

## Metóda GS6-5 (2007)

## Stanovenie $\alpha$ -amino dusíka v cukrovej repe medňatou metódou („Modré číslo“)

- po čerení základným octanom olovnatým – oficiálna metóda (1)
- po čerení síranom hlinitým – oficiálna metóda (2)

### 1 Predmet

Táto metóda, založená na metóde STAŇKA A PAVLASA (3, 4) a modifikovaná KUBADINOVOM A WIENINGEROM (5), sa používa na stanovenie  $\alpha$ -amino dusíka v kaši z cukrovej repy.

### 2 Oblasť použitia

Metóda je použiteľná pre filtráty octanu olovnatého a síranu hlinitého.

Čerenie síranom hlinitým je možné, ak sa používa na meranie absorbcie dvojlúčový fotometer (6). Základná farba roztoku vzorky čerenej síranom hlinitým sa kompenzuje meraním korešpondujúcej absorpcie v referenčnej kvete dvojlúčového fotometra. Táto modifikácia čeriackej techniky by sa mala vo všeobecnosti preferovať kvôli životnému prostrediu a zdravotným dôvodom.

### 3 Definície

**$\alpha$ -amino dusík.** Táto metóda je vhodná na stanovenie obsahu dusíka v  $\alpha$ -pozícii vo voľných aminokyselinách. Dusík v inej pozícii sa nestanoví.

### 4 Princíp metódy

Roztok dusičnanu medňatého a tlmivého roztoku octanu sodného pri pH 6,0 vytvára modrý komplex s  $\alpha$ -amino dusíkom. Absorbancia meraná pri 610 nm je úmerná obsahu  $\alpha$ -amino dusíka.

### 5 Chemikálie a materiál

UPOZORNENIE A BEZPEČNOSTNÉ OPATRENIA: POUŽÍVATELIA TEJTO METÓDY BY SA PRED PRÁCOU S TÝMITO ČINIDLAMI MALI OBOZNÁMIŤ S NÁRODNOU LEGISLATÍVOU TÝKAJÚCOU SA ZDRAVIA A BEZPEČNOSTI PRI PRÁCI. POUŽÍVAJTE LEN DEIONIZOVANÚ VODU ALEBO VODU PODOBNEJ ČISTOTY.

**5.1 Základný octan olovnatý** – zodpovedajúci ICUMSA špecifikácii v prílohe 1 Metódy GS6-1 a so zrnitosťou pod 0,42 mm.

**5.2 Roztok základného octanu olovnatého.** Rozpusťte 560 g základného octanu olovnatého v približne 1 l destilovanej vody.

Varte asi 30 minút a nechajte usadiť. Dekantujte tekutý supernatant a zriedte ho na hustotu 1,24 alebo 24,4 g.100ml<sup>-1</sup> PbO celkového obsahu olova s čerstvo prevarenou destilovanou vodou. Skontrolujte obsah celkového olova presným meraním hustoty alebo stanovením celkového olova titračne, ako je popísané v Metóde GS1/2/3-1, Príloha 2. Špecifikácia pre celkové olovo požaduje hustotu,  $\rho_{20}$ , 1,24  $\pm$  0,01 g.ml<sup>-1</sup> alebo obsah celkového olova 24,4  $\pm$  1,0 g.100ml<sup>-1</sup> PbO. Obsah základného olova má byť medzi 9,5 a 10,5 g.100ml<sup>-1</sup> PbO. Ak je množstvo základného olova mimo tohto rozsahu, upravte činidlo pridaním ľadovej kyseliny octovej. Po úprave znovu prevarte obsah celkového olova aj základného olova.

Roztok uchovávajte v nádobe uzavretej vzduchotesným uzáverom, aby sa predišlo kontaktu s oxidom uhličitým zo vzduchu. Pred uzavretím nádobu naplňte plynným dusíkom.

**5.3 Zriedený roztok základného octanu olovnatého.** Zriedte 45 ml (alebo 25 ml v závislosti od kvality repy) roztoku základného octanu olovnatého na 1 000 ml s prevarenou deionizovanou vodou alebo destilovanou vodou.

**5.4 Síran hlinitý** – Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>.18 H<sub>2</sub>O, stupeň čistoty pre analýzu.

**5.5 Roztok síranu hlinitého (7)** – hustota  $\rho_{20} \approx 0,9987$  g.ml<sup>-1</sup>. Rozpusťte 3,0 g síranu hlinitého (5.4) v 1 000ml deionizovanej vody, používajúc odmerný valec.

**5.6 Lesklý papier** – strojovo leštený papier, plošná hmotnosť 30 g.cm<sup>-2</sup>, veľkosť približne 120 mm  $\times$  120 mm. Papier musí byť schopný počas váženia zachytiť všetku kašu (vrátane šťavy).

**5.7 Filtračný papier, kremelina.** Filtračný papier s vysokou filtračnou rýchlosťou, priemer 180 mm, stredná veľkosť pórov približne 3  $\mu$ m. Papier sa nesmie pretrhnúť pri odstraňovaní po filtrácii.

