

	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50015.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTEK

1 Účel a rozsah

Postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dusíku podle Kjeldahlovy metody a metodu pro výpočet obsahu hrubého proteinu (N látek) v krmivech a ve vzorcích rostlinného materiálu.

Tato metoda nerozlišuje mezi bílkovinným a nebílkovinným dusíkem.

2 Princip

Zkušební vzorek se mineralizuje horkou kyselinou sírovou za přítomnosti katalyzátorů. K ochlazenému mineralizátu se přidá nadbytek hydroxidu sodného k uvolnění amoniaku. Uvolněný amoniak se destiluje vodní parou do přebytku roztoku kyseliny borité a poté se titruje roztokem kyseliny sírové.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Kyselina sírová, 96 % (m/m), $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 3 Tablety Kjeltabs ST (3,5 g K_2SO_4 + 3,5 mg Se), nebo podobné.
- 4 Tablety Kjeltabs CK (3,5 g K_2SO_4 + 0,4 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), nebo podobné.
- 5 Hydroxid sodný, $c(\text{NaOH}) = 400 \text{ g/l}$.

Příprava: 400 g hydroxidu sodného se za stálého chlazení rozpustí v asi 800 ml vody (1). Po vytemperování na laboratorní teplotu se kvantitativně převede do 1000ml baňky a doplní po značku vodou (1).

- 6 Kyselina boritá, H_3BO_3 .
- 7 Ethanol, $\approx 96\%$, denaturovaný.
- 8 Indikátor bromkresolová zeleň, roztok, $c = 1 \text{ g/l}$.

Příprava: 0,1 g bromkresolové zeleně se rozpustí ve 100 ml ethanolu (7).

- 9 Indikátor methylčerveně, roztok $c = 1 \text{ g/l}$.

Příprava: 0,1 g methylčerveně se rozpustí ve 100 ml ethanolu (7).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50015.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek	Revize	1

- 10 Kyselina boritá, $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 1 \text{ \% (m/V)}$, s roztokem indikátoru bromkresolové zeleně a methylčerveně.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží 10 g kyseliny borité (6), rozpustí se v 600 ml horké vody (1), roztok se ochladí, přidá se 10 ml roztoku bromkresolové zeleně (8) a 7 ml roztoku methylčerveně (9). Obsah baňky se doplní vodou (1) po značku a dobře se promíchá.

- 11 Hydrogenuhličitan draselný, KHCO_3 .

- 12 Indikátor methylořanž, roztok, $c = 1 \text{ g/l}$.

Příprava: 0,1 g methylořanže se rozpustí ve 100 ml vody (1).

- 13 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se nalije asi 800 ml vody (1), opatrně se přidá 5,6 ml kyseliny sírové (2). Roztok se promíchá, vytemperuje a doplní vodou (1) po značku.

Stanovení faktoru: Do titrační baňky se s přesností na 0,0001 g naváží přibližně 0,6 g hydrogenuhličitanu draselného (11), přidá se asi 30 ml vody (1) a 2 kapky indikátoru methylořanž (12) a titruje se odměrným roztokem kyseliny sírové (13). Při první změně zbarvení se titrační baňka zakryje hodinovým sklíčkem a vyvaří se uvolněný oxid uhličitý. Poté se baňka rychle zchladí, hodinové sklíčko se opláchne vodou (1) a roztok v baňce se dotitruje.

Faktor odměrného roztoku kyseliny sírové se vypočítá podle vztahu

$$f_{\text{H}_2\text{SO}_4} = \frac{V_{\text{teoret}}}{V}$$

kde V_{teoret} je teoretická spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (13) v ml,

V skutečná celková spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (13) v ml.

Teoretická spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (13) V_{teoret} se vypočítá podle vztahu

$$V_{\text{teoret}} = \frac{A}{B}$$

kde A je navážka hydrogenuhličitanu draselného (11) v g,

B 0,02002 g (ekvivalentní množství hydrogenuhličitanu draselného v g, které odpovídá 1 ml 0,1M kyseliny sírové).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností nejméně 0,0001 g.

- 2 Spalovací zařízení (mineralizační blok).

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50015.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek	Revize	1

- 3 Destilační jednotka, umožňující destilaci vodní parou, automatická.
- 4 Mineralizační tuby, 250 ml.
- 5 Automatická byreta.

