


| | | | |
|---|--|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 1 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Vydání | 1 |
| | | Revize | 0 |

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 do odměřeného množství kyseliny sírové a přebytek kyseliny sírové se titruje standardním roztokem hydroxidu sodného.

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


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- Síran draselný, K_2SO_4 .
- Síran měďnatý, pentahydrát ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$).
- Tablety katalyzátorů Kjeltabs. Např. Kjeltabs ST (3,5 g K_2SO_4 + 3,5 mg Se) a Kjeltabs CK (3,5 g K_2SO_4 + 0,4g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Jedná se o komerčně dodávané tablety katalyzátorů, které jsou vhodné pro automatickou mineralizaci vzorku.
- Směsný katalyzátor.
Příprava: Naváží se 100 g síranu měďnatého (3) a 1000 g síranu draselného (2) a dokonale se zhomogenizuje (lze použít i mixér). Na stanovení obsahu dusíkatých látek v 1 vzorku se použije asi 7 g katalyzátoru.
- Zinek, Zn, granulovaný.
- Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná, 96%, $\rho = 1,84$ g/ml.
- Kyselina sírová, H_2SO_4 , standardní odměrný roztok, $c(H_2SO_4) = 0,25$ mol/l.
Příprava: K 800 ml vody (1) v 1000ml odměrné baňce se přidá 13,9 ml kyseliny sírové (7) a po ochlazení doplní do 1 litru.
- Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, $c(H_2SO_4) = 0,10$ mol/l.
Příprava: K 800 ml vody (1) v 1000ml odměrné baňce se přidá 5,6 ml kyseliny sírové (7) a po ochlazení doplní do 1 litru.
V případě automatického destilačního/titračního zařízení se kyselina sírová 0,1 mol/l připravuje ve větším objemu.

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 2 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Revize | 0 |

- 10 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
Příprava: K 800 ml vody (1) v 1000ml odměrné baňce se přidá 2,8 ml kyseliny sírové (7) a po ochlazení doplní do 1 litru.
- 11 Ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, (95 – 96)%.
- 12 Indikátor methylčerveně.
- 13 Indikátor methylčerveně, $c = 3 \text{ g/l}$.
Příprava: 0,3 g methylčerveně (12) se rozpustí ve 100 ml ethanolu (11).
- 14 Indikátor methylčerveně, $c = 1 \text{ g/l}$.
Příprava: 0,1 g methylčerveně (12) se rozpustí ve 100 ml ethanolu (11).
- 15 Hydroxid sodný, NaOH, min. 98 %.
- 16 Hydroxid sodný, NaOH, $c(\text{NaOH}) \sim 40\%$, roztok pro destilační zařízení.
Příprava: 4000 g hydroxidu sodného (15) se rozpustí v 6000 ml vody (1).
- 17 Hydroxid sodný, NaOH, $c(\text{NaOH}) \sim 30\%$, roztok pro automatické destilační/titrační zařízení.
Příprava: 3000 g hydroxidu sodného (15) se rozpustí v 7000 ml vody (1).
- 18 Hydroxid sodný, NaOH, standardní odměrný roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
Příprava: 10,2 g hydroxidu sodného (15) se rozpustí v 300 ml vody (1) v 1000ml odměrné baňce a doplní do 1 litru.
- 19 Hydroxid sodný, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
Příprava: 4,1 g hydroxidu sodného (15) se rozpustí v 300 ml vody (1) v 1000ml odměrné baňce a doplní do 1 litru.
- 20 Granulovaná pemza, praná v kyselině chlorovodíkové a vysušená.
- 21 Sacharóza, dusíku prostá.
- 22 Indikátor bromkresolová zeleň.
- 23 Indikátor bromkresolová zeleň, $c = 1 \text{ g/l}$.
Příprava: 0,1 g bromkresolové zeleně (22) se rozpustí ve 100 ml ethanolu (11).
- 24 Indikátor: Zuzagovo činidlo.
Příprava: 0,83 g bromkresolové zeleně (22) a 0,17 g methylčerveně (12) se rozpustí v asi 500 ml teplého ethanolu (11) a po vychlazení doplní ethanol (11) do 1 litru.
- 25 Kyselina boritá, H_3BO_3 .
- 26 Kyselina boritá, H_3BO_3 , $c(\text{H}_3\text{BO}_3) = 10 \text{ g/l}$ až 40 g/l v závislosti na použitém přístroji.
Příprava: Navážené množství kyseliny borité (25) se rozpustí za tepla ve vodě (1) a po ochlazení doplní do 1 litru. V případě automatického destilačního/titračního zařízení se kyselina boritá připravuje ve větším objemu.

