

Rýchly postup mineralizácie pri stanovení celkového dusíka Kjeldahlovou metódou

TERÉZIA VACOVÁ — ALEXANDER PRÍBELA

Súhrn: Časovo limitujúcou fázou pri stanovení celkového dusíka Kjeldahlovou metódou je mineralizácia vzoriek. Vychádzajúc z optimálnych podmienok mineralizácie navrhli sa modifikovaný postup mineralizácie v mikroprevode, ktorý využíva koncentrovanú kyselinu sírovú vopred predvarenú so selénovým katalyzátorom. Mineralizačné činidlo možno skladovať dlhší čas. Výhodou navrhovaného postupu je skrátenie času mineralizácie jednej vzorky približne na 30 min. Reprodukateľnosť stanovenia modifikovaným postupom je ± 1 — ± 7 %, chyba metódy je $\pm 0,6$ — $\pm 1,0$ %. Postup znamená aj úsporu chemikálií a energie.

Najrozšírenejšia metóda stanovenia bielkovín je Kjeldahlova metóda vychádzajúca z predpokladu, že dusík vo väčšine organických materiálov pochádza z bielkovín. Je to absolútna metóda, ktorá nevyžaduje nijakú kalibráciu, a súčasne jediná oficiálna metóda, ktorá sa dá univerzálne použiť pre rozličné druhy vzoriek. Kjeldahlov postup mineralizácie nemožno použiť na také formy dusíka, ktoré pri mineralizácii neposkytujú amónnu soľ. Patria sem napr. diazozlúčeniny, dusitaný a dusičnany, ktoré treba vopred redukovať na aminoslúčeniny a až potom na amoniak, prípadne ich možno priamo redukovať na amoniak zahrievaním v prúde vodíka [1, 2].

Od publikovania pôvodného Kjeldahlovho postupu roku 1883 bolo opísaných veľa jeho modifikácií, ktoré smerujú k skráteniu času dvoch hlavných fáz — mineralizácie a vlastného stanovenia amoniaku. Kjeldahlova metóda je však i dnes časovo náročná a pomerne nepríjemná, čo spôsobuje najmä používanie koncentrovanej kyseliny sírovej a jej výpary. Katalyzátory obsahujúce ortuť znečisťujú životné prostredie. Napriek významu sledovania obsahu bielkovín v potravinárskych surovinách a pri riadení kvality potravinárskej výroby sa toto stanovenie často obchádza z uvedených dôvodov. Napokon príčinou sú i rozpaky nad nespoľahlivými výsledka-

Ing. Terézia Vacová, CSc. Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava

Doc. Ing. Alexander Príbel, DrSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Jánska 1, 812 37 Bratislava

mi niektorých analýz, keďže sa často mylne predpokladá, že dlhé trvanie mineralizácie zaručí dobrý výsledok [3].

Prieskum, ktorý urobila roku 1980 Subkomisia pre analytiku bielkovín pri ČSAZ, poukázal na rozličnú úroveň analytiky dusíka v našich potravinárskych a poľnohospodárskych laboratóriách. Spôsob vykonávania analýz závisí najmä od dostupnosti devízových prostriedkov na nákup spaľovacích blokov, ktoré urýchľujú mineralizáciu vzoriek. Viac ako polovica pracovísk v rezorte MPVŽ v ČSSR spaľuje vzorky v Kjeldahlových bankách nad priamym plameňom [4].

Časovo limitujúcou fázou Kjeldahlovho postupu je mineralizácia vzoriek, ktorá trvá 2 až 4 hodiny, niekedy i dlhšie. Platné ČSN uvádzajú čas potrebný na stanovenie bielkovín v mäsových výrobkoch 4 a 6 h a na stanovenie bielkovín v sušených a zahustených mliečnych výrobkoch dokonca 8 h [5, 6].

Spaľovanie možno urýchliť optimalizáciou podmienok:

a) Teplota mineralizácie sa dá regulovať prídavkom solí. Najpoužívanejším je síran draselný, pričom optimálnu rýchlosť spaľovania možno dosiahnuť pri pomere $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{K}_2\text{SO}_4 = 1 : 1$. Za optimálnu teplotu spaľovania sa pokladá rozmedzie 360 až 420 °C, pretože zaručuje i premenu ťažko mineralizovateľných látok, napr. cyklických zlúčenín (kyselina nikotínová, tryptofán) na amoniak.

