. Dodać 12 g
bezwodnego siarczanu sodowego (3.3), ponownie wstrząsnąć i odstawić do następnego dnia celem odstania się.
Odfiltrować do 500-mililitrowej kolby Erlenmeyera, a pozostałość wymyć 100 ml chloroformu (3.1). Oddesty-
lować rozpuszczalnik i usunąć ostatnie śladowe ilości nad wrzącą wodą. Ponownie rozpuścić ekstrakt w 50 ml
wody i doprowadzić do wrzenia.

Ostudzić, dokładnie zubożyć roztworem wodorotlenku sodowego (3.4) w obecności 0,5 ml roztworu czerwieni
fenolowej (3.6). Dodać następnie 20 ml roztworu azotanu srebra (3.5). Miareczkować wydzielony kwas azotowy
roztworem wodorotlenku sodowego (3.4), aż do zmiany barwy wskaźnika (pH = 7,4).

6. Obliczanie wyników

1 ml 0,1 N NaOH odpowiada 18 mg teobrominy.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

Produkty zawierające ponad 8 % surowej substancji tłuszczowej muszą być najpierw odtłuszczone podczas
6-godzinnej ekstrakcji eteru naftowego (o temperaturze wrzenia 40-60 °C).

14. OZNACZANIE MOCZNIKA

1. Cel i zakres metody

Metoda ta umożliwia oznaczenie zawartości mocznika w paszach.

2. Zasada

Próbka tworzy zawiesinę wodną ze środkiem klarującym. Zawiesina jest filtrowana. Zawartość mocznika w filtracie oznaczana jest po dodaniu 4-dwumetyloaminobenzaldehydu (4-DMAB) w wyniku pomiaru gęstości optycznej przy długości fali 420 nm.

3. Odczynniki

- 3.1. Roztwór 4-dwumetyloaminobenzaldehydu: rozpuścić 1,6 g czystego 4-DMAB, w 100 ml 96 % etanolu i dodać 10 ml czystego kwasu chlorowodorowego (o gęstości 1,19). Trwałość tego odczynnika wynosi maksymalnie 2 tygodnie.
- 3.2. Roztwór Carreza I: rozpuścić w wodzie 21,9 g octanu cynkowego $Zn(CH_2COO)_2 \cdot 2H_2O$ i 3 g kwasu octowego lodowatego. Uzupełnić wodą do 100 ml.
- 3.3. Roztwór Carreza II: rozpuścić w wodzie 10,6 g żelazocyjanku potasowego $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Uzupełnić wodą do 100 ml.
- 3.4. Czysty aktywny węgiel nieabsorbujący mocznika (należy sprawdzić).
- 3.5. Czysty 0,1-procentowy roztwór (procent wagowy) mocznika.

4. Aparatura

- 4.1. Mieszarka (bębnowa): o obrotach 35 do 40 obr/min.
- 4.2. Probówki: 160 × 16 mm ze szklanymi, szlifowanymi korkami.
- 4.3. Spektrofotometr.

5. Procedura

5.1. Analiza próbki

Z dokładnością do 1 mg odważyć 2 g próbki i umieścić w 500-mililitrowej kolbie miarowej razem z 1 g aktywnego węgla (3.4). Dodać 400 ml wody i po 5 ml roztworu Carreza I (3.2) i II (3.3). Mieszać przez 30 minut w mieszarce bębnowej. Uzupełnić wodą do pełnej objętości, wstrząsnąć i przefiltrować.

Do probówek ze szklanymi szlifowanymi korkami odlać 5 ml przezroczystego, bezbarwnego filtratu, dodać 5 ml roztworu 4-DMAB (3.1) i wymieszać. Wstawić probówki do wody o temperaturze 20 °C. Po 15 minutach zmierzyć gęstość optyczną roztworu próbki spektrofotometrem o długości fali 420 nm przez porównanie z roztworem odczynników ze ślepej próby.