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 3 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Revize | 0 |

Pokud se použije kolorimetrická detekce bodu ekvivalence, při přípravě 1 litru roztoku kyseliny borité (26) se před úpravou objemu přidá 7 ml roztoku methylčerveně (14) a 10 ml roztoku bromkresolové zeleně (23). 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.

Jako alternativa k indikátorům (12) a (22) může být využit směsný indikátor Tashiro (28).

27 Indikátor methylenová modř.

28 Směsný indikátor Tashiro (0,2% methylčerveně + 0,1% methylová modř).

Příprava: Do kádinky se naváží 0,2 g methylčerveně (12) a 0,1 g methylenové modři (27). Za mírného zahřívání se rozpustí ve 100 ml ethanolu (11) a důkladně se promíchá.

29 Tris-hydroxy-methyl-aminomethan, $C_4H_{11}NO_3$.

30 Síran amonný, $(NH_4)_2SO_4$.

31 Odpěňovací činidlo, např. oktanol, $C_8H_{17}OH$.

32 Acetanilid (obsah N = 10,36 %).

Poznámky

1 *Příklad stanovení faktoru odměrného roztoku H_2SO_4 , $c(H_2SO_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ při využití automatického destilačního/titračního zařízení.*

Do pěti mineralizačních tub se diferenčně naváží (0,20 - 0,26) g síranu amonného (30). Do tuby se následně automaticky dávkuje 30 ml vody (1) a 50 ml NaOH (17). Při destilaci vodní parou se plynný amoniak jímá do předlohy obsahující 30 ml kyseliny borité (26) s indikátory (14 a 22 nebo 28). Předloha se následně automaticky titruje odměrným roztokem kyseliny sírové (9).

Výpočet faktoru H_2SO_4 , $c(H_2SO_4) = 0,1 \text{ mol/l}$.

$$f = \frac{1000 \cdot n}{13,214 \cdot V}$$


V spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (9) v ml,

n navážka $(NH_4)_2SO_4$ (30) v g,

1 ml kyseliny sírové ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) je ekvivalentní 13,214 mg $(NH_4)_2SO_4$.

2 *Příklad stanovení faktoru odměrného roztoku H_2SO_4 , $c(H_2SO_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.*

Do tří titračních baněk o obsahu 250 ml se diferenčně naváží 0,15-0,20 g tris-hydroxy-methyl-aminomethanu (29) a rozpustí se v asi 100 ml vody (1), přidají se 2 až 3 kapky Zuzagova činidla (24) nebo směsného indikátoru Tashiro (28) a za stálého míchání se titruje připraveným odměrným roztokem kyseliny sírové (10).

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 4 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Revize | 0 |

Titrace je ukončena v okamžiku, kdy titrovaný roztok přejde jedinou kapkou z modré do růžové barvy.

Výpočet faktoru H_2SO_4 , $c(H_2SO_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.

$$f = \frac{1000 \cdot n}{12,114 \cdot V}$$

V spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (10) v ml,

N navážka tris-hydroxy-methyl-aminomethanu (29),

1 ml kyseliny sírové ($c = 0,05 \text{ mol/l}$) je ekvivalentní 12,114 mg tris-hydroxy-methyl-aminomethanu

3 *Příklad stanovení faktoru odměrného roztoku NaOH, $c(NaOH) = 0,1 \text{ mol/l}$.*

Do tří titračních baněk o objemu 250 ml se napipetuje 30 ml odměrného roztoku hydroxidu sodného (19), přidají se 1-2 kapky indikátoru Tashiro (28) a titruje se roztokem kyseliny sírové (10). Titrace je ukončena v okamžiku, kdy dojde jedinou kapkou k odbarvení původně do růžova zabarveného titrovaného roztoku.

