

Új koloriméteres módszer a szerves nitrogéntartalom mennyiségi meghatározására

KORPÁCZY ISTVÁN

Országos Élelmezés és Táplálkozástudományi Intézet, Budapest

Érkezett: 1957. január 4.

A szerves anyagok molekuláinak felépítésében részt vevő nitrogén mennyiségi meghatározásának klasszikus módszere *DUMAS*-tól származik. *DUMAS* módszerével minden szerves anyag nitrogén tartalma meghatározható, a meghatározások eredménye pedig annyira pontos, hogy a szerves anyagok molekuláris összetételének megállapításánál manapság is az egyetlen megbízhatónak, nélkülözhetetlennek, döntőnek tartott és elismert módszer. Dumas módszere klasszikus módszer. Lényege abban áll, hogy a vizsgálati anyagot rézoxiddal keverjük, égető csőben hevítéssel a hidrogént vízzé, a szénét széndioxiddá elégetjük és elnyeletjük, az esetleges klórt, ként, foszfort alkalmas vegyszerekkel megkötjük, az oxigént elnyeletjük és végül a nitrogént gazométeresen mérjük. Az eredeti módszer természetesen sok korszerűsítésen ment keresztül, de lényege változatlanul megmaradt. A meghatározások bonyolultsága és kényessége, a berendezés költséges volta miatt gyakorlati célokra és tömegvizsgálatok végzésére nem alkalmas.

A másik klasszikus módszer *WILL* és *WARRENTAPP* nevéhez fűződik. Lényege abban áll, hogy a szerves anyagot nátronmésszel keverjük, vörös izzáson elroncsoljuk és a keletkezett ammoniát meghatározzuk. Érdekes korszerű kiviteli módját *RÉMY* és *PITTIOT* közölte (1), de még ez is túlságosan bonyolult és költséges sorozatvizsgálatok céljaira.

Érdekes megoldást közölt legújabban *SCHÖNIGER* (2), aki magnéziumporral tárja fel a szerves anyag nitrogénjét és alakítja át ammoniává. Megfelelő berendezés birtokában eljárása igen tetszetősnek látszik.

A felsorolt eljárások a gyakorlati élet számára túlságosan bonyolultak, kényelmetlenek, időt rablók és költségesek voltak, azért nagy előrehaladást jelentett a szerves anyagok nitrogén tartalmának, így az élelmiszerek nyersfehérje tartalmának meghatározásában, amikor a 90-es években Kjeldahl kénsavas nedves roncsolási eljárását megismertette. Az azóta eltelt több mint 60 év alatt eljárásának óriási irodalma támadt, nagyszámú szerző törekedett az eljárást gyorsabbá, pontosabbá, a szerves anyagok nagyobb számú csoportjára alkalmassá tenni. *BRADSTREET* (3) csak 1939-től kezdődően 73 irodalmi hivatkozást ad meg.

E törekvések egy része arra irányult, hogy a kénsav forrás-pontjának emelésével a roncsolást gyorsabbá és teljesebbé tegyék, amit káliumszulfát, nátriumszulfát, foszforsav hozzáadásával értek el. Így KEYS (4) ajánlja 3 rész tömény kénsavhoz 1 rész 85 százalékos foszforsav adását, ez által 20 perc alatt teljes roncsolást lehet elérni, de a roncsoló keverék erősen megtámadja az üveget.

Más törekvések katalizátorok hozzáadásával gyorsítják meg a roncsolás folyamatát. A rézszulfát használatát már maga *KJELDAHL* is ajánlotta, újabban *THOMPSON* és *MORRISON* (5). Igen jó a fémhigany, vagy a merkurioxid, merkuriklorid, vagy merkuriszulfát katalizátor (végeredményben mindegyik merkuriszulfáttá alakulva vesz részt a reakció katalizálásában), azonban a keletkezett ammoniával merkuriamin komplexvegyületet képez, amit a lúg nem bont meg, ezért a komplexből a higanyt káliumszulfiddal vagy nátriumtioszulfáttal szulfid alakban le kell csapni, vagy cinkporral amalgámmá redukálni, hogy az ammonia ledesztillálható legyen. Higanyvegyületek használatát katalizátorként ajánlják többek között *HILLER*, *PLAZIN* és *VAN SLYKE* (6), *KÖRPÁCZY* (7), *MIDDLETON* és *STUCKEY* (8), *McCUTCHAN* és *RÖTH* (9), *POLLEY* (10).

