

- 3.4 Exsikátor s účinným vysoušecím prostředkem.
- 3.5 Analytické váhy.

4. Postup

Do misky (3.1), předem vysušené a zvážené, opatřené teploměrem (3.2) se naváží asi 20 g homogenizovaného vzorku s přesností na 1 mg. Zahřívá se na pískové lázni nebo na topné desce (3.3) za stálého promíchávání teploměrem tak, aby teplota během asi 7 minut dosáhla 90 °C.

Zahřívání se snižuje a sleduje se intenzita tvorby bublinek, které stoupají ode dna misky. Teplota nesmí přesáhnout 105 °C. V důkladném míchání ode dna misky se pokračuje, dokud se nepřestanou tvořit bubliny.

Během zahřívání se vzorek několikrát zahřeje na 103 ± 2 °C a ochladí na 93 °C, aby se zajistilo úplné odstranění vlhkosti. Poté se nechá vychladnout na laboratorní teplotu v exsikátoru (3.4) a zváží se. Tato operace se opakuje, dokud není dosaženo úbytku hmotnosti mezi dvěma následujícími váženími nižšího než 2 mg.

Poznámka: Zvýšení hmotnosti vzorku po opakovaném zahřívání je způsobeno oxidací tuku. V tomto případě se výsledek počítá z vážení provedeného bezprostředně před tím, než se hmotnost začala zvyšovat.

5. Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah vlhkosti (X) jako procento vzorku se vypočte podle následujícího vzorce:

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

kde:

- m = hmotnost zkoušeného vzorku v gramech
m₁ = hmotnost misky s obsahem před ohřevem v gramech
m₂ = hmotnost misky s obsahem po ohřevu v gramech

Výsledky nižší než 0,05 % musí být uváděny jako „nižší než 0,05 %“.

Opakovatelnost

Rozdíl ve vlhkosti mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku nesmí překročit 0,05 % v absolutní hodnotě.

C. STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTEK

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu dusíkatých látek v krmivech na základě stanovení obsahu dusíku metodou podle Kjeldahla.

2. Princip

Vzorek se mineralizuje horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátoru. Kyselý roztok se alkalizuje roztokem hydroxidu sodného. Amoniak se vydestiluje a jímá se do odměřeného množství kyseliny sírové a přebytek se titruje standardním roztokem hydroxidu sodného.

Uvolněný amoniak se případně vydestiluje do přebytku roztoku kyseliny borité a následně se titruje roztokem kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny sírové.

3. Chemikálie

- 3.1 Síran draselný.

- 3.2 Katalyzátory: oxid měďnatý (CuO) nebo síran měďnatý, pentahydrát (CuSO₄ · 5 H₂O).
- 3.3 Granulovaný zinek.
- 3.4 Kyselina sírová, ρ₂₀ = 1,84 g/ml.
- 3.5 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, c(H₂SO₄) = 0,25 mol/l.
- 3.6 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, c(H₂SO₄) = 0,10 mol/l.
- 3.7 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, c(H₂SO₄) = 0,05 mol/l.
- 3.8 Indikátor methylčerveně: 300 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml ethanolu, σ = 95–96 % (v/v).
- 3.9 Roztok hydroxidu sodného (může být použit technicky čistý), β = 40 g/100 ml (m/v: 40 %).
- 3.10 Hydroxid sodný, standardní odměrný roztok, c(NaOH) = 0,25 mol/l.
- 3.11 Hydroxid sodný, standardní odměrný roztok, c(NaOH) = 0,10 mol/l.
- 3.12 Granulovaná pemza, praná v kyselině chlorovodíkové a vysušená.
- 3.13 Acetanilid (bod tání = 114 °C, obsah N = 10,36 %).
- 3.14 Sacharóza (dusíku prostá).
- 3.15 Kyselina boritá (H₃BO₃).
- 3.16 Roztok methylčerveně: 100 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml ethanolu nebo methanolu.
- 3.17 Roztok bromokresolové zeleně: 100 mg bromokresolové zeleně se rozpustí ve 100 ml ethanolu nebo methanolu.
- 3.18 Roztok kyseliny borité (10 g/l až 40 g/l v závislosti na použitém přístroji).

