

## Современные анализаторы для определения азота методом Кьельдаля

**\*Е.А. Зауэр, А.Б. Ершов**

*Волгоградский государственный технический университет,  
Российская Федерация, 400005, г. Волгоград, пр. Ленина, 28*

*\*Адрес для переписки: Зауэр Елена Александровна, E-mail: zea1@live.ru*

Поступила в редакцию 30 января 2019 г., после исправлений – 16 апреля 2019 г.

В предлагаемом обзоре рассмотрены основные стадии определения азота методом Кьельдаля: подготовка и кислотная минерализация проб, отгонка и различные варианты (химические и инструментальные) определения аммиака, выделившегося после обработки продуктов минерализации щелочью. Приведены новые технические решения последних лет по совершенствованию и автоматизации отдельных стадий анализа: применение блочных и ИК-дигесторов, существенно повысивших эффективность минерализации образцов и снизивших ее длительность; использование автоматических подъемников минерализованных проб, максимально сокративших работу оператора с тяжелыми пробами и горячими химическими веществами; автосемплеров, обеспечивающих автоматическую передачу минерализованных проб в дистиллятор; автоматизация процессов дистилляции и титрования; использование программного обеспечения для обработки результатов анализа. Систематизированы технические характеристики основных узлов автоматических анализаторов для определения азота методом Кьельдаля – дигесторов, дистилляторов и титраторов, выпускаемых такими известными фирмами, как Vuchi (Швейцария), C. Gerhardt, Behr Labor-Technik GmbH и FoodALYT GmbH (Германия), Foss Tecator (Дания, Швеция), VELP Scientifica (Италия), J.P.Selecta (Испания), Hanon Instruments (Китай), ООО ВПК Сибгагроприбор и ООО «Вилитек» (Россия). Также приведены данные об основных аналитических характеристиках анализаторов: числе и объеме пробирок (колб), времени минерализации, дистилляции и анализа; массе (объеме) пробы, нижнем пределе обнаружения азота.

**Ключевые слова:** метод Кьельдаля, кислотная минерализация, отгонка и определение аммиака, автоматический анализатор азота.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2019, vol. 23, no. 2, pp. 168-192

DOI: 10.15826/analitika.2019.23.2.002

## Modern analyzers for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method

**\*E.A. Zauer, A.B. Ershov**

*Volgograd State Technical University, pr. Lenina, 28, Volgograd, 400005, Russian Federation*

*\*Corresponding author: Elena A. Zauer, E-mail: zea1@live.ru*

Submitted 30 January 2019, received in revised form 16 April 2019

Current review covers all main stages of the quantitative determination of nitrogen by the Kjeldahl method: preparation and acid mineralization of samples, distillation, and various chemical and instrumental options for determining the ammonia released after the treatment of mineralization products with alkali. The review also describes the latest technical solutions used to improve and automate certain stages of analysis such as the usage of block and IR digesters that significantly increases the efficiency of sample mineralization and reduces its duration; the usage of automatic lifts for the mineralized samples, which reduces the work of the operator with the heavy and hot chemical samples as much as possible; the usage of autosampler, which provides the automatic transfer of mineralized samples to the distiller; the automation of distillation and titration processes; the use of software for processing the analysis results. The following technical characteristics of the basic components of automatic analyzers for the nitrogen determination

by the Kjeldahl method are systematized: digesters, distillers, and titrators produced by such well-known companies as Buchi (Switzerland), C. Gerhardt, Behr Labor-Technik GmbH and FoodALYT GmbH (Germany), Foss Tecator (Denmark, Sweden), VELP Scientifica (Italy), J.P.Selecta (Spain), Hanon Instruments (China), ООО VPK Sibagropribor and ООО Vilitek (Russia). The data on the characteristics of the analyzers is also provided and includes the number and volume of test tubes (flasks), the time of mineralization, distillation and analysis, mass (volume) of the sample, and the lower limit of nitrogen detection.

**Keywords:** Kjeldahl method, acid mineralization, distillation and quantitative determination of ammonia, automatic nitrogen analyzer.

## Введение

135 лет назад датский химик Йохан Кьельдаля разработал метод определения азота в органических веществах [1], до сих пор широко используемый в пищевой [2] и сельскохозяйственной [3] промышленности, в клинической химии [4], в анализе почв [5, 6], удобрений [7], поверхностных и сточных вод [8].

За годы, прошедшие с момента появления, метод Кьельдаля существенно эволюционировал. Свидетельством этого является большое количество публикаций, достаточно подробно освещающих становление, основные этапы развития и современное состояние определения азота методом Кьельдаля. Это обзорные статьи [9-15], монографии [16, 17]. Большое число статей посвящено вопросам модификации отдельных стадий метода. Например, основные этапы эволюции процесса минерализации рассматриваются в работе [18]. Критический анализ использования ионной хроматографии для определения, в том числе, ионов  $\text{NH}_4^+$  в воде, сточных водах, воздухе, продуктах питания и других сложных матричных образцах дан в обзоре [19].

В предлагаемом обзоре, наряду с обсуждением общих вопросов определения азота методом Кьельдаля, уделяется внимание и новым техническим решениям последних лет, связанным с совершенствованием и автоматизацией анализа, приводятся основные технические и аналитические характеристики автоматических анализаторов, выпускаемых такими известными фирмами, как Buchi (Швейцария), C. Gerhardt, Behr Labor-Technik GmbH и FoodALYT GmbH (Германия), Foss Tecator (Дания, Швеция), VELP Scientifica (Италия), J.P.Selecta (Испания), Hanon Instruments (Китай), MRC (Израиль), ООО ВПК Сибагроприбор и ООО «Вилитек» (Россия) [20-37].

Метод Кьельдаля состоит из 4 основных стадий: 1) минерализация образца; 2) превращение сульфата аммония в свободный аммиак; 3) дистилляция аммиака и 4) титрование. Реализуют метод Кьельдаля как в ручном, так и в автоматическом варианте. Последний особенно актуален при выполнении больших объемов анализов – для его проведения используют анализаторы азота с различной степенью автоматизации. Далее будут рассмотрены все стадии определения азота методом Кьельдаля – от подготовки и взвешивания пробы до расчета массовой доли азота – как с позиции их совершенствования, так и с позиции реализации в автоматических анализаторах.

## 1. ПОДГОТОВКА, ВЗВЕШИВАНИЕ И КИСЛОТНАЯ МИНЕРАЛИЗАЦИЯ ПРОБ

### 1.1. Подготовка и взвешивание проб

Ранее уже отмечалось, что объектами анализа методом Кьельдаля могут быть растения, злаки, семена масличных культур, продукты питания, образцы экологического и биологического происхождения, почвы и удобрения.

