

Využití a přezkoušení přístroje Kjel-Foss na stanovení bílkovin

RNDR. KAREL KOSAŘ, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, pracoviště Brno

543.865
863.3.41.543

Pro stanovení množství bílkovin v našich podmínkách je určena a celosvětově uznávána od roku 1883 metoda Kjeldahlova záležející v mineralizaci materiálu a vytěsnění dusíku ve formě NH_3 , který se jímá a stanoví. Tato metoda byla na tehdejší dobu velmi jednoduchá a téměř bez jakýchkoli úprav je používána dodnes. Závadou metody je délka trvání, práce se silnými žíravinami a zdravotně závadné prostředí.

Narůstající export sladu a předeším požadavek téměř všech zákazníků na stanovení bílkovin znamenal enormní nárůst stanovení tohoto kritéria, jak ukazuje tato tabulka:

rok	počet stanovení dusíku
1965	6 000
1969	8 000
1971	12 300
1973	12 700
1975	16 100
1976	18 210

Ve snaze vyhovět podmíinkám rychlosti stanovení snaží se různé firmy metodu nejen zrychlit, ale i automatizovat celé provedení. V současné době existuje řada přístrojů upravených pro stanovení dusíku na principu metody Kjeldahla, např. Kjel-Foss Automatic (Dánsko), Tecator (Švédsko), Autoanalyser (USA). Na základě zkoušek a možnosti nákupu zvolili jsme přístroj Kjel-Foss, který byl zakoupen v roce 1976.

Popis přístroje

Kjel-Foss Automatic byl vyvinut pro automatické rychlostanovení obsahu dusíkatých látek podle Kjeldahlovy metody. Způsob práce odpovídá konvenčním předpisům této klasické metody. Použití speciální techniky k rychlejšímu provedení jednotlivých procesů zkracuje dobu stanovení na 15 minut. Na zařízení mohou být analyzovány všechny vzorky, které lze stanovit metodou Kjeldahlova. Přístroj Kjel-Foss má stejně jako Kjeldahlova metodu tyto pracovní cykly: mineralizace, ředění, neutralizace, destilace a titrace. Hlavní částí přístroje je

šest speciálních Kjeldahlových baňek rozmístěných v kruhu. Celý systém se otočí každé tři minuty o 60° ve směru hodinových ručiček.

V první poloze jsou přidány do baňky tři tablety katalyzátoru (síran draselný + kysličník rtuťnatý) speciální lžíčkou. Když časový spínač oznámi zvukovým signálem konec tříminutového intervalu, přidá se dávkovačem koncentrovaná kyselina sírová a peroxid vodíku. Potom se do baňky vloží vzorek, který je navážený a zabaleny do speciálního papíru s minimálním obsahem dusíkatých látek. Všechna baňky se ručně uzavře a od té doby vše pokračuje automaticky. Ve druhé a třetí poloze probíhá mineralizace vzorku. Ve třetí poloze se dosahuje velmi vysokých teplot (400°C), aby se zajistilo, že i těžce rozložitelné látky budou mineralizovány dokonale. Dosážená teplota závisí na poměru mezi síranem draselným a množstvím kyseliny sírové, která se přidává podle váhy vzorku a obsahu tuku. Po ukončení mineralizace přichází baňka do čtvrté polohy. Zde se ochlazuje vysokootáčkovým ventilátorem. Před otočením do páté polohy se otevře víčko a automaticky se přidá voda. V poloze páté se kyselina sírová neutralizuje hydroxidem sodným a rtuťová složka katalyzátoru se váže thiosíranem sodným. Po skončení neutralizace začíná destilace. Pára vyrobená parním generátorem vytěsnuje čpavek, který kondenzuje s vodou při průchodu chladičem a jímá se do titrační baňky, do které je dávkován indikátor podle Tashira, který změnou barvy určuje konec titrace. Titruje se kyselinou sírovou, která je přidávána motoricky regulovanou pipetou. Motor je kontrolován fotobuňkou umístěnou pod titrační nádobkou. Hřídel motoru pipety je napojen na potenciometr, jehož výkon je v poměru k obsahu dusíku ve vzorku. Tato hodnota se výčíslí a výsledek je uveden na digitálním výstupu. V poloze šesté se baňka vyprázdní do odpadní nádrže. Sírník rtuťnatý je odstraňován jako sediment. Po vyprázdnění se baňka opět otočí do polohy číslo jedna, kde je přidán další vzorek.

