

31971L0250

12.7.1971

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

L 155/13

PRVÁ SMERNICA KOMISIE
z 15. júna 1971,
ktorou sa stanovujú analytické metódy na úradnú kontrolu krmív

(71/250/EHS)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady z 20. júla 1970 o zavedení metód vzorkovania a analýz spoločenstva na úradnú kontrolu krmív⁽¹⁾, najmä na jej článok 2,

keďže smernica vyžaduje, aby sa úradné kontroly krmív vykonávali metódami vzorkovania a analytickými metódami spoločenstva na účely kontroly dodržiavania požiadaviek vyplývajúcich z ustanovení daných zákonmi, nariadeniami alebo inými právnymi predpismi a správnymi opatreniami týkajúcimi sa kvality a zloženia krmív;

keďže všetky potrebné analytické metódy sa musia stanoviť čo možno najskôr; keďže zavedenie metód na stanovenie kyseliny kyanovodíkovej, vápnika, uhličitanov, popola, popola nerozpustného v HCl, chlór z chloridov, horčičného oleja, laktózy, draslíka, sodíka, cukrov, teobromínu a močoviny a stanovenia alkaloidov v lupinách a odhadu aktivity ureázy v produktoch pochádzajúcich zo sóje predstavuje prvú etapu tohto procesu;

keďže opatrenia tejto smernice sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre krmivá,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

Článok 1

Členské štáty budú vyžadovať, aby analýzy na úradné kontroly krmív, pokiaľ ide o obsahy kyseliny kyanovodíkovej, vápnika, uhličitanov, popola, popola nerozpustného v HCl, chlór z chloridov, horčičného oleja, laktózy, draslíka, sodíka, cukrov, teobromínu a močoviny v nich a stanovenia alkaloidov v lupinách a odhadu aktivity ureázy v produktoch pochádzajúcich zo sóje boli vykonávané metódami uvedenými v prílohe k tejto smernici.

Článok 2

Členské štáty uvedú do účinnosti zákony, iné právne predpisy a administratívne opatrenia potrebné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr do 1. júla 1972. Bezodkladne o tom informujú Komisiu.

Článok 3

Táto smernica je adresovaná členským štátom.

V Bruseli 15. júna 1971

Za Komisiu
predseda
Franco M. MALFATTI

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 170, 3.8.1970, s. 2.

PRÍLOHA

METÓDY ANALÝZY ZLOŽIEK KRMÍV

1. ÚVOD

Metódy analýzy zložiek krmív sú všeobecne použiteľné na všetky krmné suroviny a krmné zmesi. Napriek tomu si určité krmivá z dôvodov charakteristík svojho zloženia vyžadujú svoje vlastné analytické metódy. Tieto prípady boli uvedené pod názvom „poznámky“ v opise metód.

Ak na stanovenie určitej zložky krmiva možno použiť dve alebo viac metód, výber metódy musí byť prenechaný, pokiaľ nie je uvedené inak, predmetnému skúšobnému laboratóriu, použitá metóda však musí byť uvedená v osvedčení o analýze.

Príprava vzorky na analýzu

Z hľadiska chemickej analýzy je *rozhodujúce*, aby bola vykonaná v *homogénnej vzorke*. Musí však existovať možnosť vykonať určité makroskopické alebo mikroskopické stanovenia a taktiež stanovenie vlhkosti vo vzorke v stave, v akom prišla do laboratória. Pre splnenie týchto dvoch požiadaviek sa *vzorka rozdelí na dve časti*. *Jedna časť sa odoberie bez úpravy, druhá sa pripraví na chemickú analýzu nasledujúcim spôsobom*.

Rozdeľte vzorku pomocou mechanického prístroja alebo rukou po opatrnom premiešaní celej vzorky na čistej suchej podložke. V posledne uvedenom prípade je vhodné použiť metódu kvartácie, ktorá pozostáva v odoberaní vzoriek z dvoch protilahlých častí. Nakoniec odoberte na analýzu časť váziacu približne 100 g a podľa potreby ju pomelte tak, aby celá vzorka prepadla cez sito s kruhovými otvormi o priemeru 1 mm. Vzorku okamžite preneste do suchej nádoby so vzduchotesným uzáverom a zatvorte ju.

Ak je vzorka veľmi vlhká, musí sa vopred predušiť, aby obsah vlhkosti klesol na 8 až 12 %. Na tento účel sušte vzorku pri vhodnej teplote primeranú dobu.

Chemikálie a prístroje

V opise analytických metód sa uvádzajú len špeciálne prístroje alebo zariadenia alebo také, ktoré si vyžadujú špeciálne normy. Nepovažuje sa za potrebné uvádzať všetky prístroje alebo zariadenia, ktoré sú súčasťou bežného vybavenia skúšobných laboratórií.

Taktiež platí, že ak sa spomína *voda* v súvislosti s *riedením* alebo premývaním, vždy je to *destilovaná voda*. Podobne, ak sa spomína *roztok* bez ďalšieho označenia, ide o *roztok v destilovanej vode*.

Vyjadrenie výsledkov

Výsledok uvedený v osvedčení o analýze predstavuje priemernú hodnotu získanú na základe najmenej dvoch skúšok. Na základe osobitných ustanovení, bude vyjadrený ako percento z pôvodnej vzorky v stave, v akom vzorka prišla do laboratória. Výsledok sa nesmie uvádzať na viac platných číslic, ako to umožňuje správnosť analytickej metódy.

2. STANOVENIE KYSELINY KYANOVODÍKOVEJ

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah kyseliny kyanovodíkovej, voľnej a kombinovanej vo forme glykozidov, v krmivách a najmä v produktoch pochádzajúcich z lanového semena, maniokovej múky a určitých druhov strukovín.

2. Podstata metódy

Vzorka sa rozmieša vo vode. Kyselina kyanovodíková sa uvoľní účinkom enzýmov, vydestiluje sa vodnou parou a zachytí sa do známeho objemu okysleného roztoku dusičnanu strieborného. Kyanid strieborný sa oddelí filtráciou a prebytok dusičnanu strieborného sa stitruje roztokom tiokyanatanu amónneho.

3. Chemikálie

- 3.1. Suspenzia sladkých mandlí: rozdrvte 20 olúpaných sladkých mandlí v 100 ml vody pri teplote 37 až 40 °C. Skontrolujte, či sa v 10 ml suspenzie nenachádza kyselina kyanovodíková pomocou papiera namočeného do pikranu sodného alebo vykonaním slepého pokusu postupom opísaným v poslednom odseku bodu 5.
- 3.2. 10 % roztok (w/v) octanu sodného, neutrálny na fenolftaleín
- 3.3. Protipeniaca emulzia (napr. silikónový olej)
- 3.4. Kyselina dusičná, d: 1,40
- 3.5. Roztok dusičnanu strieborného: 0,02 N
- 3.6. Roztok tiokyanatanu amónneho: 0,02 N
- 3.7. Nasýtený roztok síranu železito-amónneho
- 3.8. Amoniak, d: 0,958.

4. Prístroje

- 4.1. Sušiareň s termostatom nastavená na 38 °C
- 4.2. Destilačný prístroj na destiláciu vodnou parou, s chladičom so zahnutým predĺženým koncom
- 4.3. 1000 ml banky s rovným dnom so zábrusovými zátkami
- 4.4. Olejový kúpeľ
- 4.5. Byreta s delením 1/20 ml.

5. Postup

Navážte 20 g vzorky s presnosťou na 5 mg, vložte do 1 litrovej banky s rovným dnom a pridajte 50 ml vody a 10 ml suspenzie sladkých mandlí (3.1). Banku zazátkujte a preneste do sušiarne s teplotou 38 °C na šesť hodín. Následne ochladte na laboratórnu teplotu a pridajte 80 ml vody, 10 ml roztoku octanu sodného (3.2) a kvapku protipeniacej emulzie (3.3).

Pripojte banku na destilačný prístroj a vložte do olejového kúpeľa zahriateho na teplotu mierne nad 100 °C. Nadeštilujte 200 až 300 ml kvapaliny tak, že necháte cez banku prechádzať intenzívny prúd pary a budete ju mierne zohrievať v olejovom kúpeľi. Destilát zachyťte do Erlenmeyerovej banky chránenej pred svetlom a obsahujúcej presne 50 ml 0,02 N roztoku dusičnanu strieborného (3.5) a 1 ml kyseliny dusičnej (3.4). Presvedčte sa, či je koniec chladiča ponorený do roztoku dusičnanu strieborného.

Preneste obsah Erlenmeyerovej banky do 500 ml odmernej banky, doplňte na požadovaný objem vodou, premiešajte a prefiltrujte. Odoberte 250 ml filtrátu, pridajte 1 ml roztoku síranu železito-amónneho (3.7) a stitrujte späť prebytok dusičnanu strieborného 0,02 N roztokom tiokyanatanu amónneho (3.6) pridaného byretou s delením 1/20 ml.

Ak sa to vyžaduje, môže sa vykonať slepý pokus tým istým postupom s 10 ml suspenzie sladkých mandlí (3.1), s vynechaním vzorky, ktorá sa má analyzovať.