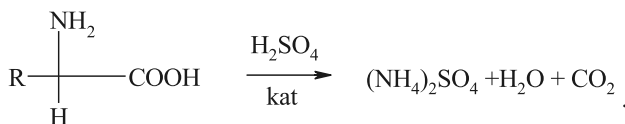
Для уменьшения объема пробы, повышения скорости минерализации и получения точных и воспроизводимых результатов анализа необходима тщательная подготовка пробы, обеспечивающая ее однородность. Размер частиц в анализируемых образцах не должен превышать 1 мм. Измельчение твердых проб проводят с помощью лабораторных мельниц: Hammertec™ и СТ 293 Cyclotec™, Knifetec, Cemotec™ [38, 13] фирмы Foss, мельниц марки МЛРП-1 и МРП-2 (для измельчения растительных проб) [39]. Пластичные пробы измельчают с помощью гомогенизаторов: НМ 294, НМ 297 и НМ 302 производства компании НТ Machinery (Япония-Тайвань) [40], В-400 фирмы Buchi.

Перед взвешиванием пробы высушивают или определяют точное содержание в них влаги с помощью титраторов Карла Фишера или термовиметрических анализаторов (таких как KERN MRS 120-3 или его аналогов, имеющих погрешность на уровне 0.05-0.1 %). Взвешивают навеску на аналитических весах с точностью 0.001 г, используя «лодочки» из растворяемой пергаментной бумаги, не содержащей азот, фирм Whatman и ALBET® LabScience (Германия) [41], Company BDL (Чехия) [42], C. Gerhardt (Германия) [21, 22].

После взвешивания навеску вместе с «лодочкой» помещают в колбу (или пробирку) Кьельдаля: лодочка растворяется в гидролизном растворе без остатка и не влияет на результат анализа. Это позволяет без потерь перенести пробу в колбу с кислотным раствором.

### 1.2. Кислотная минерализация проб

Процедура минерализации (мокрого озоления) образца необходима для перевода органического азота в сульфат аммония. Ее проводят нагреванием в концентрированной серной кислоте в присутствии катализатора (kat):



Для сохранения  $\text{NH}_3$  в виде  $\text{NH}_4^+$  в минерализате должны содержаться остаточные количества серной кислоты.

Минерализация является самой трудоемкой и продолжительной стадией в анализе азота по Кьельдалю: для ее осуществления в классическом варианте метода обычно требуется от одного до нескольких часов. Длительность минерализации зависит от таких факторов как тип образца, катализатор, окислитель, количество кислоты ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), соли ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) и их соотношение, температура процесса разложения.

Для увеличения скорости и эффективности кислотной минерализации необходимо использование катализаторов. Первым поиском катализаторов начал Уилфарт [43, 44]. Он расположил изученные им оксиды семи металлов по относительной эффективности в ряд – ртуть, медь, железо, олово, марганец, висмут и свинец, установив тем самым, что лучшим катализатором является ртуть, а затем медь. Однако применение ртути приводило к образованию нелетучих аминов на стадии дистилляции, поэтому предпочтение было отдано использованию меди, несмотря на меньшую скорость минерализации в ее присутствии. Позже Эштон [45] установил, что нелетучие амины можно легко разрушить добавлением сульфида натрия или тиосульфата натрия перед перегонкой. Среди медных катализаторов наиболее эффективным и экологически безопасным оказался сульфат меди [13, 46].

Работы по поиску катализатора на этом не были остановлены. В 1920 г. Фелпс и Даудт [47, 15], изучая определение азота в тугоплавких органических соединениях, в качестве катализаторов применяли соединения ртути, меди, никеля, цинка, марганца, вольфрама, молибдена, титана и ванадия. В 1931 году Лауро [48] предложил использовать селен, получивший широкое признание сегодня. В 1935 году Осборн и Уилки [49] исследовали применимость для этих целей 39 элементов. В результате был сформирован ряд эффективности металлоксидных катализаторов

$\text{Hg} > \text{Se} > \text{Te} > \text{Ti} > \text{Mo} > \text{Fe} > \text{Cu} > \text{V} > \text{W} > \text{Ag}$ ,  
вновь подтвердивший первенство ртути.

Значительно позже Бейкер [50] провел детальное исследование: он изучил 15 индивидуальных (соединений селена, меди, ртути, ванадия, теллура, хрома, железа, платины, молибдена) и 6 смешанных катализаторов (соединений ртути и селена; ртути и меди; селена и меди; ванадия и селена; ртути и теллура; ртути, селена и меди) на предмет их использования для кислотной минерализации. Ртуть в очередной раз была признана лучшим катализатором. Однако высокая стоимость, проблемы удаления, связанные с ее токсичностью и требованием ее полного

осаждения в виде сульфида, а также введенный в 1990-х годах запрет на использование ртути, привели к практически полному отказу от ее дальнейшего применения и замене другими катализаторами [13].

Селеновые катализаторы (в элементарном виде, в виде диоксида  $\text{SeO}_2$ , оксихлорида  $\text{SeOCl}_2$ , селената натрия  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  и др.) [51] используются для минерализации веществ, устойчивых к разложению (таких, например, как пиридин, хинолин, никотиновая кислота). Сравнение каталитической эффективности селена и сульфата меди, проведенное Эштоном [45], показало, что при одинаковом содержании общего азота результат анализа с селеном достигался примерно на 90 минут раньше, чем с сульфатом меди. Рич [52] отметил сокращение времени определения общего белка примерно вдвое при использовании смеси оксихлорида селена и меди по сравнению с индивидуальным медным катализатором. Авторы работы [53] из двух селеновых катализаторов – селена и его оксихлорида – предпочтение отдали элементарному селену. Отмечается также, что при введении больших количеств селенового катализатора (более 0.25 г) и длительном расщеплении возрастают потери азота. Потери могут начаться при температуре  $\sim 390^\circ\text{C}$  [13].

Диоксид титана  $\text{TiO}_2$ , занимающий четвертое место в ряду металлоксидных катализаторов, нетоксичен и может безопасно вводиться в достаточном количестве. Его применяют в смеси с экологически чистым сульфатом меди. Сокращение времени разложения неочищенного белка в кормах для животных до 40 минут при использовании титанового катализатора с  $\text{CuSO}_4$  и со смесью  $\text{CuSO}_4$  и селена отмечал в своих работах Кейн П.Ф. [54, 55].

В работе [56] в качестве альтернативного катализатора исследованы соединения циркония –  $\text{ZrO}_2$ ,  $\text{Zr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Сульфат циркония и в чистом виде, и в сочетании с сульфатом меди оказался не более эффективен, чем сам сульфат меди.

В настоящее время для интенсификации процесса минерализации по Кьельдалю используют медные, медно-селеновые или медно-титановые катализаторы [12, 13, 57].

На скорость кислотного разрушения образца, помимо катализатора, влияет и температура обработки: чем она выше, тем меньше времени уходит на разложение образца. При использовании серной кислоты температура минерализации ограничивается, главным образом, ее точкой кипения ( $338^\circ\text{C}$ ). Для повышения температуры кипения кислоты и обеспечения полного разложения образца добавляется соль. Обычно это сульфат калия  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ; при введении сульфата натрия  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  температура кипения смеси ниже на  $7^\circ\text{C}$  [50]. При добавлении 1 г сульфата калия на 1 мл серной кислоты температура увеличивается с  $332^\circ\text{C}$  до  $371^\circ\text{C}$  [18].

