 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin	Vydání	2
		Revize	0

STANOVENÍ OBSAHU BÍLKOVIN

1 Účel a rozsah

Tato metoda specifikuje podmínky pro stanovení bílkovin v krmivech. Metoda je použitelná pro všechna krmiva organického původu.

Mez stanovitelnosti metody závisí na matrici vzorku stejně jako na použitém přístroji.

2 Princip

Bílkoviny se postupem podle Barnsteina vysrážejí měďnatou solí a ve sraženině se stanoví dusíkaté látky metodou podle Kjeldahla.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

1 Síran měďnatý, CuSO_4 , roztok 60 g/l.

Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 60 g síranu měďnatého (1) a po rozpuštění se doplní vodou do 1 litru.

2 Hydroxid sodný, NaOH , roztok 12 g/l.

Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 12 g hydroxidu sodného (2) a po rozpuštění a ochlazení se doplní vodou do 1 litru.

3 Chlorid barnatý, BaCl_2 , roztok 10 g/l.

Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 10 g chloridu barnatého (3) a po rozpuštění se doplní vodou do 1 litru.

4 Hexakynoželeznanat tetradraselný $[\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6]$, roztok 1%.

Příprava: Naváží se 10 g hexakynoželeznanatu tetradraselného, rozpustí se asi v 500 ml vody (5) a doplní do 1 litru.

5 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).


6 Kyselina sírová, H_2SO_4 , koncentrovaná, 96%, $\rho(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,84$ g/ml.

7 Síran draselný, K_2SO_4 .


8 Katalyzátory: Oxid měďnatý CuO nebo síran měďnatý, pentahydrát $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.

9 Granulovaný zinek.

10 Ethanol, denaturovaný.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin	Vydání	2
		Revize	0

- 11 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,25 \text{ mol/l}$.
Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 13,9 ml 96% H_2SO_4 (6) a po ochlazení se doplní vodou do 1 litru.
- 12 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,10 \text{ mol/l}$.
Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 5,6 ml 96% H_2SO_4 (6) a po ochlazení se doplní vodou do 1 litru.
- 13 Kyselina sírová, standardní odměrný roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,05 \text{ mol/l}$.
Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 2,8 ml 96% H_2SO_4 (6) a po ochlazení se doplní vodou do 1 litru.
- 14 Indikátor methylčerveň I.
Příprava: 300 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml ethanolu (10).
- 15 Hydroxid sodný NaOH, může být použit technicky čistý, roztok 40%.
Příprava: K asi 500 ml vody (5) se po částech přidá 400 g NaOH a po rozpuštění a ochlazení se doplní vodou do 1 litru.
- 16 Hydroxid sodný, NaOH, standardní odměrný roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol/l}$.
Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 9,999 g NaOH a po rozpuštění a ochlazení se doplní vodou do 1 litru.
- 17 Hydroxid sodný, NaOH, standardní odměrný roztok, $c(\text{NaOH}) = 0,10 \text{ mol/l}$.
Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 3,999 g NaOH a po rozpuštění a ochlazení se doplní vodou do 1 litru.
- 18 Granulovaná pemza, praná v kyselině chlorovodíkové a vysušená.
- 19 Acetanilid, bod tání = 114 °C, obsah N = 10,36 %.
- 20 Sacharóza, dusíku prostá.
- 21 Kyselina boritá, H_3BO_3 .
- 22 Indikátor methylčerveň II.
Příprava: 100 mg methylčerveně se rozpustí ve 100 ml ethanolu (10).
- 23 Indikátor bromkresolová zeleň.
Příprava: 100 mg bromkresolové zeleně se rozpustí ve 100 ml ethanolu (10).
- 24 Roztok kyseliny borité, 10 g/l až 40 g/l v závislosti na použitém přístroji.
Příprava: K asi 700 ml vody (5) se přidá 10 g až 40 g kyseliny borité (21) a po rozpuštění se doplní vodou do 1 litru.
- 25 Směsný indikátor Tashiro (0,2% methylčerveň + 0,1% methylová modř).

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin	Vydání	2
		Revize	0

Příprava: Do kádinky se naváží 0,2 g methylčerveně (14) a 0,1 g methylenové modři (26). Za mírného zahřívání se rozpustí ve 100 ml ethanolu (10) a důkladně se promíchá.

