

# Přímé spektrofotometrické stanovení dusíku

Ing. GABRIELA BASAŘOVÁ, Csc. — Ing. TOMÁŠ LEJSEK, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

543.846  
543.42.0161 : 546.17

Do redakce došlo 15. 5. 1970

## Úvod

Stanovení anorganicky nebo organicky vázaného dusíku Kjeldahlovou metodou je časově náročné a vzhledem k nutnosti práce s agresivními chemikáliemi značně nepříjemné.

Proto se hledalo zjednodušené stanovení, jako např. jódometrické stanovení po oxidaci amoniaku po mineralizaci hypobromidem [1] nebo za tvorby fenol-indofenolu z amoniaku a fenolu za přítomnosti báze hypochloridu sodného a nitroprusidu [2].

Tyto metody sice obcházejí destilaci amoniaku z Kjeldahlových digescí a nahrazují ji kolometrickým stanovením, ale v zásadě stále je třeba pracovat s žiravinami při rozkladu vzorku.

Určité zlepšení metody stanovení dusíku znamená používání analyzátorů [3], kde jsou nepříjemné

práce s agresivními chemikáliemi zautomatizovány, avšak ne všechny laboratoře si mohou pořídit nákladné zařízení i vyškolení obsluhy pro běžné, popř. periodické stanovení dusíku.

Opravdové zjednodušení znamená spektrofotometrické stanovení dusíku v organických substancích ovšem s omezením, že se dá tato metoda použít jen pro čisté roztoky dusíkatých látek. Bílkoviny dávají absorpční maximum při 280 i 215 nm, což je způsobeno aromatickým jádrem některých aminokyselin. Nevýhoda je, že při stejné vlnové délce, kromě bílkovin, ovlivňují výsledek ještě i další látky, které ve stejném vlnovém rozsahu absorbují UV paprsky.

Wadell [4] zjistil, že Beerův zákon je splněn tehdy, je-li extinkce roztoků bílkovin nižší než 2,0 apod. Podle Murphy a Kiese [5] odpovídá Beerův



zákon při rozsahu koncentrace 20 až 100  $\mu\text{g/ml}$  bílkovin, nebo 3 až 16  $\mu\text{g/ml}$  dusíku.

Mezi stanovením proteinů podle *Kjeldahla* a rozdílem extinkcí 215 nm a 225 nm platí podle *Wadella* pro lidskou a zvířecí protoplasmu tento vztah:

$$\text{bílkovina } \mu\text{g/ml} = 114 (E_{215} - E_{225})$$

$$\text{dusík } \mu\text{g/ml} = 23,04 (E_{215} - E_{225})$$

*Franken-Luykx* [6] přezkoušela tento způsob spektrofotometrického stanovení dusíku pro mladinu a pivo. Zjistila, že stanovení dusíku spektrofotometricky lze použít jen v nechmelené sladině, protože v mladině a pivu jsou přítomny látky z chmele, které absorbují UV paprsky, a proto zkreslují výsledky měření.

Na základě určení korelačních faktorů a regresní přímky stanovila následující vztahy pro přímé spektrofotometrické stanovení obsahu bílkovin, popř. dusíku:

$$\text{dusík kongresní sladiny mg/l} = (\Delta E \cdot 2321) - 16$$

$$\text{dusík prokvašené sladiny mg/l} = (\Delta E \cdot 2474) - 16$$

*Riemann* [7] sledoval možnost použití spektrofotometrické metody stanovení dusíku pro běžné použití v praxi provozních pivovarských laboratoří.

Podrobným zhodnocením uvedené metodiky dospěl k závěru, že při velmi pečlivé přípravě vzorku (přesné pipetování, teploty vzorku) a měření (dobrý přístroj, pečlivě vyčištěné kyvety) je použitelné porovnání výsledků z rovnice *Franken-Luykx*:  $N \text{ mg/100 ml} = (\Delta E \cdot 232,1) - 1,6$ , rovněž jako jím určená rovnice srovnání:

$$N \text{ mg/100 ml} = \frac{\Delta E - 0,039}{0,004}, \text{ a to jak pro měření}$$

obsahu dusíku v kongresní sladině, tak i pro určení stupně rozluštění sladu.

