31971L0250

PRVNÍ SMĚRNICE KOMISE
ze dne 15. června 1971,
kterou se stanoví analytické metody Společenství pro úřední kontrolu krmiv

(71/250/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

s ohledem na směrnici Rady ze dne 20. července 1970 o zavedení metod pro odběr vzorků a analytických metod Společenství pro úřední kontrolu krmiv ([1]), a zejména na článek 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že směrnice stanoví, aby při úřední kontrole krmiv byly používány pro odběry vzorků a pro analýzy prováděné při kontrole dodržování podmínek předepsaných právními a správními předpisy o jakosti a složení krmiv metody Společenství;

vzhledem k tomu, že je nutné, aby všechny nezbytné analytické metody byly zavedeny co nejdříve; že zavedení metod pro stanovení kyanovodíku, vápníku, uhličitanů, popelovin, popela nerozpustného v HCl, chloru v chloridech, hořčičné silice, laktózy, draslíku, sodíku, cukrů, theobrominu a močoviny, jakož i stanovení alkaloidů v lupině a aktivity ureázy v produktech odvozených ze sóji, znamená první stupeň tohoto procesu;

vzhledem k tomu, že opatření této směrnice jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro krmiva,

PŘIJALA TUTO SMĚRNICI:

Článek 1

Členské státy stanoví, že analýzy pro úřední kontrolu krmiv týkající se obsahu kyanovodíku, vápníku, uhličitanů, popelovin, popela nerozpustného v HCL, chloru v chloridech, hořčičné silice, laktózy, draslíku, sodíku, cukrů, theobrominu a močoviny, jakož i stanovení alkaloidů v lupině a aktivity ureázy v produktech odvozených ze sóje, musí být prováděny metodami uvedenými v příloze k této směrnici.

Článek 2

Členské státy uvedou v účinnost právní a správní předpisy nezbytné pro dosažení souladu s touto směrnicí nejpozději do 1. července 1972. Uvědomí o nich Komisi.

Článek 3

Tato směrnice je určena členským státům.

V Bruselu dne 15. června 1971.

Za Komisi
předseda
Franco M. MALFATTI

([1]) Úř. věst. L 170, 3.8.1970, s. 2.

PŘÍLOHA

METODY ANALÝZ SLOŽEK KRMIV

1. ÚVOD

Metody analýz složek krmiv jsou všeobecně použitelné pro všechny krmné suroviny i krmné směsi. Nicméně, některá krmiva, vzhledem k jejich přirozeným vlastnostem složení, vyžadují speciální, individuální metody pro analýzu. Takové případy jsou uvedeny pod nadpisem „Poznámky“ při popisech příslušných metod.

Jestliže pro stanovení některé složky krmiva mohou být použity dvě nebo i více metod, pak výběr příslušné metody musí být ponechán na dané zkušební laboratoři, pokud není stanoveno jinak. V tomto případě však musí být použitá metoda popsána v příslušném analytickém atestu.

Příprava vzorku pro analýzu

Pro chemickou analýzu je nezbytné, aby tato byla provedena s *homogenním vzorkem*. Musí být rovněž možné provést určitá makro- a mikroskopická stanovení, jakož i stanovení vlhkosti vzorku přesně v tom stavu, v jakém dojde do laboratoře. Pro zajištění těchto dvou požadavků *je třeba rozdělit vzorek na dva díly. Jeden díl zůstane v původním stavu a druhý díl se upraví pro chemickou analýzu takto*:

Po předchozím pečlivém promísení vzorku na čistém a suchém podkladu se rozdělí vzorek pomocí mechanického přístroje nebo ručně. V případě ručního dělení se doporučuje vzorek rozdělit na čtyři díly a odebírat střídavě části z protilehlých stran. Nakonec se odebere pro analýzu díl vážící přibližně 100g a je-li to zapotřebí, rozdrtí se tak, aby vzorek prošel sítem s kulatými otvory o velikosti oka 1 mm. Potom je třeba vzorek neprodleně vložit do suché nádoby se vzduchotěsným uzávěrem a zapečetit.

Jestliže je vzorek velmi vlhký, musí být předsušen, tak aby byla jeho vlhkost redukována na 8–12 %. Pro tento účel je třeba sušit vzorek při vhodné teplotě po adekvátní dobu.

Činidla a přístroje.

V popisech analytických metod jsou uvedeny pouze speciální pomůcky a přístroje nebo ty, které vyžadují speciální standardy. Není zapotřebí uvádět zde všechny přístroje či pomůcky, které jsou součástí běžné výbavy zkušebních laboratoří.

Pokud je někde zmiňována *voda* pro ředění nebo promývání, míní se tím vždy *voda destilovaná*. Podobně, jestliže je uváděn *roztok* nějakého činidla bez dalšího označení, rozumí se tím jeho *roztok v destilované vodě*.

Vyjádření výsledků.

Výsledkem uvedeným v analytickém atestu musí být průměrná hodnota získaná nejméně ze dvou zkoušek. Není-li stanoveno jinak, výsledek se vyjádří v procentech původního vzorku ve stavu, v jakém došel do laboratoře. Výsledek nesmí být uváděn v číslech (hodnotách) převyšujících přesnost, kterou umožňuje metoda dané analýzy.

2. STANOVENÍ OBSAHU KYANOVODÍKU.

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit množství kyanovodíku volného i vázaného, ve formě glykosidů obsažených v krmivech, zejména v produktech vyrobených ze lněného semene, maniokové mouky a z některých druhů bobů.

2. Princip

Vzorek se rozmíchá ve vodě. Kyanovodík je uvolňován působením enzymů, vodní parou se předestiluje do okyseleného roztoku dusičnanu stříbrného. Kyanid stříbrný se oddělí filtrací a přebytečný dusičnan stříbrný se stanoví titračně v roztoku thiokyanatanu amonného.

3. Činidla.

3.1 Suspenze sladkých mandlí: Rozdrtí se 20 oloupaných sladkých mandlí ve 100 ml vody 37–40 °C teplé. S použitím Na-pikrátového papíru se přezkouší, zda v 10 ml suspenze není přítomen žádný kyanovodík. Stejnou zkoušku je možno provést podle popisu uvedeného v bodě 5, poslední odstavec.

3.2 10 % roztok (wight/volume – dále jen w/v) octanu sodného, neutrálního na indikátor fenolftalein.

3.3 Odpěňovací emulze (např. silikon).

3.4 Kyselina dusičná, h: 1,40.

3.5 Roztok dusičnanu stříbrného: 0,02 N.

3.6 Roztok thiokyanatanu (rhodanidu) amonného: 0,02 N.

3.7 Nasycený roztok síranu železitoamonného.

3.8 Amoniak (čpavek), h: 0,958.

4. Přístroje.

4.1 Pícka s termostatem nastaveným na 38 °C.

4.2 Přístroj na destilaci vodní parou vybavený kondenzátorem se zakřiveným nástavcem.

4.3 Baňky o kapacitě 1000 ml s plochým dnem a zabroušenými skleněnými zátkami.

4.4 Olejová lázeň.

4.5 Byreta kalibrovaná po 1/20 ml.

5. Postup.

Navážit 20 g vzorku ± 5 mg, vložit do jednolitrové baňky s plochým dnem, přidat 50 ml vody a 10 ml suspenze ze sladkých mandlí (3.1). Zazátkovat baňku a zahřívat v termostatu po dobu šestnácti hodin při teplotě 38 °C. Potom vychladit na pokojovou teplotu, přidat 80 ml vody, 10 ml roztoku octanu sodného (3.2) a nakápnout odpěňovací emulzi (3.3).

Spojit baňku s destilačním přístrojem a vložit do olejové lázně, která byla předem vyhřátá na teplotu mírně nad 100 °C. Vydestilovat 200 až 300 ml kapaliny silným proudem páry procházejícím baňkou, se současným mírným zahříváním olejové lázně. Jímat destilát do Erlenmeyerovy baňky chráněné před světlem s obsahem 50 ml roztoku dusičnanu stříbrného 0,02 N (3.5) a jedním ml kyseliny dusičné (3.4). Je třeba dbát, aby nástavec kondenzátoru byl ponořen do roztoku dusičnanu stříbrného.

Přelít obsah Erlenmeyerovy baňky do 500 ml odměrné baňky, doplnit na tento objem vodou, zamíchat a přefiltrovat. Odebrat 250 ml filtrátu, přidat přibližně jeden ml roztoku síranu železitoamonného (3.7) a odtitrovat přebytek dusičnanu stříbrného roztokem thiokyanatanu amonného 0,02 N (3.6), odebraného z byrety kalibrované po 1/20 ml.

Bude-li to potřebné, může být proveden slepý pokus s použitím stejného postupu pro 10 ml suspenze sladkých mandlí (3.1) – bez analýzy vzorku.

6. **Výpočet výsledků.**

Jestliže slepý pokus ukazuje, že roztok dusičnanu stříbrného 0,02 N byl spotřebován, odečíst jeho hodnotu od objemu spotřebovaného destilátu vzorku. Jeden ml $AgNO_2$ 0,02 N odpovídá 0,54 mg HCN. Výsledek se vyjádří jako procento ze vzorku.