6. Výpočet výsledkov

Ak slepý pokus naznačí, že sa 0,02 N roztok dusičnanu strieborného spotreboval, odpočítajte túto hodnotu od objemu spotrebovaného destilátom vzorky. 1 ml 0,02 N AgNO₃ zodpovedá 0,54 mg HCN. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámka

Ak vzorka obsahuje veľké množstvo sulfidov (napr. strukoviny), vytvorí sa čierna zrazenina sulfidu strieborného, ktorá sa prefiltruje spolu so zvyškom kyanidu strieborného. Tvorba tejto zrazeniny spôsobuje stratu 0,02 N roztoku dusičnanu strieborného, ktorého objem sa musí odpočítať od objemu použitého na výpočet obsahu HCN. Postupujte nasledovne:

Nechajte pôsobiť na usadeninu zachytenú na filtri 50 ml amoniaku (3.8), aby sa kyanid strieborný rozpustil. Zvyšok premyte zriedeným amoniakom a potom v ňom stanovte obsah striebra. Získanú hodnotu prepočítajte na ml 0,02 N roztoku dusičnanu strieborného.

Obsah HCN vo vzorke sa môže stanoviť aj titráciou okysleného amoniakálneho filtrátu kyselinou dusičnou.

3. STANOVENIE VÁPNIKA

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah celkového vápnika v krmivách.

2. Podstata metódy

Vápnik sa spopolní, popol sa rozpustí v kyseline chlorovodíkovej a vápnik sa vyzráža ako šťavelan vápenatý. Zrazenina sa rozpustí v kyseline sírovej a vznikajúca kyselina šťavelová sa stitruje roztokom manganistanu draselného.

3. Chemikálie

- 3.1. Kyselina chlorovodíková p. a., d: 1,14
- 3.2. Kyselina dusičná p. a., d: 1,40
- 3.3. Kyselina sírová p. a., d: 1,13
- 3.4. Amoniak, p. a., d.:0,98
- 3.5. Za studena nasýtený roztok šťavelanu amónneho p. a.
- 3.6. 30 % roztok (w/v) kyseliny citrónovej p. a.
- 3.7. 5 % roztok (w/v) chloridu amónneho p. a.
- 3.8. 0.04 % roztok (w/v) brómkrezolovej zelene
- 3.9. 0,1 N roztok manganistanu draselného

4. Prístroje

- 4.1. Elektrická muflová pec s cirkuláciou vzduchu a s termostatom
- 4.2. Platinové, kremičitanové alebo porcelánové spaľovacie misky
- 4.3. Sklenené misky s fritou o porozite G₄.

5. Postup

Navážte približne 5 g vzorky (alebo viac, ak je to potrebné) s presnosťou na 1 mg, spopolnite pri teplote 550 °C a popol preneste do 250 ml kadičky.

Pridajte 40 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1), 60 ml vody a niekoľko kvapiek kyseliny dusičnej (3.2). Privedte do varu a nechajte vriieť tridsať minút. Roztok ochlaďte a preneste do 250 ml odmernej banky. Opláchnite, objem doplňte vodou po značku, premiešajte a prefiltrujte.

Do 250 ml kadičky napipetujte primerané množstvo obsahujúce 10 až 40 mg vápnika podľa predpokladaného obsahu vápnika. Pridajte 1 ml roztoku kyseliny citrónovej (3.6) a 5 ml roztoku chloridu amónneho (3.7).

Objem doplňte približne na 100 ml vodou. Privedte do varu, pridajte 8 až 10 kvapiek roztoku brómkrezolovej zelenej (3.8) a 30 ml teplého roztoku šťavelanu amónneho (3.5). Ak sa tvorí zrazenina, rozpustite ju pridaním niekoľkých kvapiek kyseliny chlorovodíkovej (3.1).

Veľmi pomaly zneutralizujte amoniakom (3.4) za stáleho miešania, až kým pH nedosiahne 4,4 až 4,6 (t. j. do zmeny farby indikátora). Kadičku vložte do vriaceho vodného kúpeľa na 30 minút, aby sa usadila vytvorená zrazenina. Kadičku vyberte z vodného kúpeľa. Nechajte stáť jednu hodinu a potom prefiltrujte cez misku s fritou G4.

Kadičku a misku premývajte vodou až do úplného odstránenia prebytku šťavelanu amónneho (nepriťomnosť chloridov v premývacej vode znamená, že boli dostatočne vymyté).

Zrazeninu zachytenú na filtri rozpustite v 50 ml teplej kyseliny sírovej (3.3). Misku vypláchnite teplou vodou a filtrát doplňte približne na objem 100 ml. Zohrejte na 70 – 80 °C a titrujte po kvapkách roztokom manganistanu draselného (3.9) až do vzniku ružovej farby, ktorá vydrží jednu minútu.

6. Výpočet výsledkov

1 ml 0,1 N manganistanu draselného zodpovedá 2,004 g vápnika. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámky

7.1. Pri veľmi nízkom obsahu vápnika postupujte nasledovne: Zrazeninu šťavelanu vápenatého prefiltrujte cez bezpopulový filtračný papier. Po premytí filter vysušte a spopolnite v platinovej miske pri teplote 550 °C. Zvyšok rozpustite niekoľkými kvapkami kyseliny sírovej (3.3), odparte do sucha, znovu vyžhajte pri 550 °C a odvážte. Ak W je hmotnosť získaného síranu vápenatého, obsah vápnika v primeranom množstve vzatom na stanovenie = $W \times 0,2944$.

7.2. Ak vzorka pozostáva výlučne z minerálnych látok, rozpustite ju v kyseline chlorovodíkovej bez spopolnenia. Ak ide o produkty, ako je fosforečnan vápenato-hlinitý, ktoré sa ťažko v kyseline rozpúšťajú, pred rozpustením ich roztavte nasledujúcim alkalickým postupom: vzorku dôkladne premiešajte v platinovej miske so zmesou predstavujúcou päťnásobok hmotnosti vzorky, pozostávajúcou z rovnakých množstiev uhličitanu draselného a uhličitanu sodného. Opatrne zahrievajte až do úplného roztavenia zmesi. Ochlaďte a rozpustite v kyseline chlorovodíkovej.

7.3. Ak je obsah horčíka vo vzorke veľký, šťavelan vápenatý vyzrážajte druhýkrát.

4. STANOVENIE UHLIČITANOV

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť množstvo uhličitanov, všeobecne vyjadrené ako uhličitan vápenatý vo väčšine krmív.

V určitých prípadoch sa musí použiť špeciálna metóda (napr. ak ide o uhličitan železa).

2. Podstata metódy

Uhličitan sa rozloží v kyseline chlorovodíkovej, uvoľnený oxid uhličitý sa zachytí do odmernej skúmavky a jeho objem sa porovná s objemom uvoľneným za tých istých podmienok zo známeho množstva uhličitanu vápenatého p. a.

3. Chemikálie

3.1. Kyselina chlorovodíková, d: 1,10

3.2. Uhličitan vápenatý p. a.

3.3. Kyselina sírová, približne 0,1 N zafarbená metylčerveňou.

4. Prístroje

Scheibler-Dietrichov prístroj (pozri obrázok) alebo ekvivalentný prístroj.

5. Postup

Podľa obsahu uhličitanu vo vzorke navážte časť vzorky nasledujúcim spôsobom:

0,5 g, ak ide o produkty s obsahom 50 až 100 % uhličitanov, vyjadrených ako uhličitan vápenatý;

1 g, ak ide o produkty s obsahom 40 až 50 % uhličitanov, vyjadrených ako uhličitan vápenatý;

2 až 3 g, ak ide o ostatné produkty.

Vložte vzorku do banky (4) prístroja, opatrenej malou trubičkou z nerozbitného materiálu, obsahujúcej 10 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1) a banku pripojte k prístroju. Otočte trojcestný kohút (5) tak, aby trubička (1) bola spojená s vonkajškom. Mobilnou trubičkou (2), naplnenou zafarbenou kyselinou sírovou (3.3) a spojenou s odmernou skúmavkou (1), nastavte hladinu kvapaliny na značku nula. Otočte kohútom (5) tak, aby sa trubičky (1) a (3) prepojili, a skontrolujte, či je hladina na nule.

Nechajte kyselinu chlorovodíkovú (3.1) pomaly vyteciť do vzorky, pričom banku nakloňte (4). Vyrovnajte tlaky znížením trubičky (2). Bankou (4) pretrepávajte až do úplného ukončenia uvoľňovania oxidu uhličitého.

Tlak obnovte tak, že kvapalinu v trubičkách (1) a (2) vyrovnáte do rovnakej hladiny. Po *niekoľkých minútach*, po ustálení objemu plynu, zaznamenajte odčítanú hodnotu.

Vykonajte kontrolnú skúšku za tých istých podmienok s použitím 0,5 g uhličitanu vápenatého (3.2).