*Franken-Luykx* pracovala na spektrálním fotometru Unicam SP 500, *Riemann* na přístroji Zeiss M4QIII.

### Experimentální část

U 30 vzorků sladin z různých sladů jsme stanovili dusík podle *Kjeldahla* [8] a určili rozdíl extinkcí  $\Delta E$  při 215 nm a 225 nm na spektrálním fotometru fy Zeiss VSU 2P.

Pro spektrofotometrické stanovení jsme připravili vzorky takto:

Do 100 ml odměrné baňky se přesně napipetoval 1 ml kongresní sladiny vytemperované na 20 °C a odměrná baňka se doplnila po značku roztokem 0,9 % NaCl při 20 °C. U takto zředěných vzorků se měřila extinkce při 215 nm a 225 nm. Pro slepý pokus se vzal 0,9 % NaCl. Z každého vzorku sladiny se připravilo 10 ředění a z každého ředění se provedla tři stanovení rozdílu  $\Delta E$ . Dále jsme u každého vzorku sladiny trojmo stanovili dusík podle *Kjeldahla*.

Nejdříve jsme průměrné hodnoty rozdílů extinkcí dosadili do všech dříve uvedených rovnic a vypočtené výsledky srovnali s hodnotami stanovenými me-

todou podle *Kjeldahla*. Výsledky hodnot dusíku v mg/100 ml vypočtené z regresních rovnic podle *Wadella*, *Franken-Luykx* a *Riemanna* neodpovídaly hodnotám dusíku stanoveného podle *Kjeldahla* (tab. 3), proto jsme přistoupili k výpočtu vlastní regresní rovnice.

Provedli jsme kontrolu spektrálního fotometru VSU 2-P podle „Analytiky EBC“ [9]. Kalibrace se provádí 0,005 %  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  proti destilované vodě. Potom platí vztahy uvedené v tabulce 1. V následující tabulce 2 jsou hodnoty naměřené při kalibraci 0,005 %  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  na třech fotometrech v různých laboratořích.

Tabulka 1

Vlnová délka	235 nm	257 nm	313 nm	350 nm
$E_{1\text{cm}} 1\% \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	125,2	145,6	48,9	107,0
$E_{1\text{cm}} 0,005\% \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	0,626	0,728	0,245	0,535

Tabulka 2

Vlnová délka s 0,005% $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	235 nm	257 nm	313 nm	350 nm
VSU <sub>2</sub> — VÚPS	0,634	0,728	0,248	0,535
VSU <sub>2</sub> — laboratoř 2	0,654	0,742	0,255	0,542
Opton — laboratoř 3	0,686	0,773	0,279	—

Z uvedeného je patrné, že hodnoty naměřené na spektrálním fotometru VSU 2P, který jsme použili pro měření k odvození korelačního koeficientu a regresní rovnice se úzce přibližují, nebo téměř souhlasí se standardními výsledky. Hodnoty měřené při nižších vlnových délkách (257 nm a 235 nm) dávají u všech tří přístrojů maximální odchylku. Při ještě nižších vlnových délkách (pod 235 nm) citovaná literatura neuvádí hodnoty extinkcí s 0,005 procenta  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , lze však u různých přístrojů očekávat odlišnou citlivost, která silně ovlivní výsledky měření a tím i postavení regresní křivky.

Při výpočtu regresní rovnice a korelačního koeficientu jsme vycházeli z této závislosti [10]:

$$x = 1000 (\overline{\Delta E} - 0,220) \quad (1)$$

$$y = \bar{N} - 60 \quad (2)$$

kde  $\overline{\Delta E}$  je aritmetický průměr rozdílu extinkcí jednoho vzorku (u 10 ředění a 3 měření u každého ředění)

$\bar{N}$  = průměrná hodnota celkového dusíku podle *Kjeldahla* ze tří stanovení.

