	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10010.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu	Vydání	2
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU DUSÍKATÝCH LÁTEK ROZPUSTNÝCH PŮSOBENÍM PEPSINU

1 Účel a rozsah

Tento postup specifikuje podmínky pro stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové v krmivech.

Postup stanovení je použitelný pro všechny obsahy a všechny druhy krmiv, obsahující tuto složku s výjimkou krmiv s aditivním obsahem močoviny a krmiv minerálních. Metoda nerozlišuje formy proteinového a neproteinového dusíku a má-li být neproteinový dusík vyloučen z výsledku stanovení, musí být jeho obsah stanoven příslušnou metodou samostatně a od stanovení rozpustného dusíku odečten.

I když výsledek tohoto stanovení do jisté míry vyjadřuje míru stravitelnosti krmiva, nemá žádnou přímou spojitost se stravitelností dusíkatých látek "in vivo".


2 Princip

Dusíkaté látky rozpustné působením pepsinu v kyselině chlorovodíkové se stanoví titračně po inkubaci vzorku s pepsinem při 40 °C po dobu 48 h, následně separaci od nerozpustné části a určením obsahu dusíkatých látek v rozpustné části metodou podle Kjeldahla.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok $c(\text{HCl}) = 7 \text{ mol/l}$.
Příprava: 620 ml 35% HCl se rozmíchá ve vodě (16) a doplní se do 1000 ml.
- 2 Kyselina chlorovodíková, HCl, roztok $c(\text{HCl}) = 0,075 \text{ mol/l}$.
Příprava: 6,7 ml 35 % HCl se rozmíchá ve vodě (16) a doplní se do 1000 ml.
- 3 Pepsin s ověřenou aktivitou 100 j./g. Je možné použít pepsin s komerčně ověřenou aktivitou.
- 4 Pepsin, inkubační roztok.
Příprava: 2,00 g pepsinu se rozpustí v 1000 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (2) předem zahřáté na teplotu 40 °C a roztok se promíchá. Roztok se připravuje vždy čerstvý.
Inkubační roztok pepsinu se nesmí zahřívát přímo, aby nedošlo k jeho inaktivaci.
- 5 Diethylether nebo petrolether (frakce 40 až 60 °C).

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10010.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu	Vydání	2
		Revize	0

- 6 Katalyzátory.
Oxid měďnatý CuO nebo síran měďnatý, pentahydrát $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ nebo směsný katalyzátor ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O} + \text{K}_2\text{SO}_4$).
Příprava směsného katalyzátoru: Připraví se dokonalým rozetřením a smícháním obou chemikálií v hmotnostním poměru 1 : 10.
Je možné používat i tablety Cu (0,4g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O} + 3,5 \text{ g K}_2\text{SO}_4$) a tablety Se (3,5mg Se +3,5 g K_2SO_4).
- 7 Indikátory.
Směsný indikátor.
Příprava: 0,2 g methylové červeni a 0,1 g methylenové modři se rozpustí ve 100 ml ethanolu (17) a promíchá.
Methylová červeň.
Příprava: 0,30 g methylové červeni se rozpustí ve 100 ml ethanolu (17) a promíchá.
Zuzagovo činidlo.
Příprava: 0,83 g bromkresolové zeleně a 0,17 g methylčerveně se rozpustí v 1000 ml teplého ethanolu (17), promíchá a po vychladnutí doplní po značku.
- 8 Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 9 Kyselina sírová, H_2SO_4 , roztoky $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$ a $0,05 \text{ mol/l}$.
Příprava $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,1 \text{ mol/l}$: 10,2 g 96% H_2SO_4 se rozmíchá ve vodě (16) a po vychladnutí se doplní do 1000 ml.
Příprava $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$: 5,1 g 96% H_2SO_4 se rozmíchá ve vodě (16) a po vychladnutí se doplní do 1000 ml.
- 10 Hydroxid sodný, NaOH, roztok 400 g/l.
Příprava: 400 g NaOH se rozmíchá ve vodě (16) a po vychladnutí se doplní do 1000 ml.
- 11 Hydroxid sodný, NaOH, roztoky $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$ a $0,1 \text{ mol/l}$.
Příprava $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/l}$: 8 g NaOH se rozmíchá ve vodě (16) a po vychladnutí se doplní do 1 litru.
Příprava $c(\text{NaOH}) = 0,1 \text{ mol/l}$: 4 g NaOH se rozmíchá ve vodě (16) a po vychladnutí se doplní do 1 litru.
- 12 Kyselina boritá, H_3BO_3 , roztok 4%.
Příprava: 40 g H_3BO_3 a 960 ml vody (16) se rozpustí za tepla.
- 13 Síran draselný, K_2SO_4 , pevný.
- 14 Sacharosa.
- 15 Odpěňovací prostředek (např. parafin, octanol nebo silikonový olej).
- 16 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 17 Ethanol 96%.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10010.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu	Vydání	2
		Revize	0

