



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3

Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

1 Předmět a vymezení

SOP 2.3 je určen pro stanovení obsahu celkového dusíku kjeldahlovou metodou pomocí blokové mineralizace, destilace vodní parou s následnou titrací vzorku pomocí systému FOSS Analytical AB, Höganäs, Švédsko (Digestion System + Kjeltec Analyzer Unit 2300)

2 Princip metody

Obsah celkového dusíku ve vzorku je dán množstvím organicky vázaného dusíku odpovídajícího množství amoniaku uvolněného a stanoveného za podmínek metody zkoušení. Systém FOSS Analytical AB používá kjeldahlovu metodu stanovení dusíkatých látek, která probíhá ve třech základních krocích: mineralizace, destilace, titrace.

Mineralizace. Vzorek se podrobí mineralizaci mokrou cestou v prostředí koncentrované kyseliny sírové, oxidačního činidla (převádí uhlík na oxid uhličitý) a katalyzátoru za vysoké teploty (cca 420 °C), během které se organicky vázaný dusík přítomný ve formě různých funkčních skupin převede na amoniak, který zůstane vázán ve formě síranu amonného.



Destilace. V alkalickém prostředí hydroxidu sodného se pomocí vodní páry ze síranu amonného uvolní amoniak, který je v plynné formě, následně je v chladiči kondenzován a jímán do předlohy složené z kyseliny borité a směsného indikátoru (methylčervěň + bromkresolová zeleň).

Titrace. Amoniak jímáný do předlohy alkalizuje její prostředí, dochází ke změně zbarvení směsného indikátoru (zelenání) a k automatické neutralizaci prostředí pomocí jeho titrace slabou kyselinou chlorovodíkovou, jejíž spotřeba je automaticky zaznamenávána a je přímo úměrná množství amoniaku najímaného do předlohy. Titrace je skončena po dosažení bodu ekvivalence. Přetitrování předlohy se projeví jejím růžově-červeným zbarvením.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3	
Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

3 Bezpečnost práce

Kjeldahlova metoda vyžaduje provedení mineralizace vzorku pomocí koncentrované kyseliny sírové při vysokých teplotách. Opatrné zacházení s používanými roztoky je nezbytné pro dodržení bezpečnosti v laboratoři. Z důvodů zvýšení bezpečnosti práce je třeba kyselou mineralizaci provádět v digestoři s dostatečným odtahem vznikajících kyselých výparů. Při práci je potřeba používat ochranný štít a s horkými tubami pracovat opatrně.

4 Chemikálie, sklo a další laboratorní pomůcky

všechny chemikálie musí být čistoty p.a.

kyselina sírová konc., H_2SO_4

peroxid vodíku, H_2O_2

methylčerven volná kyselina

bromkresolová zeleň

metylalkohol, CH_4O

normanál kyseliny chlorovodíkové, $c(HCl) = 0,1 \text{ mol/l}$

destilovaná voda

zásobní lahev s dávkovačem o objemu 12,5 ml

baňka se špačkem o objemu 5 ml

odměrný válec 250 ml

odměrný válec na 20 ml s členěním 0,2 ml

skleněná nádoba na 1250 ml se zábrusem, zátka

skleněná 10 l nádoba (2x)

skleněná tyčinka, silná, cca 60 cm dlouhá (2x)

odměrná baňka se zábrusem a zátkou 100 ml (3x)



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3	
Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

5 Příprava roztoků

5.1 Příprava roztoků pro mineralizaci.

Kyselina sírová konc. se opatrně přelije do zásobní lahve s dávkovačem, který umožní nadávkovat 12,5 ml této kyseliny.

Příprava oxidačního činidla: **peroxid vodíku : 10% kyselina fosforečná v poměru 4 : 1**

10% roztok kyseliny fosforečné se připraví v objemu 250 ml následovně. Do odměrného válce 250 ml se nalije 100 ml destilované vody, přidá se 17,2 ml kyseliny fosforečné a doplní se do 250 ml destilovanou vodou (+ 132,8 ml dest. vody).

Oxidační činidlo se připraví v objemu 1 250 ml následovně. Do vhodné skleněné nádoby (se zábrusem a zátkou) se nalije 1 l peroxidu vodíku a přidá se 250 ml 10% roztoku kyseliny fosforečné. Nádoba se uzavře a její obsah se obrácením nádoby několikrát promíchá. Nádoba se uchovává v chladnu.

K aplikaci oxidačního činidla se používá zásobní lahev s dávkovačem nebo špačkem o objemu 5 ml.

5.2 Příprava roztoků pro destilaci

35-40% roztok hydroxidu sodného se připraví v objemu 10 l následovně. Do dostatečně velké nádoby se nalije 5 l vody a za stálého míchání se přidává 4 700 g NaOH. Po ochlazení se objem roztoku doplní na 10 l. Hotový roztok se nalije do příslušného zásobního kanystru k systému Kjeltec 2300.