6. Výpočet výsledkov

Obsah uhličitanov v gramoch vyjadrený ako uhličitan vápenatý, ako percento zo vzorky, sa vypočíta podľa vzorca:

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

v ktorom:

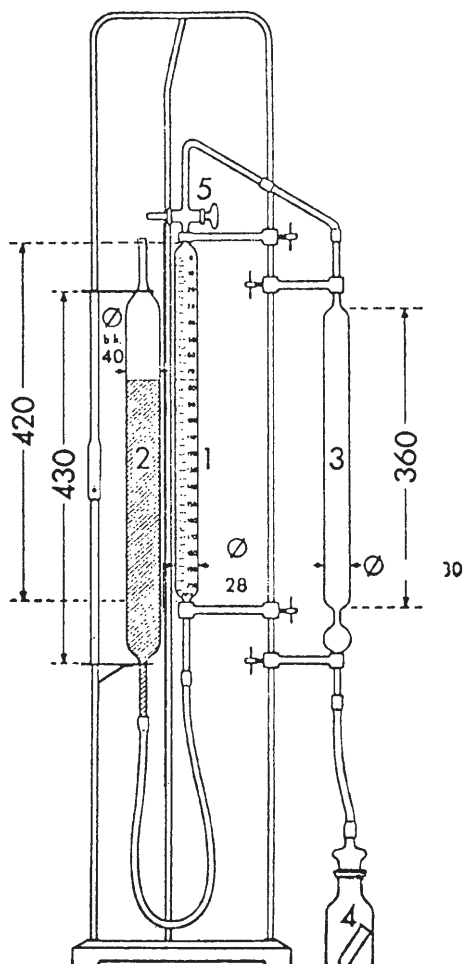
V = ml CO₂ uvoľneného zo vzorky

T = ml CO₂ uvoľneného z 0,5 g CaCO₃ p. a.

W = hmotnosť vzorky v gramoch.

7. Poznámky

- 7.1. Ak je hmotnosť navážky vzorky viac ako 2 g, do banky (4) najskôr pridajte 15 ml destilovanej vody (4) a pred začatím skúšky premiešajte. Pri kontrolnej skúške použite rovnaký objem vody.
- 7.2. Ak má použitý prístroj iný objem ako Scheibler-Dietrichov prístroj, musí sa hmotnosť navážky vzorky a kontrolnej látky, ako aj výpočet výsledkov, príslušne upraviť.

SCHEIBLER-DIETRICHOV PRÍSTROJ NA STANOVENIE CO₂

Mierka 1:8
(merané v mm)

5. STANOVENIE POPOLA

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah popola v krmivách.

2. Podstata metódy

Vzorka sa spopolní pri teplote 550 °C, zvyšok sa odváži.

3. Chemikálie

20 % roztok (w/v) dusičnanu amónneho

4. Prístroje

4.1. Vyhrievacia platňa

4.2. Elektrická muflová pec s termostatom

4.3. Spaľovacie misky vyrobené z platiny alebo zo zliatiny platiny a zlata (10 % Pt, 90 % Au), buď obdĺžnikové (60 x 40 x 25 mm), alebo valcovité (priemer: 60 až 75 mm, výška: 20 až 25 mm).

5. Postup

Navážte s presnosťou na 1 mg približne 5 g vzorky (2,5 g, ak ide o produkty s tendenciou napučiavať) a umiestnite do spaľovacej misky, vopred vyžíhanej a odváženej. Položte misku na vyhrievaciu platňu a postupne zohrievajte až do zuhoľnatenia vzorky. Misku vložte do muflovej pece nastavenej na teplotu 550 °C ± 5 °C. Túto teplotu udržiavajte až do získania bieleho, bledosivého alebo červenkastého popola, bez obsahu uhlíkatých častíc. Vložte misku do exsikátora, nechajte vychladnúť a okamžite odvážte.

6. Výpočet výsledkov

Hmotnosť zvyšku vypočítajte odpočítaním hmotnosti misky.

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámky

7.1. *Látky, ktoré sa ťažko spopolňujú*, sa musia spopolňovať najmenej tri hodiny, ochladiť a potom sa k popolu pridá niekoľko kvapiek 20 % roztoku dusičnanu amónneho, (opatrne, aby sa zabránilo rozptýleniu popola alebo tvorbe hrudiek). Po vysušení v sušiarňi pokračujte v žíhaní. Postup podľa potreby opakujte dovtedy, kým nebude spopolnenie ukončené.

7.2. Ak ide o látky odolné voči úprave opísanej v bode 7.1, postupujte nasledovne: po trojhodinovom spopolňovaní vložte popol do teplej vody a prefiltrujte cez malý bezpopolový filter. Filter a jeho obsah spopolnite v pôvodnej miske. Filtrát vložte do vychladnutej misky, odparte do sucha, spopolnite a odvážte.

7.3. *V prípade olejov a tukov* presne navážte približne 25 g vzorky do misky vhodnej veľkosti. Zuholňujte pod lampou nastavenou na vzorku a pomocou pásika bezpopolového filtračného papiera. Po spálení zvlhčite čo možno najmenším množstvom vody. Vysušte a spopolnite postupom opísaným v bode 5.

6. STANOVENIE POPOLA NEROZPUSTNÉHO V KYSELINE CHLOROVODÍKOVEJ

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť v krmivách obsah minerálnych látok nerozpustných v kyseline chlorovodíkovej. V závislosti od druhu vzorky sa môžu použiť dve metódy.

- 1.1. *Metóda A*: použiteľná na krmne suroviny organického pôvodu a na väčšinu krmných zmesí
- 1.2. *Metóda B*: použiteľná na minerálne zlúčeniny a zmesi a na krmne zmesi, v ktorých je obsah látok nerozpustných v kyseline chlorovodíkovej, stanovený metódou A, väčší ako 1 %.

2. Podstata metódy

- 2.1. *Metóda A*: vzorka sa spopolní, popol sa uvarí v kyseline chlorovodíkovej a nerozpustný zvyšok sa prefiltruje a odváži
- 2.2. *Metóda B*: na vzorku sa pôsobí kyselinou chlorovodíkovou. Roztok sa prefiltruje, zvyšok sa spopolní a takto získaný popol sa spracuje podľa metódy A

3. Chemikálie

- 3.1. Kyselina chlorovodíková 3 N
- 3.2. 20 % roztok (w/v) kyseliny trichlóroctovej
- 3.3. 1 % roztok (w/v) kyseliny trichlóroctovej

4. Prístroje

- 4.1. Vyhrievacia platňa
- 4.2. Elektrická muflová pec s termostatom
- 4.3. Spaľovacie misky vyrobené z platiny alebo zo zliatiny platiny a zlata (10 % Pt, 90 % Au), buď obdĺžnikové (60 x 40 x 25 mm), alebo valcovité (priemer 60 až 75 mm, výška: 20 až 25 mm).

5. Postup

5.1. *Metóda A*:

Vzorku spopolnite postupom opísaným pri stanovení popola. Môže sa použiť aj popol získaný takou analýzou.

Popol vložte do 250 až 400 ml kadičky, pomocou 75 ml 3 N kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Pomaly privedte do varu a nechajte jemne vriieť pätnásť minút. Teplý roztok prefiltrujte cez bezpopolový filtračný papier a zvyšok premývajte teplou vodou až do odstránenia kyslej reakcie. Filter so zvyškom vysušte a spopolnite v odváženej miske pri teplote najmenej 550 °C a najviac 700 °C. Nechajte vychladnúť v exsíkátore a odvážte.

5.2. *Metóda B*:

Navážte 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte do 250 až 400 ml kadičky. Pridajte 25 ml vody a následne 25 ml 3 N kyseliny chlorovodíkovej (3.1), premiešajte a počkajte, kým neustane búrlivý vývoj plynu. Pridajte ďalších 50 ml 3 N kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Počkajte, kým sa neprestane uvoľňovať plyn a potom kadičku vložte do vriaceho vodného kúpeľa na 30 minút alebo podľa potreby aj dlhšie, aby sa dôkladne zhydrolyzoval všetok prítomný škrob.

Prefiltrujte ešte za tepla cez bezpopulový filter a filter premyte 50 ml teplej vody (pozri poznámku 7). Filter so zvyškom vložte do spalovacej misky, vysušte a spopolnite pri teplote najmenej 550 °C a najviac 700 °C. Popol vložte do 250 až 400 ml kadičky, pomocou 75 ml 3 N kyseliny chlorovodíkovej (3.1), pokračujte postupom opísaným v druhom pododseku bodu 5.1.

6. Výpočet výsledkov

Hmotnosť zvyšku vypočítajte odpočítaním hmotnosti misky. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámka

Ak je filtrácia obtiažna, začnite analýzu znova, pričom 50 ml 3 N kyseliny chlorovodíkovej (3.1) nahraďte 50 ml 20 % kyseliny trichlóroctovej (3.2) a filter premyte teplým roztokom 1 % kyseliny trichlóroctovej (3.3).

7. STANOVENIE CHLÓRU Z CHLORIDOV

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť množstvo chlóru v chloridoch rozpustných vo vode, konvenčne vyjadrené ako chlorid sodný. Je použiteľná na všetky krmivá.