5 Postup

5.1 Příprava zkušebního vzorku

Příprava zkušebního vzorku, s ohledem na typ rostlinného materiálu, je podrobně popsána v JPP Úprava vzorků krmiv a rostlinného materiálu, kap. 5.

Poznámky

- 1 Vzorek řepky se neupravuje, navažuje se celé semeno.

5.2 Mineralizace

Do spalovací tuby se naváží 1 g zkušebního vzorku s přesností nejméně na 0,001 g. Přidá se jedna tableta Kjeltabs ST (3) a jedna tableta Kjeltabs CK (4). Dále se ke vzorku přidá 12 ml koncentrované kyseliny sírové (2), zamíchá se a umístí do mineralizačního zařízení. Mineralizuje se dle nastaveného programu, tzn. v první fázi proběhne ohřev na 300 °C, s následnou prodlevou 5 min, v druhé fázi následuje ohřev na 400 °C a výdrž při uvedené teplotě po dobu 70 min. Po ukončení mineralizace se tuba vyjme z mineralizačního zařízení a ponechá se téměř zchladnout. Poté se mineralizát opatrně zředí přídavkem asi 50 ml vody (1), aby se zabránilo zpětnému vykrystalizování solí.

5.3 Destilace a titrace pomocí automatické destilační jednotky

Tuba s mineralizovaným vzorkem se umístí do destilační jednotky a dále se postupuje podle pokynů výrobce daného zařízení. Do tuby se nadávkuje 50 ml roztoku hydroxidu sodného (5). Po alkalizaci vzorku proběhne destilace vodní parou. Uvolněný amoniak se jímá do roztoku kyseliny borité (10), která je automaticky nadávkována do titrační nádoby. Současně s probíhající destilací probíhá titrace. Titrace se provádí standardním odměrným roztokem kyseliny sírové (13).

Slepé stanovení

Souběžně s každou sérií vzorků se provádí slepé stanovení za použití všech používaných chemikálií.

Poznámky

- 2 U vzorků, které mají obsah tuku vyšší než 10 % (m/m) se při mineralizaci dávákuje 15 ml koncentrované kyseliny sírové (2).
- 3 Titraci lze provádět také standardním odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,10 mol/l.
- 4 V případě, že není dostupná automatická destilační jednotka, lze použít samostatné destilační zařízení a titrovat pomocí automatické byrety.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – testování odrůd	Vydání	1
	50015.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek	Revize	1

6 Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Výpočet obsahu dusíku

Obsah dusíku vyjádřený v hmotnostních procentech (%) se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \times c \times 2,801}{m}$$

kde V_1 je spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové při titraci zkušební podílu v ml,

V_0 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové při titraci slepého stanovení v ml,

c přesná koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové v mol/l,

m hmotnost zkušební podílu v g.

6.2 Výpočet obsahu hrubého proteinu

Obsah hrubého proteinu (N látek) vyjádřený v hmotnostních procentech se vypočítá podle vztahu.

$$X_p = X \times f_K$$

kde X je obsah dusíku ve vzorku v % (m/m), vypočítaný podle 6.1,

f_K přepočtový koeficient pro dusík dle Kjeldahla na protein,

$f_K = 6,25$ (obiloviny pro krmení, luskoviny, olejniny, krmiva),

$f_K = 5,7$ (pšenice, žito, triticales).

6.3 Vyjádření výsledků

Jako výsledek se uvádí aritmetický průměr ze dvou paralelních stanovení za předpokladu, že je splněn požadavek na opakovatelnost. Pokud tomu tak není, opakuje se stanovení se dvěma jinými zkušebními podíly. Výsledky se uvádí v % a jsou vyjádřeny na dvě desetinná místa.

7 Literatura

- 1 Jiří Zbíral a kol.: JPP Analýza rostlinného materiálu, ÚKZÚZ, Brno, 2005.
- 2 ČSN ISO 1871: Potraviny a krmiva - Obecné pokyny pro stanovení dusíku metodou podle Kjeldahla, 2010.
- 3 ČSN EN ISO 5983-2: Krmiva – Stanovení obsahu dusíku a výpočet obsahu hrubého proteinu – Část 2: Mineralizace v bloku a metoda destilace vodní parou.