Добавление сульфата калия первым предложил Ганнинг [58]: он рекомендовал использование «одной части соли на две части кислоты», т.е. 0.9 г соли на 1.0

мл [50]. Серная кислота расходуется на разрушение образца, часть потребляется использованными реагентами, и часть испаряется во время кипения [13]. Поэтому серную кислоту смешивают с сульфатом калия в соотношении 1.4 : 1 или 2 : 1 (мл / г). Большое количество соли может повысить температуру выше 420 °С, при которой начинается пиролизическая потеря азота в виде  $N_2$  [59]. Обычно один грамм твердого образца смешивают с 10–12 мл серной кислоты и ~7 г  $K_2SO_4$ . Потребление серной кислоты (мл) на один грамм органического образца согласно [13] составляет: для жиров ~ 9.4, для белков ~ 4.9, для углеводов ~ 4.0.

Увеличения скорости разложения образцов и соответственно сокращения времени минерализации можно добиться также сочетанием серной кислоты с другими окислителями. В классическом варианте метода Кьельдаля для этих целей применялся порошкообразный перманганат калия [43]. Однако это приводило к потерям азота. Не дали какого-либо положительного результата попытки применить  $V_2O_5$ ,  $CrO_3$  и  $MnO_2$ , а в больших количествах их добавление приводило к прямо противоположному эффекту [60].

На сегодняшний день наиболее широко используемыми окислителями являются персульфат калия и пероксид водорода [13, 61, 62]. Последний – чрезвычайно реакционноспособный в присутствии серной кислоты – применяют чаще. Однако  $H_2O_2$ , способствуя сокращению времени минерализации, может привести к потерям азота в виде  $N_2$ .

В работе Nach с соавторами [63] для быстрого разложения образца без добавления солей или металлических катализаторов в качестве сильного окислителя была предложена пероксомоносерная кислота (кислота Каро), образующаяся в смеси пероксида водорода и серной кислоты. Разложение в пероксидном методе происходит в 5-10 раз быстрее, чем в классическом методе Кьельдаля. Для полного восстановления азота из устойчивых к разложению веществ (таких, например, как никотиновая кислота, 8-гидроксихинолин) требуется 17.5 минут. Позже этот метод был использован для определения азота в угле [64]. Максимальное извлечение азота было получено при кипячении в течении 4 мин или более во время карбонизации образца, соотношении  $H_2O_2 : H_2SO_4$  от 4 : 1 до 9 : 1 и объеме реагента для разложения 20-40 см<sup>3</sup>.

В последнее время для разложения пробы по Кьельдалю предлагается использовать микроволновое излучение [65] – экологически чистый и очень эффективный метод, способствующий сокращению времени разложения образца, снижению количества реагентов, уменьшению его загрязнения, полной автоматизации и большей безопасности анализа. Впервые метод начали использовать для разложения биологических образцов в 1975 году [66]. С тех пор микроволновая печь была введена в химическую лабораторию как новый способ ведения химических реакций. Метод электромагнитного нагрева явля-

ется «холодным» *in situ*, основанным на прямом поглощении энергии образцом; поглощении тепла мгновенно и, как следствие, уменьшении времени разложения пробы [67].

Сочетание микроволновой и ультразвуковой обработки в работах [68] и [69] для определения общего азота методом Кьельдаля позволило сократить время разложения проб (почвы, риса, овса, муки, сухого и коровьего молока, кукурузы, говядины, солонины и нута) с 30 минут для классического метода Кьельдаля, модифицированного Nach [63]), и 25 минут при использовании ультразвука до 7 минут (классический стандартный метод занимал более 3 часов). Особенно эффективно одновременное воздействие микроволновой и ультразвуковой обработки может быть для разложения жидких, вязких и твердых продуктов [69].

В [70] для определения азота по Кьельдалю в образцах бобов разложение проводили в фокусированном микроволновом режиме. Были оптимизированы температура, при которой происходит разложение, масса сульфата калия и объем серной кислоты или пероксида водорода, позволившие минерализовать образец массой 0.25 г в течение 27 минут.

В классическом варианте метода минерализацию образцов проводят в колбах Кьельдаля, имеющих грушевидную форму и длинное горло, служащее воздушным холодильником. Традиционные многоместные колбонагревательные установки для разложения по Кьельдалю – их выпускают, например, фирмы S. Gerhardt (Германия), Labconco Corporation (США) – могут работать с четырьмя-шестью колбами Кьельдаля объемом 50 см<sup>3</sup> или 100 см<sup>3</sup> (микро), 250 см<sup>3</sup> (полумикро), 500 см<sup>3</sup> или 750 см<sup>3</sup> (макро). Эти установки оснащены стеклянной вытяжной консолью с воронкообразными адаптерами, которые вставляются в горлышко колб и вилкообразными поддерживающими штангами.

### 1.3. Кислотная минерализация проб в автоматических анализаторах азота

В автоматических анализаторах минерализацию азотсодержащих веществ осуществляют в устройствах, называемых дигесторами, а процесс минерализации называют дигерированием. Первые дигесторы появились в 1970 году и они были блочного типа, позволившие сократить длительность процесса минерализации почти на два часа, снизить энергопотребление на 95 %, а потребление химикатов на 50 % (вместо 25 см<sup>3</sup> кислоты на каждый грамм образца требуется 12 см<sup>3</sup> кислоты) [13].

Изготавливают блочные системы дигерирования из алюминия (Buchi, VELP Scientifica), нержавеющей стали (Behr Labor-Technik GmbH, ООО «Вилитек»), нержавеющей стали с химически стойким покрытием (VELP Scientifica). Они рассчитаны на одновременную обработку от 4 до 40 пробирок Кьельдаля объемом от 100 см<sup>3</sup> до 500 см<sup>3</sup>. Температура в блочных дигесторах может достигать 420-450 °С (табл. 1 и табл. 2).

Таблица 1

Технические характеристики основных узлов автоматических анализаторов Кьельдаля

Table 1

Technical characteristics of the main units of automatic Kjeldahl analyzers

Основные узлы анализаторов Кьельдаля и их характеристики		Фирмы-производители																																			
		C. Gerhardt (Германия) [21, 22]		Buchi (Швейцария) [23]		MRC (Израиль) [28, 29]		Behr Labor-Technik GmbH (Германия) [20]		5																											
1	2	3		4		5		6		7																											
Тип	Блочный	ИК	Блочный	ИК	ИК	ИК	Блочный	ИК	Блочный	ИК	ИК																										
												Kjeldatherm		Turbotherm		Kjeldigester K-449		SpeedDigerster		Graphite Digerster																	
Число мест	8, 20	40	8	12	6, 12	4	4	20	6, 12	5, 8	10, 12	K-439	K-425	K-436	Графитовый автоклав GD-52	GD-22	20	8, 12, 20	16, 24, 40	K	S	M	KL	KB	M	InKjel M**	InKjel P**	6, 12	4	4							
																															100	300	500	300	500	300	500
Объем колб, см <sup>3</sup>	100	250	400	100	250	400	800	300	100	300	500	300	500	300	500	300	500	300	250	100	250	100	500	100	500	100	250	500	100	250	500	100	250	500	100	250	500
Температура, °С	430	750	420	580	480	450	830	450	480	450	830	450	830	450	830	450	830	450	480	450	830	450	830	450	830	450	830	450	830	450	830	450	830	450	830		
Время нагрева	-	-	-	-	25 мин до 400 °С	-	1 мин до 830 °С	-	25 мин до 400 °С	-	1 мин до 830 °С	-	25 мин до 400 °С	-	1 мин до 830 °С	-	1 мин до 830 °С	-	25 мин до 400 °С	-	1 мин до 830 °С	-	1 мин до 830 °С	-	1 мин до 830 °С	-	1 мин до 830 °С	-	1 мин до 830 °С	-	1 мин до 830 °С	-	1 мин до 830 °С				
Материал	Алюминий	-	Алюминий	-	Теплопроводящий графит	-	Алюминий	-	Теплопроводящий графит	-	Алюминий	-	Теплопроводящий графит	-	Алюминий	-	Теплопроводящий графит	-	Теплопроводящий графит	-	Алюминий	-	Теплопроводящий графит	-	Алюминий	-	Теплопроводящий графит	-	Алюминий	-	Теплопроводящий графит	-	Алюминий				
Подъемник	Kjeldalift	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

