	Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20150.2 – Stanovení obsahu amidického dusíku spektrofotometricky	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU AMIDICKÉHO DUSÍKU SPEKTROFOTOMETRICKY

1 Rozsah a účel

Metoda je určena pro stanovení obsahu amidického (močovinnového) dusíku ve výluzích jednosložkových i vícenosložkových hnojiv a vzorků hnojiv s komplikovanou maticí.

2 Princip

Močovina reaguje v kyselém prostředí s 4-dimethylaminobenzaldehydem za vzniku žlutě zbarveného kondenzačního produktu, jehož absorbance se měří při vlnové délce 435 nm.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.


- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Kyselina chlorovodíková, HCl, koncentrovaná, $\rho = 1,19 \text{ g/cm}^3$.
- 3 4-dimethylaminobenzaldehyd, roztok $c = 1,6 \%$ (w/v).

Příprava: Do vhodné skleněné nádoby se naváží ($1,6 \pm 0,001$) g 4-dimethylaminobenzaldehydu, rozpustí se ve 100 ml vody (1). Poté se přidá 10 ml kyseliny chlorovodíkové (2) a roztok se důkladně promíchá. Při uchování v chladu a temnu je roztok stálý po dobu jednoho měsíce.

- 4 Močovina, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$.
- 5 Základní standardní roztok, močoviny $c(\text{CO}(\text{NH}_2)_2) = 2,5 \text{ g/l}$.

Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží ($2,5 \pm 0,0002$) g močoviny (4) vysušené 2 h při ($65 - 70$) °C a přidá se 500 ml vody (1). Po rozpuštění se odměrná baňka doplní vodou (1) po značku a pečlivě protřepe. Při uchování v chladu a temnu ve skleněné lahvi je roztok stálý dva měsíce.

- 6 Močovina, roztok, $c(\text{CO}(\text{NH}_2)_2) = 500 \text{ mg/l}$.
Příprava: Do 1000ml odměrné baňky se naváží ($0,5 \pm 0,0002$) g močoviny (4) a přidá se 500 ml vody (1). Po rozpuštění se odměrná baňka doplní vodou (1) po značku a pečlivě protřepe. Při uchování v chladu a temnu ve skleněné lahvi je roztok stálý dva měsíce.
- 7 Aktivní uhlí práškové.

	Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20150.2 – Stanovení obsahu amidického dusíku spektrofotometricky	Revize	1

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 2 Rotační třepačka.
- 3 Spektrofotometr s příslušenstvím.
- 4 Automatická pipeta, (100 – 5000) μ l.
- 5 Orbitální minitřepačka.
- 6 Filtrační papír vysoké hustoty.

5 Postup

5.1 Kalibrační křivka


Do 50ml odměrných baněk se pipetuje objem základního standardního roztoku (5) uvedený v tabulce č. 1. Objem baňky se doplní vodou (1) po značku a pečlivě se promíchá

Tabulka č. 1. Příprava kalibračních roztoků.

Kalibrační bod	Objem základního standardního roztoku (5) (ml)	$c(\text{CO}(\text{NH}_2)_2)$ (mg/l)
0	0	0
1	0,4	20
2	1	50
3	2	100
4	3	150
5	4	200
6	5	250

5.1.1 Příprava kalibrační křivky k měření

Do 25ml zkumavek se pipetuje 5 ml z každého kalibračního roztoku (viz tabulka č. 1), přidá se 0,5 ml roztoku močoviny (6) a poté 5 ml roztoku 4-dimethylaminobenzaldehydu (3). Roztok se ve zkumavce pečlivě promíchá např. pomocí orbitální minitřepačky a nechá se 15 min stát.

	Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20150.2 – Stanovení obsahu amidického dusíku spektrofotometricky	Revize	1

5.2 Příprava výluhu vzorku

Do 250ml Stohmannovy baňky se naváží 0,5 g vzorku s přesností na 4 desetinná místa a 1 g aktivního uhlí (7). Přidá se asi 150 ml vody (1), baňka se uzavře silikonovou zátkou a roztok se 1 h třepě na rotační třepačce. Po ukončení třepání se obsah baňky doplní vodou (1) po značku a pečlivě promíchá. Roztok se filtruje přes filtr vysoké hustoty do vhodné nádoby. První podíl asi 50 ml filtrátu se nepoužije.

