

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 s lepeou 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 vytěsňují a mikrodifuzí se zachycují v roztoku kyseliny borité a titrují se kyselinou sírovou.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina trichloroctová, roztok 20 % (w/v).
- 3.2 Indikátor: 33 mg bromokresolové zeleně a 65 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml 95–96 % (v/v) ethanolu.
- 3.3 Roztok kyseliny borité: v odměrné baňce o objemu 1 l se rozpustí 10 g kyseliny borité v 200 ml 95–96 % (v/v) ethanolu a 700 ml vody. Přidá se 10 ml indikátoru (3.2). Roztok se promíchá a v případě potřeby se přidá roztok hydroxidu sodného, dokud roztok nezíská světle červenou barvu. 1 ml tohoto roztoku může vázat až 300 µg NH₃.
- 3.4 Nasycený roztok uhličitanu draselného: 100 g uhličitanu draselného se rozpustí ve 100 ml vroucí vody. Po ochlazení se roztok filtruje.
- 3.5 Kyselina sírová, 0,01 mol/l.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Míchací zařízení: přibližně 35 až 40 otáček/min.
- 4.2 Skleněné nebo plastové Conwayovy misky (viz vyobrazení).
- 4.3 Mikrobirety s dělením 1/100 ml.

5. Postup

Do 200 ml odměrné baňky se naváží 10 g vzorku s přesností na 1 mg, přidá se 100 ml vody a míchá se 30 minut v míchacím zařízení. Pak se přidá 50 ml kyseliny trichloroctové (3.1), doplní vodou po značku, důkladně se protřepe a přefiltruje přes skládaný filtr.

Na střed Conwayovy misky se napipetuje 1 ml roztoku kyseliny borité (3.3), okolo ní po obvodu misky se napipetuje 1 ml přefiltrovaného vzorku. Miska se částečně zakryje víkem, potřeným tukem, pak se rychle přidá 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu draselného (3.4) na obvod misky a miska se vzduchotěsně uzavře. Aby s jistotou došlo ke smíchání reagenčních činidel, je nutno miskou opatrně otáčet ve vodorovné poloze. Pak se nechá směs stát minimálně 4 hodiny při laboratorní teplotě nebo 1 hodinu při teplotě 40 °C.

Těkavé dusíkaté báze v roztoku kyseliny borité se pak titrují kyselinou sírovou (3.5) pomocí mikrobirety (4.3).

Stejným způsobem se provede slepá zkouška bez zkoušeného vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

1 ml 0,01 mol/l H₂SO₄ odpovídá 0,34 mg amoniaku.

Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku nesmí přesáhnout:

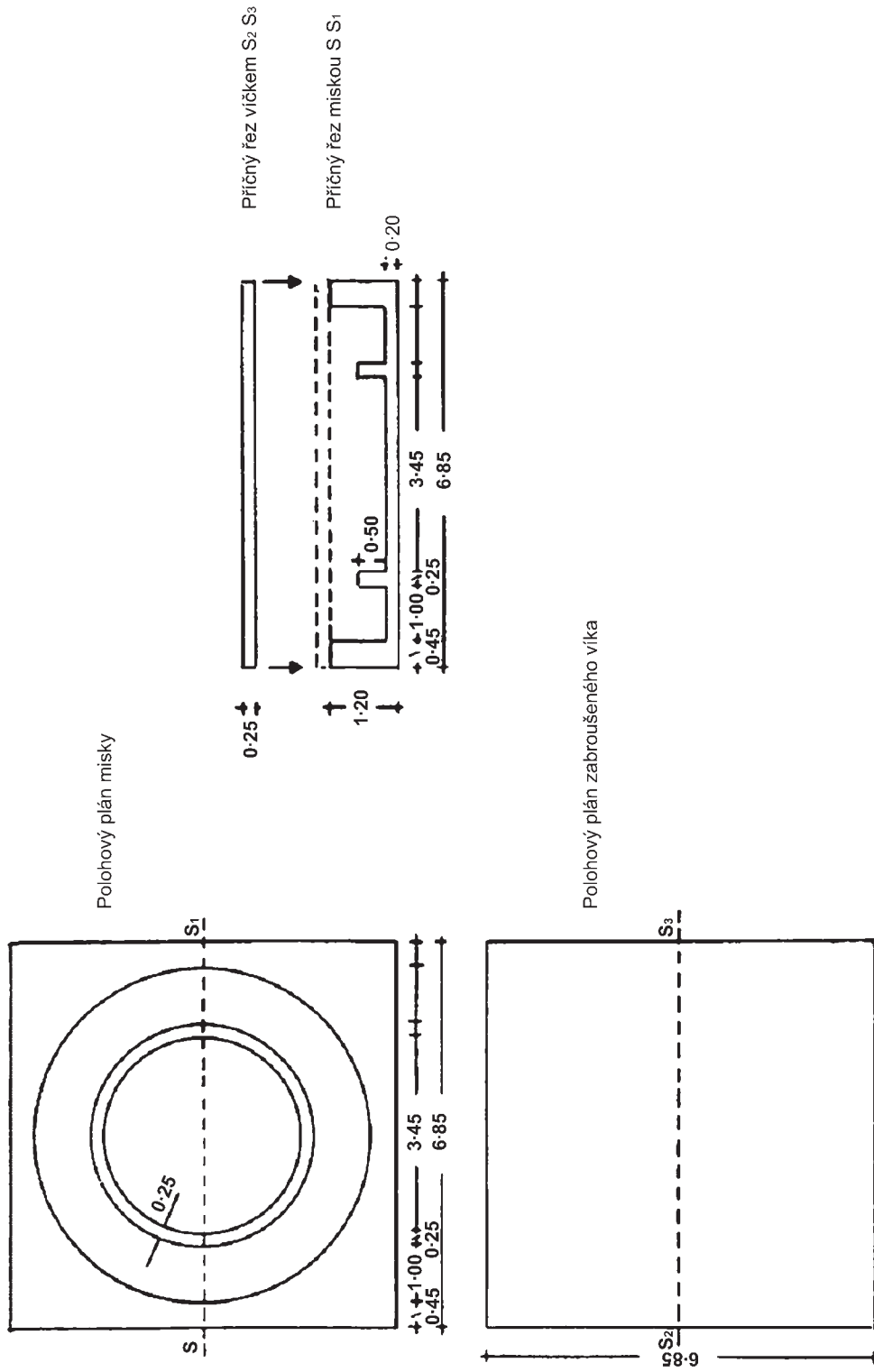
- 10 % relat. u obsahu amoniaku nižšího než 1,0 %,
- 0,1 % absol. u obsahu amoniaku 1,0 % nebo vyššího.