Дипестор

Таблица 1

Технические характеристики основных узлов автоматических анализаторов Кьельдаля

Table 1

Technical characteristics of the main units of automatic Kjeldahl analyzers

1		2			3		4	5
Скруббер (тип)		Turbosog			Скруббер К-415		WGCH-02 купол для сбора отрабо- таных газов	Вегросог 3 (с насосом мощностью 40 дм³/ч)
Поддача проб	Способ	Автосемплер			Автосемплер			
	Тип	Varodest® 50s carousel			KjelSampler			
	Varodest 50s	20	16	12	К-377	К-376		
	200, 300, 400 и 450	20	250	800	48	24		
	Тип	Varodest® 50s carousel			Kjel-master K375		Distillation Unit K-350 или K-355	S1-S2 ручные; S3- полуавтомат; S4-S5 автомат; S5 –автомат для работы с внешним титратором Tetrino 702 фирмы «Metrohm»
Дистиллятор	Varodest 50						АКА-11 (Automatic Kjeldahl Analyzer) DIST-984	
	Производительность	-			-		1.5 дм³/мин	-
Блок титрования	Потенциометрический	-	+	+	-	+		
	Колориметрический	-	-	+	+	+		
	Реагент	-	-	смесь бромкрезолового зеленого и метилового красного	-	индикатор Таширо		
	Ручной	-	-	Автотитраторы Titrimo 702SM или Titrimo 719S (фирма Metrohm)	-	Титратор STI		
	Автомат.	-	-	процессы дистилляции и титрования интегрированы	Встроенный высокочувствительный АКА-11	Внешний титратор Tetrino 702 («Metrohm»)		

Примечания: \* – Материал корпуса, подставки и вытяжной системы; \*\* – InKjel M и InKjel P соответственно с ручным и программируемым регулированием времени и температуры нагрева образцов; S – Standard; M – Micro.

Таблица 2

Технические характеристики основных узлов автоматических анализаторов Кьельдаля

Table 2

Technical characteristics of the main units of automatic Kjeldahl analyzers

Основные узлы анализаторов Кьельдаля и их характеристики		Фирмы-производители																											
		Foss Tecator (Дания, Швеция) [34 - 36]		VELP Scientifica (Италия) [24]		J.P.Selecta (Испания) [25, 26]		Hanon Instruments (Китай) [30, 31]		ООО ВПК Сибгродприбор (Россия) [32]		FoodALYT GmbH (Германия) [37]		ООО «Вилитек» (Россия) [27]															
1	2	3		4		5		6		7		8																	
		Блочный		Block-digest		ИК		ИК		ИК		ИК		Блочный															
Тип	Foss Tecator™		DK (п/авт.)		DKL (автомат.)		Macro		Micro		SH220F		SH420F		KELTRUN УК-4005 - (п/авт.)		FoodALYT		IR 600		IR 1200		ПМП		ПМП-М		-		
	Digester	DT	-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		
Число мест	2508		208		220		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		
	8	20	8	20	6, 8, 20, 42	8, 12, 20, 42	6, 12, 20	12, 24, 40	20	4 и 6,	4 и 6,	16, 40	8, 20	6	112	4	8	20	10	15	20	300	300	300	300	300	300	300	
Объем колб, см³	100		250		400		100		100		100		100		250		250		250		250		250		250		250		
	250	400	250	400	100	250	400	100	100	250	400	300	100	250	400	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	800	
Температура, °С	440		450		450		450		450		450		450		450		450		450		450		450		450		450		
	до 400 °С		до 420 °С		до 420 °С		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-
Время нагрева мин.	~35		~40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		
	~35		~40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		40		40
Материал***	Алюминий		Алюминий		Алюминий		Нержавеющая сталь		Нержавеющая сталь		Нержавеющая сталь		Высококачественный графит		-		-		-		-		-		-		-		
	Auto Lift	Auto Rack	-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-
Подъемник	Auto Lift		Auto Rack		+		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		
	Auto Lift	Auto Rack	+		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-		-

Таблица 2

Технические характеристики основных узлов автоматических анализаторов Кьельдаля

Table 2

Technical characteristics of the main units of automatic Kjeldahl analyzers

1	2	3	4	5	6	7	8	Подана проба	Дистиллятор
Скруббер (тип)	2501	Рециркуляционный водяной насос JP + скруббер SMS	Циркуляционный водяной насос	S-402	Циркуляционный водяной насос	FoodALYT PUMP с насосом 40 дм <sup>3</sup> /мин)	Вакуумный насос Chemker СКБ-4 300	Ручной	~40 см <sup>3</sup> /мин.
		Авто-семплер	Циркуляционный водяной насос					Авто-семплер	
		UDK 149	PRO-NITRO** (модели M, S и A**)	Напон K9840 (п/ авт.)	KDN	D5000	АКВ 20	20 и 60	до 3 кг/час титановый холодильник для конденсирования паров
		UDK 159, 169		Напон K1100F (авт.)			АКВ 30	24	
		250 400						21	1,5 дм <sup>3</sup> /мин. Процессы дистиляции и титрования интегрированы
								400	



Таблица 2

Технические характеристики основных узлов автоматических анализаторов Кьельдаля

Table 2

Technical characteristics of the main units of automatic Kjeldahl analyzers

1	Метод детектирования			Способ титрования	
	Потенциометрический	Колориметрический	Реагент	Ручной	Автомат.
2	+	+	-	-	-
	+	-	-	-	-
3	-	+	Индикатор	-	Встроенный титратор
	-	-	Смесь бромкреолового зеленого и метилового красного	-	-
4	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-
	-	-	-	-	-
6	+	-	-	Ручной	титратор Титрион-рН (комбинированный рН-электрод ЭСК-10601)
	+	-	-	-	Титратор TitroLine easy (Module 2)
7	+	-	-	-	-
	+	-	-	Ручной	-
8	-	+	-	-	+
	-	-	-	Ручной	Титратор

Примечания: L – полностью автоматизированный подъемник; \* Модели – М-ручная, S-полуавтоматическая, А- автоматическая; \*\*\* – Материал корпуса, подставки и вытяжной системы.