Pokud se použije kolorimetrická detekce bodu ekvivalence, do roztoků kyseliny borité se musí přidat methylčerveně a bromokresol. Pokud se připravuje 1 litr roztoku kyseliny borité, před úpravou objemu se přidá 7 ml roztoku methylčerveně (3.16) a 10 ml roztoku bromokresolové zeleně (3.17).

V závislosti na použité vodě se může pH jednotlivých roztoků kyseliny borité lišit. Často je nezbytná úprava pomocí malého množství zásadité látky, aby se získalo vhodné pH.

Poznámka: Přidání 3–4 ml NaOH (3.11) do 1 litru 10 g/l kyseliny borité obvykle představuje vhodnou úpravu. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě a během skladování musí být chráněn před světlem a zdrojem amoniakových výparů.

- 3.19 Kyselina chlorovodíková, standardní odměrný roztok, c(HCl) = 0,10 mol/l.

Poznámka: Lze použít i jiné koncentrace odměrných roztoků (3.5, 3.6, 3.7, 3.10, 3.11 a 3.19), pokud je tato skutečnost korigována ve výpočtech. koncentrace se vždy vyjadřují s přesností na čtyři desetinná místa.

4. Přístroje a pomůcky

Přístroje vhodné pro provedení mineralizace, destilace a titrace podle Kjeldahlovy metody.

5. Postup

5.1 Mineralizace

Do mineralizační baňky se navází 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 15 g síranu draselného (3.1) a vhodné množství katalyzátoru (3.2) (0,3–0,4 g oxidu měďnatého nebo 0,9–1,2 g pentahydrátu síranu měďnatého, 25 ml kyseliny sírové (3.4) a několik granulí pemzy (3.12) a zamíchá se.

Baňka se zahřívá nejprve mírně a podle potřeby se občas zamíchá, dokud nedojde ke zuhelnatění hmoty a neustane pění; potom se intenzita zahřívání zvyšuje, dokud se kapalina ustáleně nevaří. Zahřívání je odpovídající, pokud vroucí kyselina kondenzuje na stěnách baňky. Nesmí docházet k přehřívání stěn baňky a k ulpívání organických částic na stěnách baňky.

Jakmile se roztok stane čirým a získá světle zelené zbarvení, pokračuje se v ohřevu ještě 2 hodiny a potom se ponechá vychladnout.

5.2 Destilace

Opatrně se přidá tolik vody, aby došlo k úplnému rozpuštění sulfátů. Nechá se vychladnout a potom se přidá několik granulí zinku (3.3), pokud je třeba. Dále se postupuje podle bodu 5.2.1 nebo 5.2.2.

5.2.1 Destilace do kyseliny sírové

Do předlohy destilačního zařízení se odměří přesně 25 ml kyseliny sírové (3.5) nebo (3.7) podle předpokládaného obsahu dusíku. Přidá se několik kapek methylerveně (3.8).

Mineralizační baňka se připojí ke kondenzátoru destilačního přístroje a konec kondenzátoru se ponoří do kapaliny v předloze do hloubky nejméně 1 cm (viz poznámka 8.3). Do mineralizační baňky se zvolna přilije 100 ml hydroxidu sodného (3.9) tak, aby nedošlo ke ztrátám amoniaku (viz poznámka 8.1). Baňka se zahřívá, dokud se nepředestiluje veškerý amoniak.

5.2.2 Destilace do kyseliny borité

V případě manuální titrace amoniakového obsahu destilátu se použije níže popsáný postup. Pokud je destilační jednotka plně automatická a zahrnuje titraci amoniakového obsahu destilátu, dodrží se pokyny výrobce pro provoz destilační jednotky.