7. **Poznámka.**

Jestliže vzorek obsahuje velké množství sirníků (např. boby), utváří se černá sedlina sirníku stříbrného, která se filtruje společně s usazeninou kyanidu stříbrného. Vytváření zmíněné sedliny způsobuje ztrátu roztoku dusičnanu stříbrného 0,02 N, jehož objem musí být odečten z objemu použitého pro výpočet obsahu HCN. Aby to bylo možné, je třeba postupovat takto:

Přelít usazeninu, která je na filtru, 50 mililitry čpavku (3.8), tak aby se rozpustil kyanid stříbrný. Promýt zbytek ve zředěném čpavku a potom v něm stanovit obsah stříbra. Převést takto získanou hodnotu na jeden ml roztoku dusičnanu stříbrného 0,02 N.

Obsah HCN ve vzorku může být rovněž určen titrací okyseleného čpavkového filtrátu kyselinou dusičnou.

---

3. STANOVENÍ OBSAHU VÁPNÍKU.

1. **Účel a rozsah.**

Metoda umožňuje určit celkový obsah vápníku v krmivech.

2. **Princip.**

Vápník je mineralizován a popel je podroben působení kyseliny chlorovodíkové (solné) a vápník se vysráží jako šťavelan vápenatý. Sedlina se rozpustí v kyselině sírové. Titruje se kyselina šťavelová, která se tím vytvořila, roztokem manganistanu draselného.

3. **Činidla.**

3.1 Kyselina chlorovodíková (solná), p. a., h: 1,14.

3.2 Kyselina dusičná, p. a., h: 1,40.

3.3 Kyselina sírová, p. a., h: 1,13.

3.4 Amoniak (čpavek), p. a., h: 0,98.

3.5 Studený, nasycený roztok šťavelanu amonného, p. a.

3.6 30 % roztok (w/v) kyseliny citrónové, p. a.

3.7 5 % roztok (w/v) chloridu amonného, p. a.

3.8 0,04 % roztok (w/v) zeleného bromokresolu.

3.9 Roztok manganistanu draselného 0,1 N.

4. **Přístroje.**

4.1 Elektrická muflová pícka se vzduchovou cirkulací a termostatem.

4.2 Platinové, křemíkové nebo porcelánové kelímky na žíhání.

4.3 Filtrační skleněné kelímky, s pórovitostí G4.

5. **Postup.**

Navážit přibližně 5 g vzorku (v případě potřeby i více), ± jeden mg. Žíhat při teplotě 550 °C a vložit popel do 250 ml kádinky.

Přidat 40 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), 60 ml vody a několik kapek kyseliny dusičné (3.2). Přivést do varu a udržovat v bodě varu po dobu 30 minut. Ochladit a přelít roztok do 250 ml odměrné baňky. Opláchnout, doplnit obsah vodou až k rysce, promíchat a přefiltrovat.

S použitím pipety odebrat část odpovídající 10–40 mg vápníku podle předpokládaného obsahu a vložit ji do baňky na 250 ml. Přidat jeden ml roztoku kyseliny citrónové (3.6) a 5 ml roztoku chloridu amonného (3.7).

Doplnit vodou na přibližně 100 ml. Přivést do varu, přidat osm až deset kapek roztoku bromkresolové zeleně (3.8) a 30 ml horkého roztoku šťavelanu amonného (3.5). Pokud se začne tvořit sraženina, rozpustit ji několika kapkami kyseliny chlorovodíkové (3.1).

Za stálého míchání velmi pomalu neutralizovat čpavkem až je dosaženo pH 4,4–4,6, to znamená, až indikátor změní barvu. Vložit kádinku do lázně s vařící vodou, ponechat ji tam po dobu třiceti minut tak, aby se vytvořená sraženina mohla usadit. Vyjmout kádinku z vodní lázně, nechat obsah hodinu ustát a pak přefiltrovat do filtračního kelímku G4.

Vymývat kádinku i kelímek vodou až je přebytek šťavelanu amonného úplně odstraněn (nepřítomnost chloridu ve vymývací vodě ukazuje, že obě nádobky jsou dostatečně vymyty).

Rozpustit sedlinu na filtru v 50 ml horké kyseliny sírové (3.3). Vypláchnout kelímek horkou vodou a doplnit filtrát až do přibližně 100 ml. Zvýšit teplotu na 70–80 °C a titrovat po kapkách roztokem manganistanu draselného (3.9) až se objeví růžové zabarvení, které setrvá jednu minutu.

6. **Výpočet výsledků.**

Jeden ml manganistanu draselného 0,1 N odpovídá 2,004 mg vápníku. Výsledek se vyjádří jako procento ze vzorku.

7. **Poznámky.**

7.1 Při velmi nízkém obsahu vápníku postupovat takto: Přefiltrovat šťavelan vápenatý přes bezpopelový filtr. Po promytí vysušit filtr a žíhat při teplotě 550 °C v platinovém kelímku. Znovu rozpustit zbytek v několika kapkách kyseliny sírové (3.3.), odpařit do sucha, znovu žíhat při teplotě 550 °C a nakonec zvážit. Jestliže W je váha získaného síranu vápenatého, alikvotní podíl obsahu vápníku = W x 0,2944.

7.2 Jestliže vzorek je složen pouze z minerálních látek, je třeba ho nejprve rozpustit v kyselině chlorovodíkové, bez předchozího zpopelnění. V případě látek, jako např. fosforečnan hlinitovápenatý, které se v kyselině rozpouštějí nesnadno, je třeba před rozpouštěním tavit alkalickým postupem: Důkladně promíchat vzorek pro analýzu v platinovém kelímku se směsí pětinásobku jeho hmotnosti, skládající se ze stejných dílů uhličitanu draselného a uhličitanu sodného. Opatrně zahřívat, až je směs úplně roztavena. Vychladit a rozpustit v kyselině chlorovodíkové.

7.3 Jestliže má vzorek vysoký obsah hořčíku, krátce nechat usadit šťavelan vápenatý.

4. STANOVENÍ OBSAHU UHLIČITANŮ.

1. **Účel a rozsah.**

Tato metoda umožňuje stanovit obsah uhličitanů ve většině krmiv obvykle vyjadřované jako uhličitan vápenatý.

Nicméně, v některých případech (např. u uhličitanu železnatého) musí být použita speciální metoda.

2. **Princip.**

Uhličitany se rozloží v kyselině chlorovodíkové; vzniklý kysličník uhličitý se zachycuje v odměrné trubici a jeho množství se porovná s kysličníkem uhličitým p.a., jehož množství je známé a který se uvolnil za stejných podmínek.

3. **Činidla.**

3.1 Kyselina chlorovodíková, h: 1,10.

3.2 Uhličitan vápenatý, p. a.

3.3 Kyselina sírová, přibližně 0,1 N, obarvena methylovou červení.

4. **Přístroje.**

Přístroj Scheibler-Dietrich (viz vyobrazení) nebo přístroj podobný.

5. **Postup.**

Podle obsahu uhličitanů ve vzorku, provést navážku vzorku takto:

0,5 g u produktů obsahujících 50–100 % uhličitanů vyjádřených jako uhličitan vápenatý,

1 g u produktů obsahujících 10–50 % uhličitanů ve formě uhličitanu vápenatého,

2–3 g u ostatních produktů.

Vložit navážku vzorku do speciální baňky (4) přístroje vybaveného malou trubicí z nerozbitného materiálu, která obsahuje 10 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1) a spojit baňku s přístrojem. Otočit trojcestný kohout (5) tak, aby trubice směřovala mimo přístroj. S použitím mobilní trubice (2), která je naplněna obarvenou kyselinou sírovou (3.3) a spojena s kalibrovanou trubicí, vyrovnat hladinu kapaliny s nulovou značkou. Otočit kohout (5) tak, aby spojil trubice (1) a (3) a přezkoušet zda hladina je na značce nula.

Polévat část vzorku kyselinou chlorovodíkovou (3.1) pomalým nahýbáním baňky. Stejnoměrným tlakem snižovat trubici (2). Třepat baňkou (4), až se uvolňování kysličníku uhličitého zastaví.

Obnovit tlak až se kapalina znovu dostane na stejnou hladinu v obou trubicích (1 a 2). *Po několika minutách*, až se množství plynu ustálí, provést odečet.

Udělat kontrolní test za stejných podmínek s 0,5 g uhličitanu vápenatého (3,2,).

6. **Výpočet výsledků.**

Obsah uhličitanů v gramech, vyjádřený jako uhličitan vápenatý, v procentech vzorku se vypočítá s použitím vzorce:

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

V = ml CO_2 uvolněného z navážky vzorku

T = ml CO_2 uvolněného z 0,5g $CaCO_2$, p.a.