Výsledek na digitálním výstupu udává buď procenta dusíku, nebo procenta bílkovin podle toho, jak se nastaví přepínač na čelním panelu (obr. 1). Kalibrace se pro-



Obr. 1. Přístroj na stanovení bílkovin Kjel-Foss Automatic

vádí na dvě různé koncentrace síranu amonného dvěma kalibračními šrouby, jimiž se upraví výsledek na digitálním výstupu. Správnost výsledku se kontroluje i zkouškou s acetanilidem.

V našich podmínkách pracujeme s navázkou 1 000 mg rozemletého sladu nebo ječmene, což odpovídá tradiční Kjeldahlově metodě.

Pro stanovení rozpustného dusíku ve sladěném se u Kjeldahlové metody odebírá 20 ml sladiny. Při analýze na přístroji Kjel-Foss jsme po vyzkoušení stanovili 10 ml sladiny. Větší množství je nevhodné, protože první mineralizaci provází pěnění a částečný únik do bočního raménka baňky, které ústí do centrální nádrže s vodou. Maximální hodinový výkon je 20 vzorků. Pro obsluhu stačí jeden pracovník, ale pro plynulost provozu je vhodné, jestliže další pracovník navažuje vzorky a připravuje potřebné roztoky. Po skončení práce je nutné očistit vně i uvnitř všechny baňky, veškeré oplechování přístroje a doplnit roztoky. Firma předepisuje týdenní údržbu — výměnu vody v centrální nádrži, pročištění všech filtračních vložek apod.

Technické údaje	Spotřeba materiálu na jeden rozbor
rozměry: 1300 mm × 780 mm × 1115 mm	H ₂ O ₂ 36 % 10 ml
hmotnost: 170 kg	H ₂ SO ₄ 96 % 13—15 ml
napětí: 220 V ± 10 %	NaOH 20 g
výkon: 300 VA průměrně	Na ₂ S ₂ O ₈ 4 g
přívod vody — tlak: 0,25 MPa	K ₂ SO ₄ 15 g
spotřeba vody: 4 l/min	HgO 0,75 g
přívod plynu: 2 láhve 10 kg	indikační roztok 50 ml
rozsah měření: 0,15 %—15 % N	deionizovaná voda 110 ml
0,05 %—7 % N	(navážka 500 mg)
	(navážka 1 000 mg)

Ověření přístroje Kjel-Foss

Pro ověření přesnosti stanovení na přístroji Kjel-Foss jsme analyzovali 20 vzorků ječmene, sladu a sladiny metodou Kjeldahlovou klasickou a na přístroji Kjel-Foss. Pro hodnocení bylo použito t-testu pro závislé výběry. U rozpustného dusíku a sladu vychází rozdílnost od Kjeldahla vysoce průkazná, u ječmene průkazná. Posunutí Gausovy křivky do oblasti + je celkem pochopitelné, protože celý proces stanovení probíhá v uzavřeném systému a ztráty na obsahu dusíku oproti Kjeldahlově metodě jsou minimální. Matematické zhodnocení metody pro bílkoviny v ječmenu, sladu a sladině jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tabulka 1. t-test pro závislé výběry

		\bar{x}_1	\bar{x}_2	\bar{d}	$\bar{d} \%$	$s\bar{d}$	t	N
rozpusný N	K + F	71,445	75,500	4,055	5,68	0,755	5,371	20
slad Kjeldahl:	K + F	11,055	11,215	0,160	1,45	0,047	3,411	20
ječmen Kjeldahl	K + F	12,080	12,205	0,125	1,03	0,048	2,606	20

Tabulka 2. Souhrnné charakteristiky

	Metoda	N	\bar{x}	Variační koef. 95 % 99 %	Sx	$S\bar{x}$	VK
rozpusný N	Kjeldahl	20	71,445	67,650—75,240 66,262—76,628	8,107	1,813	11,347
	K + F	20	75,500	71,518—79,482 70,061—80,939	8,507	1,902	11,267
slady	Kjeldahl	20	11,055	10,209—11,901 9,900—12,210	1,807	0,404	16,341
	K + F	20	11,215	10,350—12,080 10,033—12,397	1,849	0,413	16,487
ječmeny	Kjeldahl	20	12,080	11,498—12,662 11,286—12,874	1,242	0,278	10,285
	K + F	20	12,205	11,659—12,751 11,096—13,308	1,167	0,260	9,560