**5.8 Medňaté činidlo.** Trihydrát dusičnanu medňatého (10 g) a trihydrát octanu sodného (375 g) úplne rozpusťte v destilovanej vode v 1 000ml odmernej banke. Po doplnení po značku a premiešaní, ak je to potrebné, prefiltrujte roztok cez 0,45  $\mu$ m membránový filter a pomocou kyseliny octovej upravte pH na 6,0.

**5.9 Roztok octanu sodného.** Trihydrát octanu sodného (375 g) rozpusťte vo vode, doplňte na objem 1 000 ml, ak je to potrebné, prefiltrujte cez 0,45 $\mu$ m membránový filter a pomocou kyseliny octovej nastavte pH 6,0.

**5.10 Štandardný roztok amino dusíka.** L-(+)-glutamín (1,9000 g) rozpusťte v čeriacom roztoku [zriedený roztok základného octanu olovnatého (5.3) resp. roztok síranu hlinitého (5.5)] a doplňte na objem 1 000 ml. Takto získate roztok obsahujúci 100 mmol  $\alpha$ -amino dusíka na 1 kg repy.

**5.11 Zriedený štandardný roztok amino dusíka.** Do série 100ml odmerných baniek preneste objemy 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 a 80 ml štandardného roztoku amino dusíka, doplňte po značku čeriacim roztokom [zriedený roztok základného octanu olovnatého (5.3) resp. roztok síranu hlinitého (5.5)] a pomiešajte. Získate takto roztoky, ktoré obsahujú 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 a 80 mmol  $\alpha$ -amino dusíka na 1 kg repy.

## 6 Prístrojové vybavenie

**6.1 Prístroj.** Dvojlúčový spektrofotometer alebo kolorimeter, schopný merať svetelnú transmisiu pri vlnovej dĺžke  $610 \pm 10$  nm.

**6.2 Združené optické kyvety.** Použijete dve kyvety, zvyčajne s dĺžkou 5 cm, ktoré pri teste s destilovanou vodou dávajú výsledok, že sú na 0,2 % identické.

**6.3 Membránové filtre** – veľkosť pórov 0,45  $\mu$ m, priemer 50 mm.

**6.4 Držiak membránových filtrov** – najlepšie uchytený na držiaku z nehrzdavejúcej ocele, pripnutý na odsávačku (vákuovú banku).

**6.5 Odmerné banky** – trieda A, objemy 100 a 1 000 ml.

**6.6 Pipety** – trieda A, objemy 10, 20 a 50 ml.

**6.7 Kadičky** – objem 250 ml.

## 7 Vzorky

**7.1 Repná kaša.** Pre prípravu repnej kaše, ako aj prípravu a čerenie roztoku vzorky postupujte podľa postupu uvedeného v Metóde GS6-1 (octan olovnatý), resp. GS6-3 (síran hlinitý).

## 8 Postup

**8.1 Príprava vzorky.** Do 250ml kadičky preneste 40 ml roztoku určeného na analýzu (pozri kap. 7) a 10 ml meďnatého činidla.

**8.2 Meranie.** Po premiešaní sa meria absorbancia pri 610 nm v kyvete (s dĺžkou napr. 5 cm) oproti vzorke činidla, t.j. zmesi 40 ml roztoku vzorky a 10 ml roztoku octanu sodného, ktorá je v zodpovedajúcej referenčnej kyvete.

Kalibračná krivka sa pripraví rovnakým spôsobom, pričom sa použijú roztoky zriedeného štandardu (5.11), vrátane slepej vzorky.

## 9 Vyjadrenie výsledkov

**9.1 Kalibračná krivka.** Hodnoty absorbcie vzoriek štandardu (pozri 8.2) sa vynesú do grafu oproti zodpovedajúcim koncentráciám.

**9.2 Výsledok.** Obsah  $\alpha$ -amino dusíka v roztoku vzorky sa odčíta z kalibračnej krivky a vyjadří sa ako mmol.kg<sup>-1</sup>.

Fotometre sú zvyčajne vybavené programom pre výpočet výsledkov z nameranej kalibračnej krivky (9.1).

**9.3 Presnosť.** Štatistické údaje pre opakovateľnosť a reprodukovateľnosť boli vypracované na základe medzinárodných medzilaboratórnych testov, v ktorých bola použitá lyofilizovaná repná kaša ako stabilný referenčný materiál a síran hlinitý ako čeriacie činidlo (2):

- priemerný obsah dusíka v repe . . . . . 15,83 mmol.kg<sup>-1</sup>,  
 - opakovateľnosť  $r$  . . . . . 1,33 mmol.kg<sup>-1</sup>,  
 - reprodukovateľnosť . . . . . 3,32 mmol.kg<sup>-1</sup>.

## 10 Modifikovaná metóda pre použitie v automatických analyzátoroch kvality cukrovej repy

**10.1 Roztok vzorky** pozri bod 7.1.

**10.2 Meďnaté činidlo.** Koncentrácia dusičnanu meďnatého a octanu sodného v roztoku činidla závisia od pomeru medzi objemami roztoku vzorky a činidla.