Předloha s obsahem 25–30 ml roztoku kyseliny borité (3.18) se umístí pod otvor kondenzátoru tak, že jeho vývod je ponořen pod hladinu přebytku roztoku kyseliny borité. Destilační jednotka se upraví na dávkování 50 ml roztoku hydroxidu sodného (3.9). S destilační jednotkou se pracuje podle pokynů výrobce a oddestiluje se amoniak uvolněný přidáním roztoku hydroxidu sodného. Destilát se jímá do roztoku kyseliny borité. Množství destilátu (doba destilace párou) závisí na množství dusíku ve vzorku. Je třeba dodržet pokyny výrobce.

Poznámka: V poloautomatické destilační jednotce se doplnění přebytku hydroxidu sodného a destilace párou provádí automaticky.

5.3 Titrace

Postupuje se podle bodu 5.3.1 nebo 5.3.2.

5.3.1 Kyselina sírová

Přebytek kyseliny sírové v předloze se titruje roztokem hydroxidu sodného (3.10 nebo 3.11) podle použité koncentrace kyseliny sírové do dosažení bodu ekvivalence.

5.3.2 Kyselina boritá

Obsah předlohy se titruje se standardním odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové (3.19) nebo se standardním odměrným roztokem kyseliny sírové (3.6) s použitím byrety a odečte se množství použitého titračního činidla.

Pokud se použije kolorimetrická detekce bodu ekvivalence, je bodu ekvivalence dosaženo při prvním zbarvení obsahu do růžova. Odečte se objem byretou s přesností na 0,05 ml. Bod ekvivalence bude zřetelnější při použití osvětlené magnetické míchačky nebo fotometrického detektoru.

Lze provést automaticky s použitím parního destilátoru s automatickou titrací.

Je třeba dodržet pokyny výrobce pro provoz konkrétního destilačního přístroje nebo destilačního/titračního přístroje.

Poznámka: Při použití automatického titračního systému začíná titrace ihned po zahájení destilace a použije se 1 % roztok kyseliny borité (3.18).

Při použití plně automatické destilační jednotky lze automatickou titraci amoniaku provést rovněž pomocí detekce bodu ekvivalence s použitím potenciometrického systému pH.

V tomto případě se použije automatický titrační přístroj s pH metrem. pH metr je správně kalibrován v rozsahu pH 4–7 podle běžných laboratorních postupů pro kalibraci pH.

Takto bude pH bodu ekvivalence titrace dosaženo při hodnotě pH 4,6, přičemž se jedná o nejstrmější skok na titrační křivce (inflexní bod).

5.4 Slepá zkouška

Pro potvrzení, že všechny použité chemikálie jsou prosté dusíku, se provede slepá zkouška (mineralizace, destilace a titrace) s 1 g sacharózy (3.14) místo vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

Výpočet se provede podle bodu 6.1 nebo 6.2.

6.1 Výpočet pro titraci podle bodu 5.3.1

Obsah dusíkatých látek vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\frac{(V_0 - V_1) \times c \times 0,014 \times 100 \times 6,25}{m}$$

kde:

V_0 = spotřeba NaOH (3.10 nebo 3.11) na slepou zkoušku v ml

V_1 = spotřeba NaOH (3.10 nebo 3.11) na titraci vzorku v ml

c = koncentrace hydroxidu sodného (3.10 nebo 3.11) v mol/l

m = hmotnost vzorku v g.

6.2 Výpočet pro titraci podle bodu 5.3.2

6.2.1 Titrace kyselinou chlorovodíkovou

Obsah dusíkatých látek vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 1,4 \times 6,25}{m}$$

kde:

m = hmotnost zkoušeného vzorku v g

c = koncentrace standardního odměrného roztoku hydroxidu sodného (3.19) v mol/l

V_0 = spotřeba kyseliny chlorovodíkové na slepou zkoušku v ml

V_1 = spotřeba kyseliny chlorovodíkové na zkušební vzorek v ml.