26 Indikátor methylenová modř.

Poznámky

- Pokud se použije kolorimetrická detekce bodu ekvivalence, do roztoků kyseliny borité se musí přidat roztok methylčerveně II (22) a bromokresolové zeleně (23). Pokud se připravuje 1 litr roztoku kyseliny borité, před úpravou objemu se přidá 7 ml roztoku methylčerveně II (22) a 10 ml roztoku bromokresolové 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. Přidání 3 – 4 ml NaOH (17) do 1 litru 10 g/l kyseliny borité obvykle představuje vhodnou úpravu. Roztok se skladuje při laboratorní teplotě a během skladování musí být chráněn před světlem a zdrojem amoniakových výparů.*
- Všechny použité chemikálie musejí být prosté dusíku.*

4 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- Laboratorní odstředivka vhodné konstrukce.
- Lázeň vodní s termostatem.
- Přístroje vhodné pro provedení mineralizace, destilace a titrace podle Kjeldahlovy metody.


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 Izolace bílkovin

Asi 1 g až 2 g zkušebního vzorku se odváží s přesností nejméně na 0,001 g do 400ml kádinky, přidá se 100 ml horké vody (5) a zahřeje k varu. Potom se přidá 25 ml roztoku síranu měďnatého (1), přikryje hodinovým sklíčkem a vaří po dobu 2 min. Po skončení varu se za stálého míchání přidává po částech 25 ml roztoku hydroxidu sodného (2), obsah kádinky se zředí 100 ml horké vody (5), promíchá a po usazení sraženiny se filtruje přes středně hustý filtr, prostý dusíku. Promývá se opět horkou vodou (5) i po převedení sraženiny na filtr, až již další podíl filtrátu nedává reakci na měď (hexakynoželeznan tetradraselný (4)), resp. na sírany (chlorid barnatý (3)). Filtrát se dále nepoužije.

 Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin	Vydání	2
		Revize	0

Poznámky

- 4 *U škrobnatých krmiv a krmiv, kde filtrace probíhá velmi obtížně, se pevný podíl odděluje odstředěním a promývá opět horkou vodou (5) do negativní reakce promývací kapaliny na měď (hexakvanoželeznatan tetradráselný (4)) resp. sírany (chlorid barnatý (3)). Jiným způsobem usnadnění filtrace je 30min zahřívání výluhu na vodní lázni při teplotě 60 °C, namísto vaření po dobu 2 min.*
- 5 *Krmiva, která obsahují slizovité látky, např. len, se 2 min vaří a bílkoviny se vysrážejí 100 ml ethanolu (10). Dále se postupuje, jak je uvedeno dříve.*

Filtr se sraženinou se převede do mineralizační baňky, resp. sraženina se převede pomocí dávky koncentrované kyseliny sírové (6) z centrifugační kyvety do mineralizační baňky při opatrném zředění vodou (5).

5.3 Stanovení dusíku

5.3.1 Mineralizace

Do mineralizační baňky se naváží 1 g vzorku s přesností na 0,001 g. Přidá se 15 g síranu draselného (7), vhodné množství katalyzátoru (8), tj. 0,3 g až 0,4 g oxidu měďnatého nebo 0,9 g až 1,2 g pentahydrátu síranu měďnatého, dále 25 ml kyseliny sírové (10) a několik granulí pemzy (18) 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, dokud se kapalina ustáleně nevaří. 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 se roztok stane čirým a získá světle zelené zbarvení, pokračuje se v ohřívání ještě 2 h a potom se ponechá vychladnout.


5.3.2 Destilace

Opatrně se přidá tolik vody, aby došlo k úplnému rozpuštění sulfátů. Nechá se vychladnout a potom se přidá několik granulí zinku (9), pokud je třeba. Dále se postupuje jako u destilace do kyseliny sírové nebo u destilace do kyseliny borité (viz. níže).

Destilace do kyseliny sírové

Do předlohy destilačního zařízení se odměří přesně 25 ml kyseliny sírové (11) nebo (13) podle předpokládaného obsahu dusíku. Přidá se několik kapek methylerčeně (14).

Mineralizační baňka se připojí ke kondensátoru destilačního přístroje a konec kondensátoru se ponoří do kapaliny v předloze do hloubky nejméně 1 cm. Do mineralizační baňky se zvolna přilije 100 ml hydroxidu sodného (15) tak, aby nedošlo ke ztrátám amoniaku. Baňka se zahřívá, dokud se nepředestiluje veškerý amoniak.

	Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin	Vydání	2
		Revize	0

Poznámky

- 6 *Přístroje na destilaci 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 přikapávací nálevka, přilévá se hydroxid sodný opatrně po stěně bezprostředně před připojením baňky ke kondenzátoru.*
- 7 *U produktů s nízkým obsahem dusíku může být objem kyseliny sírové (13) snížen na 10 ml nebo 15 ml a doplní se vodou na objem 25 ml.*

Destilace do kyseliny borité

V případě manuální titrace amoniakového obsahu destilátu se použije níže popsany postup. Pokud je destilační jednotka plně automatická a zahrnuje titraci amoniakového obsahu destilátu, dodrží se pokyny výrobce pro provoz destilační jednotky.