*Príklad pre zmes 1:1 roztoku vzorky a činidla:* rozpustiť trihydrát dusičnanu meďnatého (2,86 g.l<sup>-1</sup>) a trihydrát octanu sodného (250 g.l<sup>-1</sup>) v deionizovanej vode.

*Príklad pre zmes 4:1 roztoku vzorky a činidla:* rozpustiť trihydrát dusičnanu meďnatého (10 g.l<sup>-1</sup>) a trihydrát octanu sodného (375 g.l<sup>-1</sup>) v deionizovanej vode.

Nerozpustné nečistoty sa môžu odstrániť filtráciou alebo dekantáciou.

**10.3 Roztok octanu sodného.** Koncentrácia octanu sodného v tlmivom roztoku závisí od pomeru medzi objemami roztoku vzorky a činidla.

*Príklad pre zmes 1:1 roztoku vzorky a činidla:* rozpustiť trihydrát octanu sodného (250 g.l<sup>-1</sup>) v deionizovanej vode.

*Príklad pre zmes 4:1 roztoku vzorky a činidla:* rozpustiť trihydrát octanu sodného (375 g.l<sup>-1</sup>) v deionizovanej vode.

Nerozpustné nečistoty sa môžu odstrániť filtráciou alebo dekantáciou.

**10.4 Štandardný roztok amino dusíka** pozri bod 5.10.

**10.5 Prístroj.** Dvojlúčový fotometer schopný merať svetelnú absorbanciu pri vlnovej dĺžke  $610 \pm 10$  nm. Prístroj by mal byť schopný zobrazovať  $A_{MER} - A_{REF}$ , rozdiel absorbcí meraných v hlavnej komore a v referenčnej komore, alebo pomer zodpovedajúcich transmitancií  $T_{MER}/T_{REF}$ .

**10.6 Združené optické kyvety.** Použijete dve prietokové kyvety o dĺžke 10–50 mm (ako je špecifikované v bode 6.2). Kyveta v hlavnej komore sa naplní zmesou vzorky a činidla (1:1 alebo 4:1), referenčná komora sa naplní zmesou vzorky a roztoku octanu sodného v rovnakom pomere.

**10.7 Kalibrácia fotometra.** Použijete zriedené roztoky štandardu amino dusíka, ako je popísané v bode 5.11.

Odmerajte slepú vzorku, t.j. čeriacie činidlo (5.3 resp. 5.5) zmiešané s meďnatým činidlom (pozri 10.2) v hlavnej kyvete a čeriacie činidlo (5.3 resp. 5.5) zmiešané s roztokom octanu sodného (pozri 10.3) v referenčnej kyvete. Keď sa displej fotometra ustáli, resetujte hodnotu absorbcie na 0 alebo hodnotu transmitancie na 100 %, podľa toho, čo sa dá aplikovať pre daný prístroj. Potom vykonajte meranie s kalibračnými vzorkami od 10 do 80 mmol  $\alpha$ -amino dusíka na 1 kg repy (pozri 5.11), zaznamenajte hodnoty amino dusíka a zodpovedajúce hodnoty absorbcí alebo transmitancií, a údaje použijete na výpočet kalibračnej funkcie fotometra, ktorá konvertuje hodnoty absorbcie, resp. transmitancie na jednotky mmol dusíka na kg repy.

**10.8 Rutinná kontrola/kalibrácia pre automatický analyzátor.** Na tento účel sa používa testovací roztok obsahujúci 30 mmol  $\alpha$ -amino dusíka na 1 kg repy.

## 11 Literatúra

1. *Správa z 17. zasadania ICUMSA*, 1978, s. 295.
2. MARTIN D.: *Referee's Report General Subject 6, ICUMSA*, 2006.
3. STANĚK V., PAVLAS P.: *Z. Zuckerind. Czecho-Slov. Rep.*, 59, 1934/35, s. 129.

## LISTY CUKROVARNICKÉ a ŘEPAŘSKÉ

---

4. STANĚK V., PAVLAS P.: *Z. Zuckerind. Czecho-Slov. Rep.*, 60, 1935/36, s. 46.
5. KUBADINOV N., WIENINGER L.: *Zucker*, 25, 1972, s. 43.
6. *Správa z 21. zasadania ICUMSA*, 1994, 105.
7. HOBBS J. K.: (1983). Skúsenosti spoločnosti American Crystal Sugar Company pri nahrádzaní olova soľami hliníka na čerenie. In *22<sup>nd</sup> ASSBT General Meeting*, 20.–24. 2. 1983, Phoenix, Arizona.

### *História*

Táto metóda bola prvýkrát publikovaná v roku 1979 v „Sugar Analysis: ICUMSA Methods“ od F. Schneidera. Bola revidovaná a znovu publikovaná v Správe z 23. zasadania v roku 2002, a neskôr v Návrhu Metódy č. 6 v Knihe Metód 2005. Bola prijatá ako Oficiálna metóda GS6-5 v roku 2006.

*Preložila Alžbeta Korčeková*