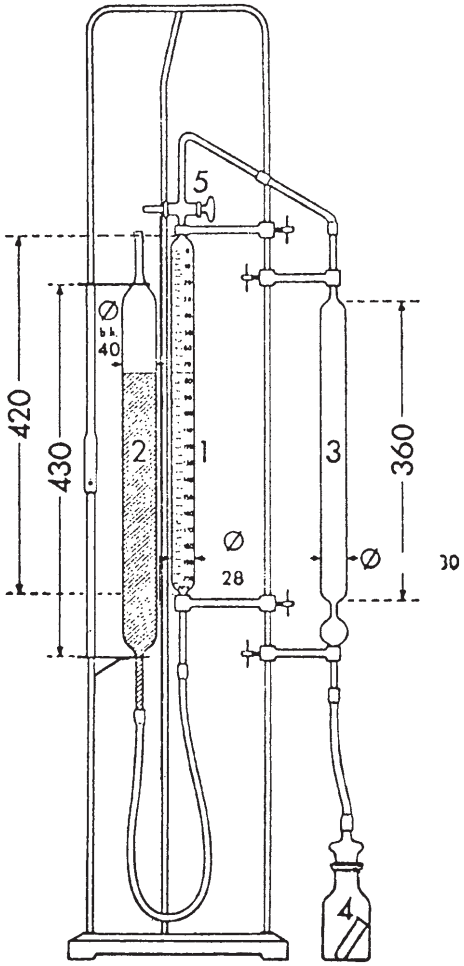
P = hmotnost navážky vzorku v gramech.

7. **Poznámky**

7.1 Jestliže navážka vzorku váží více než dva gramy, nejprve nalít 15 ml destilované vody do baňky (4) a promíchat před započetím zkoušky. Použít stejné množství vody i pro kontrolní test.

7.2 Jestliže použitý přístroj má jiný objem než přístroj Scheibler-Dietrich, navážky odebrané ze vzorku a z kontrolní látky, jakož i výpočet výsledků musí být příslušně upraveny.

PŘÍSTROJ PODLE SCHEIBLER-DIETRICHA PRO STANOVENÍ CO_2



Měřítko: 1/8

(míry v mm)

5. STANOVENÍ OBSAHU HRUBÉHO POPELA.

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje určit obsah hrubého popela v krmivech.

2. **Princip**

Vzorek je zpopelněn při 550 °C; popel je zvážen.

3. **Činidla.**

20 % roztoku (w/v) dusičnanu amonného.

4. **Přístroje.**

4.1 Topná deska.

4.2 Elektrická muflová pícka s termostatem.

4.3 Žíhací kelímky z platiny nebo ze slitiny platiny a zlata (10 % Pt, 90 % Au) buď pravoúhlé (60 x 40 x 25 mm) nebo kulaté (průměr 60–70 mm, výška 20–25 mm).

5. **Postup.**

Zvážit 5 g ± 1 mg vzorku (2,5 g v případě látek, které mají tendenci zvětšovat svůj objem) a vložit do kelímku na žíhání, který byl předem vyžíhán a zvážen. Položit kelímek na topnou desku a postupně ho zahřívat až látka zuhelnatí. Vložit kelímek do muflové pícky zahřáté na 550 °C ± 5 °C. Při této teplotě spalovat až vznikne bílý, lehce šedý nebo načervenalý popel, který se zdá být prostý zuhelnatělých částic. Vložit kelímek do exsikátoru, nechat vychladnout a ihned zvážit.

6. **Výpočet výsledků.**

Spočítat váhu zbytku odečtením váhy kelímku (táry).

Výsledek se vyjádříjako procento vzorku.

7. **Poznámky.**

7.1 Popel *látek, které se obtížně zpopelňují*, musí být předběžně žíhán nejméně po dobu tří hodin. Po vychladnutí se přidá několik kapek 20 % roztoku dusičnanu amonného (opatrně, aby nedošlo k rozptylu popela anebo ke tvoření hrudek). Po vysušení v sušárně pokračovat v žíhání. Opakovat postup podle potřeby, až je zpopelnění úplné.

7.2 V případě látek, které jsou rezistentní na proces popsaný v bodě 7.1, postupovat takto: Po žíhání po dobu tří hodin vložit popel do horké vody a přefiltrovat přes malý, popelu prostý filtr. Žíhat filtr s popelem v originálním kelímku. Vložit filtrát do vychladlého kelímku, odpařit do vysušení, opět žíhat a popel zvážit.

7.3 V případě *olejů a tuků* přesně zvážit přibližně 25 g vzorku v kelímku vhodné velikosti. Zuhelnit zapálením látky proužky z popele prostého filtračního papíru. Po spálení zvlhčit co nejmenším množstvím vody. Vysušit a spálit podle popisu v bodu 5.

6. STANOVENÍ PODÍLU POPELA NEROZPUSTNÉHO V KYSELINĚ CHLOROVODÍKOVÉ

1. **Účel a rozsah.**

Tato metoda umožňuje stanovit v krmivech množství minerálních látek, které se nerozpouštějí v kyselině chlorovodíkové. Mohou být použity dvě metody, jejichž volba závisí na druhu vzorku.

1.1 *Metoda A*: Použitelná pro jednoduchá, organická krmiva a pro většinu krmných směsí.

1.2 *Metoda B*: Použitelná pro minerální krmiva a směsi, jakož i pro krmné směsi, jejichž obsah minerálních látek v kyselině chlorovodíkové stanovených podle metody A převyšuje 1 %.

2. **Princip.**

2.1 *Metoda A*: Vzorek je zpopelněn, popel je vařen v kyselině chlorovodíkové a nerozpustný zbytek pak přefiltrován a zvážen.

2.2 *Metoda B*: Na vzorek se působí kyselinou chlorovodíkovou. Vzniklý roztok je přefiltrován, zbytek spálen na popel a ten dále zpracován podle metody A.

3. **Činidla.**

3.1 Kyselina chlorovodíková, 3 N.

3.2 20 % roztok (w/v) kyseliny trichloroctové.

3.3 1 % roztok (w/v) kyseliny trichloroctové.

4. **Přístroje**

4.1 Topná deska..

4.2 Elektrická muflová pícka s termostatem.

4.3 Žíhací kelímky vyrobené z platiny nebo ze slitiny platiny a zlata (10 % Pt, 90 % Au), buď pravoúhlé (60 x 40 x 25 mm) nebo kulaté (průměr 60–75 mm, výška 20–25 mm).

5. **Postup**

5.1 *Metoda A*

Vzorek se žíhá na popel metodou popsanou pro stanovení obsahu popela. Popel získaný z uvedené analýzy může být rovněž použit.

Vpravit popel do 250–400 ml kádinky a přelít ho 75 ml kyseliny chlorovodíkové, 3 N (3.1). Zvolna přivést do varu a mírně vařit po dobu patnácti minut. Přefiltrovat ještě horký roztok přes popele prostý papírový filtr a promývat zbytek horkou vodou tak dlouho, až kyselá reakce již není patrná. Vysušit filtr obsahující zbytek a žíhat v předem odváženém kelímku a při teplotě minimálně 550 °C, ne vyšší než 700 °C. Vychladit v exsikátoru a zvážit.

5.2 *Metoda B*

Navážit 5 g vzorku ± 1 mg a vložit do 250–400 ml kádinky. Postupně přidávat 25 ml vody a 25 ml kyseliny chlorovodíkové, 3 N (3.1), zamíchat a počkat až ustane šumění. Přidat dalších 50 ml kyseliny chlorovodíkové 3 N (3.1). Počkat až únik plynů přestane úplně a pak vložit kádinku do vařící vodní lázně a ponechat ji v ní po dobu třiceti minut, ev. i déle, jestliže je to zapotřebí, aby se úplně hydrolyzoval škrob, který by mohl být přítomen.

Dokud je vzorek horký, přefiltrovat přes popele prostý filtr a promýt filtr 50 ml horké vody (viz poznámka 7). Vložit filtr obsahující usazeninu do kelímku na žíhání, vysušit a spálit při teplotě minimálně 550 °C a max. 700 °C. Vpravit popel do 250–400 ml kádinky za použití kyseliny chlorovodíkové, 3 N (3.1). Dále pak pokračovat podle postupu uvedeného v druhém odstavci bodu 5.1.

6. **Výpočet výsledků**

Vypočítá se hmotnost zbytku po odečtení táry. Výsledek se vyjádří procentem ze vzorku.

7. **Poznámka**

Jestliže je filtrace obtížná, začít analýzu znovu s náhradou 50 ml kyseliny chlorovodíkové 3 N (3.1) 50 ml 20 % kyseliny trichloroctové (3.2) a promýt filtr horkým roztokem 1 % kyseliny trichloroctové (3.3).

---

7. STANOVENÍ OBSAHU CHLORU Z CHLORIDŮ.

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovit množství chlóru v chloridech, které jsou ve vodě rozpustné a obvykle vyjadřované jako chlorid sodný. Tato metoda je použitelná pro všechny druhy krmiv.

2. **Princip**

Chloridy se rozpustí ve vodě. Jestliže látka obsahuje organickou hmotu, roztok se vyčeří. Roztok je slabě okyselen kyselinou dusičnou a chloridy se vysrážejí pomocí dusičnanu stříbrného na chlorid stříbrný. Přebytek dusičnanu stříbrného je titrován roztokem thiokyanatanu amonného podle Volhardovy metody.

3. **Činidla**

3.1 Roztok thiokyanatanu amonného 0,1 N.

3.2 Roztok dusičnanu stříbrného 0,1 N.

3.3 Nasycený roztok síranu železito-amonného.

3.4 Kyselina dusičná, h: 1,38.

3.5 Diethylether p.a.

3.6 Aceton p.a.

3.7 Carrezovo činidlo I: Rozpustit ve vodě 24 g octanu zinečnatého, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplnit vodou na 100 ml.