Predlžovanie varu pri nižšej teplote ako 360 °C zvyšuje koncentráciu solí vplyvom značnej straty kyseliny sírovej. Úbytok kyseliny súčasne spôsobuje stratu dusíka, pretože sa amoniak vplyvom vznikajúceho oxidu sírového a kyslíka oxiduje na plynný dusík.

b) Obsah kyseliny sírovej treba prispôsobiť charakteru vzorky. Na účinnú mineralizáciu 1 g sacharidov treba 7,3 g koncentrovanej H_2SO_4 , 1 g bielkovín 8,1 g H_2SO_4 , 1 g lipidov 17,8 g H_2SO_4 .

c) Prítomnosť katalyzátorov urýchľuje konverziu dusíka na amoniak. Bežne sa používajú meď, selén, ortuť, zriedka titán a zirkón. Za najvhodnejší katalyzátor sa pokladá ortuť, ktorá sa používa vo forme oxidu ortuťnatého.

d) K mineralizovanej zmesi treba pridať oxidačné činidlo, keďže koncentrovaná kyselina sírová je pomerne slabé oxidačné činidlo. Vhodný je peroxid vodíka, ktorý sa má pridať k spaľovacej zmesi pri teplote nižšej ako 160 °C, pretože sa pri tejto teplote rozkladá [4, 7—9].

V zahraničí sa vyrábajú prístroje na stanovenie celkového dusíka v organických materiáloch na princípe Kjeldahlovej metódy. Tieto sa vyznačujú vysokou analytickou kapacitou a dobrou spoľahlivosťou výsledkov, pričom sa v porovnaní s klasickými manuálnymi postupmi šetria náklady na chemikálie, energiu, pracovný priestor a čas a zlepšujú sa podmienky práce v laboratóriách [7]. Dosiahnuté výhody sa však viažu na zvýšené investičné nároky, ktoré sú opodstatnené iba tam, kde je zabezpečená ich využiteľnosť.

V nadväznosti na súčasný stav v analytike dusíka u nás a na obmedzené možnosti nákupu zahraničných prístrojov sme vypracovali modifikáciu Kjeldahlovej metódy

v mikrovýhotovení. Výhodou navrhovaného postupu je značné urýchlenie času analýz oproti doteraz používaným postupom, zníženie spotreby chemikálií a zníženie energetickej náročnosti v prepočte na jednu vzorku. Mineralizácia trvá približne 30 min, nasledujúca destilácia 5 min. Pri súčasnom spaľovaní 6 vzoriek v jednom digestórii to znamená možnosť analýzy približne 6 vzoriek za hodinu. Postup je aplikovateľný na rozličné druhy vzoriek, pričom tieto musia byť dobre zhomogenizované, keďže sa navažujú veľmi malé množstvá.

V porovnaní s uvedenými poznatkami sme v postupe nepoužili prídavok solí z týchto dôvodov: v prítomnosti solí je sťažená manipulácia so vzorkou pri jej odstránení z mineralizačnej banky. Okrem toho nemožno uskladňovať predpripravenú kyselinu sírovú s prídavkom solí a navažovanie tohto prídavku do každej banky zvlášť predlžuje pracovný postup. Ďalšie skrátenie času mineralizácie nie je pri tomto postupe zreteľné.

Modifikovaný postup:

0,05 až 0,1 g jemne zhomogenizovanej vzorky sa dá do 50 ml Kjeldahlovej banky a zaleje sa 2 ml koncentrovanej H_2SO_4 vopred pripravenej s katalyzátorom. (Vzorku možno spláchnuť do banky veľmi malým množstvom destilovanej vody.) Do banky sa pridá sklená guľička a obsah banky sa opatrne krúživým pohybom premieša. Banka sa zakryje malým lievikom alebo sklenou hruštičkou. Spočiatku sa spaľuje opatrne, aby sa zamedzilo peneniu a vykypeniu vzorky. Po stekutení vzorky sa zvýši teplota ohrevu na maximálne možnú mieru. Po 15 min spaľovania sa ohrev odstaví, roztok sa nechá 15 min vychladnúť. Do vychladnutého roztoku sa opatrne po kvapkách pridá 1 ml 30 % H_2O_2 . Ak je roztok číry, bezfarebný, vzorka je zmineralizovaná. V niektorých prípadoch treba vzorku spaľovať ešte asi 2 až 5 min. Roztok po mineralizácii nesmie mať žltkastý nádych, musí byť bezfarebný, prípadne so svetlozeleným nádychom (od selénu).

Príprava H_2SO_4 na mineralizáciu vzoriek: 0,5 g selénu sa zaleje 100 ml koncentrovanej H_2SO_4 , opatrne sa v digestórii pri stálom premiešavaní zahreje do varu a krátko povarí, kým roztok nezmení farbu z tmavohnedej cez zelenú na žltú (približne 10 min varu). Roztok sa zakryje hodinovým sklíčkom a nechá sa vychladnúť. Z vychladnutej kyseliny sa naberá množstvo potrebné na mineralizáciu. Kyselina sírova predvarená so selénom značne urýchľuje mineralizáciu vzoriek a možno ju pripraviť do zásoby a dlhší čas skladovať.