Výpočet faktoru NaOH, $c(NaOH) = 0,1 \text{ mol/l}$.

$$f = \frac{V \cdot f(H_2SO_4)}{30}$$

V spotřeba roztoku kyseliny sírové (10) v ml,

$f(H_2SO_4)$ je faktor použitého odměrného roztoku kyseliny sírové (10)

4 *Přidání 3 ml až 4 ml NaOH (19) do 1 litru kyseliny borité o koncentraci 10 g/l (26) obvykle představuje vhodnou úpravu. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě a během skladování musí být chráněn před světlem a zdrojem amoniakových výparů.*

5 *Lze použít i jiné koncentrace odměrných roztoků (8), (9), (10), (18) a (19), pokud se tato skutečnost koriguje ve výpočtech. Koncentrace se vždy vyjadřují s přesností na čtyři desetinná místa.*


4 **Přístroje a pomůcky**

- 1 Přístroje vhodné pro provedení mineralizace, destilace a titrace podle Kjeldahlovy metody.
- 2 Analytické váhy s přesností nejméně 0,001 g.

5 **Postup**

5.1 **Mineralizace**

Do mineralizační baňky se naváží 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 15 g síranu

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 5 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Revize | 0 |

draselného (2) a (0,9 – 1,2) g pentahydrátu síranu měďnatého (3), nebo se přidá najednou asi 7 g směsného katalyzátoru (5) a 25 ml kyseliny sírové (7) a několik granulí pemzy (20) 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, až do dosažení bodu varu. 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 je roztok čirý a získá světle zelené zabarvení, pokračuje se v ohřevu ještě 2 h. Po ukončení mineralizace se ponechá vzorek téměř zchladnout. Poté se mineralizát opatrně zředí přídatkem asi (50 – 100) ml vody (1), aby se zabránilo zpětnému vykrystalizování solí.

Jestliže se použije zařízení pro automatickou mineralizaci vzorku, lze využít následující postup:

Do skleněné mineralizační tuby, která se komerčně dodává k danému typu mineralizačního zařízení, se naváží 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se buď jedna tableta katalyzátoru Kjeltabs ST a jedna tableta katalyzátoru Kjeltabs CK (4), nebo 7 g směsného katalyzátoru (5), (10 – 20) ml kyseliny sírové (7). Objem se zvolí tak, aby nedocházelo ke ztuhnutí mineralizátu po zchladnutí a dále se přidá a několik kapek odpěňovacího činidla (31).

Tuby se vloží do studeného mineralizačního zařízení a vzorek se mineralizuje podle optimalizovaného programu:

Příklad mineralizačního programu: Pozvolný nárůst teploty mineralizačního zařízení na 100 °C, udržení teploty po dobu 5 min., nárůst teploty na 200 °C, udržení teploty po dobu 5 min., nárůst teploty na 300 °C, udržení teploty po dobu 5 min., nárůst teploty na 400 °C. Při této teplotě se vzorky 70 min mineralizují. Po ukončení mineralizace se vzorky vyjmou z mineralizačního zařízení a ponechají se téměř zchladnout. Poté se mineralizát opatrně zředí přídatkem asi 50 ml vody (1), aby se zabránilo zpětnému vykrystalizování solí.

Při využití automatického destilačního/titračního zařízení se 30 ml vody (1) dávkuje přístrojem před počátkem destilace.

Poznámky


6 *Pokud mineralizát po zchladnutí ztuhne, opakuje se stanovení s větším množstvím kyseliny sírové (7), než je uvedeno výše.*

5.2 Destilace

Vzorek se nechá vychladnout a potom, pokud je třeba, se přidá několik granulí zinku (6). 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 (8) nebo (10) podle předpokládaného obsahu dusíku. Přidá se několik kapek methylčerveně (13). Mineralizační baňka se připojí ke kondenzátoru destilačního přístroje a konec kondenzátoru se ponoří do kapaliny v předloze do hloubky nejméně 1 cm. Do mineralizační baňky se zvolna přilije 100 ml hydroxidu sodného (16) tak, aby nedošlo ke ztrátám amoniaku. Baňka se zahřívá,

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 6 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Revize | 0 |

dokud se nepředestiluje veškerý amoniak.