V našem případě je závislost obou sledovaných veličin lineární a hledáme proto rovnici regresní přímky. Regresní přímka je dána obecným výrazem:

$$y = a + bx \quad (3), \text{ kde konstanty } a, b \text{ nazýváme koeficienty regrese.}$$



Tabulka 3

Vzorek	Kjeldahl N mg/100 ml	Wadell N = ΔE × 230,4 mg/100 ml	Δ N mg/100 ml	Franken-Luyckx N = (ΔE × 232,1) - 1,6 mg/100 ml	Δ N mg/100 ml	Riemann ΔE = 0,113 N = 0,003 mg/100 ml	Δ N mg/100 ml	Riemann ΔE = 0,039 N = 0,004 mg/100 ml	Δ N mg/100 ml	N = 270,6 ΔE + 6,62	Δ N mg/100 ml
1	80,26	61,78	+ 18,48	60,65	+ 19,61	51,54	+ 28,72	57,30	+ 22,96	79,14	+ 1,12
2	81,98	62,58	+ 19,40	61,49	+ 20,49	53,27	+ 28,71	58,20	+ 23,78	80,22	+ 1,76
3	73,32	56,20	+ 17,12	55,00	+ 18,32	43,65	+ 29,67	51,37	+ 21,95	72,64	+ 0,68
4	70,41	53,00	+ 17,41	51,80	+ 18,61	38,90	+ 31,51	47,75	+ 22,66	68,85	+ 1,56
5	74,16	57,40	+ 16,76	56,25	+ 17,91	45,44	+ 28,72	52,77	+ 21,39	74,00	+ 0,16
6	72,73	53,70	+ 19,03	52,58	+ 20,15	40,15	+ 32,58	48,60	+ 24,13	69,66	+ 3,07
7	72,60	54,60	+ 18,00	53,44	+ 19,16	41,38	+ 31,22	49,54	+ 23,06	70,75	+ 1,85
8	68,05	54,40	+ 13,65	53,18	+ 14,87	41,00	+ 27,05	49,25	+ 18,80	70,47	- 2,42
9	82,08	64,60	+ 17,48	63,43	+ 18,65	55,73	+ 26,35	60,33	+ 21,75	82,39	- 0,31
10	82,25	66,50	+ 15,75	65,43	+ 16,82	58,58	+ 23,67	62,44	+ 19,81	84,82	- 2,57
11	66,50	53,60	+ 12,90	52,43	+ 14,07	39,92	+ 26,58	48,47	+ 18,03	69,67	- 3,17
12	87,26	68,20	+ 19,06	67,19	+ 20,07	60,94	+ 26,32	54,21	+ 23,05	86,72	+ 0,54
13	90,65	67,88	+ 22,77	66,92	+ 23,73	60,54	+ 30,11	63,91	+ 26,74	86,45	+ 4,20
14	84,51	67,10	+ 17,41	66,03	+ 18,48	59,41	+ 25,10	63,00	+ 21,51	85,36	- 0,85
15	86,17	67,64	+ 18,53	66,65	+ 19,52	60,24	+ 25,93	63,68	+ 22,49	86,17	0
16	79,74	63,73	+ 16,01	62,68	+ 17,06	54,53	+ 25,21	59,40	+ 20,34	81,57	- 1,83
17	78,55	61,64	+ 16,91	60,51	+ 18,04	51,53	+ 27,02	57,23	+ 21,32	79,14	- 0,59
18	77,97	63,09	+ 14,88	61,97	+ 16,00	53,62	+ 24,35	58,71	+ 19,26	80,76	- 2,79
19	79,03	61,80	+ 17,23	60,74	+ 18,29	51,79	+ 27,24	57,34	+ 21,69	79,15	- 0,12