3.8 Carrezovo činidlo II: Rozpustit ve vodě 10,6 g ferrokyanidu draselného $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$. Doplnit vodou do 100 ml.

3.9 Aktivní uhlí p.a. bez chloridů a chloridy neabsorbující.

4. **Přístroje**

Třepačka (otáčivá bubnová míchačka).

5. **Postup**

5.1 *Příprava roztoku*

Podle druhu vzorku připravit roztok jak, je uvedeno v odstavcích 5.1.1 a 5.1.2 nebo 5.1.3.

Současně provést slepou zkoušku bez vzorku, který má být analyzován.

5.1.1 *Vzorky bez organické hmoty*

Odvážit s přesností jednoho mg ne více než 10 g vzorku, který neobsahuje více než 3 g chloru ve formě chloridů. Vpravit společně se 400 ml vody do 500 ml odměrné baňky při teplotě přibližně 20 °C. Třicet minut třepat na třepačce nebo v míchačce, doplnit k rysce, promíchat a filtrovat.

5.1.2 *Vzorky obsahující organickou hmotu, kromě produktů uvedených v bodě 5.1.3.*

Odvážit přibližně 5 g vzorku ± jeden mg a vpravit společně s jedním gramem aktivního uhlí do 500 ml odměrné baňky. Přidat 400 ml vody teplé přibližně 20 °C a 5 ml činidla podle Carreze I (3.7). Zamíchat a přidat 5 ml činidla podle Carreze II (3.8). Třepat po dobu třiceti minut na třepačce nebo v míchačce, doplnit množství k rysce, promíchat a filtrovat.

5.1.3 *Tepelně opracovaná krmiva, lněné pokrutiny, lněná moučka, směsi s jejich převážným obsahem a jiné produkty bohaté na rostlinný sliz nebo koloidní látky (např. dextrinový škrob).*

Připravit roztok podle popisu v bodě 5.1.2, ale nefiltrovat. Dekantovat (v případě potřeby odstředit), odebrat 100 ml supernatantu a přelít do 200 ml odměrné baňky. Promíchat s acetonem (3.6) a tímto rozpouštědlem doplnit k rysce. Promíchat a filtrovat.

5.2 *Titrování*

S použitím pipety vpravit do Erlenmayerovy baňky 25 až 100 ml filtrátu (podle předpokládaného obsahu chlóru), který byl získán podle postupu v odst. 5.1.1, 5.1.2 a 5.1.3. Alikvotní část nesmí obsahovat více než 150 ml chlóru (Cl). V případě potřeby rozředit vodou na minimálně 50 ml, přidat 5 ml kyseliny dusičné (3.4), 20 ml nasyceného roztoku síranu železitoamonného (3.3) a dvě kapky roztoku thiokyanatanu amonného (3.1) a s pomocí byrety doplnit ke značce nula. Byretou dále přidat roztok dusičnanu stříbrného (3.2) tak, aby se získal přebytek 5 ml. Přidat 5 ml diethyléteru (3.5) a silně protřepat, aby sraženina koagulovala.

Titrovat přebytek dusičnanu stříbrného roztokem thiokyanátu amonného až červenohnědé zabarvení vydrží jednu minutu.

6. **Výpočet výsledků**

Obsah chlóru (w) vyjádřený jako chlorid sodný, který je přítomen ve filtrátu odebraném na titrování, lze vypočítat s použitím tohoto vzorce:

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

kde:

V_1 = přidané mililitry dusičnanu stříbrného 0,1 Na

V_2 = mililitry roztoku thiokyanátu amonného 0,1 N použitého pro titraci.

Jestliže při slepé zkoušce tento roztok dusičnanu stříbrného byl spotřebován, odečte se jeho hodnota z objemu $(V_1 - V_2)$.

7. **Poznámky**

7.1 Titrace může být rovněž provedena potenciometricky.

7.2 V případě produktů velmi bohatých na oleje a tuky se nejprve odtuční diethyléterem nebo petroléterem.

7.3 V případě rybí moučky titrace může být provedena Mohrovou metodou.

8. STANOVENÍ OBSAHU HOŘČIČNÉHO OLEJE

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení množství hořčičného oleje vyjádřeného jako allyisothiokyanát, obsaženého v pokrutinách rodu Brassica a Sinapis a v krmných směsích, které je obsahují. Metoda stanovení allyisothiokyanátu využívá jeho uvolňování vodní párou.

2. Princip

Vzorek se rozmíchá ve vodě. Hořčičný olej je uvolňován působením enzymů, vytěsní se destilací s ethanolem a jímá se do zředěného čpavku. Roztok se nechá reagovat za tepla s určitým množstvím dusičnanu stříbrného, potom je vychlazen a přefiltrován. Přebytek dusičnanu stříbrného je titrován roztokem thiokyanatanu amonného.

3. Činidla

3.1 Bílá hořčice. (*Sinapsis alba*).

3.2 95–96 % ethanol (v/v).

3.3 Odpěnovací emulze, např. silikonový olej.

3.4 Čpavek, h: 0,958.

3.5 Roztok dusičnanu stříbrného 0,1 N.

3.6 Roztok thiokyanatanu amonného 0,1 N.

3.7 Kyselina dusičná, h: 1,4.

3.8 Nasycený roztok síranu železitoamonného.

4. Přístroje

4.1 500 ml baňky s plochým dnem a se zabroušenými, skleněnými zátkami.

4.2 Destilační přístroj spojený s chladičem a zařízením pro zamezení strhávání kapiček.

5. Postup

Navážit 10 g vzorku ± jeden mg, vpravit do baňky 500 ml s plochým dnem a přidat dva gramy jemně umleté bílé hořčice (3.1) – zdroj enzymu. Dále přidat 200 ml vody o teplotě 20 °C. Zazátkovat baňku a ponechat při teplotě 20 °C za častého protřepávání přibližně dvě hodiny. Přidat 40 ml ethanolu (3.2) a jednu kapku odpěňovací emulze (3.3). Vydestilovat přibližně 150 ml a přelít destilát do 250 ml odměrné baňky s obsahem 20 ml čpavku (3.4). Konec chladiče musí být přitom ponořen do kapaliny. Přidat do roztoku čpavku 50 ml roztoku dusičnanu stříbrného 0,1 N (3.5) – nebo i více, bude-li zapotřebí. Na odměrnou baňku umístit malou nálevku a směs zahřívat na horké vodní lázni po dobu jedné hodiny. Nechat vychladnout, doplnit k rysce vodou, zamíchat a filtrovat. Odebrat 100 ml čirého filtrátu, přidat 5 ml kyseliny dusičné (3.7) a přibližně 5 ml roztoku síranu železitoamonného (3.8). Titrovat přebytek dusičnanu stříbrného roztokem thiokyanatanu amonného, 0,1 N (3.6).

Provést *slepý pokus* s použitím stejného postupu se dvěma gramy jemně umleté bílé hořčice, s vynecháním vzorku pro analýzu.

6. Výpočet výsledků

Odečíst množství roztoku dusičnanu stříbrného 0,1 N spotřebovaného ve slepém pokuse od množství spotřebovaného vzorkem v roztoku. Obdržená hodnota udává počet ml roztoku dusičnanu stříbrného 0,1 N spotřebovaného hořčičným olejem ve vzorku. Jeden mililitr $AgNO_3$ 0,1 N odpovídá 4,956 mg allyisothiokyanátu. Výsledek se vyjádří procentem ze vzorku.

9. STANOVENÍ OBSAHU LAKTÓZY

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit množství laktózy v krmivech obsahujících více než 0,5 % laktózy.

2. Princip

Cukry se rozpustí ve vodě. Roztok se vystaví fermentačnímu účinku kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*, které ponechávají laktózu nedotčenou. Po vyčeření a přefiltrování je obsah laktózy ve filtrátu stanoven metodou Luffovou-Schoorlovou.

3. Činidla

3.1 Suspenze kvasinek *Saccharomyces cervisiae*: Suspendovat 25 g čerstvého droždí ve 100 ml vody. Suspenze vydrží v chladničce maximálně jeden týden.

3.2 Carrezovo činidlo I: Rozpustit ve vodě 24 g octanu zinečnatého Zn $(CH_3\ C00)_2 \cdot 2H_2O$a 3 g ledové kyseliny octové. Doplnit vodou do 100 ml.

3.3 Carrezovo činidlo II: Rozpustit ve vodě 10,6 g kyanoželeznatanu draselného (ferrokyanidu draselného) $K_4Fe\ (CN_6)\ 3H_2O$. Doplnit vodou na 100 ml.

3.4 Luffovo-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného míchání nalévat roztok kyseliny citrónové do roztoku uhličitanu sodného (3.4.2). Přidat roztok síranu měďnatého, (3.4.1) a doplnit vodou do jednoho litru. Nechat přes noc usadit a přefiltrovat. Přezkoušet normalitu roztoku takto získaného činidla (Cu 0,1 N; $Na_2\ CO_3$ 2 N). Roztok by měl mít pH přibližně 9,4.

3.4.1 Roztok síranu měďnatého: Rozpustit 25 g síranu měďnatého, p.a. Cu $SO_4 \cdot 5H_2O$, prostého železa, ve 100 ml vody.