Poznámky

1 *Diethylether a petrolether jsou nebezpečnými hořlavinami I. třídy, proto při jakékoli manipulaci s nimi je nezbytné dodržovat bezpečnostní pravidla.*

2 *Použité chemikálie ani zkušební pomůcky nesmějí obsahovat žádný dusík.*

3 *Faktor kyseliny sírové: $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.*

Příprava: Do tří titračních baněk o obsahu 250 ml se diferenčně odváží 0,15 g až 0,20 g tris-hydroxymethyl-aminomethanu (molekulová hmotnost TRIS $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 = 121,14$), rozpustí se v asi 100 ml vody (16), přidají se 2 až 3 kapky indikátoru (např. Zuzagova činidla (7) a za stálého míchání se titruje připraveným odměrným roztokem kyseliny sírové až do barevné změny (modrá – špinavě červená). Titrace je ukončena, když titrovaný roztok přejde jedinou kapkou na špinavě červenou barvu.

$$\text{faktor} = \frac{1000 \times n}{12,114 \times V}$$

kde

V - spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové (ml),

n - navážka standardu TRIS (g).

4 *K ověření výtěžnosti se používá acetanilid s obsahem dusíku 10,36 %, tj. 64,75 % dusíkatých látek nebo tryptofan s obsahem 13,72 % dusíku, tj. 85,75 % dusíkatých látek.*

4 Přístroje a pomůcky

1 Termostat s automaticky regulovatelnou teplotou 40 °C nebo vodní lázeň stejných parametrů.


2 Laboratorní odstředivka s odstředivým zrychlením do 5000 G, vybavená kyvetami na 250 ml, nejlépe plastovými.

3 Odměrná baňka na 500 ml se širokým hrdlem (podle Stohlmanna) a zátkou, odměrná baňka 250 ml, titrační baňka 250 ml.

4 Mineralizační zařízení vhodné konstrukce.

5 Destilační zařízení vhodné konstrukce.

6 Mineralizační baňky nebo tuby vhodné velikosti (doporučují se baňky podle Kjeldahla 500 ml až 750 ml, tuby 250ml).

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10010.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu	Vydání	2
		Revize	0

5 Postup

5.1 Úprava vzorku

Úprava vzorků se provádí podle ČSN EN ISO 6498 Krmiva - Pokyny pro přípravu vzorku a JPP 60010.1 Postupy úprav zkušebních vzorků jednotlivých druhů krmiv.

5.2 Krmiva s obsahem tuku do 10 %

Odváží se asi 2 g upraveného zkušebního vzorku s přesností 0,001 g do 500ml odměrné baňky a přidá se 450 ml inkubačního roztoku pepsinu (4) předem zahřátého na teplotu 40 °C. Inkubační roztok pepsinu (4) se přidává po částech za průběžného promíchávání a před přidáním posledního přídavku se opět důkladně promíchá, aby se rozrušila aglomerace zkoušeného vzorku. Posledním přídavkem tohoto roztoku se opláchnou stěny baňky, pak se zkontroluje hodnota pH, která má být nejvýše 1,7. V případě potřeby se pH upraví roztokem kyseliny chlorovodíkové (1), což přichází v úvahu zejména u silně alkalických krmiv.