Nagyon sok szerző ajánlja a szelén illetve szelénessav használatát, viszont sok szerző ellenzi, amennyiben huzamosabb hevítésnél nitrogénveszteséget okoz. Sokan ajánlják azonban keverékkatalizátorként való felhasználását. Így rézszulfáttal *BORSOOK* és *DUBNOFF* (11), *TOMPKINS* és *KIRK* (12), *SOBEL*, *MAYER* és *GOTTFRIED* (13), merkuriszulfáttal együtt *KULEN* (14), *HADORN*, *JUNGKUNZ* és *BIEFER* (15).

RAPPAPORT (16) titánhidroxidot ajánl katalizátorként, *BENCZE* (17), pedig rézszulfát és higanyzulfát keverékét, azonkívül nagyon ügyes kis készüléket is ismertet.

Nagyon sok szerző oxidáló szereket használ a roncsolás meggyorsítására, míg sok szerző tiltja használatukat nitrogénveszteség bekövetkezése miatt. Leggyakrabban a hidrogénperoxidot vagy káliumperszulfátot ajánlják akár egyedül, akár katalizátorokkal (rézszulfát, merkuriszulfát) együtt, így *BORSOOK* és *DUBNOFF* (11), *LEVY* és *PALMER* (18), *THOMPSON* és *MORRISON* (5), *HADORN*, *JUNGKUNZ* és *BIEFER* (15), *ROBINSON* és *SHELLENBERGER* (19), *KEYS* (3), *HARVEY* (20). *BEET* (21) a káliumpermanganát használatát tartja legjobbnak. Nitrátokat, nitriteket tartalmazó anyagok-

nál ferrokloriddal bontjuk el e vegyületeket a roncsolás előtt. Szerves nitro és nitrózóvegyületek roncsolására szalicilsav és nátriumtioszulfát, ill. tioszalicilsav vagy alfa-naftol és pirogallol keverékét ajánlja *McCUTCHAN* és *ROTH* (9), illetőleg *BRADSTREET* (4).

Ez a hiányos felsorolás is mutatja, hogy még mindig a legellentmondóbb nézetek uralkodnak a Kje dahl szerinti roncsolás leghelyesebb és legpontosabb eredményeket adó kivitelési módját illetően. Ezért elhatároztam, hogy összehasonlító kísérletekkel döntöm el, melyik bizonyul használhatónak új koloriméteres nitrogén meghatározási módszeremmel kapcsolatban. Már előzetes számítások is azt mutatták, hogy a kénsav forráspontjának emelésére csakis nátriumszulfát alkalmazása jöhet tekintetbe, az is csak korlátozott mennyiségben, hogy a 40—50 térfogat százalék alkoholt tartalmazó reakcióelegyben oldható maradjon. Foszforsav nem használható, mert nagy mértékben emelné a semlegesítésre szükséges nátronlúg mennyiségét és a Kjeldahl-lombikokat is nagyon erősen megmarja. A szelénnel való kísérletezéstől a sok ellentmondó irodalmi adat hatására lemondtam és így csak rézszulfáttal, merkuriszulfáttal, hidrogénperoxiddal és káliumpermanganáttal végeztem összehasonlító kísérleteket. A roncsolmányokból az ammoniát *WAGNER—PARNAS* készülékből 0,01 n kénsavba desztillálták át. Nem szándékozem e kísérleteket részletesen tárgyalni, csak az eredményeket közlöm. Ezek szerint a rézszulfátos és a merkuriszulfátos roncsolás egymással nagyon jól megegyező eredményeket adott, az eltérés köztük abban állt, hogy a merkuriszulfátos roncsolás fele annyi idő alatt fejeződött be, mint a rézszulfátos. Nagyon gyorsan elroncsolta a szerves anyagot a hidrogénperoxid hozzáadásával végzett roncsolás, de nagyon jelentős (15—20 százalékos) nitrogén veszteséget okozott. Teljesen alkalmatlannak bizonyult a káliumpermanganát használata, akár száraz por, akár tömény oldat alakjában adagoltam is. Így tehát a rézszulfát és higanyszulfát katalizátorok közt kellett választanom a koloriméteres meghatározások céljára. A kísérletekből kiderült, hogy a merkuriszulfátos roncsolmányok erre a célra nem alkalmasak, csupán a rézszulfát katalizátor alkalmazásával kapott roncsolmányok használhatók koloriméteres módszerem kivitelére abban az esetben, ha mind az extinkciós koefficiens meghatározásra az ammonszulfát törzsoldatokat, mind pedig a vakpróba oldatokat legalább is megközelítőleg ugyanakkora rézszulfát, nátriumszulfát és kénsav koncentrá-