Upozornění! Při nedostatečném míchání se hydroxid usazuje v odolných nálepech na dně a stěnách nádoby. Roztok se zahřívá a během rozpouštění hydroxidu se uvolňují agresivní výpary. Přípravu roztoku je potřeba provádět v digestoři.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3

Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

1% kyselina boritá se připraví v objemu 10 l následovně. Do dostatečně velké nádoby se nalije 5 l vody a za stálého míchání se přidává 100 g kyseliny borité a po jejím rozpuštění se objem doplní do 10 l. Hotový roztok se nalije do příslušného zásobního kanystru k systému Kjeltec Analyser Unit 2300.

K tomuto roztoku se postupně přidá:

- 100 ml roztoku bromkresolové zeleni (100 mg bromkresolové zeleni se rozpustí ve 100 ml metylalkoholu)
- 70 ml roztoku methylčerveni (100 mg methylčerveni se rozpustí ve 100 ml metylalkoholu)
- a 5 ml 4% roztoku NaOH (4 g NaOH se rozpustí v dest. vodě a doplní vodou do 100 ml po rysku v odměrné baňce).

Nakonec se obsah příslušného zásobního kanystru s kyselinou boritou, směsným indikátorem a hydroxidem sodným důkladně promíchá několikanásobným obrácením nádoby.

Provede se kontrola naplnění příslušného zásobního kanystru k systému Kjeltec Analyser Unit 2300 destilovanou vodou, případně se vodou doplní.

5.3 Příprava roztoků pro titraci

Titrační činidlo $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ mol/l}$ se připraví v objemu 1 l následovně. Do odměrné baňky 1 l se nalije 100 ml dest. vody, přidá se normální kyseliny chlorovodíkové a objem uvnitř baňky se doplní dest. vodou po rysku. Obsah se promíchá několikanásobným obrácením baňky. Po vychladnutí roztoku se provede kontrola objemu roztoku a v případě potřeby se ještě jednou obsah baňky doplní po rysku a opět promíchá. Hotový roztok se nalije do příslušného zásobního kanystru k systému Kjeltec Analyser Unit 2300.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3	
Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

6 Přístroje a pomocná zařízení

Pracovní desky, nůž
Homogenizátor (např. vysokootáčkový rotační kutr)
Váhy s přesností na 0,0001 g
Bezpopelové cigaretové papírky, pomůcky pro navažování
Mineralizační tuby o objemu 250 ml
Mineralizační přenosná klec
Digestion system FOSS Analytical AB, Höganäs, Švédsko
Kjeltec 2300 FOSS Analytical AB, Höganäs, Švédsko

7 Pracovní postup

Originální balení hluboce zmrazených filetů vyjmeme z mrazničky.
Bezprostředně nato otevřeme obal, pokud jsou hluboce zmrazené filety glazovány, odstraníme glazuru podle SOP 1 (ze dne 3. 2. 2011).

7.1 Příprava analytického vzorku – rozmrazování

Reprezentativní vzorek filetů (min. 200 g), ze kterých byla odstraněna glazura, vložíme do dostatečně velké skleněné nádoby a necháme rozmrazit při teplotě max. +21 °C. Pomocí vpichového teploměru monitorujeme vnitřní teplotu produktu. Rozmrazování ukončíme, když se teplota produktu pohybuje mezi -1 až +2 °C.

Rozmrazování musí být prováděno ve shodě s nařízením (ES) č. 852/2004, Kapitola IX, tak, aby se minimalizovalo riziko růstu patogenních mikroorganismů nebo tvorba toxinů. Při rozmrazování musí být filety vystaveny takovým teplotám, které nevedou k ohrožení zdraví.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3

Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

7.2 Homogenizace

Rozmrazený reprezentativní vzorek filetů včetně tekutiny uvolněné v důsledku rozmrazení vložíme do vhodného homogenizátoru a zhomogenizujeme. Důležité je, aby nedošlo ke ztrátám uvolněného tekutého podílu filetu. Zhomogenizovaný vzorek se analyzuje bezprostředně nebo se do analýzy přechovává ve vzduchotěsném obalu chránícím před změnami jeho vlhkosti při teplotě chladničky. Z každého vzorku se provedou dvě stanovení.

7.3 Metoda stanovení dusíkatých látek

Do dvou mineralizačních tub o objemu 250 ml navážíme cca 1,5 g homogenizovaného vzorku s přesností na 0,00 g. K navážování používáme bezpopelový cigaretový papírek. Hmotnost vzorků zapíšeme do laboratorního protokolu. Do každé tuby se vzorkem nadávkuje 12,5 ml konc. kyseliny sírové. Tuby vložíme do mineralizační klece Digestion System.

Příprava mineralizační jednotky (Digestion system). Zapneme odtah digestoře. Jednotku napojíme na el. zásuvku. Vložíme tuby do studené mineralizační jednotky umístěné v digestoři. Do každé tuby nadávkuje nejdříve 5 ml oxidačního činidla a následovně vhodíme do každé tuby 1 ks katalyzátorové tablety.

