	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20151.1 - Stanovení obsahu biuretu v močovině spektrofotometricky	Revize	1

STANOVENÍ OBSAHU BIURETU V MOČOVINĚ SPEKTROFOTOMETRICKY

1 Rozsah a účel

Postup je určen pro stanovení obsahu biuretu v extraktech vzorků močoviny a hnojiv, jejichž základem je močovina.


2 Princip

Biuret tvoří v alkalickém prostředí za přítomnosti vinanu draselno sodného s dvojmocnou mědí modro-fialový vodorozpustný komplex, jehož absorbance se měří při vlnové délce 546 nm.


3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).
- 2 Hydroxid sodný, NaOH.
- 3 Vinan draselno-sodný, tetrahydrát, $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.
- 4 Vinan draselno-sodný, tetrahydrát, alkalický roztok, $c(\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}) = 50 \text{ g/l}$.
 Příprava: V 800ml kádince se rozpustí 40 g hydroxidu sodného (2) v 500 ml vody (1) a nechá se zchladnout. Přidá se 50 g vinanu sodno-draselného (3), převede se kvantitativně vodou (1) do 1000ml odměrné baňky a doplní se vodou (1) po značku. Roztok se před použitím nechá 24 h stát. Roztok je stálý.
- 5 Síran měďnatý pentahydrát, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.
- 6 Síran měďnatý pentahydrát, roztok, $c(\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}) = 15 \text{ g/l}$.
 Příprava: V 1000ml kádince se rozpustí 15 g síranu měďnatého (5) v 500 ml vody (1). Roztok se doplní vodou (1) na objem 1000 ml a promíchá se. Roztok je stálý.
- 7 Biuret, $\text{NH}(\text{CONH}_2)_2$, $M = 103,08 \text{ g/mol}$.
- 8 Biuret, základní standardní roztok, $c(\text{biuret}) = 1 \text{ g/l}$.
 Příprava: Do 100ml kádinky se naváží $(0,25 \pm 0,001) \text{ g}$ biuretu (7), předem vysušeného 1 h při 105°C a rozpustí se za tepla ve vodě (1). Po vytemperování se kvantitativně převede do 250ml odměrné baňky, doplní se vodou (1) po značku a promíchá.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20151.1 - Stanovení obsahu biuretu v močovíně spektrofotometricky	Revize	1

- 9 Indikátor methylčerveně (volná kyselina), roztok, $c = 0,1 \text{ \% (m/V)}$.
 Příprava: Ve 100ml odměrné baňce se rozpustí 0,1 g methylčerveně asi v 50 ml ethanolu ($\rho = 95 \text{ \%}$), doplní ethanolem po značku a promíchá.
- 10 Hydroxid sodný, roztok, $c(\text{NaOH}) \approx 0,1 \text{ mol/l}$.
 Příprava: Do 250ml kádinky se naváží 4 g hydroxidu sodného (2), rozpustí se ve 150 ml vody (1) a po vytemperování se kvantitativně převede do 1000ml odměrné baňky, doplní vodou (1) po značku a promíchá.
- 11 Kyselina sírová, H_2SO_4 , 96%, koncentrovaná, $\rho = 1,84 \text{ g/ml}$.
- 12 Kyselina sírová, H_2SO_4 , roztok, $c(\text{H}_2\text{SO}_4) \approx 0,05 \text{ mol/l}$.
 Příprava: Do 1000ml odměrné baňky s asi 500 ml vody (1) se přidají 3 ml kyseliny sírové (11). Po vytemperování se baňka doplní vodou (1) po značku a promíchá.
- 13 Kyselina chlorovodíková, HCl , koncentrovaná, $\rho = 1,19 \text{ g/ml}$.
- 14 Kyselina chlorovodíková, HCl , roztok, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$.
 Příprava: Do 1000ml odměrné baňky, ve které je asi 500 ml vody (1), se postupně přidá 100 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové (13). Obsah baňky se vytemperuje na laboratorní teplotu, doplní vodou (1) po značku a promíchá.
- 4 Přístroje a pomůcky**
- 1 Analytické váhy s přesností 0,001 g.
- 2 Spektrofotometr se skleněnou květou 10 mm.
- 3 Vodní lázeň s regulací teploty.
- 4 Filtr střední nebo vysoké hustoty.
- 5 Skleněný filtrační kelímek, fritá S3, porozita (5 – 20) μm .
- 6 Skleněná kolona pro iontoměnič, výška 200 mm, průměr 25 mm, na spodním konci opatřená nylonovou gázou se šířkou ok 0,1 mm a zakončená úzkou výpustí s kohoutkem.
 Příprava: Kolona se naplní iontoměničem (silný katex např. Duolite C20) do výšky asi 120 mm. Před použitím kolony se musí pryskyřice nejprve regenerovat 100 ml kyseliny chlorovodíkové (přibližně 4 mol/l) a následně promýt vodou, dokud není eluent prostý kyseliny. Po každém stanovení se musí pryskyřice regenerovat. Využitelná kapacita pryskyřice musí být dostatečně velká k zachycení veškerého amoniaku. Celkový objem pryskyřice je přibližně 60 ml; využitelná kapacita je přibližně 60 miliekvivalentů.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20151.1 - Stanovení obsahu biuretu v močovině spektrofotometricky	Revize	1

5 Postup

5.1 Kalibrační křivka


Do 100ml odměrných baněk se pipetuje odpovídající množství základního standardního roztoku (8) podle tabulky 1, doplní vodou (1) přibližně na objem 50 ml, přidá se jedna kapka indikátoru (9) a je-li to nutné, neutralizuje se kyselinou sírovou (12). Za míchání se přidá 20 ml alkalického roztoku vinanu sodno-draselného (4) a poté se přidá 20 ml roztoku síranu měďnatého (6). Baňky se doplní vodou (1) po značku, promíchají a nechají stát 15 min při $(30 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

Tabulka 1. Příprava kalibračních roztoků do 100ml odměrných baněk.