Baňka se uzavře zátkou, vloží do termostatu nebo do vodní lázně (1) vyhřáté na 40 °C a při této teplotě se nechá inkubovat po dobu 48 h, přičemž se přibližně vždy po 6 h, 24 h a 32 h promíchá. Během inkubace musí veškerá hmota zůstat ve styku s roztokem.


Po 48h inkubaci se baňka z termostatu nebo vodní lázně vyjme, přidá se 15 ml kyseliny chlorovodíkové (1), obsah se promíchá, vytemperuje na laboratorní teplotu (omezení působení pepsinu), doplní vodou (16) po značku a promíchá. Potom se filtruje přes suchý středně hustý filtr do suché kádinky, přičemž první podíl filtrátu se nezachycuje. U krmiv, kde by filtrace probíhala pravděpodobně obtížně nebo kde by nebylo možno získat zcela čirý roztok (nerozpustné částice procházející filtrem, např. některé druhy kvasnic), se oddělí nerozpustný podíl postupným odstředěním suspence pomocí laboratorní odstředivky (2). Pro stanovení dusíkatých látek se použije supernatant.

V části filtrátu se mineralizací a následnou destilací stanoví dusíkaté látky.

5.2.1 Mineralizace vzorku

Manuální metoda

Odpipetuje se 100 ml filtrátu do Kjeldahlovy baňky (6), přidá se opatrně 30 ml kyseliny sírové (8) a 14 g směsného katalyzátoru (6), v případě potřeby i odpěňovací prostředek (15). Po promíchání obsahu se baňka vloží do mineralizačního zařízení (4). Baňka se mírně zahřívá tak, aby se zabránilo vzlínání pěny do hrdla baňky a případnému úniku vzorku z baňky. V mírném zahřívání s občasným promícháváním se pokračuje do ustálení varu kapaliny, potom se intenzita zahřívání zvýší. Jakmile se kapalina stane zcela čirou (může být zbarvena barvou katalyzátoru), pokračuje se v ohřevu od tohoto okamžiku ještě 1 hodinu. Potom se kapalina ponechá téměř zchladnout a opatrně se zředí asi 75 ml až 100 ml vody (16). V případě, že po zchladnutí roztok ztuhne, přidá se opatrně větší množství vody (16), částečně se zahřeje a promíchává do rozpuštění tuhého zbytku. Pokud se mineralizát nerozpustí, je nutno stanovení pakovat. Obsah Kjeldahlovy baňky převede do odměrné baňky (3) a doplní vodou (16) na přesně definovaný objem. Stejným způsobem se zpracovává slepý vzorek.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10010.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu	Vydání	2
		Revize	0

Instrumentální metoda

Do mineralizační tuby (6) se odpipetuje 50 ml filtrátu, přidá se 1 tableta Cu katalyzátoru a 1 tableta Se katalyzátoru (6), 12 ml kyseliny sírové (8) a několik kapek odpeňovacího činidla (15). Mineralizační tuba se umístí do studeného mineralizačního bloku (4), který se zahřívá na 300 °C, prodleva 5 min, ohřev na 400 °C, prodleva 70 min. Po ukončení mineralizace se tuby vyjmou z bloku (4), nechají se částečně zchladnout a opatrně se přidá 75 – 100 ml vody (16). Doporučuje se ředit částečně zchladlý mineralizát, aby se zabránilo zpětnému vykrystalizování solí, které se hůře rozpouštějí. Obsah tuby se převede do odměrné baňky (3) a doplní vodou (16) na přesně definovaný objem. Stejným postupem se zpracovává slepý vzorek.