2. Podstata metódy

Chloridy sa rozpustia vo vode. Ak produkt obsahuje organické látky, vyčirí sa. Roztok sa mierne okyslí kyselinou dusičnou a chloridy sa vyzrážajú vo forme chloridu strieborného roztokom dusičnanu strieborného. Prebytok dusičnanu strieborného sa stitruje roztokom tiokyanatanu amónneho Volhardovou metódou.

3. Chemikálie

- 3.1. 0,1 N roztok tiokyanatanu amónneho
- 3.2. 0,1 N roztok dusičnanu strieborného
- 3.3. Nasýtený roztok síranu železito-amónneho
- 3.4. Kyselina dusičná, d: 1,38
- 3.5. Dietyléter p. a.
- 3.6. Acetón p. a.
- 3.7. Carrezovo činidlo I: rozpustite vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.8. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu feroxyanadu draselného $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.9. Aktívne uhlie p. a., ktoré neobsahuje chloridy a ani ich neabsorbuje.

4. Prístroje

Trepačka: približne 35 – 40 ot/min

5. Postup

5.1. Príprava roztoku

V závislosti od druhu vzorky pripravte roztok postupom uvedeným v bode 5.1.1, 5.1.2 alebo 5.1.3.

Zároveň vykonajte slepý pokus bez použitia vzorky, ktorá sa má analyzovať.

5.1.1. Vzorky bez organických látok

Navážte s presnosťou na 1 mg vzorku v množstve najviac 10 g, aby obsahovala najviac 3 g chlóru vo forme chloridov. Vložte spolu so 400 ml vody do 500 ml odmernej banky pri teplote 20 °C. Miešajte po dobu tridsať minút v trepačke, doplňte na požadovaný objem, premiešajte a prefiltrujte.

5.1.2. Vzorky s obsahom organických látok, okrem produktov uvedených v bode 5.1.3.

Navážte približne 5 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte spolu s 1 g aktívneho uhlia do 500 ml odmernej banky. Pridajte 400 ml vody o teplote približne 20 °C a 5 ml Carrezovho činidla I (3.7), premiešajte a pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.8). Miešajte po dobu tridsať minút v trepačke, doplňte na požadovaný objem, premiešajte a prefiltrujte.

5.1.3. Tepelne upravené krmivá, ľanové výlisky a múčka, produkty bohaté na ľanovú múčku a ostatné produkty bohaté na slizovité alebo na koloidné látky (napr. dextrínovaný škrob)

Pripravte roztok postupom opísaným v bode 5.1.2, ale bez filtrácie. Nechajte usadiť (podľa potreby odstredíte), odoberte 100 ml supernatantu a preneste do 200 ml odmernej banky. Zmiešajte s acetonóm (3.6) a doplňte na požadovaný objem týmto rozpúšťadlom, premiešajte a prefiltrujte.

5.2. Titrácia

Do Erlenmeyerovej banky napipetujte 25 ml až 100 ml filtrátu (podľa predpokladaného obsahu chlóru) získaného postupom opísaným v bode 5.1.1, 5.1.2 alebo 5.1.3. Primeraná časť nesmie obsahovať viac ako 150 mg chlóru (Cl). Podľa potreby zriedte vodou na objem najmenej 50 ml, pridajte 5 ml kyseliny dusičnej (3.4), 20 ml nasýteného roztoku síranu železito-amónneho (3.3) a z naplnenej byrety 2 kvapky roztoku tiokyanatanu amónneho (3.1). Byretou pridajte roztok dusičnanu strieborného (3.2) v prebytku 5 ml. Pridajte 5 ml dietyléteru (3.5) a intenzívne pretrepte, aby sa vytvorila zrazenina.

Prebytok dusičnanu strieborného stitrujte roztokom tiokyanatanu amónneho (3.1) až do vzniku jednu minútu trvajúceho červenkasto-hnedého sfarbenia.

6. Výpočet výsledkov

Množstvo chlóru (w), vyjadrené ako chlorid sodný, prítomné v objeme filtrátu odobratom na titráciu sa vypočíta podľa vzorca:

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

v ktorom:

V_1 = ml pridaného 0,1 N roztoku dusičnanu strieborného

V_2 = ml 0,1 N roztoku tiokyanatanu amónneho spotrebovaného na titráciu.

Ak slepý pokus naznačil, že 0,1 N roztok dusičnanu strieborného bol spotrebovaný, odpočítajte túto hodnotu od objemu ($V_1 - V_2$).

7. Poznámky

7.1. Titrácia sa môže vykonať aj potenciometricky.

7.2. Produkty veľmi bohaté na oleje a tuky najskôr odtučnite dietyléterom alebo petroléterom.

7.3. V rybej múčke možno titráciu vykonať Mohrovou metódou.

8. STANOVENIE HORČIČNÉHO OLEJA

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť množstvo horčičného oleja obsiahnuté vo výliskoch z druhov *Brassica* a *Sinapis*, a v kýmnych zmesiach, ktoré obsahujú výlisky z týchto druhov, a vyjadrené ako izotiokyanatan alylový, ktorý sa dá vytesniť vodnou parou.

2. Podstata metódy

Vzorka sa rozmieša vo vode. Horčičný olej sa uvoľní pôsobením enzýmov, vytesní sa destiláciou s etanolom a zachytí sa do zriedeného amoniaku. Roztok sa za tepla vystaví účinku známeho objemu roztoku dusičnanu strieborného, potom sa ochladí a prefiltruje. Prebytok dusičnanu strieborného sa stitruje roztokom tiokyanatanu amónneho.

3. Chemikálie

- 3.1. Biela horčica (*Sinapis alba*)
- 3.2. 95 až 96 % etanol (v/v)
- 3.3. Protipeniaca emulzia (napr. silikónový olej)
- 3.4. Amoniak, d: 0,958
- 3.5. 0,1 N roztok dusičnanu strieborného
- 3.6. 0,1 N roztok tiokyanatanu amónneho
- 3.7. Kyselina dusičná, d: 1,40
- 3.8. Nasýtený roztok síranu železito-amónneho.

4. Prístroje

- 4.1. 500 ml banky s rovným dnom so zábrusovými zátkami
- 4.2. Destilačný prístroj s chladičom a zariadením zabráňujúcim strhávaniu kvapôčok.

5. Postup

Navážte 10 g vzorky s presnosťou na 1 mg, vložte do 500 ml banky s rovným dnom a pridajte 2 g jemne pomletej bielej horčice (3.1) (zdroj enzýmu) a 200 ml vody o teplote 20 °C. Banku zazátkujte a nechajte ju za občasného pretrepávania stáť približne 2 hodiny pri teplote 20 °C. Pridajte 40 ml etanolu (3.2) a jednu kvapku protipeniacej emulzie (3.3). Nadeštilujte približne 150 ml a destilát zachytávajte do 250 ml odmernej banky obsahujúcej 20 ml amoniaku (3.4), presvedčte sa, či je koniec chladiča ponorený do kvapaliny. Do amoniakálneho roztoku pridajte 50 ml 0,1 N roztoku dusičnanu strieborného (3.5) (alebo viac, ak je to potrebné), na odmernú banku položte malý lievik a zmes zahrievajte jednu hodinu nad vriacim vodným kúpelom. Nechajte vychladnúť, doplňte na požadovaný objem vodou, premiešajte a prefiltrujte. Odoberte 100 ml číreho filtrátu, pridajte 5 ml kyseliny dusičnej (3.7) a približne 5 ml roztoku síranu železito-amónneho (3.8). Prebytok dusičnanu strieborného stitrujte 0,1 N roztokom tiokyanatanu amónneho (3.6).

Vykonajte *slepý pokus* rovnakým postupom s 2 g jemne pomletej bielej horčice, bez vzorky.

6. Výpočet výsledkov

Odpočítajte objem 0,1 N roztoku dusičnanu strieborného spotrebovaného pri slepom pokuse od objemu spotrebovaného na roztok vzorky. Získaná hodnota udáva počet ml 0,1 N roztoku dusičnanu strieborného, spotrebovaného horčičným olejom vo vzorke. 1 ml 0,1 N AgNO₃ zodpovedá 4,956 mg izotiokyanatanu alylového. Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

9. STANOVENIE LAKTÓZY

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah laktózy v krmivách obsahujúcich viac ako 0,5 % laktózy.

2. Podstata metódy

Cukry sa rozpustia vo vode. Roztok sa podrobí fermentácii kvasinkami *Sacchromyces cerevisiae*, ktoré ponechávajú laktózu nedotknutú. Po vyčírení a prefiltrovaní sa obsah laktózy vo filtráte stanoví Luff-Schoorlovou metódou.

3. Chemikálie

3.1. Suspenzia kvasiniek *Sacchromyces cerevisiae*: rozmiešajte 25 g čerstvých kvasníc v 100 ml vody. Táto suspenzia vydrží v chladničke maximálne jeden týždeň.

3.2. Carrezovo činidlo I: rozpustite vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte vodou na objem 100 ml.

3.3. Carrezovo činidlo II: rozpustite vo vode 10,6 g trihydrátu feroxyanidu draselného $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Doplňte vodou na objem 100 ml.