Tabulka 4. Podklady pro výpočet regresní rovnice a korelačního koeficientu

Vzorek	ΔE	x <sub>i</sub>	x <sub>i</sub> <sup>2</sup>	y <sub>i</sub>	y <sub>i</sub> <sup>2</sup>	x <sub>i</sub> y <sub>i</sub>	x <sub>i</sub> -x̄	y <sub>i</sub> -ȳ	(x <sub>i</sub> -x̄) <sup>2</sup>	(y <sub>i</sub> -ȳ) <sup>2</sup>
1	0,268	48	2304	20	400	960	3,053	1,69	9,320	2 856
2	0,272	52	2704	22	484	1144	7,053	3,69	49,745	13,616
3	0,244	24	576	13	169	312	-20,947	-5,31	438,777	28,196
4	0,230	10	100	10	100	100	-34,947	-8,31	1221,293	69,056
5	0,249	29	841	14	196	406	-15,947	-4,31	254,307	18,576
6	0,233	13	169	13	169	169	-31,947	-5,31	1020,610	28,196
7	0,237	17	289	13	169	221	-27,947	-5,31	781,035	28,196
8	0,236	16	256	8	64	128	-28,947	-10,31	837,929	106,296
9	0,280	60	3600	22	484	1320	15,053	3,69	226,593	13,764
10	0,289	69	4761	22	484	1518	24,053	3,69	578,547	13,764
11	0,233	13	169	6	36	78	-31,947	12,31	1020,611	151,536
12	0,296	76	5776	27	729	2052	31,053	8,69	964,289	75,516
13	0,295	75	5625	31	961	2325	30,053	12,69	903,183	161,036
14	0,291	71	5041	25	625	1775	26,053	6,69	678,759	44,756
15	0,294	74	5476	26	676	1924	29,053	7,69	844,077	59,136
16	0,277	57	3249	20	400	1140	12,053	1,69	145,275	2,856
17	0,268	48	2304	19	361	912	3,053	0,69	9,321	0,476
18	0,274	54	2916	18	324	972	9,053	-0,31	81,958	0,096
19	0,268	48	2304	19	361	912	3,053	0,69	9,321	0,476
Σ:		854	48460	348	7192	18368			10074,952	818,400
Ø		44,947		18,31						

Dosazením do rovnice (3) z rovnic (1) a (2), které usnadňují vlastní výpočet, obdržíme pak hledanou stochastickou závislost veličin N a ΔE.

Při zjištění regresních koeficientů a i b se využije hodnot získaných v souboru uskutečněného prov-návaciho měření ΔE a N (tabulka 3 a 4, 19 vzorků). Regresní koeficienty jsou definovány závislostmi:

$$b = \frac{K \sum (x_i y_i) - \sum x_i \sum y_i}{K \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (4)$$

$$a = \bar{y} - b \bar{x} \quad (5)$$

kde K je počet měření,

$\bar{x}$  — aritmetický průměr hodnot x<sub>i</sub>,

$\bar{y}$  — aritmetický průměr hodnot y<sub>i</sub>,

V našem případě je po dosazení z tab. 4: b = 0,2703  
a = 6,15

Dalším výpočtem z rovnic (1) až (3) jsme odvodili regresní přímkou pro stanovení celkového dusíku ve sladinách na spektrálním fotometru Zeiss VSU 2P:

$$N \text{ mg/100 ml} = 1000 b (\Delta E - 0,220) + a + 60$$

a po úpravě

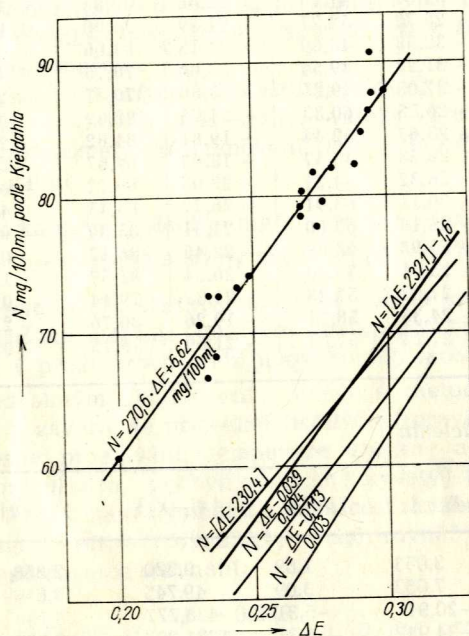
$$N \text{ mg/100 ml} = 270,3 \Delta E + 6,62$$



Grafické znázornění regresní přímky a vztahu zjištěných hodnot rozdílů extinkcí k celkovému obsahu dusíku stanovenému metodou podle *Kjeldahla* jsou v *grafu 1*. V témž grafu jsou zaznamenány regresní rovnice pro naše podmínky nevyhovující, a to podle *Wadella*, *Franken-Luykx* a *Riemanna*. Korelační koeficient se vypočítá ze vztahu:

$$r^2 = \frac{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

Po dosazení z *tabulky 4*:  $r^2 = 0,90$   
 $r = 0,95$



Graf 1. Závislost dusíku podle Kjeldahla a rozdílu extinkcí  $\Delta E$ .