5.2.2 Destilace vzorku

Z odměrné baňky se odpipetuje alikvotní podíl (50 ml) do destilační tuby, která se umístí do destilačního zařízení. K přestupníku destilačního zařízení se umístí předloha tak, aby konec přestupníku zasahoval asi 10 mm pod hladinu roztoku v předloze. Jako předloha se použije titrační baňka vhodného objemu, do které se přidá 25 ml odměrného roztoku kyseliny sírové (9) nebo roztoku kyseliny borité (12) a několik kapek indikátoru (7), není-li v návodu použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Z dávkovacího zařízení se do destilační tuby opatrně přidá vytěšňovací roztok NaOH (10) a její obsah se začne zahřívát přiváděnou vodní párou. Destiluje se asi 5 min až objem v předloze dosáhne asi 150 ml, není-li návodem použitého destilačního zařízení uvedeno jinak. Obsah titrační baňky se titruje ihned po skončení destilace. Pokud to dovolují podmínky instrumentace, doporučuje se titrovat již během destilace odměrným roztokem hydroxidu sodného (11) nebo odměrným roztokem kyseliny sírové (9) do právě vzniklé změny zabarvení roztoku. Při použití kolorimetrické detekce bodu ekvivalence je bodu ekvivalence dosaženo při prvním zbarvení obsahu do růžova. Koncentrace kyseliny sírové použité k titraci se volí podle očekávaného obsahu dusíkatých látek ve zkoušeném vzorku a podle objemu mineralizátu použitého k destilaci.

Destilovat lze i automaticky s použitím parního destilátoru s automatickou titrací, při níž je třeba dodržovat pokyny výrobce pro provoz přístroje.


Jímání destilátu do kyseliny borité je možné jen v případě, že teplota kondenzátu nepřesáhne 25 °C (chlazení). Při obsahu dusíkatých látek vyšším než 40 % se volí poloviční navážka vzorku.

Souběžně se provede slepá zkouška za použití stejného postupu s výjimkou přidání zkoušeného vzorku.

5.3 Krmiva s obsahem tuku nad 10 %

Upravený zkušební vzorek s vyšším obsahem tuku musí být před inkubací alespoň částečně odtučněn.

Odtučnění se provede trojnásobnou dekantací vzorku diethyletherem nebo petroletherem (5) po dávkách 10 ml až 15 ml, přičemž je nutno dbát, aby nedošlo ke ztrátám vzorku. Po posledním odlití rozpouštědla (5) se rozpouštědlo nechá ze vzorku volně odpařit.

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10010.1 – Stanovení obsahu dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu	Vydání	2
		Revize	0

Jiný způsob odtučnění lze provést tak, že zkoušený vzorek se odváží na středně hustý filtr a promývá rozpouštědlem (5) po dávkách, jak výše uvedeno a po odpaření rozpouštědla z filtru se vzorek převede kvantitativně do odměrné baňky.

Dále se postupuje podle 5.2.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah dusíkatých látek rozpustných působením pepsinu v % (X) se vypočítá podle vztahu

1. při jímání destilátu do kyseliny sírové

$$X = \frac{6,25 \times 2,801 \times c \times f \times (V_0 - V_1)}{m}$$

2. při jímání destilátu do kyseliny borité

$$X = \frac{6,25 \times 2,801 \times c \times f \times (V_3 - V_2)}{m}$$

kde

- c koncentrace odměrného roztoku v mol/l,
- f faktor odměrného roztoku,
- V_0 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na slepou zkoušku v ml,
- V_1 spotřeba odměrného roztoku hydroxidu sodného na zkoušený vzorek v ml,
- V_2 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na slepou zkoušku v ml,
- V_3 spotřeba odměrného roztoku kyseliny sírové na zkoušený vzorek v ml,
- m hmotnost alikvotního podílu navážky vzorku v g,
- 6,25 koeficient přepočtu obsahu N na dusíkaté látky,
1 ml přesně 0,1 mol kyseliny sírové odpovídá 2,801 mg dusíku.

7 Literatura

- 1 ČSN 46 7092-35 Metody zkoušení krmiv, Část 5: Stanovení dusíkatých látek rozpustných působením roztoku pepsinu v kyselině chlorovodíkové