cióra állítjuk be, mint amekkora a roncsolmányokban szerepel. Ezért szükséges a roncsolást szigorúan a következő előírás betartása mellett végezni, hogy a Kjeldahl-desztillálási eljárással megegyező pontosságú eredményeket kapjunk.

Szükséges vegyszerek és oldatok. 1.) Vegytiszta tömény kénsav. 2.) Vegytiszta vízmentes nátriumsulfát poritva. 3.) Vegytiszta kristályos rézszulfát, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ poritva. 4.) 1 százalékos Folin kémszer oldat; 5.) 0,25 százalékos fenolftalein oldat; 6.) 0,1 n nátriumhidroxid oldat; 7.) kb. 2 n nátriumhidroxid oldat; 8.) 4 százalékos borax oldat; 9.) savas formalin oldat; 10.) 0,1 nátriumtiosulfát oldat; 11.) 95—96 térfogat százalékos etanol vagy metanol; ezen kémszerek teljesen módszeren előírásai szerint (22) készüljenek. 12.) Ammonszulfát törzsoldat: 4,720 g vegytiszta, száraz ammonszulfátot, 2,00 g rézszulfátot és 20,0 g nátriumsulfátot kb. 500 ml ammoniamentes desztillált vízben oldunk, 100 ml kénsavat adunk hozzá és lehűtés után 20 C°-on ammoniamentes desztillált vízzel pontosan 1 l-re feltöltjük. Ez oldat minden ml-e 1,000 mg nitrogént tartalmaz. Ebből az oldatból mérünk ki pontosan mikropipettával 0,05—0,10 ml-t vagy megfelelő mértékben hígítjuk ammoniamentes desztillált vízzel az extinkciós viszonyszám meghatározására, amikor is a bemérések pontosabbak lehetnek. 13.) Vakpróba törzsoldat az extinkciós viszonyszám meghatározásához: 2,00 g rézszulfátot, 20,0 g nátriumsulfátot és 100 ml kénsavat az előbb leírt módon ammoniamentes desztillált vízzel pontosan 1 l-re oldunk. Ezt az oldatot, illetve megfelelő mértékű hígításait használjuk. 14.) Ammoniamentes desztillált víz; a módszer előírása (22) szerint készítjük és tartjuk el.

Szükséges felszerelés: A módszernél (22) 1.)—8.) pontban leírt felszerelésen kívül szükségesek még: 9.) cigarettapapíros, vagy kb. hasonló nagyságúra vágott selyempapíros. 10.) Kis átmérőjű üvegyöngy. 11.) 100 ml-es Kjeldahl-lombikok Ergon, vagy Duran üvegből. 12.) Roncsolóállvány Bunsen égőkkel felszerelve. 13.) Jó huzatu vegyi fülke.

A roncsolás kivitele. A szükséges számú cigarettapapírost finom olló segítségével analitikai mérlegen pontosan egyező súlyuakra vágjuk; az egyik darab lesz a roncsolási vakpróba tárgya, a többiek a vizsgálandó, lehetőleg finomra aprított anyagokat mérjük le és becsomagolva a Kjeldahl-lombikokba dobjuk őket. Folyékony anyagokat előre lemért kis vékonyfalú ampullákba (amilyeneket magunk is könnyen készíthetünk) szívunk fel, leforrasztjuk, kihűlés után lemérjük, a Kjeldahl lombikba dobjuk és erős rázással összetörjük. A minták tömege