3.4.2 Roztok kyseliny citrónové: Rozpustit 50 g kyseliny citrónové, p.a. $C_6H_6O_7 \cdot H_2O$ v 50 ml vody.

3.4.3 Roztok uhličitanu sodného: Rozpustit 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného v přibližně 300 ml teplé vody. Nechat vychladnout.

3.5 Granulovaná pemza vyvařená v kyselině chlorovodíkové, promytá vodou a vysušená.

3.6 30 % roztok (w/v) jodidu sodného.

3.7 Kyselina sírová 6 N.

3.8 Roztok thiosíranu sodného 0,1 N.

3.9 Roztok škrobu: Přidat směs 5 g rozpuštěného škrobu ve 30 ml vody do jednoho litru vařící vody. Vařit tři minuty, nechat vychladnout a bude-li třeba, přidat 10 g jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.

4. Přístroje

Vodní lázeň s termostatem nastaveným na 38 °C–40 °C.

5. Postup

Navážit 1 g vzorku ± 1 mg a vpravit tuto část vzorku do 100 ml odměrné baňky. Přidat 25–30 ml vody. Umístit baňku do vroucí vodní lázně na třicet minut a pak schladit na přibližně 35 °C. Přidat 5 ml suspenze kvasinek (3.1) a homogenizovat. Ponechat obsah baňky ustát po dobu dvou hodin ve vodní lázni teplé 38–40 °C. Vychladit na přibližně 20 °C.

Přidat 2,5 ml činidla podle Carreze I (3.2) a třicet vteřin míchat. Potom přidat 2,5 ml činidla podle Carreze II (3.3) a znovu třicet vteřin míchat. Doplnit vodou na 100 ml, zamíchat a přefiltrovat. S použitím pipety odebrat část filtrátu, ne větší než 25 ml, který pokud možno obsahuje 40 až 80 mg laktózy, a vpravit ho do 300 ml Erlenmeyrovy baňky. Pokud je potřeba, doplnit vodou do 25 ml.

Stejným způsobem se provede *slepý pokus* s 5 ml suspensí kvasinek (3.1).

Stanovení obsahu laktózy podle Luffa-Schoorla: Přidat přesně 25 ml Luffova-Schoorlova činidla (3.4) a dvě granule pemzy (3.5). Ručně míchat při zahřívání na volném plameni střední výšky a přivést tekutinu do varu přibližně během dvou minut. Potom neprodleně vložit Erlenmeyerovou baňku na azbestem potaženou drátěnou tkaninu s přibližně 6 cm otvorem, pod kterým byl zapálen plamen. Tento plamen je třeba vyregulovat tak, aby ohříval pouze dno Erlenmeyrovy baňky. Připevnit zpětný chladič k Erlenmerově baňce. Vařit přesně deset minut. Ihned zchladit ve studené vodě a přibližně po pěti minutách titrovat takto:

Přidat 10 ml roztoku jodidu sodného (3.6) a ihned poté (pozor – jinak vzniká riziko mohutného zpěnění) přidat 25 ml roztoku kyseliny sírové 6 N (3.7). Titrovat roztokem thiosíranu sodného 0,1 N (3.8) až do vzniku kalné, žluté barvy. Potom přidat škrobový indikátor (3.9) a dokončit titraci.

Provést tutéž titraci s přesně odměřenou směsí 25 ml Luffova-Schoorlova činidla (3.4) a 25 ml vody, po přidání 10 ml roztoku jodidu draselného (3.6) a 25 ml kyseliny sírové 6 N (3.7), bez povaření.

6. **Výpočet výsledků**

S použitím přiložené tabulky stanovit množství laktózy v miligramech, které odpovídá rozdílu mezi výsledky dvou titrací, vyjádřených v mililitrech thiosíranu sodného 0,1 N.

Výsledek se vyjádří v procentním podílu bezvodé laktózy ve vzorku.

7. **Poznámka**

U látek obsahujících více než 40 % zkvasitelného cukru použít více než 5 ml kvasinkové suspenze.

Tabulka množství pro 25 ml Luffova-Schoorlova činidla

ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 N, dvě min. zahřívání, 10 min. vaření

$Na_2S_2O_3$	Glukóza, fruktóza invertní cukry $C_8H_{12}O_6$		Laktóza $C_8H_{12}O_{11}$		Maltóza $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_4O_3$ 0,1 N
Ml	Mg	rozdíl	mg	rozdíl	mg	rozdíl	ml
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. STANOVENÍ OBSAHU DRASLÍKU

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit množství draslíku v krmivech.

2. Princip

Vzorek se zpopelní a popel se rozpustí v kyselině chlorovodíkové. Obsah sodíku v roztoku se stanoví plamennou fotometrií za přítomnosti chloridu cesného a dusičnanu hlinitého. Přidání těchto dvou látek zcela eliminuje vliv interferujících látek.

3. Činidla

3.1 Kyselina chlorovodíková, p.a., h: 1,12.

3.2 Chlorid cesný, p.a.

3.3 Dusičnan hlinitý $Al(NO_3)3 \cdot 9\ H_2O$, víceúčelové činidlo.

3.4 Bezvodý chlorid draselný, p.a.

3.5 Pufr: Rozpustit ve vodě 50 g chloridu cesného (3.2) a 250 g dusičnanu hlinitého (3.3), doplnit do jednoho litru vodou a promíchat. Uchovávat v plastových lahvích.

3.6 Standardní roztok draslíku: Rozpustit ve vodě 1,907 g chloridu draselného (3.4), přidat 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplnit do jednoho litru vodou a promíchat. Uchovávat v plastikových lahvích. Jeden mililitr tohoto roztoku obsahuje jeden miligram draslíku.

4. Přístroje

4.1 Platinové, křemenné či porcelánové kelímky pro žíhání, vybavené podle potřeby víčky.

4.2 Elektrická, muflová pícka s termostatem.

4.3 Plamenný fotometr.

5. Postup

5.1 *Analýza vzorku*

Obvykle se naváží 10 g vzorku ± 10 mg, vpraví se do kelímku a zpopelní tři hodiny při teplotě 450 °C. Po vychladnutí se popel kvantitativně vpraví do 500 ml odměrné baňky s pomocí 250–300 ml vody a pak 50ml ml kyseliny chlorovodíkové (3.1). Když úplně ustane uvolňování kysličníku uhličitého, zahřát roztok na přibližně 90 °C a na této teplotě držet po dobu dvou hodin za občasného míchání. Po vychladnutí na pokojovou teplotu doplnit k rysce vodou, protřepat a přefiltrovat. Alikvotní část tohoto filtrátu, obsahujícího maximálně 1 mg draslíku, přelít do 100 ml odměrné baňky, přidat 10 ml pufru (3.5), doplnit vodou k rysce a promíchat. V případě vyšších hodnot draslíku, zředitt analyzovaný roztok ve vhodných poměrech před přidáním pufru.

Níže uvedená tabulka slouží jako příklad pro vzorek o hmotnosti přibližně 10 gramů:

Předpokládaný obsah draslíku ve vzorku (% K)	Poměr ředění	Alikvotní část roztoku v ml
Až do 0,1	—	50
0,1 až 0,5	—	10
0,5 až 1,0	—	5
1,0 až 5,0	1 : 10	10
5,0 až 10,0	1 : 10	5
10,0 až 20,0	1 : 20	5

Změřit plamenným fotometrem při vlnové délce 768 nm. Vypočítat výsledek pomocí kalibrační křivky.

5.2 *Kalibrační křivka*

Vpravit přesně 10 ml standardního roztoku (3.6) do 250 ml odměrné baňky, doplnit k rysce a promíchat. Vpravit do 100 ml odměrných baněk 5, 10, 15, 20 a 25 ml přesně. Tato množství roztoku odpovídají příslušným množstvím draslíku takto: 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 a 1 mg. Doplnit sadu testovací baňkou bez standardního roztoku. Přidat 10 ml pufru (3.5) do každé baňky, doplnit k rysce vodou a promíchat. Provést měření tak jak je uvedeno v odstavci 5.1. Kalibrační křivka obvykle lineárně stoupá podle koncentrace draslíku až k obsahu 1 mg ve 100 ml roztoku.

6. **Výpočet výsledků**

Výsledek se vyjádří procentním poměrem ke vzorku.

7. **Poznámky**

Ne vždy je nutné přidávat pufr (3.5) pro eliminaci interference rušivých prvků.

---

11. STANOVENÍ OBSAHU SODÍKU

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovit obsah sodíku v krmivech.

2. **Princip**

Vzorek se zpopelní a popel se rozpustí v kyselině chlorovodíkové. Obsah sodíku v roztoku se stanoví plamennou fotometrií za přítomnosti chloridu cesného a dusičnanu hlinitého. Přísada těchto látek značně omezuje vliv interferujících látek.

3. **Činidla**

3.1 Kyselina chlorovodíková, p.a., h: 1,12.

3.2 Chlorid cesný, p.a.

3.3 Dusičnan hlinitý Al $(NO_3)3 \cdot 9H_2O$, mnohoúčelové činidlo.

3.4 Bezvodý chlorid sodný, p.a.

3.5 Pufr: Rozpustit ve vodě 50 g chloridu cesného (3.2) a 250 g uhličitanu hlinitého (3.3), doplnit vodou na jeden litr a promíchat. Uchovávat v plastových lahvích.