5.2. Krzywa wzorcowania

Do kolb miarowych o pojemności 100 ml nalać 1, 2, 4, 5 i 10 ml roztworu mocznika (3.5) i uzupełnić do pełnej objętości wodą. Z każdego roztworu odlać 5 ml, dodać 5 ml roztworu 4-DMAB (3.1) do każdej kolby, poddać homogenizacji i zmierzyć gęstość optyczną w podany wyżej sposób, porównując z roztworem kontrolnym zawierającym 5 ml 4-DMAB i 5 ml wody pozbawionej mocznika. Wykreślić krzywą wzorcowania.

6. Obliczanie wyników

Na podstawie krzywej wzorcowania oznaczyć zawartość mocznika w próbce.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

7. Uwagi

- 7.1. Jeśli zawartość mocznika przekracza 3 %, zmniejszyć masę próbki do 1 g lub rozcieńczyć pierwotny roztwór tak, aby w 500 ml nie znajdowało się więcej niż 50 mg mocznika.
- 7.2. W przypadku niskiej zawartości mocznika zwiększać masę próbki dotąd, dopóki filtrat pozostaje przezroczysty i bezbarwny.
- 7.3. Jeśli próbka zawiera proste związki azotowe, takie jak aminokwasy, gęstość optyczną należy mierzyć przy długości fali 435 nm.

15. OZNACZANIE ALKALOIDÓW W ŁUBINIE**1. Cel i zakres metody**

Metoda ta umożliwia oznaczenie alkaloidów w nasionach łubinu.

2. Zasada

Alkaloidy rozpuszczane są w mieszaninie eteru etylowego i chloroformu, a następnie ekstrahowane kwasem chlorowodorowym. Alkaloidy są wytrącane w kwasie krzemowo-wolframowym. Wytrącony osad jest spopieleny, a pozostałość ważona.

3. Odczynniki

- 3.1. Eter etylowy.
- 3.2. Chloroform.
- 3.3. 4 N roztwór wodorotlenku sodowego.
- 3.4. 0,3 N kwas chlorowodorowy.
- 3.5. Czysty chlorek sodowy.
- 3.6. 10-procentowy roztwór (procent wagowy) kwasu krzemowo-wolframowego $S \cdot O_2 \cdot 12WO_3 \cdot 26H_2O$.

4. Aparatura

- 4.1. Mieszarka mechaniczna.
- 4.2. Platynowe, kwarcowe lub porcelanowe tygłe do spopielenia.
- 4.3. Elektryczny piec muflowy.

5. Procedura

Z dokładnością do 5 mg odważyć 15 g próbki i umieścić w pojemniku o pojemności około 200 ml, wyposażonym w szlifowany korek (np. rozdzielacz). Dodać dokładnie 100 ml eteru etylowego (3.1) i 50 ml chloroformu (3.2), a następnie pipetą z podziałką dodać 10 ml roztworu wodorotlenku sodowego (3.3). Energicznie wstrząsnąć, aby zapobiec zbrylaniu. Ponownie wstrząsnąć kilka razy i zostawić na noc do odstania się. Jeśli ciecz sklarowana nad osadem nie jest całkowicie przejrzysta, dodać kilka kropli wody. Przefiltrować warstwę eteru i chloroformu. Zebrać 50 ml filtratu w kolbie miarowej o pojemności 50 ml i przenieść ilościowo do 150-mililitrowego rozdzielacza, za pomocą 50 ml eteru etylowego (3.1). Ekstrahować trzy razy po kolei dodając 20 ml kwasu chlorowodorowego (3.4), pozostawić do zdekantowania i zbierać ekstrakt kwasu po każdej ekstrakcji. Zebrać ekstrakty w 250-mililitrowej zlewce i usunąć ostatnie ilości śladowe eteru i chloroformu, delikatnie podgrzewając zawartość zlewki. Dodać około 1 g chlorku sodowego (3.5), pozostawić do ostygnięcia i wytrącić alkaloidy w roztworze kwasu krzemowo-wolframowego (3.6). Mieszać mieszarką mechaniczną przez 30 minut. Pozostawić na noc do odstania się, przefiltrować przez filtr pozbawiony popiołu i zmyć wytrącony osad kolejno dwa razy 10 mililitrami i dwa razy 5 mililitrami kwasu chlorowodorowego (3.4). Umieścić filtr z osadem w tyglu i spopielić w temperaturze 900 °C. Pozostawić do ostygnięcia i zważyć.