akkora legyen, hogy közel 10 mg nitrogén legyen jelen bennük. Ezután minden lombikba 200 mg. rézszulfátot, majd 2,00 g nátriumszulfátot adunk be hosszúszerű üvegtölcsér segítségével, savpipettával 10,0 ml kénsavat mérünk hozzájuk, 2 üvegyöngyöt is beledobunk és ismeretes módon tökéletesen elroncsoljuk, a világoskék szín elérése után még negyed óráig mérsékelt forraljuk. Ezután lehűlni hagyjuk, kb. 90 C°-ra, kis részletekben hozzáadott ammoniamentes vízzel kb. 50 ml-re felhígítjuk, 100 ml-es mérőlombikba gondosan átmoszuk, majd 20 C°-on jelig feltöltjük. Teljesen ugyanígy és egyidejűleg roncsoljuk el a vakpróba részére féltett papírost és készítjük el roncsolmányát. Minthogy aránylag csekély mennyiségű szerves anyagról van szó, a roncsolás 1—2 óra alatt be szokott fejeződni. A katalizátorok bemérését meggyorsíthatjuk, ha előre elkészítjük 2000 mg nátriumszulfát és 200 mg rézszulfát sokszorosának, pl. 100-szorosának, keverékét porcellánmozsárban való gondos eldörzsölésével; ekkor egy meghatározáshoz 2200 mg-ot mérünk be a lombikba. Sőt üvegsóból mércét is készíthetünk e mennyiség le mérésére. Természetesen a vakpróba-hoz és extinkciós viszonyszámhoz is ezt használjuk. A katalizátor keveréket jól záró üvegdugós porüvegben nedvességtől óvva tartjuk el.

A szín kifejllesztése és a meghatározás kivitele teljesen úgy történik, amint azt az ammónia meghatározására szolgáló koloriméteres módszeremnél leírtam (22) Egyetlen eltérés csupán az, hogy az extinkciós viszonyszámot a rézszulfátos törzsoldatból vagy hígítmányból határozzuk meg a rézszulfátos vakpróbával vagy ugyanolyan mértékű hígítmányával szemben. A vizsgálati anyagok roncsolmányainak extinkcióját a roncsolási vakpróbával szemben olvassuk le. Miután a roncsolmány nitrogéntartalmát előzetesen nem ismerjük, ajánlatos 0,50 és 1,00 ml-es részlegeiből kiindulva végezni az előmeghatározást. Ha kiderül hogy a roncsolmány túl sok nitrogént tartalmaz, akkor ajánlatos az eredeti roncsolmányból 10,0 ml-t pontosan 100 ml-re hígítva elvégezni a meghatározást. Az extinkciós viszonyszámot a rézszulfát jelenléte befolyásolja, (így például a rézszulfátos törzsoldat esetében 0,0959 mikrogram volt az extinkciós viszonyszám) azért mindig a meghatározásnak megfelelő koncentrációjú rézszulfátos standard oldattal kell meghatározni a kérdéses extinkciós viszonyszámot. Ezért kell a megadott roncsolási előírást betartani, a nátriumszulfát és rézszulfát mennyiségét minden lombik számára legalábbis cg-nyi pontossággal külön-külön lemérni és beleadni.

Az eljárás pontosságának és megbízhatóságának bemutatására közlöm néhány nitrogén tartalmú anyag meghatározásának eredményét. A leírt módon történt elroncsolás után a roncsolmányokból az ammóniát egyrészt WAGNER—PARNAS készülékből 0,01 n kénsavba ledesztillálással, másrészt új koloriméteres módszeremmel határoztam meg. Az egyes eredmények 3 párhuzamos meghatározás középértékét jelentik.

Anyag	Nitrogéntartalom %		Eltérés %
	desztillálással	koloriméteresen	
Kereskedelmi kazein ...	14,51	14,30	—1,45
Casamin	12,16	12,13	—0,24
Szárított kalács.....	2,34	2,36	+0,87
Karbamid	46,47	46,91	+0,36

Amint látható, a megegyezés igen jó.

Ezúton is köszönetet mondok ASBÓTH Károlyné, GYŐRI Jenőné és BERGOVITS Erzsébet asszisztenseknek a nitrogén tartalom desztillációs úton végzett meghatározásával nyújtott segítségükért.