### Diskuse

U analyzované série kongresních sladín, jejíž výsledky jsme použili pro výpočet regresní rovnice a korelačního koeficientu, jsme zjistili maximální hodnotu dusíku 90,65 mg/100 ml podle *Kjeldahla*, minimální 66,50 mg/100 ml, průměrnou 78,32 mg/100 ml. Tomu odpovídala maximální hodnota rozdílů extinkcí  $\Delta E$  0,296, minimální 0,230, průměrná 0,264.

*Franken-Luykx* pracovala se sladínami s maximální hodnotou dusíku 93,7 mg/100 ml, minimální 61,6 mg/100 ml a průměrnou 76,6 mg/100 ml. Zjistila

Tabulka 7

		$\Delta N$ mg/100 ml		
		střed.	max.	min.
Wadell	$N = \Delta E \times 230,4$	+ 17,30	+ 22,0	+ 12,90
Franken-Luykx	$N = (\Delta E \times 232,1) - 1,6$	+ 18,41	+ 23,73	+ 32,58
Riemann	$N = \frac{\Delta E - 0,039}{0,004}$	+ 12,90	+ 14,07	+ 23,67
	$N = 270,6 \Delta E + 6,62$	$\pm 1,54$	+ 4,20	0

odpovídající maximální hodnotu  $\Delta E$  0,402, minimální 0,279 a průměrnou 0,377. *Riemann* stanovil maximální hodnotu dusíku 91,6 mg/100 ml, minimální 59,2 mg/100 ml a průměrnou 70,6 mg/100 ml. Maximální hodnotu  $\Delta E$  naměřil 0,377, minimální 0,235 a průměrnou 0,325.

Korelační koeficient zjištěný *Franken-Luykx* byl 0,94, *Riemannem* 0,99 (při exaktním provedení měření — u první série měření bez přesné standardizace podmínek  $r = 0,65$ ) a při našem měření jsme určili korelační koeficient 0,95.

Důležitost exaktního ředění vzorku a celkového provedení měření dokumentoval *Riemann*, který zjišťoval při nedodržení postupu provedení analýzy rozdíly v obsahu dusíku v mg/100 ml, které jsou uvedeny v *tabulce 5*.

Při exaktním provedení analýz *Riemann* dospěl k výsledkům, které jsou uvedeny v *tabulce 6*.

Tabulka 5

	$\Delta N$ mg/100 ml		
	střed.	max.	min.
$N = \Delta E \times 230,4$	$\pm 7,5$	$\pm 15,9$	- 0,2
$N = (\Delta E \times 232,1) - 1,6$	$\pm 7,8$	$\pm 16,6$	- 0,9
$N = \frac{\Delta E - 0,039}{0,004}$	$\pm 8,4$	$\pm 16,1$	+ 0,1

Tabulka 6

	$\Delta N$ mg/100 ml		
	střed.	max.	min.
$N = \Delta E \times 230,4$	$\pm 3,0$	+ 3,4	$\pm 1,0$
$N = (\Delta E \times 232,1) - 1,6$	$\pm 1,9$	+ 2,4	+ 0,1
$N = \frac{\Delta E - 0,039}{0,004}$	$\pm 1,2$	- 3,1	+ 0,1

Dosažením našich výsledků rozdílů extinkcí do rovnic odvozených *Wadellem*, *Franken-Luykx* a *Riemannem* jsme dostali vysoké rozdíly vypočtených hodnot dusíku od zjištěných hodnot stanovených *Kjeldahlovou* metodou, zatímco při dosažení