3.4. Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného miešania nalejte roztok kyseliny citrónovej (3.4.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.4.2). Pridajte roztok síranu meďnatého (3.4.1) a doplňte na objem 1 liter vodou. Nechajte stáť cez noc a prefiltrujte. Skontrolujte normalitu takto získaného činidla (Cu 0,1 N; Na_2CO_3 2N). Roztok by mal mať pH približne 9,4.

3.4.1. Roztok síranu meďnatého: rozpustite 25 g pentahydrátu síranu meďnatého p. a., $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ neobsahujúceho železo v 100 ml vody

3.4.2. Roztok kyseliny citrónovej: rozpustite 50 g monohydrátu kyseliny citrónovej p. a., $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ v 50 ml vody

3.4.3. Roztok uhličitanu sodného: rozpustite 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného p. a. v približne 300 ml teplej vody. Nechajte vychladnúť.

3.5. Granulovaná pemza prevarená v kyseline chlorovodíkovej, premytá vodou a vysušená.

3.6. 30 % roztok (w/v) jodidu draselného

3.7. 6 N kyselina sírová

3.8. 0,1 N roztok tiosíranu sodného

3.9. Roztok škrobu: pridajte zmes 5 g rozpustného škrobu v 30 ml vody do 1 litra vriacej vody. Nechajte vriť tri minúty, nechajte vychladnúť a v prípade potreby pridajte 10 mg jodidu ortuťnatého ako konzervačný prostriedok.

4. Prístroje

Vodný kúpeľ s termostatom nastaveným na 38 – 40 °C

5. Postup

Navážte 1 g vzorky s presnosťou na 1 mg do 100 ml odmernej banky. Pridajte 25 – 30 ml vody. Vložte banku na tridsať minút do vriaceho vodného kúpeľa a potom ochlaďte na teplotu približne 35 °C. Pridajte 5 ml suspenzie kvasiniek (3.1) a premiešajte. Banku vložte na dve hodiny do vodného kúpeľa o teplote 38 – 40 °C. Ochlaďte na teplotu približne 20 °C.

Pridajte 2,5 ml Carrezovho činidla I (3.2) a miešajte 30 sekúnd. Potom pridajte 2,5 ml Carrezovho činidla II (3.3) a znovu miešajte 30 sekúnd. Doplňte na objem 100 ml vodou, premiešajte a prefiltrujte. Množstvo filtrátu, nie väčšie ako 25 ml, ktoré obsahuje 40 až 80 mg laktózy, napipetujte do 300 ml Erlenmeyerovej banky. Podľa potreby doplňte na objem 25 ml vodou.

Rovnakým postupom vykonajte slepý pokus s 5 ml suspenzie kvasiniek (3.1).

Stanovte obsah laktózy podľa Luff-Schoorla nasledovne: pridajte presne 25 ml Luff-Schoorlovho činidla (3.4) a dve granule pemzy (3.5). Miešajte ručne počas zahrievania nad stredne vysokým voľným plameňom a kvapalinu privedie do varu približne za dve minúty. Erlenmeyerovu banku položte okamžite na azbestom potiahnutú drôtenú sieťku s otvorom o priemere približne 6 cm, pod ktorou je zapálený plameň. Plameň sa musí regulovať tak, aby zahrieval len dno Erlenmeyerovej banky. Spätný chladič nasadte na Erlenmeyerovu banku. Nechajte variť presne desať minút. Okamžite ochlaďte v studenej vode a približne po piatich minútach stitrujte nasledujúcim spôsobom:

Pridajte 10 ml roztoku jodidu draselného (3.6) a ihneď potom (opatrne, kvôli silnému peneniu) pridajte 25 ml 6 N kyseliny sírovej (3.7). Titrujte 0,1 N roztokom tiosíranu sodného (3.8) až do vzniku matnej žltej farby, pridajte škrobový indikátor (3.9) a dotitrujte.

Rovnakú titráciu vykonajte v presne odmeranej zmesi 25 ml Luff-Schoorlovho činidla (3.4) a 25 ml vody po pridaní 10 ml roztoku jodidu draselného (3.6) a 25 ml 6 N kyseliny sírovej (3.7) bez varu.

6. Výpočet výsledkov

Podľa priloženej tabuľky stanovte množstvo laktózy v mg, zodpovedajúce rozdielu medzi výsledkami dvoch titrácií, vyjadrené v ml 0,1 N tiosíranu sodného.

Vyjadrite výsledok ako podiel bezvodéj laktózy v percentách vzorky.

7. Poznámka

Pre produkty s obsahom viac ako 40 % fermentovateľného cukru použite viac ako 5 ml suspenzie kvasiniek (3.1).

Tabuľka hodnôt pre 25 ml Luff-Schoorlovho činidla

ml 0,1 N Na₂S₂O₃, dvojminútové zahrievanie, desaťminútový var

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N	Glukóza, fruktóza		Laktóza		Maltóza		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N
	ml	mg	rozdiel	mg	rozdiel	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. STANOVENIE DRASLÍKA

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť hladinu draslíka v krmivách.

2. Podstata metódy

Vzorka sa spopolní a popol sa rozpustí v kyseline chlorovodíkovej. Obsah draslíka v roztoku sa stanoví plameňovou fotometriou v prítomnosti chloridu cézneho a dusičnanu hlinitého. Prídavok týchto látok do značnej miery eliminuje interferenciu rušivých prvkov.

3. Chemikálie

- 3.1. Kyselina chlorovodíková p. a., d: 1,12
- 3.2. Chlorid cézny p. a.
- 3.3. Dusičnan hlinitý A I (NO_3)₃ · 9 H₂O, na všeobecné použitie
- 3.4. Chlorid draselný bezvodý p. a.
- 3.5. Tlmivý roztok: rozpustíte vo vode 50 g chloridu cézneho (3.2) a 250 g dusičnanu hlinitého (3.3), doplníte objem na 1 liter vodou a premiešajte. Skladujte v plastových fľašiach.
- 3.6. Štandardný roztok draslíka: rozpustíte vo vode 1,907 g chloridu draselného (3.4), pridajte 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1), doplníte na 1 liter vodou a premiešajte. Skladujte v plastových fľašiach. 1 ml tohto roztoku obsahuje 1,00 mg draslíka.

4. Prístroje

- 4.1. Platinové, kremičitanové alebo porcelánové spaľovacie misky podľa potreby s viečkami
- 4.2. Elektrická muflová pec s termostatom
- 4.3. Plameňový fotometer

5. Postup

5.1. Analýza vzorky

Ako všeobecné pravidlo, navážte 10 g vzorky s presnosťou na 10 mg, vložte do misky a spopolňujte pri teplote 450 °C tri hodiny. Po vychladnutí preneste popol kvantitatívne do 500 ml odmernej banky, pomocou 250 až 300 ml vody a potom 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Po ukončení uvoľňovania oxidu uhličitého roztok zahrejte a za občasného premiešania udržiavajte pri teplote približne 90 °C dve hodiny. Po vychladnutí na laboratórnu teplotu doplníte po značku vodou, premiešajte a prefiltrujte. Preneste do 100 ml odmernej banky primeranú časť filtrátu obsahujúcu maximálne 1,0 mg draslíka, pridajte 10,0 ml tlmivého roztoku (3.5), doplníte po značku vodou a premiešajte. Pri vyššom obsahu draslíka zriedte roztok vzorky na vhodnú koncentráciu ešte pridaním tlmivého roztoku.

Nižšie uvedená tabuľka uvádza návod pre vzorku o hmotnosti asi 10 g.

Predpokladaný obsah draslíka vo vzorke (% K)	Faktor zriedenia	Primeraná časť roztoku v 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

Zmerajte plameňovou fotometriou pri vlnovej dĺžke 768 nm. Výsledok vypočítajte pomocou kalibračnej krivky.

5.2. Kalibračná krivka

Vložte presne 10 ml štandardného roztoku (3.6) do 250 ml odmernej banky, doplňte po značku vodou a premiešajte. Vložte do 100 ml odmerných baniek presne 5, 10, 15, 20 a 25 ml tohto roztoku, čo zodpovedá množstvám draslíka 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 a 1,0 mg. Sadu doplňte o slepú banku neobsahujúcu štandardný roztok. Do každej banky pridajte 10 ml tlmivého roztoku (3.5), doplňte po značku vodou a premiešajte. Merania vykonajte postupom uvedeným v bode 5.1. Kalibračná krivka je spravidla lineárna až do koncentrácie draslíka 1 mg v 100 ml roztoku.

6. Výpočet výsledkov

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámky

Kvôli eliminovaniu interferencie rušivých prvkov nie je vždy potrebné pridávať tlmivý roztok (3.5).

11. STANOVENIE SODÍKA

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah sodíka v krmivách.

2. Podstata metódy

Vzorka sa spopolní a popol sa rozpustí v kyseline chlorovodíkovej. Obsah sodíka v roztoku sa stanoví plameňovou fotometriou v prítomnosti chloridu cézneho a dusičnanu hlinitého. Prídavok týchto látok do značnej miery eliminuje interferenciu rušivých prvkov.