Upozornění! Bezprostředně po aplikaci oxidačního činidla a katalyzátorové tablety dochází k uvolňování agresivních par. Digestoř musí mít zapnutý odtah (vzduchotechniku) a bezpečnostní sklo musí být staženo tak, aby byla chráněna horní polovina těla.

Po ukončení dávkování oxidačního činidla a katalyzátorových tablet nasadíme na tuby odtahovou skleněnou hlavici napojenou na vodní vývěvu. Zkontrolujeme, zda hlavice tuby dostatečně těsní. Otevřeme vodní vývěvu a zkontrolujeme intenzitu odsávání kyselých par (zda je dostatečný podtlak). Zapneme hlavní vypínač mineralizační jednotky. Nastavena je výchozí teplota mineralizace na 100 °C. Teplotu mineralizace postupně (nesmí dojít k vypěnění hnědě zabarveného obsahu tuby k jejímu okraji) zvyšujeme po hodinách o dalších 100 °C celkem 3x, poslední zvýšení teploty nastavíme na 420 °C. Při této teplotě mineralizujeme 1 až 2 hodiny do odbarvení obsahu tuby.

Poté mineralizační jednotku vypneme ze sítě, vodní vývěvu zajišťující odtah agresivních par z tub necháme zapnutou ještě další 1 hodinu. Poté zavřeme i vodní vývěvu. Mineralizační tuby vyndáváme z jednotky až po jejich dostatečném vychlazení.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3	
Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Příprava destilačně-titrační jednotky Kjeltec Analyzer Unit 2300.

Zkontrolujeme hladinu naplnění příslušných zásobních kanystrů (pro destilovanou vodu, hydroxid sodný, kyselinu boritou a směsný indikátor). Otevřeme přívod vody ke chladicí jednotce. Systém připojíme k el. zásuvce a zapneme hlavní vypínač. Necháme proběhnout autotestační cyklus analyzátoru. V ručním režimu nastavíme režim pro destilaci a titraci slepého vzorku – blanku. Vložíme čistou tubu do systému a necháme několikrát za sebou destilovat a titrovat slepý vzorek až do konstantní hodnoty spotřeby titračního činidla (pod 0,2 ml). Nastavíme na displeji hodnotu slepého vzorku-blanku pro jeho automatický odečet od spotřeby vzorků. Ruční režim přepneme na automatický režim pro destilaci a titraci vzorků zmineralizovaných v tubách.

Do systému vkládáme postupně tuby s mineralizovaným vzorkem. Pro každý nový vzorek ručně nastavujeme na displeji jeho původní navážku v g.

Cyklus se zapíná zatažením bezpečnostních dvířek. Destilace a titrace probíhá automaticky. Obsah bílkovin v g.kg⁻¹ se zobrazuje na displeji analyzátoru. Hodnoty postupně zapisujeme z displeje do pracovního protokolu.

8 Opakovatelnost

Rozdíl mezi dvěma nezávislými jednotlivými výsledky rozboru při použití téže metody, na stejném zkušebním materiálu, v téže laboratoři, při použití téhož vybavení nesmí být větší než 0,10 g dusíku na 100 g vzorku.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUP 2.3	
Aktivita 2350/KA1-2	Stanovení čisté hmotnosti a původního podílu produktu: zmrazené rybí filety
Dílčí SOP 2.3	STANOVENÍ CELKOVÉHO DUSÍKU A OBSAHU BÍLKOVIN V PRODUKTU
Registrační číslo projektu	CZ.1.07/2.2.00/15.0063
Název projektu	Inovace výuky veterinárních studijních programů v oblasti bezpečnosti potravin
Název příjemce podpory	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

9 Hodnocení

Obsah bílkovin s přesností na 0,0001 g na 100 g vzorku (nebo %) zjistíme na displeji analyzátoru.

Výpočet celkových organicky vázaných dusíkatých látek ve vzorku provedeme následovně:

Celkový dusík = obsah bílkovin : 6,25*

*empirický faktor: $100:16 = 6,25$ (bílkoviny obsahují v průměru 16% dusíku)

Pozn.

Obsah celkového dusíku ve vzorcích je rovněž možné stanovit analyticky nastavením příslušného režimu měření a vyhodnocení výsledků (% Nitrogen) v analyzátoru Kjelttec Analyzer Unit 2300.

10 Literatura

ČSN ISO 937:1978 Meat and meat products – Determination of nitrogen content (Reference method)

ČSN ISO 57 6023 Maso a masné výrobky – Stanovení obsahu dusíku (Referenční metoda)

Application Note AN 300 The determination of nitrogen according to kjeldahl using block digestion and steam distillation

2000 Digestion System User Manual, FOSS Analytical AB, Höganäs, Švédsko

2003 Kjelttec Analysator User Manual, FOSS Analytical AB, Höganäs, Švédsko