Tabulka 8

Vlastní stanovení			Riemann		
	$\Delta E$	$N = 270,6 \Delta E + 6,62$	$\Delta E$	$N = (\Delta E \times 232,1) - 1,6$	$N = \frac{\Delta E - 0,039}{0,004}$
$\sigma$	0,266	78,04	0,339	77,0	74,9
$\delta$	$\pm 0,001$	$\pm 0,27$	0,003	$\pm 0,7$	$\pm 0,7$

Tabulka 9

	Franken-Luykx	Riemann	Vlastní stanovení
regresní rovnice	$N = (\Delta E \times 232,1) - 1,6$	$N = \frac{\Delta E - 0,039}{0,004}$	$N = 270,6 \Delta E + 6,62$
celková chyba	$\pm 2,6$	$\pm 1,9$	$\pm 1,8$

Tabulka 10

Vzo- rek	Dusík Kjeldahl mg/100 ml	Pravdě- podob. chyba $\pm$	Dusík spektr. mg/100 ml	Pravdě- pod. chyba $\pm$	$\Delta E$	Pravdě- pod. chyba $\pm$	Největší od- chyłka $\Delta E$ při ředění		Největší od- chyłka $\Delta E$ při měření		Největší od- chyłka N mg/100 ml při ředění		Největší od- chyłka N mg/100 ml při měření	
							+	-	+	-	+	-	+	-
1	80,26	0,59	79,14	0,26	0,268	0,001	0,005	0,008	0,018	0,017	1,35	2,16	4,86	4,59
2	81,98	0,06	80,22	0,18	0,272	0,0007	0,004	0,009	0,009	0,017	1,08	2,43	2,43	4,59
3	73,32	0,36	72,64	0,15	0,244	0,0006	0,004	0,004	0,006	0,006	1,08	1,08	1,62	1,62
4	70,41	0	68,85	0,02	0,230	0,0001	0,007	0,007	0,013	0,009	1,89	1,89	3,51	2,43
5	74,16	0,32	74,00	0,10	0,249	0,0004	0,002	0,003	0,006	0,006	0,54	0,80	1,62	1,62
6	72,73	0,19	69,66	0,18	0,233	0,0007	0,007	0,006	0,009	0,009	1,89	1,62	2,43	2,43
7	72,60	0,28	70,75	0,13	0,237	0,0005	0,003	0,004	0,005	0,006	1,80	1,08	1,35	1,62
8	68,05	0,19	70,47	0,10	0,236	0,0004	0,002	0,004	0,008	0,006	0,53	1,08	2,16	1,62
9	82,08	0,63	82,39	0,05	0,280	0,0002	0,001	0,002	0,005	0,005	0,26	0,53	1,35	1,35
10	82,25	0,14	84,82	0,18	0,289	0,0007	0,006	0,006	0,004	0,011	1,62	1,62	1,08	2,97
11	66,50	0,14	69,67	0,18	0,289	0,0007	0,004	0,006	0,005	0,007	1,08	1,62	1,35	1,89
12	87,26	0,15	86,72	0,05	0,233	0,0002	0,003	0,002	0,005	0,011	0,80	0,53	1,35	2,97
13	90,65	0,007	86,45	0,21	0,296	0,0008	0,004	0,005	0,007	0,008	1,08	1,35	1,89	2,16
14	84,51	0,48	85,36	0,29	0,295	0,0011	0,016	0,006	0,024	0,017	4,32	1,62	6,49	4,59
15	86,17	0,28	81,17	0,07	0,291	0,0003	0,002	0,001	0,009	0,005	0,53	0,26	2,43	1,35
16	79,74	0,00	81,57	0,21	0,294	0,0008	0,005	0,004	0,007	0,009	1,35	1,08	1,89	2,43
17	78,55	0,38	79,14	0,07	0,277	0,0003	0,002	0,001	0,004	0,004	0,53	0,26	1,08	1,08
18	77,97	0,15	80,76	0,10	0,274	0,0004	0,003	0,002	0,007	0,006	0,80	0,53	1,89	1,62
19	79,03	0,00	79,15	0,21	0,268	0,0008	0,005	0,004	0,010	0,009	1,35	1,08	2,70	2,43

do regresní rovnice ( $N$  mg/100 ml =  $270,6 \Delta E + 6,62$ ) odvozené v naší experimentální práci byly odchylky odpovídající (viz tabulka 7).

