

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).

3.5 Močovina, 0,1% roztok (w/v).

4. **Přístroje a pomůcky**

4.1 Míchací zařízení: frekvence otáčení asi 35–40 otáček/min.

4.2 Zkumavky: 160 mm × 16 mm se zabroušenou zátkou.

4.3 Spektrofotometr.

5. **Postup**

5.1 *Analýza vzorku*

Do 500ml odměrné baňky se naváží 2 g vzorku ± 1 mg a přidá se 1 g aktivního uhlí (3.4). Přidá se 400 ml vody a 5 ml Carrezova činidla I (3.2), míchá se po dobu 30 sekund a přidá se 5 ml Carrezova činidla II (3.3). Míchá se po dobu třiceti minut na míchacím zařízení. Doplní se vodou po značku, promíchá a přefiltruje.

Do zkumavek se zabroušenými skleněnými zátkami se odpipetuje 5 ml čirého, bezbarvého filtrátu, přidá se 5 ml roztoku 4-DMAB (3.1) a promíchá. Zkumavky se vloží do vodní lázně nastavené na teplotu 20 °C (+/- 4 °C). Po patnácti minutách se změří absorbance roztoku na spektrofotometru při vlnové délce 420 nm. Porovná se slepou zkouškou roztoku činidel.

5.2 *Kalibrační křivka*

Do odměrných baněk na 100 ml se napipetuje 1, 2, 4, 5 a 10 ml roztoku močoviny (3.5) a doplní se po značku vodou. Z těchto roztoků se odpipetuje 5 ml, ke každému se přidá 5 ml roztoku 4-DMAB (3.1), homogenizuje se a změří se absorbance, jak je uvedeno výše, a porovná s kontrolním roztokem obsahujícím 5 ml 4-DMAB a 5 ml vody bez močoviny. Sestaví se kalibrační křivka.

6. **Výpočet a vyjádření výsledků**

Stanoví se množství močoviny ve vzorku s použitím kalibrační křivky.

Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

7. **Poznámky**

7.1 V případě, že vzorek obsahuje více než 3 % močoviny, vzorek se redukuje na 1 g nebo se původní roztok zředí tak, aby v něm nebylo více než 50 mg močoviny na 500 ml roztoku.

7.2 V případě nízkého obsahu močoviny se vzorek zvětšuje tak dlouho, až je filtrát čirý a bezbarvý.

7.3 V případě, že vzorek obsahuje jednoduché dusíkaté sloučeniny, jako například aminokyseliny, absorbance se změří při vlnové délce 435 nm.

E. STANOVENÍ OBSAHU TĚKAVÝCH DUSÍKATÝCH BÁZÍ

I. **MIKRODIFUZE**

1. **Účel a rozsah**

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu těkavých dusíkatých látek vyjádřených jako amoniak v krmivech.

2. **Princip**

Vzorek se extrahuje vodou, roztok se vyčerí a přefiltruje. Těkavé dusíkaté báze se po přidání roztoku uhličitanu draselného vytěsní a mikrodifuzí se zachycují v roztoku kyseliny borité a titrují se kyselinou sírovou.