IRODALOM

- (1) Rémy, I. és Pitiot, J: Bull. Soc. Chim. Biol. 33. 405. 1951.
- (2) Schöniger, W: Mikrochim. Acta, 44—48. 1955.
- (3) Bradstreet, R. B: Anal chem. 26. 185. 1954.
- (4) Keys, A: J. Biol. Ch. 132. 181. 1940.
- (5) Thompson, J. F., és Morrison G. R: Anal. Chem. 23. 1153. 1951.
- (6) Hiller, J., Plazin, R. és Van Slyke, D. D: J. Biol. Ch. 176. 1401. 1948.
- (7) Korpáczy, I: Nem közölt jodométeres módszerében.
- (8) Middleton, H. és Stuckey, P. W: Idézve BRADSTREET cikke alapján (3). Zschr. anal. Ch. 137. 377. 1953.
- (9) Mc Cutchan, P., és Roth, W. F: Anal Chem. 24. 369. 1952.
- (10) Polley, R: Anal. Chem. 26. 1523. 1954.
- (11) Borsook, H. és Dubnoff: J. Biol. Ch. 142. 977. 1942.
- (12) Tomkins, E. és Kirk, P.: J. Biol. Ch. 142. 977. 1942.
- (13) Sobel, A. E., Mayer, A. M. és Gottfried, S. P: J. Biol. Ch. 156. 355. 1944.
- (14) Kulen, M. J: Gigena i Sanit. 11. füz. 39. 1949.
- (15) Hadorn, H., Jungkunz, R. és Biejer K. W: Mitteil. 44. 14. 1953.
- (16) Rappaport, F: Mikroch. 14. 49. 1933/4.

- (17) *Bencze, B*: *Angew. Chem.* 129. 126. 1949.
 (18) *Levy, M. és Palmer, A*: *J. Biol. Ch.* 136. 57. 1940.
 (19) *Robinson, F., és Shellenberger, J*: *Ind. Eng. Ch. An. Ed.* 4. 243 1932.
 (20) *Harvey, H. W*: *Analyst*, 76. 657. 1951.
 (21) *Beel, A. E*: *Anal. Chem.* 27. 1035. 1955.
 (22) *Korpáczy, I*: *Élelmiszervizsgálóti Közl.* III. 55. 1957.

EINE NEUE KOLORIMETRISCHE METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DES ORGANISCHEN NITROGENGEHALTES

I. Korpáczy

Verfasser berichtet über seine Versuche um sein neues kolorimetrisches Verfahren zur Bestimmung des Ammoniaks auf Kjeldahl'sche Digestionsmischungen zu übertragen. Nur das Digerieren der organischen Verbindungen mit Kupfersulfat als Katalysator und Natriumsulfat als Siedepunkterhöher hat sich bewährt. Das erwähnte kolorimetrische Verfahren kann ohne jede Änderung benutzt werden, nur der Extinktionsfaktor soll mit einer Standardlösung bestimmt werden, welche eine ähnliche Konzentration an Natriumsulfat, Kupfersulfat und Schwefelsäure haben muss, wie die betreffende Digestionsmischung. Diese Forderung aber ist leicht erfüllbar.

UNE NOUVELLE MÉTHODE POUR LE DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU CONTENT EN AZOTE ORGANIQUE

I. Korpáczy

L'auteur a fait beaucoup des experiments pour adopter sa nouvelle méthode colorimétrique du dosage de l'ammoniac aux digestion-mixtures selon Kjeldahl. La digestion avec les sulfates de sodium et cuivre comme catalyseurs se présente comme satisfaisante. Dans telles digestion-mixtures la nouvelle méthode de l'auteur se laisse appliquer sans aucune altération. Seul l'indice d'extinction est à déterminer avec une standard solution de sulfate d'ammonium contenant les sulfates de sodium, cuivre et l'acide sulfurique en proportions égales à la digestion-mixture elle-même. Mais cette condition est facilement remplie.

A NEW COLORIMETRIC METHOD FOR ESTIMATING THE ORGANIC NITROGEN CONTENT

I. Korpáczy

Author describes his many experiments to find the way of adopting his new colorimetric method to estimate the ammoniac content of ammoniacal salts to check the nitrogen content of Kjeldahl-digests. He succeeded in stating that digestion with sodiumsulfate and copper-sulfate as catalysts gives a solution available for applying his method. There is no need of any alterations, the standard ammoniumsulfate solution only is to be prepared in such a way that it should contain sodiumsulfate, copper-sulfate and sulfuric acid in the same proportions like the digest in question. But this is not at all difficult to fulfill.