V tabulce 8 je přehled vypočtených směrodatných odchylek z našich měření (průměr z 19 sérií vždy 10krát ředěných vzorků) a směrodatných odchylek, které uvádí Riemann.

Směrodatnou odchylku stanovení celkového dusíku podle Kjeldahla, kterou jsme zjistili u průměrné hodnoty 78,33 mg N/100 ml (průměr z 19 vzorků a vždy 3 stanovení) =  $\pm 0,27$  mg/100 ml, Franken-Luykx uvádí  $\pm 0,4$  mg/100 ml.

Celková chyba stanovení se určila ze součtu směrodatné odchylky měření extinkce a střední odchylky od hodnoty vypočtené z rovnice. Hodnota

celkové chyby společně s celkovou chybou stanovenou Riemannem u dvou regresních rovnic je v tabulce 9.

Dále jsme se zabývali výpočtem chyb, kterých se dopustíme při ředění vzorku a měření. Přehled vypočtených odchylek je v tabulce 10. Z výpočtů vyplývá, že není nutno u jednoho vzorku připravovat 10 ředění, protože odchylky jsou v zásadě zanedbatelné, ale je nutno z každého vzorku provést alespoň 2 až 3 měření extinkcí a výsledky rozdílů extinkcí  $\Delta E$  počítat z průměru.

Na závěr našich měření jsme sledovali chybu stanovení rozdílu  $\Delta E$  třemi laboratořemi, a to dvakrát při použití spektrálního fotometru Zeiss V5U 2P a jednou na spektrálním fotometru Opton. Výsledky



jsou v tabulce 11. Rozdíl ve výpočtu při stanovení celkového dusíku dvěma laboratořemi podle naší regresní rovnice:

$$N \text{ mg/100 ml} = 270,6 \Delta E + 6,62 \text{ je v tabulce 12.}$$

Orientačně se spektrofotometrická metoda stanovení celkového dusíku použila i pro studený výluh podle Hartonga mixací, který odpovídá Hartongovu

Tabulka 11

VSU <sub>2</sub> — VÚPS ΔE	VSU <sub>2</sub> — labora- toř 1 — ΔE	Opton — labora- toř 2 — ΔE
0,253	0,251	0,322
0,245	0,241	0,315
0,294	0,298	0,361

Tabulka 12

		Vzorek 1	Vzorek 2
Laboratoř 1 — spektrální fotometr Zeiss VSU <sub>2</sub>	N mg/100 ml	77,64	80,04
Laboratoř 2 — spektrální fotometr Zeiss VSU <sub>2</sub>	N mg/100 ml	76,70	80,76
	ΔN mg/100 ml	0,94	0,72

Tabulka 13

Vzo- rek	mg N/100 ml Kjeldahl	mg N/100 ml spektrofotomet- ricky	ΔN mg/100 ml
1	45,4	43,43	+ 1,97
2	44,7	42,61	+ 2,09
3	45,81	45,90	- 0,09
4	48,38	48,20	+ 0,18
5	46,70	45,81	+ 0,89
6	47,04	45,40	+ 1,64
7	49,50	48,15	+ 1,35
8	50,96	49,10	+ 1,86

výluhu při 20 °C. Princip přípravy výluhu: celá zrna naklíčeného ječmene se mixují dvě minuty ve vodě 10 °C [11]. Po filtraci se stanovil trojmo celkový dusík podle Kjeldahla a dusík spektrofotometricky. Popsaný postup přípravy výluhu se používá pro hodnocení mj. změn dusíkatých látek při sladování. Srovnávací průměrné výsledky analýz podle Kjeldahla, celkový dusík spektrofotometricky a rozdíl ΔN v mg/100 ml jsou v tabulce 13. Každý vzorek výluhu se pro spektrofotometrické měření dvakrát ředil a z každého ředění se provedla tři měření. Zjištěné rozdíly v obsahu dusíku stanoveného spektrofotometricky a metodou podle Kjeldahla jsou poněkud vyšší, než jsme zjišťovali u kongresní sladiny. Tyto rozdíly lze připsat nestejně době měření vzorků po filtraci a ředění. Přesto se maximál-

ní odchylky neodlišují od hraničních hodnot stanovených u porovnávacích vzorků sladového výluhu Kjeldahlovou metodou.