6. Obliczanie wyników

Zawartość alkaloidów w próbce oblicza się, mnożąc masę popiołu przez współczynnik równy 0,2.

Wynik wyrazić jako udział procentowy w próbce.

16. OSZACOWANIE AKTYWNOŚCI UREAZY W PRODUKTACH POCHODZĄCYCH Z SOI

1. Cel i zakres metody

Próba ta umożliwi oszacowanie aktywności ureazy w produktach pochodzących z soi oraz wykazanie, czy produkty te były gotowane wystarczająco długo.

2. Zasada

Aktywność ureazy jest oceniana poprzez ilość azotu amonowego na 1 g produktu na minutę uwolnionego z roztworu mocznika w temperaturze 30 °C.

3. Odczynniki

3.1. 0,1 N kwas chlorowodorowy.

3.2. 0,1 N roztwór wodorotlenku sodowego.

3.3. Środek wiążący z 0,05-molowego fosforanu w 1000 ml zawierający 4,45 g fosforanu dwusodowego ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) i 3,40 g fosforanu potasowego (KH_2PO_4).

3.4. Świeżo przygotowany mocznikowy środek wiążący zawierający 30,0 g mocznika na 1000 ml środka wiążącego (3.3); pH 6,9-7,0.

4. Aparatura

4.1. Aparatura do miareczkowania potencjometrycznego lub bardzo dokładny pehametr (0,02 pH) z mieszadłem magnetycznym.

4.2. Kąpiel wodna z termostatem nastawionym dokładnie na 30 °C.

4.3. Probówki: 150 × 18 mm ze szlifowanymi korkami.

5. Procedura

Zemleć około 10 g próbki (na przykład w młynku do kawy) tak, żeby przechodziła przez sito o wielkości oczka 0,2 mm. Z dokładnością do 1 mg odważyć 0,2 g zmielonej próbki, wsypać do probówki ze szlifowanym korkiem szklanym i dodać 10 ml środka wiążącego z mocznikiem (3.4). Zatkać natychmiast i energicznie wstrząsnąć. Wstawić probówkę do kąpeli wodnej o temperaturze dokładnie 30 °C i trzymać w wodzie dokładnie przez 30 minut. Natychmiast dodać 10 ml 0,1 N kwasu chlorowodorowego (3.1), gwałtownie ochłodzić do temperatury 20 °C i ilościowo przenieść zawartość probówki do naczynia do miareczkowania, przepłukując dwukrotnie 5 mililitrami wody. Miareczkować elektrometrycznie natychmiast i szybko 0,1 N roztworem wodorotlenku sodowego (3.2) do osiągnięcia pH = 4,7, stosując szklaną elektrodę (4.1).

Próbę ślepą przeprowadzić w następujący sposób:

Próbkę o masie 0,2 g, odważoną z zaokrągleniem do 1 mg, szybko umieścić w probówce ze szlifowanym korkiem szklanym, dodać 10 ml 0,1 N kwasu chlorowodorowego (3.1), a następnie 10 ml środka wiążącego z mocznikiem (3.4). Natychmiast ochłodzić probówkę w wodzie z lodem i pozostawić w niej przez 30 minut. W opisanych wyżej warunkach przenieść zawartość probówki do naczynia do miareczkowania dodając 0,1 N roztwór wodorotlenku sodowego (3.2) do osiągnięcia pH równego 4,7.

6. Obliczanie wyników

Aktywność ureazy obliczana jest z następującego wzoru:

$$\frac{\text{mg N}}{\text{g min}} = \frac{1 \times 4(b - a)}{30 \times E}$$

gdzie:

a = = objętość w ml 0,1 N roztworu wodorotlenku sodowego zużytego przez próbkę,

b = = objętość w ml 0,1 N roztworu wodorotlenku sodowego zużytego w ślepej próbie,

E = = masa próbki w gramach g.

7. Uwagi

7.1. Opisywana metoda nadaje się do określania aktywności ureazy w zakresie do 1 mg N/g/min w temperaturze 30 °C. Dla bardziej aktywnych produktów wielkość próbki można zmniejszyć do 50 mg.

7.2. Produkty zawierające ponad 10 % surowej substancji tłuszczowej należy najpierw odtłuścić na zimno.