В автоматических анализаторах ускоряющие минерализацию катализатор и соль вводятся в виде таблеток (табл. 3). Для предотвращения вспенивания используют таблетки состава:  $0.97 \text{ г Na}_2\text{SO}_4 + 0.03 \text{ г}$  силикон (фирмы VELP Scientifica, Buchi).

В последнее время в автоматических анализаторах азота для увеличения скорости разложения азотсодержащих соединений стали применять дигесторы с инфракрасными кварцевыми излучателями (так называемые ИК-дигесторы): behrotest® InKjel (фирма Behr Labor-Technik GmbH), Turbotherm (фирма С. Gerhardt), SpeedDigester (фирма BUCHI), KELTRUN (ООО ВПК Сибпроприбор) (Россия). Фирмы ООО «Вилитек» и Hanon Instruments также комплектуют печи для мокрого озоления ИК-излучателями. Изготавливают ИК-дигесторы из алюминия, нержавеющей стали, графита (MRC и Hanon Instruments). Рассчитаны ИК-дигесторы на одновременное разложение от 4 до 12 (фирма Hanon Instruments – 20) проб объемом от 800 до 100 см<sup>3</sup> соответственно.

Благодаря ИК-излучению обеспечивается быстрая передача тепла от инфракрасных нагревателей к образцам, и быстрое же их охлаждение. Так, согласно данным фирмы Behr Labor-Technik GmbH, температура 830 °С в ИК-дигесторах достигается за 1 минуту, сокращая время обработки образцов с 90 до 60 минут. Кроме того, применение ИК-излучателей способствует равномерному нагреву всех зон

образца, увеличивая тем самым воспроизводимость результатов анализа.

ИК-дигесторы могут работать с широким перечнем проб: с сильно пенообразующими образцами, образцами большой массы и объема (например, сточных вод или шлама), с пробирками разных объемов (100, 300, 400 или 800 см<sup>3</sup>). ИК-дигесторы позволяют работать с пероксидом водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, добавление которого в присутствии серной кислоты в обычных условиях, как известно [60, 15], приводит к чрезмерному пенообразованию и потере образца. Контролируемое добавление H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> дополнительным модулем всасывания предусмотрено, например, в анализаторах фирмы BUCHI.

Для сокращения до минимума контакта оператора с горячими химическими веществами и тяжелыми пробами многие фирмы выпускают системы дигерирования с автоматическими подъемниками (например, Auto Lift фирмы Foss Tecator, Kjeldalift фирмы Gerhardt), способными обрабатывать до 8, 20 или 40 пробирок объемом 100, 250 или 400 см<sup>3</sup> [13].

Выпускаются также минерализаторы с контролируемым температурным процессом, которые не требуют присутствия оператора, имеют программное управление и интегрируются с автосамплерами. Они полностью окупаются при поточном производстве или при проведении масштабных исследований.

Контроль правильности процесса минерализации проводят обычно по стандартным веществам с из-

Таблица 3

Составы таблеток, используемых для минерализации проб в автоматических анализаторах азота

Table 3

The composition of the tablets used for the mineralization of samples in automatic nitrogen analyzers

Наименование фирмы	Состав катализатора, г					
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	CuSO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub>	TiO <sub>2</sub>	Se
Behr Labor-Technik GmbH (Германия) [20]	5.0	–	–	0.5	–	–
	5.0	–	–	0.15	0.15	–
	3.5	–	–	0.4	–	–
	3.5	–	–	–	–	3.5
С. Gerhardt (Германия) [21, 22]	3.500	–	–	–	–	0.0035
	5.000	–	0.5	–	–	–
	5.000	–	0.15	–	0.15	–
	5.000	–	0.1	–	–	–
Buchi (Швейцария) [23]	3.500	–	0.105	–	0.105	–
	4.980	–	0.020	–	–	–
	3.998	–	0.002	–	–	–
	1.500	–	0.045	–	0.045	–
	1.500	–	0.150	–	–	–
FOSS Tecator™ [34 - 36]	1.5	–	–	–	–	0.075
	1.5	–	0.15	–	–	–
	3.5	–	–	–	–	0.035
	3.5	–	0.4	–	–	–
	3.5	–	0.105	–	0.105	–
	5.0	–	0.15	–	0.15	–
VELP Scientifica (Италия) [24]	3.5	–	0,105	–	0.105	–
	–	4.875	0.075	–	–	0.050
	3.5	–	–	0.1	–	–
	3.5	–	–	–	–	0.0035

Таблица 4

Аналитические характеристики автоматических анализаторов Кьельдаля

Table 4

Analytical characteristics of automatic Kjeldahl analyzers

Основные аналитические характеристики	Фирмы-производители																						
	C. Gerhardt (Германия) [21, 22]		Buchi (Швейцария) [23]		MRC (Израиль) [28, 29]		Behr Labor-Technik GmbH (Германия) [20]		Foss Tecator (Дания, Швеция) [34 - 36]		VELP Scientifica (Италия) [24]		J.P.Selecta (Испания) [25, 26]		Hanon Instruments (Китай) [30, 31]		ООО ВПК Сибпро прибор (Россия) [32]		FoodALYT GmbH (Германия) [37]		ООО «Вилитек» (Россия) [27]		
	Тип дигестора	Блочный	ИК	Блочный	ИК	Тип дигестора	Блочный	ИК	Тип дигестора	Блочный	ИК	UDK 159	UDK 169	М	С	А	–	Тип дигестора	Блочный	ИК	–	АКВ 20	АКВ-30
Время реакции, мин	–	20	10	–	90	60	30-40	от 1 до 999 мин	от 1 до 999 мин	max 600 минут	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Время дистилляции пробы	2–4 минуты	150–300 с	< 5 минут	2–3 минуты	5–6 минут	5–6 минут	от 4 минут, включая титрование	20 с–30 минут	1–3/15	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Масса твердой пробы (г)/ объем жидкой пробы (см³)	–	более 4/400	до 5 г/20 мл	–	–	–	4,5 минуты – при 30 мг N; 7,5 минут – при 200 мг N	1-160 мг N или 6-1000 мг белка (N x 6,25)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Время анализа	–	200 минут/20 образцов;	5-10 минут на образец	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5-6 минут
Нижний предел обнаружения	0.1 мг N	0.1 мг N	0.1 мг N - 200 мг N	0.1 мг N	0.1 мг N	0.1 мг N	–	≥0.1 мг N	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	0.1-200 мг N

Примечание: Серии L оснащены полностью автоматическим лифтом.

вестным содержанием азота. Если анализируемые пробы озоляются легко, используют ацетанилид  $C_8H_9NO$ , имеющий температуру плавления  $114\text{ }^\circ\text{C}$  и содержание азота  $10.36\text{ г} / 100\text{ г}$ ; в противном случае – применяют триптофан  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  с температурой плавления  $282\text{ }^\circ\text{C}$  и содержанием азота  $13.72\text{ г} / 100\text{ г}$ . Извлечение азота при озолении ацетанилида должно составлять не менее  $99.5\%$ , триптофана – не менее  $99.0\%$  [59].