3.6 Standardní roztok sodíku: Rozpustit ve vodě 2,542 g chloridu sodného (3.4), přidat 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1), doplnit vodou na jeden litr a promíchat. Uchovávat v plastových lahvích. Jeden mililitr tohoto roztoku obsahuje jeden miligram sodíku.

4. **Přístroje**

4.1 Kelímky na žíhán platinové, křemenné či porcelánové, v případě potřeby s víčky.

4.2 Elektrická muflová pícka s termostatem.

4.3 Plamenný fotometr.

5. **Postup**

5.1 *Analýza vzorku*

Obvykle se naváží 10 g vzorku ± 10 mg. Vpraví se do kelímku (4.2) a při teplotě 450 °C se tři hodiny žíhá. Je třeba se vyhnout přehřátí, protože hrozí vzplanutí. Po vychladnutí se popel kvantitativně vloží do 500 ml odměrné baňky pomocí 250–300 ml vody, a pak 50 ml kyseliny chlorovodíkové (3.1). Když ustane veškerý únik kysličníku uhličitého, zahřát roztok a udržet ho na teplotě kolem 90 °C po dobu dvou hodin za občasného míchání. Po vychladnutí na pokojovou teplotu doplnit k rysce vodou, protřepat a přefiltrovat. Přelít do 100 ml odměrné baňky alikvotní část filtrátu obsahujícího maximálně 1 mg sodíku. Přidat 10 ml pufru (3.5), doplnit k rysce vodou a promíchat. V případě vyššího obsahu sodíku rozředit roztok, který má být analyzován, ve vhodných poměrech před přidáním pufru.

Níže uvedená tabulka slouží jako příklad pro vzorek o hmotnosti přibližně 10 g.

Předpokládaný obsah sodíku ve vzorku (% Na)	Poměr ředění	Alikvotní část roztoku v ml
až do 0,1	—	50
0,1 až 0,5	—	10
0,5 až 1,0	—	5
1,0 až 5,0	1 : 10	10
5,0 až 10,0	1 : 10	5
10,0 až 20,0	1 : 20	5

Změřit plamenným fotometrem při vlnové délce 589 nm. Vypočítat výsledek pomocí kalibrační křivky.

5.2 *Kalibrační křivka*

Vpravit přesně 10 ml standardního roztoku (3.6) do 250 ml odměrné baňky, doplnit k rysce vodou a promíchat. Vpravit do 100 ml odměrných baněk přesně 5, 10, 15, 20 a 25 ml tohoto roztoku, což odpovídá příslušným množstvím sodíku 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 a 1 mg. Doplnit tuto sadu zkušební baňkou bez standardního roztoku. Přidat 10 ml pufru (3.5) do každé baňky, doplnit vodou k ryskám a promíchat. Provést změření podle návodu v odstavci 5.1. Kalibrační křivka obvykle lineárně stoupá podle koncentrace sodíku až k obsahu 1 mg ve 100 ml roztoku

6. **Výpočet výsledků**

Výsledek se vyjádří procentem ze vzorku.

7. **Poznámky**

7.1 U produktů, které obsahují více než 4 % sodíku, je výhodnější žíhat vzorek v kelímcích s víčky po dobu dvou hodin. Po vychladnutí přidat vodu, suspendovat popel pomocí platinového drátku, vysušit a znovu žíhat po dobu dvou hodin v kelímku s víčkem.

7.2 Pokud je vzorek složen pouze z minerálních látek, rozpustí se bez předchozího žíhání.

---

12. **STANOVENÍ OBSAHU CUKRŮ**

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovit obsah redukujících cukrů, jakož i celkové množství cukrů po inverzi ve formě glukózy, anebo kde je to vhodné, ve formě sacharosy, přepočtené faktorem 0,95. Tato metoda je použitelná pro krmné směsi. Speciální metody se používají pro jiná krmiva. Kde je to nutné, laktóza by měla být měřena separátně a vzata v úvahu při vypočítávání výsledků.

2. **Princip**

Cukry jsou extrahovány zředěným ethanolem. Roztok je vyčeřen Carrezovými činidly I a II. Po odstranění ethanolu, množství před a po inverzi se stanoví Luffovou-Schoorlovou metodou.

3. **Činidla**

3.1 40 % ethanol (v/v), h: 0,948 při 20 °C, neutralizovaný na fenolftalein.

3.2 Carrezovo činidlo I: Rozpustit ve vodě 24 g octanu zinečnatého Zn $(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplnit vodou na 100 ml.

3.3 Carrezovo činidlo II: Rozpustit ve vodě 10,6 g kyanoželeznatanu draselného (ferrokyanidu draselného) $K_4FeCN_6 \cdot 3H_2O$. Doplnit vodou na 100 ml.

3.4 0,1 % roztok (w/v) methyloranže.

3.5 Kyselina chlorovodíková, 4 N.

3.6 Kyselina chlorovodíková, 0,1 N.

3.7 3.7.Roztok hydroxidu sodného, 0,1 N.

3.8 Luffovo-Schoorlovo činidlo:

Za opatrného míchání nalít roztok kyseliny citrónové (3.8.2) do roztoku uhličitanu sodného (3.8.3). Přidat roztok síranu měďnatého (3.8.1) a doplnit vodou do jednoho litru. Nechat přes noc usadit a pak přefiltrovat. Přezkoušet normalitu takto získaného činidla (Cu 0,1 N, Na_2CO_3 2 N). pH tohoto roztoku by mělo být přibližně 9,4.

3.8.1 Roztok síranu měďnatého: Rozpustit 25 g síranu měďnatého, p.a., Cu $SO_4 \cdot 5H_2O$, prostého železa, ve 100 ml vody.

3.8.2 Roztok kyseliny citrónové: Rozpustit 50 g kyseliny citrónové, p.a., v 50 ml vody. $C_6H_3O_7 \cdot H_2O$.

3.8.3 Roztok uhličitanu sodného: Rozpustit 143,8 g bezvodého uhličitanu sodného, p.a., v přibližně 300 ml teplé vody. Nechat vychladnout.

3.9 Roztok thiosíranu sodného 0,1 N.

3.10 Roztok škrobu: Přidat směs 5 g rozpuštěného škrobu ve 30 ml vody do jednoho litru vařící vody. Tři minuty vařit, nechat vychladnout a v případě potřeby přidat 10 mg jodidu rtuťnatého jako stabilizátoru.

3.11 Kyselina sírová 6 N.

3.12 30 % roztok (w/v) jodidu draselného.

3.13 Granulovaná pemza vyvařená v kyselině chlorovodíkové, propraná ve vodě a vysušená.

3.14 3-methylbutan-1-01 (isopentanol).

4. **Přístroje**

Rotační (bubnová) třepačka: přibližně na 35–40 ot./min.

5. **Postup**

5.1 *Extrakce vzorku*

Navážit 2,5 g vzorku ± 1 mg a vpravit do 250 ml odměrné baňky. Přidat 200 ml ethanolu (3.1) a míchat po dobu jedné hodiny na třepačce. Přidat 5 ml Carrezova činidla I (3.2) a minutu míchat. Přidat 5 ml Carrezova činidla II (3.2) a znovu minutu míchat. Doplnit k rysce ethanolem (3.1), promíchat a přefiltrovat. Odebrat 200 ml filtrátu a odpařovat na polovinu objemu, aby se odstranila většina ethanolu. Usazeninu po odpařování vzniklou kvantitativně převést do 200 ml odměrné baňky s pomocí horké vody. Zchladit, doplnit vodou k rysce, promíchat a v případě potřeby přefiltrovat. Tento roztok bude použit pro stanovení obsah redukujících cukrů, a po inverzi, pro stanovení obsahu všech cukrů.

5.2 *Stanovení redukujících cukrů*

S použitím pipety odebrat maximálně 25 ml roztoku obsahujícího méně než 60 mg redukujících cukrů ve formě glukózy. V případě potřeby doplnit destilovanou vodou do 25 ml a stanovit obsah redukujících cukrů Luffovou-Schoorlovou metodou. Výsledek se vyjádří jako procentní obsah glukózy ve vzorku.

5.3 *Stanovení celkového obsahu cukrů po inverzi*

S použitím pipety odebrat 50 ml roztoku a přelít ho do 100 ml odměrné baňky. Přidat několik kapek roztoku methyloranže (3.4), a potom za stálého, opatrného míchání přidat kyselinu chlorovodíkovou 4 N (3.5) až se kapalina trvale zbarví do červena. Přidat 15 ml kyseliny chlorovodíkové 0,1 N (3.6), ponořit baňku rychle do vařící vodní lázně a ponechat ji tam třicet minut. Rychle vychladit na 20 °C a přidat 15 ml roztoku hydroxidu sodného 0,1 N (3.7). Doplnit na 100 ml vodou a promíchat. Odebrat maximálně 25 ml, obsahujících méně než 60 mg redukujících cukrů ve formě glukózy. V případě potřeby doplnit destilovanou vodou do 25 ml a stanovit obsah redukujících cukrů Luffovou-Schoorlovou metodou. Výsledek se vyjádří jako procento glukózy, anebo kde je to vhodné, jako sacharosy po vynásobení faktorem 0,95.