3. Chemikálie

- 3.1. Kyselina chlorovodíková p. a., d: 1,12
- 3.2. Chlorid cézny p. a.
- 3.3. Dusičnan hlinitý A I (NO_3)₃ · 9 H₂O, na všeobecné použitie
- 3.4. Chlorid sodný bezvodý p. a.
- 3.5. Tlmivý roztok: rozpustite vo vode 50 g chloridu cézneho (3.2) a 250 g dusičnanu hlinitého (3.3), doplňte objem na 1 liter vodou a premiešajte. Skladujte v plastových fľašiach.
- 3.6. Štandardný roztok sodíka: rozpustite vo vode 2,542 g chloridu sodného (3.4), pridajte 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1), doplňte na 1 liter vodou a premiešajte. Skladujte v plastových fľašiach, 1 ml tohto roztoku obsahuje 1,00 mg sodíka.

4. Prístroje

- 4.1. Platinové, kremičitanové alebo porcelánové spaľovacie misky, podľa potreby s viečkami
- 4.2. Elektrická muflová pec s termostatom
- 4.3. Plameňový fotometer

5. Postup

5.1. Analýza vzorky

Ako všeobecné pravidlo, navážte 10 g vzorky s presnosťou na 10 mg, vložte do misky a spopolňujte pri teplote 450 °C tri hodiny. Zabráňte prehriatiu (vznieteniu). Po vychladnutí preneste popol kvantitatívne do 500 ml odmernej banky, pomocou 250 až 300 ml vody a potom 50 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.1). Po ukončení uvoľňovania oxidu uhličitého roztok zahrejte a za občasného premiešania udržiavajte pri teplote približne 90 °C dve hodiny. Po vychladnutí na laboratórnú teplotu doplňte po značku vodou, premiešajte a prefiltrujte. Preneste do 100 ml odmernej banky primeranú časť filtrátu obsahujúcu maximálne 1,0 mg sodíka, pridajte 10,0 ml tlmivého roztoku (3.5), doplňte po značku vodou a premiešajte. Pri vyššom obsahu sodíka zriedte roztok vzorky na vhodnú koncentráciu ešte pred pridaním tlmivého roztoku.

Nižšie uvedená tabuľka uvádza návod pre vzorku o hmotnosti okolo 10 g.

Predpokladaný obsah draslíka vo vzorke (% Na)	Faktor zriedenia	Primeraná časť roztoku v 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

Zmerajte plameňovou fotometriou pri vlnovej dĺžke 589 nm. Výsledok vypočítajte pomocou kalibračnej krivky.

5.2. Kalibračná krivka

Vložte presne 10 ml štandardného roztoku (3.6) do 250 ml odmernej banky, doplňte po značku vodou a premiešajte. Vložte do 100 ml odmerných baniek presne 5, 10, 15, 20 a 25 ml tohto roztoku, čo zodpovedá množstvám sodíka 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 a 1,0 mg. Sadu doplňte o slepú banku neobsahujúcu žiadny štandardný roztok. Do každej banky pridajte 10 ml tmivého roztoku (3.5), doplňte po značku vodou a premiešajte. Merania vykonajte postupom uvedeným v bode 5.1. Kalibračná krivka je spravidla lineárna až do koncentrácie sodíka 1 mg v 100 ml roztoku.

6. Výpočet výsledkov

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámky

7.1. V produktoch s obsahom viac ako 4 % sodíka je vhodnejšie spopolňovať vzorku dve hodiny v miske s viečkom. Po vychladnutí pridajte vodu, pomocou platínového drôtu vytvorte suspenziu, vysušte a znovu spopolňujte dve hodiny v miske s viečkom.

7.2. Ak vzorka pozostáva len z minerálnych látok, rozpustite ju bez spopolňovania.

12. STANOVENIE CUKRU

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť množstvo redukujúcich cukrov a celkových cukrov po inverzii, vyjadrené ako glukóza alebo ak je to vhodné, ako sacharóza, prepočítané pomocou faktora 0,95. Je použiteľná na kŕmne zmesi. Pre ostatné krmivá sú ustanovené osobitné metódy. Podľa potreby sa laktóza musí merať samostatne a musí sa zohľadniť pri výpočte výsledkov.

2. Podstata metódy

Cukry sa vyextrahujú zriedeným etanolom; roztok sa vyčíri Carrezovými činidlami I a II. Po odstránení etanolu sa stanovia Luff-Schoorlovou metódou množstvá pred a po inverzii.

3. Chemikálie

- 3.1. 40 % (v/v) etanol, d: 0,948 pri 20 °C, zneutralizovaný na fenoftaleín
- 3.2. Carrezovo činidlo I: rozpustíte vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.3. Carrezovo činidlo II: rozpustíte vo vode 10,6 g trihydrátu feročyanidu draselného $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.4. 0,1 % roztok (w/v) metyloranže
- 3.5. Kyselina chlorovodíková 4 N
- 3.6. Kyselina chlorovodíková 0,1 N
- 3.7. 0,1 N roztok hydroxidu sodného
- 3.8. Luff-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného miešania nalejte roztok kyseliny citrónovej (3.8.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.8.3). Pridajte roztok síranu meďnatého (3.8.1) a doplňte na objem 1 liter vodou. Nechajte odstáť cez noc a prefiltrujte. Skontrolujte normalitu takto získaného činidla (Cu 0,1 N; Na_2CO_3 2N). Roztok by mal mať pH približne 9,4.

- 3.8.1. Roztok síranu meďnatého: rozpustíte 25 g pentahydrátu síranu meďnatého p. a. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ bez obsahu železa v 100 ml vody.
- 3.8.2. Roztok kyseliny citrónovej: rozpustíte 50 g monohydrátu kyseliny citrónovej p. a., $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ v 50 ml vody.
- 3.8.3. Roztok uhličitanu sodného: rozpustíte 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného p. a. v približne 300 ml teplej vody. Nechajte vychladnúť.
- 3.9. 0,1 N roztok tiosíranu sodného
- 3.10. Roztok škrobu: pridajte zmes 5 g rozpustného škrobu v 30 ml vody do 1 litra vriacej vody. Nechajte vrieť tri minúty, nechajte vychladnúť a podľa potreby pridajte 10 mg jodidu ortuťnatého ako konzervačný prostriedok.
- 3.11. 6 N kyselina sírová
- 3.12. 30 % roztok (w/v) jodidu draselného
- 3.13. Granulovaná pemza prevarená v kyseline chlorovodíkovej, premytá vodou a vysušená.
- 3.14. 3-metylbutanol

4. Prístroje

Trepačka približne 35 – 40 ot/min

5. Postup

5.1. Extrakcia vzorky

Navážte 2,5 g vzorky s presnosťou na 1 mg do 250 ml odmernej banky. Pridajte 200 ml etanolu (3.1) a miešajte v trepačke jednu hodinu. Pridajte 5 ml Carrezovho činidla I (3.2) a miešajte jednu minútu. Pridajte 5 ml Carrezovho činidla II (3.3) a miešajte znovu jednu minútu. Doplňte na požadovaný objem etanolom (3.1), premiešajte a prefiltrujte. Odoberte 200 ml filtrátu a odparte na približne polovičný objem, aby sa odstránila väčšina etanolu. Preneste zvyšok po odparení kvantitatívne do 200 ml odmernej banky pomocou teplej vody, ochlaďte, doplňte na požadovaný objem vodou, premiešajte a v prípade potreby prefiltrujte. Tento roztok sa použije na stanovenie množstva redukujúcich cukrov a po inverzii na stanovenie celkových cukrov.

5.2. Stanovenie redukujúcich cukrov

Napipetujte najviac 25 ml roztoku obsahujúceho menej ako 60 mg redukujúcich cukrov vyjadrených ako glukóza. V prípade potreby doplňte na 25 ml destilovanou vodou a obsah redukujúcich cukrov stanovte Luff-Schoorlovou metódou. Výsledok sa vyjadrí ako percentuálny obsah glukózy vo vzorke.

5.3. Stanovenie celkových cukrov po inverzii

50 ml roztoku napipetujte do 100 ml odmernej banky. Pridajte niekoľko kvapiek roztoku metyloranže (3.4) a potom opatrne a za stáleho miešania pridávajte 4 N kyselinu chlorovodíkovú (3.5) až do vzniku červenej farby. Pridajte 15 ml 0,1 N (3.6) kyseliny chlorovodíkovej, banku ponorte do vriaceho vodného kúpeľa na tridsať minút. Prudko ochlaďte na teplotu približne 20 °C a pridajte 15 ml 0,1 N roztoku hydroxidu sodného (3.7). Doplňte vodou na objem 100 ml a premiešajte. Odoberte najviac 25 ml obsahujúcich menej ako 60 mg redukujúcich cukrov vyjadrených ako glukóza. Podľa potreby doplňte na 25 ml destilovanou vodou a obsah redukujúcich cukrov stanovte Luff-Schoorlovou metódou. Výsledok sa vyjadří ako percento glukózy alebo, ak je to vhodné, sacharózy, vynásobením faktorom 0,95.