Pro ověření reproducovatelnosti byly vybrány ječmeny, slad a sladina, u kterých byly stanoveny 10krát bílkoviny na přístroji Kjel-Foss a metodou Kjeldahlovou. Obsah bílkovin kolísal v ječmenech v rozsahu 10 až 15 %, ve sladech 9 až 12 %, ve sladinách 63 až 76 mgN/100 ml. Stanovení reproducovatelnosti u metody Kjel-Foss a metody Kjeldahlové:

průměrné směrodatné odchyly

Kjel-Foss	Kjeldahl
ječmen 0,064	0,229
slad 0,066	0,198
sladina 0,810	2,106

Vypočtené směrodatné odchyly jednotlivých stanovení u reproducovatelnosti jasné ukazují zvýšenou reproducovatelnost při stanovení bílkovin na přístroji Kjel-Foss proti metodě Kjeldahlové. Přesnost stanovení je asi 3krát vyšší a tím se chybou stanovení podstatně snižuje. Souhrn výsledků dává jednoznačný kladný závěr pro využití metody Kjel-Foss ve sladařských laboratořích.

Zhodnocení metody stanovení bílkovin na přístroji Kjel-Foss

Stanovení dusíkatých látek metodou Kjeldahlovou je zatíženo jistou nepřesností, vzniklou děleným postupem provedení, tj. navažování, spalování, přelevání zmineralizované látky do destilační baňky, přesnost dávkování H₂SO₄ do předlohy, destilace a titrace jsou zdrojem chyb, které ovlivňují stanovení. Při velkém počtu vzorků a kapacitním přetížení dusíkárny se stává, že se opakuje kolem 10 % vzorků. Přístroj Kjel-Foss téměř zaručuje při správné navážce, přesné kalibraci přístroje a dodržení čistoty roztoků bezchybnost analýz. Přístroj rovněž plně odpovídá hygienickým požadavkům, tekutiny jsou neutralizovány a silně ředěny vodou a lze je vypouštět přímo do kanalizace. Použití propan-butánu umožňuje instalaci v laboratořích, které nemají možnost používat zemního plynu. Pro 100 stanovení bílkovin metodou Kjeldahlovou bylo zapotřebí tří laborantek a jedné myčky skla při

osmihodinové pracovní době. Pro 100 stanovení bílkovin na přístroji Kjel-Foss je potřeba dvou laborantek.

Nevýhodou přístroje je vysoká cena a složitá údržba. Všechny náhradní díly, navažovací papírky a katalyzátor se musí dovážet z devizové oblasti. Největší nevýhodou je zatím těžko dosažitelný servis. V našem ústavu pracuje přístroj od června roku 1976. Všechny poruchy, které se zatím na přístroji objevily, byly provozního charakteru (prasklé baňky, porušené těsnění, zanešené magnetické ventily apod.). Doba potřebná pro zjištění příčiny začlenění chodu přístroje a pro následující opravu závisí jen na praxi obsluhy.

V druhém pololetí roku 1976 jsme stanovovali dusíkaté látky výhradně na tomto přístroji. Bylo provedeno přibližně 9 000 analýz. Přes všechny uvedené nevýhody je konečný přínos tohoto přístroje pro náš ústav nesmírně veliký a můžeme jej doporučit všem laboratořím, ve kterých se provádí větší množství analýz obsahu dusíkatých láttek.

Literatura

- [1] Prospektová literatura A/S N. Foss Electric, Dánsko 1974.
[2] NENTWICHOVÁ M., DOLEZALOVÁ A.: Zavedení nových metod pro kontrolu výroby sladu, VÚ 7b/1976, VÚPS-Praha

Kosař, K.: Využití a přezkoušení přístroje Kjel-Foss na stanovení bílkovin. Kvas. prům. 23, 1977, č. 8, s. 169—171.

V roce 1976 náš ústav zakoupil přístroj Kjel-Foss pro stanovení dusíkatých láttek. Přístroj pracuje zcela automaticky při plném zachování principu Kjeldahlových metod (mineralizace, ředění, neutralizace, destilace a titrace). Hlavní částí přístroje je šest speciálních Kjeldahlových baněk rozmístěných v kruhu, který se otočí každé tři minuty ve směru hodinových ručiček. Od vložení vzorku po obdržení výsledku uplyne doba 15 minut, maximální hodinový výkon je 20 vzorků. Zárukou přesnosti analýzy je kalibrace přístroje na chemikálie se známým obsahem dusíku. Stanovení obsahu dusíkatých láttek na přístroji Kjel-Foss je přesnější než tradiční Kjeldahlova metoda. Nevýhodou přístroje je vysoká cena a složitá údržba, výhodou je rychlosť stanovení, jednoduchá obsluha a snížená spotřeba chemikálií.

