

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20143.1 - Stanovení obsahu amonného dusíku spektrofotometricky	Vydání Revize	1 0

STANOVENÍ OBSAHU AMONNÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY

1 Účel a rozsah

Metoda je vhodná pro stanovení obsahu amonného dusíku v hnojivech.

2 Princip

Amonný dusík přítomný ve vodném extraktu (výluhu) hnojiva reaguje s chlornanem a salicylanem za vzniku modrého zbarvení (salicylátový analog indofenolu). Intenzita zbarvení se měří fotometricky při 660 nm. Výsledky se vyhodnocují pomocí kalibrační křivky.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Salicylan sodný, $C_7H_5NaO_3$.
- 3 Citronan sodný dihydrát, $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$.
- 4 Vinan sodný dihydrát, $C_4H_4Na_2O_6 \cdot 2H_2O$.
- 5 Nitroprusid sodný dihydrát, $Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$.
- 6 Reakční roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 500 ml vody (1) se rozpustí 34 g salicylanu sodného (2), 25 g citronanu sodného (3), 25 g vianu sodného (4) a 0,12 g nitroprusidu sodného (5). Po dokonalém rozpuštění se baňka doplní vodou (1) po značku a pečlivě zamíchá. Při uchování ve skle, v chladu a temnu je roztok stálý 1 týden.

- 7 Hydroxid sodný, NaOH.
- 8 Chlornan sodný, NaClO, minimální obsah aktivního chloru 5 %.
- 9 Alkalický roztok.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 250 ml vody (1) se rozpustí 30 g hydroxidu sodného (7) a přidá se 10 ml chlornanu sodného (8). Po rozpuštění a ochlazení na teplotu laboratoře se roztok doplní vodou po značku. Při uchování ve skle, v chladu a temnu je roztok stálý 1 týden.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20143.1 - Stanovení obsahu amonného dusíku spektrofotometricky	Vydání	1
		Revize	0

- 10 Sírán amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Suprapur®.
Příprava: Skleněná vysoušečka s asi 10 g síranu amonného se suší v sušárně 2 h při $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$. Poté se uzavře víčkem a umístí do exsikátoru. Po ochlazení je sírán amonný připraven k použití.
- 11 Základní standardní roztok $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $c(\text{N-NH}_4^+) = 1000 \text{ mg/l}$.
Příprava: Do 500ml odměrné baňky se v asi 250 ml vody (1) rozpustí 2,3595 g síranu amonného (10), doplní vodou (1) po značku a promíchá. Při uchování ve skle, v chladu a temnu je roztok stálý 6 měsíců.
- 12 Sírán amonný, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pracovní standardní roztok, $c(\text{N-NH}_4^+) = 50 \text{ mg/l}$.
Příprava: Do 100ml odměrné baňky se pipetuje 5 ml základního standardního roztoku (11), baňka se doplní vodou (1) po značku a roztok se pečlivě promíchá. Při uchování ve skle, v chladu a temnu je roztok stálý 3 týdny.

Poznámky

- Pro přípravu pracovních standardních roztoků je možné využít komerčně dodávaný základní standardní roztok od ověřeného výrobce.*
- Chlornan sodný (8) může být nahrazen běžně dostupným výrobkem SAVO, pokud obsahuje více než 5 % aktivního chloru.*

4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- Třepačka rotační, (30 – 45) ot/min.
- Filtrační papír střední nebo vysoké hustoty s vysokou rychlostí filtrace.
- Odstředivka, 4000 ot/min.
- Spektrofotometr s nastavitelnou vlnovou délkou 660 nm a kyvetou 10 mm.
- Dilutor nebo vhodné dávkovače.
- Sušárna s regulací teploty.

5 Pracovní postup

5.1 Kalibrace

Podle tabulky č. 1 se do 100ml odměrných baněk připraví kalibrační roztoky tak, že se ředí pracovní standardní roztok (12) a obsahy baněk se doplní vodou (1) po značku. Obsahy baněk se pečlivě promíchají. Kalibrační roztoky se připravují vždy čerstvé.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20143.1 - Stanovení obsahu amonného dusíku spektrofotometricky	Vydání Revize	1 0

Tabulka č. 1. Příprava kalibračních roztoků pro měření N-NH_4^+ do 100ml odměrných baněk.