5.4. Titrácia Luff-Schoorlovou metódou

25 ml Luff-Schoorlovho činidla (3.8) napipetujte do 300 ml Erlenmeyerovej banky, pridajte presne 25 ml vyčisteného roztoku cukru. Pridajte 2 granule pemzy (3.13) a zahrievajte za ručného miešania nad stredne vysokým voľným plameňom tak, aby ste kvapalinu priviedli do varu za približne dve minúty. Erlenmeyerovu banku položte okamžite na azbestom potiahnutú drôtenú sieťku s otvorom o priemere približne 6 cm, pod ktorou je zapálený plameň. Plameň sa musí regulovať tak, aby zohrieval len dno Erlenmeyerovej banky. Na Erlenmeyerovu banku nasadte spätný chladič. Varte presne desať minút. Okamžite ochlaďte v studenej vode a približne po piatich minútach stitrujte nasledujúcim spôsobom:

Pridajte 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a ihneď potom (opatrne kvôli silnému peneniu) pridajte 25 ml 6 N kyseliny sírovej (3.11). Titrujte 0,1 N roztokom tiosíranu sodného (3.9) až do vzniku matnej žltej farby, pridajte škrobový indikátor (3.10) a dotitrujte.

Rovnakú titráciu vykonajte v presne odmeranej zmesi 25 ml Luff-Schoorlovho činidla (3.8) a 25 ml vody po pridaní 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a 25 ml 6 N kyseliny sírovej (3.11) bez varu.

6. Výpočet výsledkov

Pomocou priloženej tabuľky stanovte množstvo glukózy v mg zodpovedajúce rozdielu medzi výsledkami dvoch titrácií, vyjadrené v mg 0,1 N tiosíranu sodného.

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Špeciálne postupy

7.1. Ak ide o krmivá bohaté na melasu a ostatné krmivá, ktoré nie sú zvlášť homogénne, navážte 20 g a vložte spolu s 500 ml vody do 1 l odmernej banky. Miešajte jednu hodinu v trepačke. Vyčírte pomocou Carrezových činidiel I (3.2) a II (3.3), ako je opísané v bode 5.1, tentokrát však použite štvornásobné množstvo každého činidla. Doplňte na požadovaný objem 80 % etanolom (v/v).

Premiešajte a prefiltrujte. Etanol odstráňte postupom opísaným v bode 5.1. Ak sa tam nenachádza žiadny dextrózovaný škrob, doplňte na požadovaný objem destilovanou vodou.

7.2. Ak ide o melasu a krmné suroviny bohaté na cukor a neobsahujúce takmer žiadny škrob, (svätójánsky chlieb, sušené rezky červenej repy atď.), navážte 5 g, vložte do 250 ml odmernej banky, pridajte 200 ml destilovanej vody a miešajte v trepačke jednu hodinu alebo podľa potreby aj dlhšie. Vyčírte pomocou Carrezových činidiel I (3.2) a II (3.3) postupom opísaným v bode 5.1. Doplňte na požadovaný objem studenou vodou, premiešajte a prefiltrujte. Pokračujte v stanovení obsahu celkových cukrov podľa bodu 5.3.

8. Poznámky

- 8.1. Aby sa zabránilo peneniu, treba pridať (bez ohľadu na objem) približne 1 ml 3-metylbutanolu (3.14) ešte pred varením s Luff-Schoorlovým činidlom.
- 8.2. Rozdiel medzi obsahom celkových cukrov po inverzii, vyjadreným ako glukóza, a obsahom redukujúcich cukrov, vyjadreným ako glukóza, dáva po vynásobení faktorom 0,95 percentuálny obsah sacharózy.
- 8.3. Na stanovenie obsahu redukujúcich cukrov, okrem laktózy, sa môžu prijať dve metódy.
- 8.3.1. Na približný výpočet vynásobte faktorom 0,675 obsah laktózy stanovený inou analytickou metódou a získaný výsledok odpočítajte od obsahu redukujúcich cukrov.
- 8.3.2. Na presný výpočet redukujúcich cukrov, okrem laktózy, sa musí použiť na obidve konečné stanovenia tá istá vzorka. Jedna z analýz sa vykoná v časti roztoku získaného podľa bodu 5.1, druhá v časti roztoku získaného počas stanovenia laktózy metódou určenou na tento účel (po skvasení ostatných druhov cukrov a po vyčírení).

V oboch prípadoch sa množstvo prítomného cukru stanoví Luff-Schoorlovou metódou a vypočíta sa v mg glukózy. Jedna z hodnôt za odpočíta od druhej a rozdiel sa vyjadrí ako percento vzorky.

Príklad

Obidva odobraté objemy zodpovedajú, pre každé stanovenie, vzorke o hmotnosti 250 mg.

V prvom stanovení sa spotrebovalo 17 ml 0,1 N roztoku tiosíranu sodného, čo zodpovedá 44,2 mg glukózy, v druhom stanovení 11 ml, čo zodpovedá 27,6 mg glukózy.

Rozdiel je 16,6 mg glukózy.

Obsah redukujúcich cukrov (okrem laktózy), vypočítaný ako glukóza, je:

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

Tabuľka hodnôt pre 25 ml Luff-Schoorlovho činidla

ml 0,1 N Na₂S₂O₃, dvojminútové zohrievanie, desaťminútový var

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N	Glukóza, fruktóza		Laktóza		Maltóza		Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 N
	ml	mg	rozdiel	mg	rozdiel	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. STANOVENIE TEOBROMÍNU

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť množstvo teobromínu vo vedľajších produktoch spracovania kakaových bôbov.

2. Podstata metódy

Teobromín sa vyextrahuje chloroformom. Extrakt sa odparí do sucha, rozpustí vo vode a vystaví účinku známeho množstva roztoku dusičnanu strieborného. Uvoľnená kyselina dusičná sa stitruje roztokom hydroxidu sodného.

3. Chemikálie

- 3.1. Chloroform p. a.
- 3.2. Amoniak, d: 0,958
- 3.3. Síran sodný bezvodý, p. a.
- 3.4. 0,1 N roztok hydroxidu sodného
- 3.5. 0,1 N roztok dusičnanu strieborného
- 3.6. 1 % (w/v) etanolový roztok fenolovej červene
- 3.7. Petroléter, bod varu 40 – 60 °C

4. Prístroje

500 ml banky s rovným dnom so zábrusovými zátkami

5. Postup

Navážte s presnosťou na 1 mg najviac 10 g vzorky obsahujúcej najviac 80 mg teobromínu, do 500 ml banky s rovným dnom so zábrusovou zátkou a pridajte 270 ml chloroformu (3.1) a 10 ml amoniaku (3.2). Banku zazátkujte a intenzívne pretrepávajte päť minút. Pridajte 12 g bezvodého síranu sodného (3.3), znovu pretrepte a nechajte stáť do nasledujúceho dňa. Prefiltrujte do 500 ml Erlenmeyerovej banky a zvyšok premyte 100 ml chloroformu (3.1). Rozpúšťadlo oddestilujte a posledné zvyšky odstráňte nad vriacim vodným kúpeľom. Extrakt znovu rozpustite v 50 ml vody a priveďte do varu.

Ochlaďte, presne zneutralizujte roztokom hydroxidu sodného (3.4) pomocou 0,5 ml roztoku fenolovej červene (3.6). Pridajte 20 ml roztoku dusičnanu strieborného (3.5). Uvoľnenú kyselinu dusičnú stitrujte roztokom hydroxidu sodného (3.4), do zmeny farby indikátora (pH 7,4).

6. Výpočet výsledkov

1 ml 0,1 N NaOH = 18 mg teobromínu.

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámky

Produkty obsahujúce viac ako 8 % tukových zložiek sa musia najskôr odtučniť šesťhodinovou extrakciou petroléterom (bod varu 40 – 60 °C).

14. STANOVENIE MOČOVINY

1. Účel a oblasť

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah močoviny v krmivách.

2. Podstata metódy

Vzorka sa rozmieša vo vode s číriacim činidlom. Suspenzia sa prefiltruje. Obsah močoviny vo filtráte sa stanoví po pridaní 4-dimetylaminobenzaldehydu (4-DMAB) zmeraním absorpcie pri vlnovej dĺžke 420 nm.

3. Chemikálie

- 3.1. Roztok 4-dimetylaminobenzaldehydu: rozpustíte 1,6 g 4-DMAB p. a., v 100 ml 96 % etanolu a pridajte 10 ml kyseliny chlorovodíkovej p. a. (d: 1,19). Toto činidlo sa môže používať najviac dva týždne.
- 3.2. Carrezovo činidlo I: rozpustíte vo vode 21,9 g dihydrátu octanu zinočnatého $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ľadovej kyseliny octovej. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.3. Carrezovo činidlo II: rozpustíte vo vode 10,6 g trihydrátu ferokyanidu draselného $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Doplňte vodou na objem 100 ml.
- 3.4. Aktívne uhlie p. a., ktoré neabsorbuje močovinu (musí sa skontrolovať).
- 3.5. 0,1 % roztok (w/v) močoviny p. a.