6.2.2 Titrace kyselinou sírovou

Obsah dusíkatých látek vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,8 \times 6,25}{m}$$

kde:

m = hmotnost zkušební vzorku v g

c = koncentrace standardního odměrného roztoku kyseliny sírové (3.6) v mol/l

V_0 = spotřeba kyseliny sírové (3.6) na slepou zkoušku v ml

V_1 = spotřeba kyseliny sírové (3.6) na zkušební vzorek v ml.

7. Verifikace metody

7.1 Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených u stejného vzorku nesmí překročit:

- 0,2 % v absolutní hodnotě u obsahů dusíkatých látek nižších než 20 %,
- 1,0 % relativně vzhledem k vyšší hodnotě, u obsahů dusíkatých látek od 20 % do 40 %,
- 0,4 % v absolutní hodnotě u obsahů dusíkatých látek vyšších než 40 %.

7.2 Přesnost

Provede se zkouška (mineralizace, destilace a titrace) s 1,5–2,0 g acetanilidu (3.13) a 1 g sacharózy (3.14); spotřeba kyseliny sírové (3.5) na 1 g acetanilidu je 14,80 ml. Výtěžnost musí být nejméně 99 %.

8. Poznámky

- 8.1 Přístroje mohou být manuální, poloautomatické nebo automatické. Pokud zařízení vyžaduje převod mezi mineralizačním a destilačním krokem, musí být tento krok proveden bez ztrát. Pokud k baňce destilačního přístroje není připojena přikapávací nálevka, přilévá se hydroxid sodný opatrně po stěně bezprostředně před připojením baňky ke kondenzátoru.
- 8.2 Pokud mineralizát po zchlazení ztuhne, opakuje se stanovení s větším množstvím kyseliny sírové (3.4), než je uvedeno výše.
- 8.3 U produktů s nízkým obsahem dusíku může být objem kyseliny sírové (3.7) snížen na 10 nebo 15 ml a doplní se vodou na objem 25 ml.
- 8.4 Při rutinní zkoušce lze pro stanovení dusíkatých látek použít alternativní metody, ale referenční metodou je Kjeldahlova metoda uvedená v části C. Ekvivalence výsledků získaných alternativní metodou (např. DUMAS) v porovnání s referenční metodou musí být prokázána samostatně pro každou matici. Jelikož výsledky získané alternativní metodou se mohou i v případě ověření ekvivalence nepatrně odchylovat od výsledků získaných referenční metodou, je zapotřebí uvést v protokolu o zkoušce metodu laboratorního zkoušení použitou pro stanovení dusíkatých látek.

D. STANOVENÍ OBSAHU MOČOVINY

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu močoviny v krmivech.

2. Princip

Vzorek s čerčicím činidlem se rozmíchá ve vodě. Suspenze se přefiltruje. Obsah močoviny ve filtrátu se stanoví po přidání 4-dimethylaminobenzaldehydu (4-DMAB) spektrofotometricky při vlnové délce 420 nm.

3. Chemikálie

- 3.1 Roztok 4-dimethylaminobenzaldehydu: 1,6 g 4-DMAB se rozpustí v 100 ml 96 % ethanolu a přidá se 10 ml kyseliny chlorovodíkové (ρ_{20} 1,19 g/ml). Skladovatelnost tohoto roztoku je nejvýše dva týdny.
- 3.2 Carrezovo činidlo I: 21,9 g dihydrátu octanu zinečnatého $(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve vodě a přidají se 3 ml ledové kyseliny octové. Doplní se vodou na objem 100 ml.
- 3.3 Carrezovo činidlo II: 10,6 g trihydrátu hexakvanoželeznatého tetradraselného $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve vodě. Doplní se vodou na objem 100 ml.
- 3.4 Aktivní uhlí, které neabsorbuje močovinu (musí být ověřeno).