### Závěr

Při přímém spektrofotometrickém stanovení rozpuštěného dusíku je nezbytně nutno zachovat exaktní podmínky, aby se odchylky jednotlivých měření a vypočtené hodnoty nelišily od celkového dusíku stanoveného Kjeldahlovou metodou. Ukázalo se, že dříve publikované regresní rovnice Wadellem, Franken-Luykx a Riemannem nelze univerzálně použít pro všechny typy spektrálních fotometrů, protože citlivost v oblasti nízkých vlnových délek se značně liší. V naší práci jsme odvodili regresní přímku pro spektrofotometrické stanovení celkového dusíku ve sladinaх z českého světlého sladu na spektrálním fotometru fy Zeiss VSU 2P. Těchto přístrojů se v poslední době stále více používá v našich pivovarských a sladařských laboratořích. Sou-

časně jsme podali přehled postupu výpočtu regresní přímky a korelačního koeficientu. Tohoto postupu je možno obecně použít pro odvození regresní rovnice a korelačního koeficientu pro kterýkoli spektrální fotometr, popř. jiný typ sladu.

Spektrofotometrická metoda stanovení dusíku je velmi jednoduchá. Celá příprava vzorku a měření trvá maximálně 10 minut (kromě času potřebného k temperaci vzorku) a z chemikálií je zapotřebí pouze roztok 0,09 % NaCl. Přímá spektrofotometrická metoda je vhodná pro stanovení celkového dusíku ve sladinaх, avšak jak ukázala orientační měření, lze ji i úspěšně použít k hodnocení postupného rozluštění zrna, čili ke kontrole určitého stupně sladování, popř. hvozdní. V každém případě je nutná občasná kontrola výsledků spektrofotometrické metody s metodou podle Kjeldahla.

### Souhrn

Autoři zjistili, že dříve publikované regresní rovnice pro výpočet celkového dusíku ve sladinaх spektrofotometrickým stanovením neodpovídají celkovému dusíku podle Kjeldahla při použití spektrálního fotometru Zeiss VSU 2P, proto odvodili novou regresní přímku pro tento přístroj. V práci dokumentují na základě propočtů různých odchylek přesnost metody. Orientačně použili přímého spektrofotometrického stanovení celkového dusíku pro hodnocení kvality studeného výluhu zelených sladů.



**Literatura**

- [1] HASHMI, M - ALI, H. E. - UMAR, M.: *Analyt. Chem.* **34**, 1982: 988.
- [2] LEWIS, T - MANN, J. R.: *Analyt. Chem.* **35**, 1963: 2179—2182.
- [3] FERRARI, A.: Sonderdruck 289, Technicon GmbH Frankfurt (ref. Riemann l. c. 7).
- [4] WADELL, W. J.: *J. Lab. and clin. Med.*, **48**, 1956: 311.
- [5] MURPHY, J. B - KIES, M. W.: *Biochim. Biophys. Acta* **45**, 1960: 382.
- [6] FRANKEN-LUYKX, J. M. M.: *J. Inst. Brew.* **73**, 1960: 187—189.
- [7] RIEMANN, J.: *Brauwissenschaft* **21**, 1968: 375—378.
- [8] VANČURA, M. a spol.: *Pivovarsko-sladařská analytika*. SNTL — Praha 1936.
- [9] *Analytika EBC — Second Edition 1963: 213*, vydal: Elsevier Publishing Company London.
- [10] PECHOČ, V.: *Vyhodnocování měření a početní metody v chemickém inženýrství*, SNTL, Praha 1961.
- [11] ŠAUER, Z. - VOBORSKÝ, J. - SIBLÍK, Z.: *Závěrečná zpráva VÚPS 1938 „Výzkum nových postupů při výrobě sladu“*.

Lektoroval Ing. J. Káš