5.4 *Titrace Luffovou-Schoorlovou metodou*

S použitím pipety odebrat 25 ml Luffova-Schoorlova činidla (3.8) a vpravit ho do 300 ml Erlenmeyerovy baňky; přidat přesně 25 ml vyčeřeného cukerného roztoku. Přidat dvě granule pemzy (3.13), při ručním míchání zahřívat nad otevřeným plamenem střední délky a přivést kapalinu do varu přibližně za dvě minuty. Neprodleně pak umístit Erlenmeyerovou baňku na asbestem potaženou drátěnou síťku s otvorem o přibližném průměru 6 cm, pod kterou je zapálen plamen. Tento plamen musí být regulován tak, aby bylo zahříváno pouze dno Erlenmeyrovy baňky. Připojit zpětný chladič k Erlenmeyerově baňce. Vařit přesně deset minut a pak ihned vychladit ve studené vodě a přibližně po pěti minutách titrovat takto:

Přidat 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a ihned potom (opatrně, vzhledem k riziku mohutného vypěnění) přidat 25 ml kyseliny sírové 6 N (3.11). Titrovat roztokem thiosíranu sodného 0,1 N (3.9) až se objeví kalně žlutá barva. Pak přidat škrobový indikátor (3.10) a dokončit titraci. Provést stejnou titraci ***s*** přesně odměřenou směsí 25 ml Luffova-Schoorlova činidla (3.8) a 25 ml vody, po přidání 10 ml roztoku jodidu draselného (3.12) a 25 ml kyseliny sírové (3.11) – bez vaření.

6. **Výpočet výsledků**

S použitím tabulky stanovit obsah gluosy v mg, který odpovídá rozdílu mezi hodnotami obou titrací vyjádřený v ml thiosíranu sodného 0,1 N.

Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

7. **Zvláštní postupy**

7.1 V případě krmiv bohatých na melasu nebo jiných krmiv, která nejsou zcela homogenní, odvážit 20 g vzorku a vložit, společně s 500 ml vody, do jednolitrové odměrné baňky. Míchat hodinu na třepačce (bubnové míchačce). Vyčeřit s použitím činidel Carrez I a Carrez II (3.2 a 3.3), tak jak je uvedeno v odstavci 5.1, ale v tomto případě se čtyřnásobným množstvím obou činidel. Doplnit k rysce 80 % ethanolem (v/v).

Promíchat a přefiltrovat. Odstranit ethanol postupem uvedeným v odstavci 5.1. Pokud ve směsi není žádný dextrinovaný škrob, doplnit k rysce destilovanou vodou.

7.2 V případě melas a krmných surovin, které jsou bohaté na cukry a téměř bez škrobu (svatojánský chléb, sušené řepné řízky), odvážit 5 g, vložit do 250 ml odměrné baňky, přidat 200 ml destilované vody a míchat na třepačce po dobu jedné hodiny a v případě potřeby i více. Vyčeřit činidly Carrez I (3.2) a Carrez II (3.2), jak uvedeno v odstavci 5.1. Doplnit k rysce studenou vodou, promíchat a přefiltrovat. Pro stanovení obsahu všech cukrů pokračovat podle popisu uvedeného v odstavci 5.3.

8. **Poznámky**

8.1 Pro zamezení pěnění se doporučuje přidat (bez ohledu na množství vzorku) přibližně jeden mililitr isopentanolu (3.14) před povařením s Luffovým-Schoorlovým činidlem.

8.2 Rozdíl mezi obsahem všech cukrů po inverzi vyjádřeným jako glukóza a obsahem cukrů redukujících vyjádřených jako glukóza, vynásobený koeficientem 0,95, udává procentní obsah sacharosy.

8.3 Pro stanovení obsahu redukujících cukrů, s výjimkou laktózy, lze použít dvě metody:

8.3.1 Pro přibližný výpočet vynásobit koeficientem 0,675 obsah laktózy stanovený odlišnou separátní analýzou a odečíst výsledek získaný z obsahu redukujících cukrů.

8.3.2 Pro přesný výpočet obsahu redukujících cukrů, s výjimkou laktózy, stejný vzorek musí být použit pro dvě konečná stanovení. Jedna z analýz je provedena s částí roztoku získaného podle odstavce 5.1, druhá analýza je provedena s částí roztoku získaného při stanovení laktózy metodou určenou pro tento účel (po fermentaci ostatních druhů cukrů a jejich vyčeření).

V obou případech je množství přítomného cukru stanoveno Luffovou-Schoorlovou metodou a stanoveno v mg glukózy. Jeden údaj je odečten od druhého a rozdíl se vyjádří jako procento vzorku.

Příklad:

Oba objemy odpovídají pro každé stanovení vzorku o váze 250 mg.

V prvním případě je spotřebováno 17 ml roztoku thiosíranu sodného 0,1 N, což odpovídá 44,2 mg glukózy. V druhém případě je spotřebováno 11 ml téhož roztoku, což odpovídá 27,6 mg glukózy.

Rozdíl činí 16,6 mg glukózy.

Obsah redukujících cukrů (s výjimkou laktózy), vyjádřených jako glukóza je proto:

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

Tabulka hodnot pro 25 ml Luffova-Schoorlova činidla

ml $Na_2S_2O_3$ 0,1 N, dvě minuty ohřívání, deset minut varu

$Na_2S_2O_3$	Glukóza, fruktóza invertní cukry $C_8H_{12}O_6$		Laktóza $C_{12}H_{22}O_{11}$		Maltóza $C_{12}H_{22}O_{11}$		$Na_2S_2O_3$
Ml	Mg	rozdíl	Mg	rozdíl	mg	rozdíl	Ml
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. STANOVENÍ OBSAHU THEOBROMINU

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovit obsah theobrominu ve vedlejších produktech vznikajících při zpracování kakaových bobů.

2. **Princip**

Theobromin se extrahuje chloroformem. Extrakt se odpaří do sucha, rozpustí ve vodě a nechá se reagovat se specifickým množstvím roztoku dusičnanu stříbrného. Uvolněná kyselina dusičná je titrována roztokem hydroxidu sodného.

3. **Činidla**

3.1 Chloroform, p.a.

3.2 Čpavek, h:0,958

3.3 Bezvodý síran sodný, p.a.

3.4 Roztok hydroxidu sodného, 0,1 N.

3.5 Roztok dusičnanu stříbrného, 0,1 N.

3.6 1 % (w/v) ethanolický roztok fenolové červeně.

3.7 Petroléter bod varu 40–60 °C.

4. **Přístroje**

500 ml baňky s plochým dnem a zabroušenými, skleněnými zátkami.

5. **Postup**

Navážit maximálně 10 ± 1 mg vzorku obsahujícího maximálně 80 mg theobrominu. Vpravit do 500 ml baňky s plochým dnem a se zabroušenou skleněnou zátkou. Přidat 270 ml chloroformu (3.1) a 10 ml čpavku (3.2). Zazátkovat baňku a silně třepat po dobu pěti minut. Přidat 12 g bezvodého síranu sodného (3.3), znovu protřepat a nechat usadit do příštího dne. Přefiltrovat do 500 ml Erlenmeyrovy baňky a promýt sedlinu 100 ml chloroformu (3.1). Destilovat rozpouštědlo a odpařit jeho poslední rezidua na vroucí vodní lázni. Znovu rozpustit extrakt v 50 ml vody a uvést ho do varu.

Vychladit, přesně neutralizovat roztokem hydroxidu sodného (3.4), s použitím 0,5 ml roztoku fenolové červeně (3.6). Přidat 20 ml roztoku dusičnanu stříbrného (3.5); titrovat unikající kyselinu dusičnou roztokem hydroxidu sodného (3.4) až indikátor změní barvu (pH 7,4).

6. **Výpočet výsledků**

1 ml 0,1 N NaOH = 18 mg theobrominu.

Výsledek se vyjádří procentem ze vzorku.

7. **Poznámky**

Produkty obsahující více než 8 % tuku musí být nejprve odtučněny šestihodinovou extrakcí s petroléterem (bod varu 40–60 °C).

14. STANOVENÍ OBSAHU MOČOVINY

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovit obsah močoviny v krmivech.

2. Princip

Vzorek s čeřícím činidlem se rozpustí ve vodě a přefiltruje. Obsah močoviny ve filtrátu se stanoví po přidání 4-dimethylaminobenzaldehydu (4-DMAB) spektrofotometrickypři vlnové délce 420 nm.

3. Činidla

3.1 Roztok 4-dimethylaminobenzaldehydu: Rozpustit 1,6 g 4-DMAB, p.a., ve 100 ml 96 % ethanolu a přidat 10 ml kyseliny chlorovodíkové, p.a., h: 1,19. Toto činidlo vydrží maximálně dva týdny.

3.2 Carrezovo činidlo I: Rozpustit ve vodě 24 g octanu zinečnatého $Zn(CH_3COO) \cdot {}_2 2H_2O$ a 3 g ledové kyseliny octové. Doplnit vodou na 100 ml.