При «сжигании» органического вещества по методу Кьельдаля образуются едкие и токсичные пары, которые необходимо удалить и нейтрализовать для минимизации выделения в лабораторию и окружающую среду. Удаление и нейтрализацию едких и токсичных паров осуществляют в три ступени: конденсация и нейтрализация кислотных и щелочных паров, абсорбция диоксида серы активированным углем. Для реализации этих процессов используют, как правило, трехступенчатые скрубберы (табл. 1 и табл. 2): Turbosog (фирма С. Gerhardt), Behrosog 3 (BEHR Labor-Technik GmbH). Фирма BUCHI проводит отвод и нейтрализацию едких и токсичных паров с помощью четырехступенчатого скруббера (QuadScrubECO), дублируя стадию нейтрализации.

Основные аналитические характеристики наиболее распространенных анализаторов азота, работающих по методу Кьельдаля, приведены в табл. 4.

## 2. ПРЕВРАЩЕНИЕ СУЛЬФАТА АММОНИЯ В СВОБОДНЫЙ АММИАК. ОТГОНКА АММИАКА ВОДЯНЫМ ПАРОМ (ДИСТИЛЛЯЦИЯ)

Полученный минерализат разбавляют дистиллированной водой, охлаждают и медленно (так как тепло реакции между серной кислотой и гидроксидом натрия достаточно велико, чтобы вызвать потерю аммиака) добавляют или твердый гидроксид натрия, или избыток его концентрированного раствора ( $30, 40$  или  $50\%$ ). В результате сульфат аммония превращается в свободный аммиак

$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow 2NH_3\uparrow + Na_2SO_4 + 2H_2O$ , отгоняемый далее в кислоту. Наиболее распространенным способом отгонки аммиака является паровая дистилляция. Скорость перегонки зависит от температуры; однако даже при слабом нагревании большая часть аммиака перегоняется уже в течение первых  $5-10$  минут [16].

Выпускаются классические установки для дистилляции, рассчитанные на  $4-6$  мест (например, фирмы С. Gerhardt [21, 22]). В автоматических анализаторах аммиак отгоняют водяным паром в дистилляционных установках типа VAPODEST (С. Gerhardt), UDK (Velp Scientifica), S 5 (Behr Labor-Technik GmbH), Kjeltec™ (Foss Tecator) (табл. 1 и табл. 2). Многие анализаторы укомплектованы автосемплерами, связанными с помощью пробоотборной трубки (или так называемого загрузочного зонда) с дистилля-

ционной установкой. Автосемплеры – 50s carousel (Gerhardt), Kjeltec™ sampler (Foss Tecator), AutoKjel (Velp Scientifica), KjelSampler (BUCHI) – рассчитаны на одновременное размещение от  $12$  до  $60$  пробирок объемом от  $250$  до  $800\text{ см}^3$ . После установки поддона с минерализованными пробами в автосемплер модуль загрузочного зонда самостоятельно перемещается между сосудами с образцами, готовыми к отгонке с паром, останавливается, соединяется с пробиркой и образец с водяным паром всасывается в сосуд, установленный в дистилляторе. В результате перенос образцов происходит практически мгновенно и без участия оператора; оператору необходимо только следить за количеством реагентов в бункерах и менять пробирки (сосуды) в дистилляторе. Пробирки, остающиеся в автосемплере после переноса образцов с водяным паром, не требуют дополнительной мойки и готовы к загрузке новых проб для минерализации.

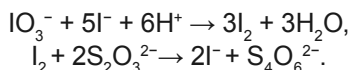
Благодаря автоматизации всех процессов время дистилляции одной пробы сокращается до  $5-10$  минут (табл. 4). Например, автоматический дистиллятор UDK 159 (Velp Scientifica) после установки пробирки в рабочее положение управляет всеми процессами: разбавление образца, добавление щелочи, отгонка в течение заданного времени с заданной мощностью, добавление в ячейку для титрования борной кислоты, колориметрическое титрование, удаление остатков дистилляции, расчет результатов анализа. Управление осуществляется через сенсорный дисплей, данные всех проведенных анализов сохраняются в памяти прибора, запуск всех процессов производится одной кнопкой в соответствии с выбранной программой. Во всех моделях дистилляторов фирмы VELP используются твердотельные парогенераторы на дистиллированной воде, не требующие обслуживания в процессе работы. Использование титанового холодильника для конденсации паров обеспечивает высокую производительность дистиллятора.

Качество процесса отгонки [9, 10, 13] контролируют с помощью растворов сульфата или хлорида аммония [59]. Степень отгонки должна быть более  $99.5\%$ . В классическом варианте метода Кьельдаля отгонку производят в сильную кислоту. Однако в последнее время аммиак чаще всего улавливают  $4\%$ -м раствором слабой борной кислоты  $H_3BO_3$ , не требующей точного приготовления [71]; стандартизованным должен быть только раствор титранта (HCl или  $H_2SO_4$ ):

в сильную кислоту (классический вариант)	в слабую кислоту (современный вариант)
$NH_3 + HCl$ (или $H_2SO_4$ ) $\rightarrow$ $\rightarrow NH_4Cl$ (или $(NH_4)_2SO_4$ )	$2NH_3 + 4H_3BO_3 \rightarrow$ $\rightarrow (NH_4)_2B_4O_7 + 5H_2O$ .

### 3. ТИТРОВАНИЕ

После отгонки аммиака в сильную кислоту избыток последней может быть определен, как это делал Кьельдаль, методом йодометрического титрования [43] с использованием крахмала в качестве индикатора в соответствии со следующими реакциями



Однако этот метод сейчас применяется редко из-за необходимости предварительного кипячения дистиллята для удаления обычно присутствующего в растворе диоксида углерода.

Как правило, если в приемнике находится сильная кислота (HCl или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), ее избыток титруют сильным основанием (раствором NaOH); если в приемнике находится слабая кислота (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), то титрование проводят сильной кислотой:

при дистилляции в сильную кислоту (классический вариант), 1 моль/л раствором гидроксида натрия (реже калия)	при дистилляции в слабую кислоту (современный вариант) 0.1 моль/л соляной (или 0.05 моль/л серной) кислотой
HCl + NaOH → NaCl + H <sub>2</sub> O или H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2 NaOH → Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2 H <sub>2</sub> O	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> + 2 HCl + 5H <sub>2</sub> O → → 2NH <sub>4</sub> Cl + 4H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
Индикатор – метиловый красный	Индикатор – метиловый голубой или смешанный индикатор

Титрование тетрабората аммония сильной кислотой при дистилляции аммиака в слабую борную кислоту было предложено Винклером [72] и основано на том, что образующийся (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> при гидролизе дает щелочную реакцию. Чтобы исключить потери аммиака, титрование проводят сразу после завершения дистилляции при температуре дистиллята не выше 25 °C [73].

Наблюдаемые переходы окрасок индикаторов при титровании представлены в табл. 5. В случае дистилляции аммиака в раствор борной кислоты

предпочтение отдается смешанным индикаторам, имеющим, как правило, резкий переход окраски в узком диапазоне pH [16]. В настоящее время наиболее часто применяют предложенную Ма Т.С. и Зуазага Г. в 1942 г. [74] смесь бромкрезолового зеленого с метиловым красным ввиду ее контрастности и отчетливо видимой точки конца титрования [59]. Этот же индикатор применяют в автоматических анализаторах фирм Buchi и J.P.Selecta (табл. 1 и табл. 2).