Косарж, К.: Прибор КЬЕЛ-ФОСС для определения белковых веществ, его свойства и преимущества Квас. прум. 23, 1977, № 8, стр. 169—171

В 1976 г. Научно-исследовательский институт пивоваренно-солодильной промышленности в Брно приобрел прибор КЬЕЛ-ФОСС для определения азотистых веществ. Прибор работает вполне автоматически на принципе методы Кельдаля с такой же последовательностью операций (минерализация, растворение, нейтрализация, дистилляция, титрация). Главная часть прибора состоит из шести специальных колб Кельдаля, прикрепленных к круглому столу, врачающемуся в направлении часовой стрелки. Через каждые 3 минуты стол поворачивается на 1/5 оборота. Анализ занимает 15 минут. За час можно сделать 20 анализов. Предпосылкой точности определения является калибровка по химикатам с точно известным содержанием азота. Опреде-

ление азотистых веществ с помощью прибора КЬЕЛ-ФОСС дает более точные результаты чем традиционный метод Кельдаля. Широкое применение прибора ограничивает высокая цена. Определенной невыгодой является также довольно сложный уход. Из преимуществ следует отметить скорость анализа, простоту манипуляции и снижение расхода химикатов.

Kosař, K.: KJEL-FOOS — an Instrument for the Determination of Proteins, Its Properties, Accuracy and Advantages. Kvas. prům., Vol. 23, 1977, No. 8, pp. 169—171.

In 1976 Research Institute of Brewing and Malting Industries in Brno purchased a new instrument, known as KJEL-FOSS, for the determination of nitrogenous substances. The instrument operates quite automatically the sequence of operations being the same as that of the Kjeldahl method (mineralization, dilution, neutralization, distillation and titration). The principal part of the instrument consists of six special Kjeldahl flasks attached to a rotating table making 1/5 of revolution every 3 minutes. The results of analysis are known in 15 minutes after putting a sample in-to the instrument. Its maximum capacity is 20 samples per hour. To obtain reliable data it is necessary to calibrate the instrument using chemicals with known content of nitrogen. Determination of the content of nitrogenous substances by means of a KJEL-FOSS instrument gives more accurate results than the traditional Kjeldahl method, but the instrument is expensive and its maintenance is rather exacting. On the other hand one must underline its advantages: minimum consumption of chemicals, simple analyzing technique and saving of time.

Kosař, K.: Anwendung und Erprobung des Kjel-Foss-Apparates zur Eiweißbestimmung. Kvas. prům. 23, 1977, No. 8, s. 169—171.

Seit dem Jahr 1976 steht dem Forschungsinstitut für Brauerei und Mälzerei, Zweigstelle Brünn, der Kjel-Foss-Apparat zur Bestimmung der stickstoffhaltigen Substanzen zur Verfügung. Der Apparat arbeitet vollautomatisch bei vollkommener Einhaltung des Prinzips der Kjeldahl-Methode (Mineralisierung, Verdünnung, Neutralisierung, Destillation und Titration). Den Hauptteil des Apparates bilden sechs spezielle Kjeldahl-Kolben, in einem Kreis geordnet, der jede 3 Minuten eine Umdrehung in der Richtung des Uhrzeigers vollbringt. Die Analysendauer von der Einlegung der Probe zur Erzielung des Ergebnisses beträgt 15 Minuten, die maximale Stundenleistung des Apparates 20 Proben. Die Genauigkeit der Analyse wird durch die Kalibrierung des Apparates auf Chemikalien mit einem bekannten Stickstoffgehalt gesichert. Die Bestimmung des Gehaltes der stickstoffhaltigen Substanzen auf dem Kjel-Foss-Apparat ist genauer als bei der ursprünglichen Kjeldahl-Methode. Zu den Nachteilen des Apparates gehören der hohe Beschaffungspreis und die komplizierte Wartung, zu den Vorteilen die schnelle Bestimmung, die einfache Bedienung und der niedrigere Chemikalienverbrauch.