7. Poznámka

Obsahuje-li vzorek více než 0,6 % amoniaku, je nutno původní filtrát zředit.

CONWAYOVA MISKA

Poměr 1/1



II. DESTILACE

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu těkavých dusíkatých bází, vyjádřených jako amoniak, v rybích moučkách, které neobsahují prakticky žádnou močovinu. Metoda je použitelná pouze u obsahu amoniaku nižšího než 0,25 %.

2. Princip

Vzorek se extrahuje vodou, roztok se vyčeří a přefiltruje. Těkavé dusíkaté báze se vytěsňují za varu po přidání oxidu hořečnatého a zachycují se v předepsaném množství kyseliny sírové. Přebytek kyseliny sírové se titruje roztokem hydroxidu sodného.

3. Chemikálie

- 3.1 Kyselina trichloroctová, roztok 20 % (w/v).
- 3.2 Oxid hořečnatý.
- 3.3 Odpěňovací emulze (např. silikonový olej).
- 3.4 Kyselina sírová, 0,05 mol/l.
- 3.5 Roztok hydroxidu sodného, 0,1 mol/l.
- 3.6 Roztok methylčerveně 0,3 % v 95–96 % (v/v) ethanolu.

4. Přístroje a pomůcky

- 4.1 Míchací zařízení: přibližně 35 až 40 otáček/min.
- 4.2 Kjeldahlova destilační aparatura.

5. Postup

Do 200 ml odměrné baňky se naváží 10 g vzorku s přesností na 1 mg, přidá se 100 ml vody a míchá se 30 minut v míchacím zařízení. Pak se přidá 50 ml roztoku kyseliny trichloroctové (3.1), doplní se vodou po značku, důkladně se protřepe a přefiltruje přes skládaný filtr.

Podle předpokládaného obsahu těkavých dusíkatých bází se odpipetuje odpovídající množství čirého filtrátu (obvykle 100 ml), zředí se na 200 ml a přidají se 2 g oxidu hořečnatého (3.2) a několik kapek odpěňovací emulze (3.3). Roztok musí na lakmusový papírek reagovat alkalicky; v opačném případě je nutno ještě přidat oxid hořečnatý (3.2). Dále se postupuje podle bodů 5.2 a 5.3 metody laboratorního zkoušení pro stanovení obsahu dusíkatých látek (část C této přílohy).

Stejným způsobem se provede slepá zkouška, ale bez zkoušeného vzorku.

6. Výpočet a vyjádření výsledků

1 ml 0,05 mol/l H_2SO_4 odpovídá 1,7 mg amoniaku.

Výsledek se vyjádří jako procento vzorku.

Opakovatelnost

Rozdíl mezi výsledky dvou paralelních stanovení provedených na stejném vzorku nesmí překročit hodnotu 10 % amoniaku v relativní hodnotě.

F. STANOVENÍ OBSAHU AMINOKYSELIN (KROMĚ TRYPTOFANU)

1. Účel a rozsah

Tato metoda umožňuje stanovení obsahu volných (syntetických a přírodních) a celkových (peptidy vázané a volné) aminokyselin v krmivech za použití analyzátoru aminokyselin. Metoda je použitelná pro tyto