Помимо классических титриметрических методов анализа выделившийся аммиак может быть определен с помощью инструментальных методов: спектрофотометрии, потенциометрии с ионоселективным электродом, проточно-инжекционного анализа (ПИА), ионной хроматографии [19]. Возможность автоматизации, быстрота и точность инструментальных методов, обеспечивают анализ большого количества образцов.

#### 3.1. Спектрофотометрическое определение аммиака

Спектрофотометрическое определение можно проводить, используя реактив Несслера, индофенол, ацетил-ацетонный реагент, нингидрин и о-фталальдегид.

##### 3.1.1. Определение с реактивом Несслера

Реактив Несслера, предложенный в 1856 г. и представляющий собой щелочной раствор дигидрата тетраиодомеркурата (II) калия K<sub>2</sub>[HgI<sub>4</sub>]·2H<sub>2</sub>O [75], с небольшим количеством аммиака дает коллоидный комплекс желтого цвета

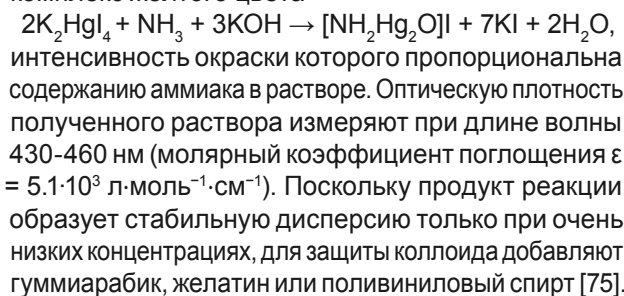


Таблица 5

Изменение цвета раствора при титровании с различными индикаторами\*

Table 5

Color change of the solution during the titration with various indicators\*

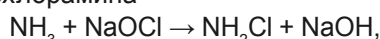
Индикатор	Цвет раствора		
	Исходный	В точке эквивалентности	В точке конца титрования
Метиленовый голубой	Зеленый	Серый	Фиолетовый
Метиловый красный и метиленовый голубой (индикатор Таширо)	Зеленый		Красно-фиолетовый
Бромкрезоловый зеленый и бриллиантовый зеленый	Зеленый	Серо-желтый	Красный
Бромкрезоловый зеленый и метиловый красный	Зеленый		Винно-красный

Примечание: \* – ГОСТ 4919.1-77. Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления растворов индикаторов

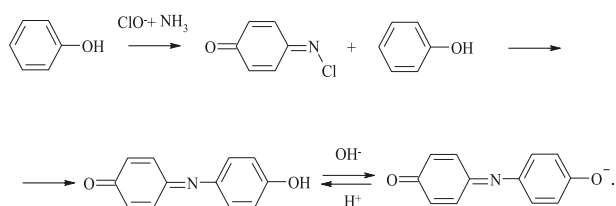
Концентрацию аммиака находят по градуировочному графику, построенному по стандартным растворам сульфата (или хлорида) аммония и сохраняющему линейность до концентрации 75 мг (аммиака)/см<sup>3</sup>. Спектрофотометрическое определение с реактивом Несслера использовали, например, в работе [68].

### 3.1.2. Определение с индофенолом

Определение, основанное на образовании индофенола [76], заключается в совместном окислении фенола и аммиака. В качестве окислителей используют гипохлорит натрия (NaOCl), хлорную или бромную воду, пероксид водорода. Аммиак реагирует с гипохлорит-ионом (OCl<sup>-</sup>) с образованием монохлорамина



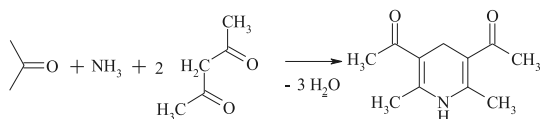
который, в свою очередь, реагирует с двумя молекулами фенола с образованием индофенола [75]



Индофенол окрашивает раствор в интенсивный синий цвет ( $\lambda = 625 \text{ нм}$ ,  $\epsilon = 4.5 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ ), по оптической плотности которого определяют содержание аммиака. Индофенольный метод более удобен, чем метод Несслера, так как продукт реакции растворим в воде [75]. Он находит широкое применение в проточно-инжекционном анализе [77]. Один из недостатков метода – использование канцерогенного реагента: фенола.

### 3.1.3. Определение с ацетил-ацетонным реагентом

Поскольку реакции с реактивом Несслера и индофенолом выполняются в щелочной среде [10], это вызывает осаждение металлов, используемых в качестве катализаторов процесса минерализации азотсодержащих органических соединений, и мешает определению аммиака. В связи с этим для анализа аммиака удобнее использовать ацетил-ацетонный реагент (реакция Ханца): аммиак реагирует с ацетилацетон-формальдегидным реагентом в присутствии ацетата натрия с получением желтого продукта реакции – 3,5-диацетил-1,4-дигидролутидина

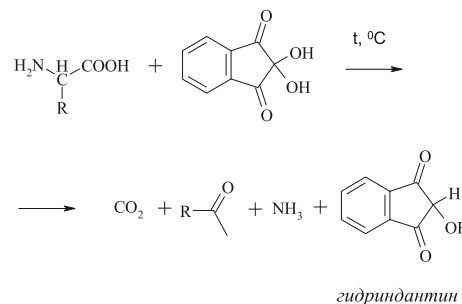


с максимальной поглощающей способностью на длине волны 410 нм ( $\epsilon = 1.4 \cdot 10^3 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$  [10]). Реакционная смесь имеет pH = 5.5–6.0, поэтому используемые для минерализации ионы металлов не осаждаются. Потеря аммиака за счет улетучивания

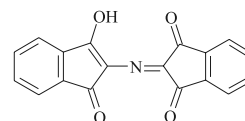
также предотвращается. Метод простой, быстрый, точный, не требующий подщелачивания минерализата [78]. Применяемые реагенты стабильны, недороги и доступны.

### 3.1.4. Определение с нингидрином

С нингидрином (гидрат трикетогидриндена, по международной номенклатуре он имеет название 2,2-дигидроксиинандион-1,3) реагируют все первичные амины, включая амины, аминокислоты, пептиды, белки и аммиак [79]. В присутствии нингидрина большинство свободных аминокислот окислительно дезаминируют с образованием аммиака, а нингидрин превращается в гидриндантин:



Аммиак и гидриндантин реагируют с образованием фиолетового продукта дикетогидриндиден-дикетогидриндамина (ДИДА, фиолетовый Рузманна)

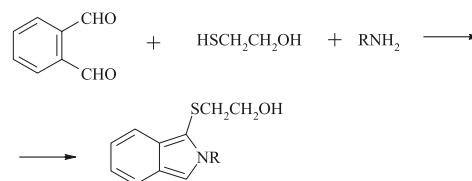


который может быть определен количественно на длине волны  $\lambda = 570 \text{ нм}$ :

Автоматическое определение содержания азота в пшенице, рапсовой муке и концентратах соевых белков методом Кьельдаля с нингидриновым реагентом представлено в [80].