Pořadové číslo roztoku	Pipetovaný objem pracovního standardního roztoku (12) (ml)	Koncentrace kalibračního roztoku $c(\text{N-NH}_4^+)$ (mg/l)
0	0	0
1	0,5	0,25
2	1	0,5
3	2	1,0
5	3	1,5
7	4	2,0
8	5	2,5
9	6	3,0
10	7	3,5

Poznámky

- 3 *K vlastní kalibraci postačí pět připravených kalibračních roztoků podle očekávaného obsahu amonného dusíku.*

5.2 Příprava výluhu vzorku

Do 500ml Stohmanovy baňky se naváží $(2,5 \pm 0,001)$ g vzorku. Ke vzorku v baňce se přidá přesný objem 250 ml vody (1). Baňka se uzavře zátkou a třepe se 60 min v rotační třepačce při $(35 - 45)$ ot/min. Roztok se promíchá a zfiltruje přes suchý filtr střední hustoty do suché nádoby. Filtrát musí být čirý. Prvních 50 ml filtrátu se nepoužije. Slepý pokus se připraví pouze s použitím 250 ml vody (1).

Poznámky

- 4 *Filtraci výluhů lze nahradit odstředěním po dobu 20 min. při 4000 ot/min.*
- 5 *Místo Stohmanovy baňky se může použít 1000ml láhev z inertního PE-HD materiálu.*
- 6 *Zabarvení výluhu se eliminuje vysokým naředěním vzorku před přidávkou reakčního roztoku (6) a alkalického činidla (9).*

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20143.1 - Stanovení obsahu amonného dusíku spektrofotometricky	Vydání Revize	1 0

5.3 Příprava výluhu pro měření

Výluhy připravené podle bodu 5.2 se ředí vodou (1) podle tabulky č. 2.

Tabulka č. 2. Příprava ředění výluhů pro měření N-NH₄⁺.

Deklarovaný obsah N-NH ₄ ⁺ v hnojivu (%)	Objem baňky (ml)	Pipetovaný objem výluhu vzorku (ml)	Použití ředění (×)
Do 0,5	100	5	20
0,5 – 2,5	100	1	100
2,5 – 5,0	200	1	200
Nad 5,0	500	1	500

Do 20ml zkumavek se pipetují 3 ml kalibračních roztoků připravených podle tabulky 1 nebo ředěného výluhu vzorku nebo slepého pokusu připraveného podle bodu 5.2. Přidá se 5 ml reakčního roztoku (6), obsah zkumavky se důkladně promíchá a nechá se 15 min stát. Poté se přidá 5 ml roztoku alkalického roztoku chlornanu sodného (9), opět se důkladně promíchá a nechá se vybarvovat 60 min. Výsledné zabarvení je stálé několik hodin.

5.4 Měření

Po ukončení vybarvovací reakce se přístroj nastaví podle doporučení výrobce. Nulová linie spektrofotometru se nastaví na vodu (1) a změří se absorpance kalibračních roztoků v kyvetě o optické délce 10 mm, při vlnové délce procházejícího světla $\lambda = 660$ nm. Stejným způsobem se měří i hodnota slepého pokusu, připravených vzorků a referenčního materiálu.

Poznámky

- 7 Kalibrační přímka prochází bodem 0.
- 8 Pokud naměřená absorpance vzorku překročí rozsah kalibrační křivky, je nutné původní vzorek vhodně naředit vodou (1) a zopakovat celý proces vybarvení a měření vzorku.
- 9 Při analýze se používají čiré roztoky výluhů vzorků.
- 10 Pokud koncentrace amonného dusíku se slepém pokusu nepřesáhne hodnotu meze stanovitelnosti, může se hodnota slepého pokusu zanedbat.
- 11 Na výsledek analýzy má velký vliv čistota používaného nádobí.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení hnojiv 20143.1 - Stanovení obsahu amonného dusíku spektrofotometricky	Vydání	1
		Revize	0

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah amonného dusíku vyjádřený hmotnostním zlomkem w v procentech se vypočte podle vztahu

$$w = \frac{(c_v - c_s) \times V \times V_1}{m \times a_1 \times 10000}$$

- V celkový objem zásobního roztoku vzorku v ml,
- V_1 objem zředěného roztoku vzorku v ml,
- a_1 objem použitého alikvotního podílu z celkového objemu zásobního roztoku v ml,
- m hmotnost navážky vzorku v g,
- c_v množství N-NH_4^+ ve vzorku, odečtené z kalibrační křivky v mg/l,
- c_s množství N-NH_4^+ ve slepém pokusu, odečtené z kalibrační křivky v mg/l.

7 Literatura

- 1 Forster, J. C.: Soil nitrogen (1995) Assay of anaerobic ammonification.
- 2 Rypl, V., Tůmová, L., Hamplová, L.: Závěrečná zpráva vývojového úkolu č. 20.01/2018 Využití spektrofotometrických metod pro stanovení obsahu amonného a dusičnanového dusíku v hnojivech. ÚKZÚZ Brno, 2020.