4. Prístroje

- 4.1. Trepačka približne 35 – 40 ot/min
- 4.2. Skúmavky: 160 x 16 mm so zábrusovými zátkami
- 4.3. Spektrofotometer

5. Postup

5.1. Analýza vzorky

Navážte 2 g vzorky s presnosťou na 1 mg a vložte spolu s 1 g aktívneho uhlia (3.4) do 500 ml odmernej banky. Pridajte 400 ml vody a 5 ml Carrezovho činidla I (3.2) a II (3.3). Miešajte tridsať minút v trepačke. Doplňte na požadovaný objem vodou, premiešajte a prefiltrujte.

Odoberte 5 ml číreho bezfarebného filtrátu do skúmaviek so zábrusovými zátkami, pridajte 5 ml roztoku 4-DMAB (3.1) a premiešajte. Skúmavky vložte do vodného kúpeľa o teplote 20 °C. Po pätnástich minútach zmerajte absorpciu roztoku vzorky spektrofotometrom pri 420 nm. Porovnajte so slepým pokusom z použitých chemikálií.

5.2. Kalibračná krivka

Odoberte objemy 1, 2, 4, 5 a 10 ml roztoku močoviny (3.5), vložte do 100 ml odmerných baniek a doplňte na požadovaný objem vodou. Odoberte 5 ml z každého roztoku, pridajte 5 ml roztoku 4-DMAB (3.1) do každého z nich, premiešajte a zmerajte absorpciu vyššie uvedeným postupom porovnaním s kontrolným roztokom obsahujúcim 5 ml 4-DMAB a 5 ml vody bez obsahu močoviny. Urobte kalibračnú krivku.

6. Výpočet výsledkov

Množstvo močoviny vo vzorke stanovte z kalibračnej krivky.

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

7. Poznámky

- 7.1. Ak obsah močoviny presahuje 3 %, zmenšíte množstvo vzorky na 1 g alebo pôvodný roztok zriedíte tak, aby sa v 500 ml nenachádzalo viac ako 50 mg močoviny.
- 7.2. Ak obsah močoviny je nízky, zväčšujte množstvo vzorky dovtedy, kým je filtrát ešte stále číry a bezfarebný.
- 7.3. Ak vzorka obsahuje jednoduché dusíkaté zlúčeniny ako sú aminokyseliny, absorbanca sa musí merať pri 435 nm.

15. STANOVENIE ALKALOIDOV Z LUPINY**1. Účel a oblasť**

Táto metóda umožňuje stanoviť obsah alkaloidov v semenách lupiny.

2. Podstata metódy

Alkaloidy sa rozpustia v zmesi dietyléru a chloroformu a vyextrahujú kyselinou chlorovodíkovou. Alkaloidy sa vyzrážajú v kyseline volfrámatokremičitej, zrazenina sa spopolní a zvyšok sa odváži.

3. Chemikálie

- 3.1. Dietyléter
- 3.2. Chloroform
- 3.3. 4 N roztok hydroxidu sodného
- 3.4. 0,3 N kyselina chlorovodíková
- 3.5. Chlorid sodný p. a.
- 3.6. 10 % (w/v) roztok kyseliny volfrámatokremičitej $\text{SiO}_2 \cdot 12\text{WO}_3 \cdot 26\text{H}_2\text{O}$

4. Prístroje

- 4.1. Mechanické miešadlo
- 4.2. Platinové, kremičitanové alebo porcelánové spaľovacie misky
- 4.3. Elektrická muflová pec

5. Postup

Navážte 15 g vzorky s presnosťou na 5 mg a vložte do nádoby s objemom približne 200 ml, so zábrusovou zátkou (napr. oddeľovací lievik). Pridajte presne 100 ml dietyléru (3.1) a 50 ml chloroformu (3.2) a potom pipetou, 10 ml roztoku hydroxidu sodného (3.3). Intenzívne pretrepávajte, aby sa nevytvorili hrudky. Znovu niekoľkokrát pretrepte a nechajte stáť cez noc. Ak supernatant nebude úplne číry, pridajte niekoľko kvapiek vody. Prefiltrujte éter-chloroformovú vrstvu. Zachyťte 50 ml filtrátu do 50 ml odmernej banky a preneste kvantitatívne do 150 ml oddeľovacieho lievika pomocou 50 ml dietyléru (3.1). Extrahujte trikrát po sebe pomocou 20 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.4), nechajte usadiť a zachyťte po každej extrakcii kyslý extrakt. Kyslé extrakty spojte v 250 ml kadičke a odstráňte posledné zvyšky éteru a chloroformu miernym zahrievaním. Pridajte približne 1 g chloridu sodného (3.5), nechajte vychladnúť a alkaloidy vyzrážajte roztokom kyseliny volfrámatokremičitej (3.6). Miešajte tridsať minút na mechanickom miešadle. Nechajte usadiť cez noc, prefiltrujte cez bezpopolový filtračný papier a zrazeninu následne premyte dvakrát 10 ml a dvakrát 5 ml kyseliny chlorovodíkovej (3.4).

Vložte filter obsahujúci zrazeninu do misky a spopolnite pri teplote 900 °C. Nechajte vychladnúť a odvážte.

6. Výpočet výsledkov

Obsah alkaloidov vo vzorke sa získa vynásobením hmotnosti popola faktorom 0,2.

Výsledok vyjadrite ako percento vzorky.

16. ODHAD AKTIVITY UREÁZY V PRODUKTOCH POCHÁDZAJÚCICH ZO SÓJE

1. Účel a oblasť

Táto skúška umožňuje odhadnúť aktivitu ureázy v produktoch pochádzajúcich zo sóje a zistiť, či tieto produkty boli dostatočne dlho tepelne upravené.

2. Podstata metódy

Aktivita ureázy sa odhadne podľa množstva amoniakálneho dusíka uvoľneného v 1 g produktu za minútu pri teplote 30 °C z roztoku močoviny.

3. Chemikálie

3.1. 0,1 N kyselina chlorovodíková

3.2. 0,1 N roztok hydroxidu sodného

3.3. 0,05 M fosforečnanový tlmivý roztok, obsahujúci v 1000 ml 4,45 g dihydrátu fosforečnanu disodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 3,40 g dihydrogénfosforečnanu draselného (KH_2PO_4)

3.4. Čerstvo pripravený tlmivý roztok močoviny, obsahujúci 30,0 g močoviny v 1000 ml tlmivého roztoku (3.3), pH 6,9 – 7,0.

4. Prístroje

4.1. Potenciometrický titračný prístroj alebo vysoko citlivý pH meter (0,02 pH) s magnetickým miešadlom

4.2. Vodný kúpeľ s termostatom nastaveným na presne 30 °C

4.3. Skúmavky so zábrusovými zátkami, 150 x 18 mm.

5. Postup

Zomelte približne 10 g vzorky (napríklad v kávovom mlynčeku) tak, aby prešla cez sito s otvormi o veľkosti 0,02 mm. Navážte 0,2 g pomletej vzorky s presnosťou na 1 mg, vložte do skúmavky so zábrusovou zátkou a pridajte 10 ml tlmivého roztoku močoviny (3.4). Okamžite zazátkujte a intenzívne pretrepávajte. Skúmavku vložte do vodného kúpeľa nastaveného presne na teplotu 30 °C a intenzívne pretrepávajte. Skúmavku vložte do vodného kúpeľa nastaveného presne na teplotu 30 °C a nechajte ju tam presne 30 minút. Hneď pridajte 10 ml 0,1 N kyseliny chlorovodíkovej (3.1), rýchlo ochlaďte na 20 °C a obsah skúmavky preneste kvantitatívne do titračnej nádoby, skúmavku vypláchnite dvakrát 5 ml vody. Pomocou sklenej elektródy (4.1) okamžite a rýchlo titrujte 0,1 N roztokom hydroxidu sodného (3.2) do hodnoty pH 4,7.

Vykonajte slepý pokus nasledujúcim spôsobom:

0,2 g vzorky navážené s presnosťou na 1 mg vložte rýchlo do skúmavky so zábrusovou zátkou, pridajte 10 ml 0,1 N kyseliny chlorovodíkovej (3.1) a potom pridajte 10 ml tlmivého roztoku močoviny (3.4). Skúmavku ihneď ochlaďte v ľadovej vode a nechajte ju ponorenú tridsať minút. Za podmienok uvedených vyššie preneste obsah skúmavky do titračnej nádoby a titrujte 0,1 N roztokom hydroxidu sodného (3.2) do hodnoty pH 4,7.

6. Výpočet:

Aktivita ureázy sa vypočíta podľa vzorca:

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

v ktorom:

a = ml 0,1 N roztoku hydroxidu sodného spotrebovaného na vzorku

b = ml 0,1 N roztoku hydroxidu sodného spotrebovaného na slepý pokus

E = hmotnosť vzorky v g.

7. Poznámka

7.1. Táto metóda je vhodná na aktivitu ureázy do 1 mg/N/g/min pri 30 °C. V produktoch s väčšou aktivitou sa môže veľkosť vzorky zmenšiť na 50 mg.

7.2. Produkty obsahujúce viac ako 10 % tukových zložiek sa musia najskôr odtučniť za studena.