Vzorku z mineralizačnej banky možno:

a) zriediť malým množstvom destilovanej vody a kvantitatívne preniesť do odmernej banky. Banku po starostlivom premiešaní roztoku a vytemperovaní na laboratórnu teplotu doplniť po značku a na destiláciu pipetovať alikvotný podiel vzorky;

b) zriediť malým množstvom destilovanej vody a kvantitatívne preniesť priamo do destilačného prístroja.

Amoniak zo vzorky sa vydestiluje s vodnou parou v alkalickom prostredí

v destilačnej aparátúre podľa Parnasa a Wagnera, zvyčajným postupom. Čas destilácie s koncom chladiča ponoreným v predlohe je 4 min, s odstaveným koncom chladiča ešte 1 min. Ako predlohu možno použiť 2 % roztok kyseliny boritej s Tashiro indikátorom, pričom sa po destilácii priamo stitruje absorbovaný amoniak s 0,01 N H₂SO₄, ktorá musí byť štandardizovaná.

Reprodukovateľnosť metódy overená na vzorkách s rozličným obsahom bielkovín je v tabuľke 1. Pre správnu interpretáciu výsledkov treba stanoviť reprodukovateľnosť pre každý typ analyzovaného materiálu osobitne.

Pri zachovaní uvedeného postupu je limitujúcim faktorom analytickej kapacity počet spaľovacích miest v digestóriu, avšak i pri ich menšom počte je produktivita práce oveľa vyššia ako pri doteraz používaných manuálnych postupoch. Rýchlosť analýz možno porovnať s deklarovanou rýchlosťou zahraničných prístrojov pracujúcich na princípe Kjeldahlovej metódy. Modifikovaná metóda sa preto dá výhodne použiť najmä tam, kde sa vyžadujú rutinné analýzy.

Tabuľka 1. Reprodukovateľnosť stanovení celkového dusíka modifikovaným postupom pre vzorky s rozličným obsahom bielkovín, pri 95 % pravdepodobnosti

Table 1. Reproducibility of total nitrogen determinations by means of the modified process for samples with different content of proteins, with a probability of 95 %

Vzorka	Priemerný obsah bielkovín \bar{x} [%]	Miera reprodukovateľnosti M [%]	Chyba metódy vyjadrená absolútnym množstvom bielkovín [%]
Sušené repné rezky	8,1	± 7	± 0,6
Sušené mlieko	35,1	± 3	± 1,0
Kazeín	76,0	± 1	± 0,8

Literatúra

1. PRÍBELA, A.: Analýza prírodných látok v požívatinách. Bratislava; Alfa 1978.
2. Official Methods of Analysis of the AOAC, 12th ed. Washington 1975.
3. ROSDAHL, A. — MOSSBERG, R.: In Focus, 1980, č. 6, s. 5.
4. Zpráva Subkomise pro analytiku bílkovin při ČSAZ. Prům. potravin, 31, 1980, č. 11, s. 651.
5. ČSN 57 0185: Zkoušení masa, masných výrobků, masných konzerv a hotových jídel v konzervách.
6. ČSN 57 0105: Metody zkoušení mléčných výrobků sušených a zahuštěných.
7. EKLUND, S. — ROSDAHL, A.: In Focus, 1980, č. 6, s. 7.
8. PFLEIDERER, G.: Stickstoffverbindungen — Proteine, Aminosäuren und Amine. In: Handbuch der Lebensmittelchemie II/2. Berlin—Heidelberg—New York, Springer-Verlag 1967.
9. RAUSCHER, K. a spol.: Untersuchung von Lebensmitteln. Leipzig, VEB Fachbuchverlag 1972.

Быстрый процесс минерализации при определении общего азота по методу Кьельдаля

Резюме

Лимитирующей по времени фазой при определении общего азота по методу Кьельдаля является минерализация органических образцов. Исходя из оптимальных условий минерализации, был предложен модифицированный процесс минерализации в микроисполнении, который использует концентрированную серную кислоту, предварительно бланшированную с селеновым катализатором. Минерализационный реактив можно хранить длительное время. Преимуществом метода является сокращение времени минерализации одного образца до 30 минут. Воспроизводимость определения по модифицированному методу составляет $\pm 1 - \pm 7\%$, ошибка методики — $\pm 0,6 - \pm 1,0\%$. Процесс означает и экономию химикатов и энергии.

Quick process of mineralization in determining total nitrogen by the Kjeldahl method

Summary

The mineralization of organic samples in determining total nitrogen by the Kjeldahl method is a time limiting phase. On the basis of optimal mineralization conditions, a modified mineralization process in a microversion has been projected, which utilizes the concentrated sulphuric acid preboiled in advance with selenic catalyst. Mineralization agent can be stored for a longer time. The advantage of process projected is a time shortening of one sample mineralization to 30 min approximately. The determination reproducibility by modified process is ± 1 to $\pm 7\%$; method error is $\pm 0,6$ to $\pm 1,0\%$. This process does also contribute to economization with chemicals and power.