3.3 Carrezovo činidlo II: Rozpustit ve vodě 10,6 g ferrokyanidu draselného $K_4Fe\ CN_6 \cdot 3H_2O$. Doplnit vodou na 100 ml.

3.4 Aktivní uhlí, p.a, které neabsorbuje močovinu (třeba přezkoušet).

3.5 0,1 % roztok (w/v) močoviny, p.a.

4. Přístroje

4.1 Rotační (bubnová) třepačka na přibližně 35–40 ot./min.

4.2 Zkumavky: 160 x 16 nm se zabroušenými, skleněnými zátkami.

4.3 Spektrofotometr

5. Postup

5.1 *Analýza vzorku*

Odvážit 2 g vzorku ± 1 mg a vpravit ho s 1 g aktivního uhlí (3.4) do 500 ml odměrné baňky. Přidat 400 ml vody a 5 ml činidla podle Carreze I (3.2) a Carreze II (3.3). Míchat po dobu třiceti minut v bubnové třepačce. Doplnit vodou k rysce, protřepat a přefiltrovat.

Odebrat 5 ml průhledného, bezbarvého filtrátu, přelít do zkumavek se zabroušenými skleněnými zátkami, přidat 5 ml roztoku 4-DMAB a promíchat. Vložit zkumavky do lázně s teplou (20 °C) vodou. Po patnácti minutách změřit spektrálním fotometrem optickou hustotu tohoto roztoku při vlnové délce 420 nm. Porovnat se slepým roztokem činidel.

5.2 *Kalibrační křivka*

Odebrat množství 1, 2, 4, 5 a 10 ml roztoku močoviny (3.5), vložit do 100ml odměrných baněk a doplnit k ryskám vodou. Odebrat z každého roztoku 5 ml, přidat ke každému 5 ml roztoku 4-DMAB (3.1), promíchat a změřit optickou hustotu jak je uvedeno výše a porovnat s kontrolním roztokem obsahujícím 5 ml 4-DMAB a 5 ml vody bez močoviny. Sestavit kalibrační křivku.

6. Výpočet výsledků

Stanovit množství močoviny ve vzorku s použitím kalibrační křivky.

Výsledek se vyjádří procentem ze vzorku.

7. **Poznámky**

7.1 V případě, že vzorek obsahuje více než 3 % močoviny, redukovat vzorek na 1 g, anebo rozředit původní roztok tak, že v něm není více než 50 mg močoviny na 500 ml roztoku.

7.2 V případě nízkého obsahu močoviny zvětšovat vzorek tak dlouho, až je filtrát průhledný a bez barvy.

7.3 V případě, že vzorek obsahuje jednoduché dusíkaté sloučeniny, jako na příklad aminokyseliny, optická densita se změří při vlnové délce 435 nm.

---

15. **STANOVENÍ OBSAHU ALKALOIDŮ** *V* **LUPINĚ.**

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovit obsah alkaloidů v semenech lupiny.

2. **Princip**

Alkaloidy se vyluhují směsí diethyléteru a chloroformu a extrahují kyselinou chlorovodíkovou. Alkaloidy se vysráží kyselinou silikowolframovou, sraženina se zpopelní a popel zváží.

3. **Činidla**

3.1 Diethyléter.

3.2 Chloroform.

3.3 Roztok hydroxidu sodného, 4 N.

3.4 Kyselina chlorovodíková, 0,3 N.

3.5 Chlorid sodný, p.a.

3.6 10 % roztok (w/v) kyseliny silikowolframové $SiO_2 \cdot 12\ WO_3 .\ 26\ H_2O$.

4. **Přístroje**

4.1 Mechanická míchačka.

4.2 Platinové, křemenné nebo porcelánové kelímky na žíhání.

4.3 Elektrická muflová pícka.

5. **Postup**

Navážit 15 g vzorku ± 5 mg a vpravit do nádobky s kapacitou přibližně 200 ml, se zabroušenou, skleněnou zátkou (např. dělící nálevka). Přidat přesně 100 ml diethyléteru (3.1) a 50 ml chloroformu (3.2). Potom s použitím kalibrované pipety dodat 10 ml roztoku hydroxidu sodného (3.3). Silně protřepat, aby se zabránilo hrudkování. Znovu několikrát protřepat a nechat pře noc ustát. Jestliže supernatant není úplně čirý, přidat několik kapek vody. Přefiltrovat éterochloroformovou vrstvu. Odebrat 50 ml filtrátu do 50 ml odměrné baňky a kvantitativně převést do 150 ml dělící nálevky, s použitím 50 ml diethyléteru (3.1). Třikrát postupně extrahovat s 20 ml kyseliny chlorovodíkové (3.4). Nechat dekantovat a odebrat kyselý extrat po každé extrakci. Soustředit kyselé extrakty do 250 ml kádinky a odstranit i poslední stopy éteru a chloroformu mírným zahříváním. Přidat přibližně jeden gram chloridu sodného (3.5), nechat vychladnout a vysrážet alkaloidy v roztoku kyseliny silikowolframové (3.6). Promíchat mechanickou míchačkou po dobu třiceti minut. Nechat přes noc usadit, pak přefiltrovat přes bezpopelový filtrační papír a promýt usazeninu postupně dvakrát 10 ml a dvakrát 5 ml kyseliny chlorovodíkové (3.4). Vložit filtr obsahující usazeninu do kelímku a žíhat při teplotě 900 °C. Nechat vychladnout a zvážit.

6. **Výpočet výsledků**

Obsah alkaloidů ve vzorku se stanoví znásobením váhy popele faktorem 0,2.

Výsledek se vyjádří procentem vzorku.

---

16. STANOVENÍ AKTIVITY UREÁZY V PRODUKTECH POCHÁZEJÍCÍCH ZE SÓJI

1. **Účel a rozsah**

Tato zkouška umožňuje stanovit aktivitu ureázy v produktech pocházejících ze sóji a prokázat, zda tyto produkty prošly dostatečnou tepelnou úpravou.

2. **Princip**

Působení močoviny se stanoví podle množství amoniakálního dusíku uvolňovaného jedním gramem produktu za jednu minutu z roztoku močoviny při teplotě 30 ° C.

3. **Činidla**

3.1 Kyselina chlorovodíková, 0,1 N.

3.2 Roztok hydroxidu sodného, 0,1 N.

3.3 Fosfátové plnidlo, 0,05 M, obsahující ve 1000 ml 4,45 g dihydrátu hydrogen fosforečnanu sodného ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) a 3,4 g dihydrogen fosforečnanu draselného (KH_2PO_4).

3.4 Čerstvě připravené močovinové plnidlo obsahující 30 g močoviny v 1000 ml fosfátového plnidla (3.3); pH 6,9–7,0.

4. **Přístroje**

4.1 Potenciometrický titrační přístroj nebo vysoce citlivý pH metr (0,02 pH) s magnetickou míchačkou.

4.2 Vodní lázeň vybavená termostatem nastaveným na 30 °C přesně.

4.3 Zkumavky se skleněnými, zabroušenými zátkami 150 x 18 mm.

5. **Postup**

Rozdrtit přibližně 10 g vzorku (např. v kávomlýnku) tak, aby drť prošla sítem s oky (mesh) 0,2 mm. Odvážit 0,2 g rozdrceného vzorku ± 1 mg, vložit ho do zkumavky se zabroušenou, skleněnou zátkou a přidat 10 ml močovinového plnidla (3.4). Ihned zazátkovat a silně protřepat. Vložit zkumavku do vodní lázně s teplotou přesně 30 °C, přesně a silně protřepat. Zkumavku ponechat v této lázni přesně třicet minut. Ihned potom přidat 10 ml 0,1 N kyseliny chlorovodíkové (3.1), rychle ochladit na 20 °C a obsah zkumavky převést kvantitativně do titrační nádoby s dvojím propláchnutím 5 ml vody. S použitím skleněné elektrody (4.1), ihned a rychle titrovat do hodnoty pH 4,7 s 0,1 N roztokem hydroxidu sodného (3.2) s pomocí elektrometrie.

Provést tento *slepý test*:

Rychle vložit vzorek o váze 0,2 g ± 1 mg do zkumavky se zabroušenou skleněnou zátkou, přidat 10 ml 0,1 N kyseliny chlorovodíkové (3.1) a následně 10 ml močovinového plnidla (3.4). Bezprostředně potom zchladit zkumavku v ledové vodě a ponechat v ní po dobu třiceti minut. Za podmínek uvedených výše převést obsah zkumavky do titrovací nádoby a titrovat s použitím 0,1 N hydroxidu sodného (3.2) až do hodnoty pH 4,7.

6. **Výpočet**

Aktivita ureázy se vypočítá podle tohoto vzorce:

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

kde:

a = ml 0,1 roztoku hydroxidu sodného sodného spotřebovaného vzorkem

b = ml 0,1 N roztoku hydroxidu sodného spotřebovaného ve slepém testu

E = váha vzorku v gramech

7. **Poznámky**

7.1 Tato metoda je vhodná do hodnoty aktivity ureázy 1 mg N/g/min při teplotě 30 °C. Pro vyšší hodnoty aktivity může být hmotnost vzorku omezena na 50mg.

7.2 Produkty obsahující více než 10 % hrubého tuku musejí být nejdříve za odtučněny.