Předloha s obsahem 25 ml až 30 ml roztoku kyseliny borité (24) 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 (15). 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 dodržovat pokyny výrobce.

Poznámky

- 8 *V poloautomatické destilační jednotce se doplnění přebytku hydroxidu sodného a destilace párou provádí automaticky.*

5.3.3 Titrace


Použije se jeden z uvedených postupů.

Titrace pro destilaci do kyseliny sírové

Přebytek kyseliny sírové v předloze se titruje roztokem hydroxidu sodného (16 nebo 17) podle použité koncentrace kyseliny sírové do dosažení bodu ekvivalence. Jako indikátor se použije methylerveň II (22).

Titrace pro destilaci do kyseliny borité

Obsah předlohy se titruje se standardním odměrným roztokem kyseliny chlorovodíkové (25) nebo se standardním odměrným roztokem kyseliny sírové (12) s použitím byrety a odečte se objem použitého titračního činidla. Jako indikátor se použije methylerveň (14) nebo Tashiro (25).

	Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin	Vydání	2
		Revize	0

Poznámky

- 9 *Pokud se použije kolorimetrická detekce bodu ekvivalence, je bodu ekvivalence dosaženo při prvním zbarvení obsahu do růžova. Objem spotřebovaného činidla se odečte s přesností na 0,05 ml. Bod ekvivalence bude zřetelnější při použití osvětlené magnetické míchačky nebo fotometrického detektoru.*
- 10 *Titrovat lze automaticky za použití parního destilátoru s automatickou titrací. Je třeba dodržet pokyny výrobce pro provoz konkrétního destilačního přístroje nebo destilačního/titračního přístroje.*
- 11 *Při použití automatického titračního systému začíná titrace ihned po zahájení destilace a použije se 1% roztok kyseliny borité (24).*
- 12 *Při použití plně automatické destilační jednotky lze automatickou titraci amoniaku provést rovněž pomocí detekce bodu ekvivalence s použitím potenciometrického systému pH. V tomto případě se použije automatický titrační přístroj s pH metrem. pH metr je správně kalibrován v rozsahu pH (4 – 7) podle běžných laboratorních postupů pro kalibraci pH.*
- Takto bude pH bodu ekvivalence titrace dosaženo při hodnotě pH 4,6, přičemž se jedná o nejstrmější skok na titrační křivce (inflexní bod).*

5.3.4 Slepá zkouška

Pro potvrzení, že všechny použité chemikálie jsou prosté dusíku, se provede slepá zkouška (mineralizace, destilace a titrace) s 1 g sacharózy (20) místo vzorku.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Postupuje se podle bodu 6.1 nebo 6.2.

6.1 Výpočet pro titraci do kyseliny sírové

Obsah bílkovin vyjádřený v procentech (X) se vypočítá podle vztahu

$$X = \frac{6,25 \times 1,4 \times (V_0 - V_1) \times C}{m}$$


kde

V_0 je spotřeba NaOH (16 nebo 17) na slepou zkoušku v ml,

V_1 spotřeba NaOH (16 nebo 17) na titraci vzorku v ml,

C koncentrace hydroxidu sodného (16 nebo 17) v mol/l,

m hmotnost vzorku v g.

	Národní referenční laboratoř	Strana	7
	Jednotné pracovní postupy – zkoušení krmiv 10020.1 – Stanovení obsahu bílkovin	Vydání	2
		Revize	0

6.2 Výpočet pro titraci do kyseliny borité

Obsah bílkovin vyjádřený v procentech (X) se vypočítá podle vztahu

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

kde

V_0 je spotřeba kyseliny sírové (12) na slepou zkoušku v ml,

V_1 spotřeba kyseliny sírové (12) na zkušební vzorek v ml,

m hmotnost zkušební vzorku v g,

C koncentrace standardního odměrného roztoku kyseliny sírové (12) v mol/l.

6.3 Přesnost

Provede se zkouška (mineralizace, destilace a titrace) s 1,5 g až 2,0 g acetanilidu (19) a 1 g sacharózy (20); spotřeba kyseliny sírové (11) na 1 g acetanilidu je 14,80 ml. Výtěžnost musí být nejméně 99 %.

7 Literatura

- 1 ČSN 46 7092-35 Metody zkoušení krmiv, Část 27: Stanovení obsahu bílkovin