Kalibrační bod	Objem základního standardního roztoku (8) (ml)	c(biuret) (mg/l)
0	0	0
1	2	20
2	5	50
3	10	100
4	20	200
5	30	300

5.2 Příprava výluhu vzorku

Do 250ml odměrné baňky se naváží přibližně 10 g vzorku s přesností 0,001 g, přidá se přibližně 200 ml vody (1) a důkladně se protřepe. Potom se obsah baňky doplní vodou (1) po značku a opět důkladně protřepe. Roztok se filtruje přes filtr střední hustoty do suché nádoby. První podíl asi 50 ml filtrátu se nepoužije. Čirý a bezbarvý filtrát se použije k dalšímu stanovení.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20151.1 - Stanovení obsahu biuretu v močovině spektrofotometricky	Revize	1

Poznámky

1 *Je-li ve vzorku přítomen síran amonný, postupuje se takto:*

Navází se přibližně 25 g vzorku s přesností 0,001 g, rozpustí se ve 250ml kádince ve 100 ml vody (1) o teplotě přibližně 70 °C. Roztok se přefiltruje přes skleněný filtrační kelímek (fritu) a filtr se promyje přibližně 50 ml vody (1). Filtrát se kvantitativně přenesse do 250ml odměrné baňky. Dále se postupuje dle bodu 5.3.

Teplota se upraví na 20 °C, doplní se vodou (1) po značku a promíchá se. Odpipetuje se 100 ml roztoku a nechá se projít přes katex při rychlosti asi 150 ml/h. Eluát se zachytí do 250ml odměrné baňky. Katex se promývá vodou (1), dokud se nezíská celkový objem přibližně 220 ml. Potom se odměrná baňka doplní vodou (1) po značku a promíchá se. Tento roztok se použije k dalšímu stanovení.

2 *Je-li přítomna jakákoli koloidní látka, mohou nastat potíže při filtraci. V tom případě se k vodě (1) při extrakci vzorku přidají 2 ml kyseliny chlorovodíkové (14) a přefiltruje se přes 2 velmi jemné filtry do 250ml odměrné baňky. Filtry se promyjí vodou a filtrát v baňce se doplní vodou (1) po značku. Dále se postupuje dle bodu 5.3.*

Zároveň s extraktem vzorku se podle potřeby připraví i slepý pokus stejným postupem, ale bez navážky vzorku.

5.3 Příprava vzorku k měření

Do 100ml odměrné baňky se dle předpokládaného obsahu pipetuje 25 ml nebo 50 ml extraktu vzorku. Je-li to nutné, neutralizuje se podle potřeby roztokem kyseliny sírové (12) nebo roztokem hydroxidu sodného (10) s využitím methylenové červeně (9) jako indikátoru. Přidá se 20 ml alkalického roztoku vinanu draselno-sodného (4), poté se přidá 20 ml roztoku síranu měďnatého (6), doplní se vodou (1) po značku a promíchá. Odměrné baňky se nechají stát 15 min při (30 ± 2) °C.

5.4 Měření obsahu biuretu


Spektrofotometr se nastaví podle doporučení výrobce. Absorbance kalibračních roztoků, slepých pokusů i vzorků se měří v kyvetě o optické délce 10 mm, při vlnové délce procházejícího světla $\lambda = 546$ nm. Výsledky se vyhodnocují metodou kalibrační křivky.

V každé sérii vzorků se provede i stanovení vhodného IRM, popřípadě slepého pokusu.

Poznámky

3 *Lze použít průtokovou kyvetu.*

4 *Obsahy biuretu ve slepých vzorcích jsou zpravidla zanedbatelné. Slepý pokus je vhodné zařazovat k ověření vnějších vlivů (nové balení chemikálií, výměna laboratorního nádobí, stabilita přístroje apod.).*

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy - zkoušení hnojiv	Vydání	2
	20151.1 - Stanovení obsahu biuretu v močovíně spektrofotometricky	Revize	1

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsahu biuretu v močovíně vyjádřený jako $\text{NH}(\text{CONH}_2)_2$ hmotnostním zlomkem v procentech w_{Biuret} se vypočte podle vztahu

$$w_{\text{Biuret}} = \frac{(c_v - c_s) \times V \times 100}{m \times a \times 1000} = \frac{(c_v - c_s) \times V}{m \times a \times 10}$$

- c_v množství biuretu ve vzorku, odečtené z kalibrační křivky v mg,
- c_s množství biuretu ve slepém pokusu, odečtené z kalibrační křivky v mg,
- V objem odměrné baňky s výluhem vzorku v ml,
- a objem alikvotního podílu výluhu použitý k spektrofotometrickému stanovení v ml,
- m hmotnost navážky vzorku v g.

Poznámky

- 5 Pokud koncentrace biuretu v roztoku slepého pokusu nepřesáhne mez stanovitelnosti, lze hodnotu c_s ve výpočtu zanedbat.

7 Literatura

- 1 Nařízení (ES) č. 2003/2003, příloha IV, postup 2.5.
- 2 ČSN EN 15479: Hnojiva – Stanovení biuretu v močovíně spektrofotometricky.