Zároveň s výluhem vzorku se stejným postupem připraví slepý pokus, ale bez navážky vzorku a vhodné IRM.

5.2.1 Příprava výluhu vzorku k měření

Do 25ml zkumavky se pipetuje objem filtrátu vzorku v závislosti na obsahu močoviny tak, aby celkový objem dosáhl 5 ml podle údajů v tabulce č. 2

Tabulka č. 2. Příprava vzorků k měření.

Deklarované obsahy dusíku ve vzorku (%)	Ředění (x)	Objem pipetovaného vzorku (ml)	Objem přidané H ₂ O (ml)
0,2 – 4	1	5	0
4,1 – 9,9	2	2,5	2,5
10 – 20	5	1	4
20,1 – 46,6	10	0,5	4,5


Do zkumavky se vzorkem se přidá 0,5 ml roztoku s močovinou (6) a poté 5 ml roztoku 4- dimethylaminobenzaldehydu (3). Roztok se ve zkumavce pečlivě promíchá např. pomocí orbitální minitřepačky a nechá se 15 min stát.

Poznámky

1 *Pro přípravu vzorku k měření je možné použít 5 ml předem naředěného vzorku.*

5.3 Měření obsahu močovinného dusíku

Po ukončení 15 minutové vybarvovací reakce se začne měřit na spektrofotometru. Přístroj se nastaví podle doporučení výrobce. Změří se absorbance kalibračních roztoků (5.1) a poté se změří absorbance slepého pokusu i vzorků (5.2). Měří se v kyvetě o optické délce 10 mm a při vlnové délce procházejícího světla $\lambda = 435$ nm. Software přístroje vyhodnotí výsledky metodou kalibrační křivky. Výsledek je vyjádřený v mg/l.

	Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	1
	20150.2 – Stanovení obsahu amidického dusíku spektrofotometricky	Revize	1

Poznámky

- Měřit se může manuálně nebo s použitím průtokové kyvety. Použití kyvety s delší optickou dráhou je třeba ověřit.
- Přídavkem konstantního objemu roztoku močoviny (6) ke vzorkům a roztokům kalibrační křivky se zlepšuje průběh kalibrační křivky a dosáhne se nižších mezí stanovitelnosti.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah močovinného dusíku vyjádřený hmotnostním zlomkem v procentech w_N jako N se vypočte podle vztahu

$$w_N = \frac{(c_{vz} - c_s) \times V \times V_1 \times 0,4665}{m \times a \times 10000} \quad (\%)$$

kde

- V je celkový objem zásobního roztoku vzorku v ml,
- V_1 konečný objem vzorku k vlastnímu měření v ml,
- a objem použitého alikvotního podílu z celkového zásobního roztoku (V) v ml,
- m hmotnost navážky vzorku v g,
- c_{vz} obsah močoviny ve vzorku v mg/l,
- c_s obsah močoviny ve slepém pokusu v mg/l,
- 0,4665 koeficient pro přepočítání $\text{CO}(\text{NH}_2)_2/\text{N}$.

Poznámky

- Pokud koncentrace močovinného dusíku v roztoku slepého pokusu nepřesáhne mez stanovitelnosti, může se hodnota c_s ve výpočtu zanedbat.
- Metodu lze použít pouze při použití spektrofotometru s velmi kvalitní optikou, která umožňuje měření v nízkých absorbancích se zachováním nízké hladiny šumu.
- Metoda je zatížena menším vlivem interferentů v důsledku vysokého naředění měřeného vzorku.

7 Literatura

- Příloha č. 2 vyhlášky 309/2021 Sb., ve znění pozdějších předpisů, postup 2.7.1.
- Rypl, V., Žalmanová, A., Tůmová, L., Turnvaldová, R.: Závěrečná zpráva vývojového úkolu č. 20.01/2020 Optimalizace metody stanovení močovinného dusíku spektrofotometricky.

Schválil: RNDr. Jiří Zbírál, Ph.D., ředitel NRL
Platné od: 20. 9. 2023