5.2.2 Destilace do kyseliny borité

V případě manuální titrace amoniakového obsahu destilátu se použije níže popsany postup. Předloha s obsahem (25 – 30) ml roztoku kyseliny borité (26) s indikátorem (12) a (22) nebo (28) 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 (16). 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.

Při využití automatického destilačního/titračního zařízení se do předlohy automaticky nadávkuje 30 ml kyseliny borité (26) s indikátorem (12) a (22) nebo (28). Do tuby s mineralizátem se nadávkuje 30 ml vody (1) a 50 ml hydroxidu sodného (17). 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.

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 (18) nebo (19) podle použité koncentrace kyseliny sírové do dosažení bodu ekvivalence.

5.3.2 Kyselina boritá

Obsah předlohy se ihned po destilaci titruje standardním odměrným roztokem kyseliny sírové (9) nebo (10) 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.

Při použití automatického destilačního/titračního zařízení se obsah předlohy titruje standardním odměrným roztokem kyseliny sírové (9) automaticky po dokončení destilace párou.

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

5.4 Slepá zkouška

Pro potvrzení, že všechny použité chemikálie jsou prosté dusíku, se provede slepá zkouška (mineralizace, destilace a titrace) bez přítomnosti vzorku nebo s přidavkem 1 g sacharózy (21) místo vzorku.

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 7 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Revize | 0 |

6 Výpočet a vyjádření výsledků

6.1 Výpočet pro titraci podle bodu 5.3.1

Obsah dusíkatých látek vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočítá podle vztahu

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

kde

V_0 je spotřeba NaOH (18 nebo 19) na slepou zkoušku v ml,

V_1 spotřeba NaOH (18 nebo 19) na titraci vzorku v ml,

c koncentrace NaOH (18 nebo 19) v mol/l,

m hmotnost vzorku v g.

6.2 Výpočet pro titraci podle bodu 5.3.2

Obsah dusíkatých látek vyjádřený v procentech hmotnosti se vypočítá podle vztahu

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

kde

m je hmotnost zkušební vzorku v g,


c koncentrace standardního odměrného roztoku H_2SO_4 (9 nebo 10) v mol/l,

V_0 spotřeba H_2SO_4 (9 nebo 10) na slepou zkoušku v ml,

V_1 spotřeba H_2SO_4 (9 nebo 10) na zkušební vzorek v ml.

Poznámky

- 7 *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 příkapávací nálevka, přilévá se hydroxid sodný opatrně po stěně bezprostředně před připojením baňky ke kondenzátoru.*
- 8 *Při využití automatického destilačního/titračního zařízení se postup nastavení a ovládání zpracuje podle doporučení výrobce daného přístroje.*
- 9 *U produktů s nízkým obsahem dusíku se může objem kyseliny sírové (10) snížit na 10 nebo 15 ml a doplní se vodou na objem 25 ml.*

| | | | |
|---|---|--------|---|
|  | Národní referenční laboratoř | Strana | 8 |
| | Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv | Vydání | 1 |
| | 10014.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek | Revize | 0 |

10 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.

11 *Ověření zařízení.*

Provede se zkouška (mineralizace, destilace a titrace) pomocí acetanilidu (32). Navážka acetanilidu (32) se volí v množství odpovídajícím koncentraci použitého roztoku k titraci.

Příklad: při použití kyseliny sírové (10) se naváží asi 0,3 g acetanilidu (32), přidá se 0,7 g sacharózy (21) a použije se stejný postup zkoušky jako u stanovení vzorku. Výtěžnost má být minimálně 99 %.

Výpočet výtěžnosti:

$$NL \% = \frac{1,4007 \times V \times c}{n}$$

V spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (10) v ml,

c koncentrace odměrného roztoku kyseliny sírové (10),

n navážka acetanilidu (32) v g.