### 3.1.5. Определение с о-фталальдегидом

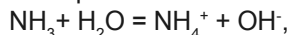
В последнее время наиболее часто используемый аналитический реагент для определения иона аммония и аминокислот – о-фталальдегид (о-фталевый альдегид) в присутствии 2-меркаптоэтанола [81, 82]:



Продукт реакции флуоресцирует (470 нм) под действием излучения с длиной волны 410 нм. Метод чувствителен в диапазоне 5–400 нмоль аммониевой соли/см<sup>3</sup>. Анализ очень специфичен для аммиака [83]. Метод простой, чувствительный и имеет большой линейный диапазон концентраций, который устраняет необходимость разбавления образца. В отсутствие флуориметра метод может быть реализован в спектрофотометрическом варианте [84].

### 3.2. Потенциометрическое определение с ионселективными электродами (ИСЭ)

Для определения аммиака и ионов аммония применяют ИСЭ соответственно с газочувствительной или матричной мембраной. В электродах, чувствительных к аммиаку, последний диффундирует через газопроницаемую мембрану, вступает в реакцию с внутренним раствором



вызывая изменение его pH, которое измеряют стеклянным электродом [85, 86].

Газочувствительные электроды для определения аммиака выпускают фирмы Mettler Toledo и Metrohm (Швейцария), Thermo Orion (США). Диапазон определяемых концентраций  $\text{NH}_3$ : для электродов GSE Ammonia Electrode фирмы Mettler Toledo от  $10^{-6}$  моль/дм<sup>3</sup> до  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/дм<sup>3</sup> (оптимальный интервал pH = 11 – 14); для электродов Orion™ Ammonia Gas Sensing ISE Electrodes – от  $5 \cdot 10^{-7}$  до 1.0 M. Однако, определению низких концентраций аммиака с помощью газочувствительных электродов мешают амины и, кроме того, период жизни мембраны у электродов составляет только несколько недель [10, 87].

Иногда, несмотря на кислотный или основной характер газа, предпочтительнее использовать ИСЭ, высокоселективные к иону, образующемуся при растворении газа. В этом случае возможно селективное определение данного газа в смеси с другими газами кислотного или основного характера. Для аммиака это ИСЭ с мембраной, селективной по отношению к иону аммония. Переносчиками ионов  $\text{NH}_4^+$  в электродах этого типа могут быть природные (нонактин, монактин) [88-93] или синтетические вещества (краун- [90, 94] и тиазолбензо-краун-эфир [95, 96], криптанды [96-98], бициклические пептиды [99], циклодепептиды [100], триподальные соединения на основе триметил- и триэтилбензола, содержащие пиразольные или индазольные группы [101-103]).

Применение аммоний-селективных электродов позволяет исключить этап дистилляции в анализе Кьельдаля [10]. В результате время определения азота, например, в воде [104] сокращается в 4.8 раза, а затраты – в 6.6 раза по сравнению с классическим вариантом анализа.

Аммоний-селективные электроды выпускают фирмы Mettler Toledo (Швейцария), Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten (WTW) (Германия), Orion™ High-Performance Ammonia Electrode (США). Для ИСЭ DX218-NH4 фирмы Mettler Toledo диапазон определяемых концентраций  $\text{NH}_4^+$  составляет от  $10^{-7}$  моль/дм<sup>3</sup> до 1 моль/дм<sup>3</sup>; оптимальный интервал pH = 2 – 9.

### 3.3. Проточно-инжекционный анализ (ПИА)

Проточно-инжекционный анализ, предложенный в 1974 г. Ружичкой и Хансеном [105], основан на вводе небольшого объема пробы в создаваемый перистальтическим насосом поток носителя, содер-

жащий необходимые для протекания аналитической реакции реагенты. Впервые техника ПИА была применена корпорацией Technicon и реализована в автоматическом анализаторе AutoAnalyzer. Его использовали, в том числе, и для автоматизации этапа дистилляции при определении азота методом Кьельдаля [8, 9]. Интенсивность окраски комплексов, образованных аммиаком с индофенолом [77, 106, 107], нингидрином [80] или реактивом Несслера [108], измеряют спектрофотометрическим методом. В работе [109] после введения образца в донорный раствор NaOH, аммиак и другие летучие вещества переносятся из донорного потока в акцепторный поток, содержащий салицилат натрия и нитропруссид, который впоследствии смешивается со щелочным раствором дихлоризоцианурата натрия для классической реакции Бертра. Образованный комплекс синего цвета фотометрируют при длине волны 655 нм. В [110] этот метод проводили с использованием в качестве акцепторного потока, содержащий индикаторы крезоловый красный и тимоловый синий. Изменение цвета в результате попадания аммиака из блока первапарации в акцепторный поток контролировали фотометрически на длине волны 590 нм. Простой в использовании, чувствительный и легко воспроизводимый метод анализа сегментированного потока, основанный на реакции аммиака с орто-фталальдегидом и сульфитом, описан в [111]. Использование вместо 2-меркаптоэтанола сульфита натрия в качестве восстановителя снижает чувствительность метода к аминокислотам и делает его более специфичным для аммония [112]. В результате исключается необходимость в газодиффузионной ячейке, обычно используемой для устранения аминокислотных помех. Новый спектрофотометрический метод для определения аммиачного азота в воде с инъекцией потока разработан авторами работы [113]: продукт реакции  $\text{NH}_3$ -о-фталальдегид -  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  при pH более 10.4 становится розово-красным; максимум его светопоглощения наблюдается на 550 нм. В работе [114] используется флуориметрическое детектирование с о-фталальдегидом для определения аммония в водных экосистемах. В работе [115] соответствующий объем гидроксида натрия добавляли в морскую воду для превращения аммония в газообразный аммиак, который продували из раствора в паровую фазу аргоном со скоростью 350 мл/мин в течение 15 минут при 80 °С и улавливали соляной кислотой. Раствор анализировали на основании флуоресцентного определения продукта реакции о-фталеевого альдегида, сульфита натрия и аммония. Предел обнаружения составлял 7.4 нмоль/л. Этот подход, согласно данным работы, обеспечивает более высокую чувствительность, эффективность сбора и незначительное влияние солености в сравнении с использованием газодиффузионной ячейки.

Введение газодиффузионного (ГД) блока в систему ПИА способствовало улучшению селективности анализа и минимизации влияния матрицы [77]. Техника ПИА, основанная на газодиффузионном разделении (ГД-ПИА), используется для определения летучих веществ или веществ, которые могут быть выборочно и количественно превращены в газообразные вещества из сложной матрицы. Образец смешивается в донорном канале ГД устройства с гидроксидом натрия. Выделенный в результате щелочного гидролиза аммиак диффундирует через газопроницаемую мембрану (полипропилен, политетрафторэтилен) ГД устройства в поток поглотительного (акцепторного) раствора. Рассеянный в акцепторном потоке аммиак обнаруживается реакцией с индофенолом [77, 106, 107]; с помощью введенных в поток акцептора кислотно-основных индикаторов – бромтимолового синего [107, 116], смеси бромкрезолового фиолетового, бромтимолового синего и крезолового красного [117] или смеси крезолового красного и тимолового синего (максимум поглощения при 580 нм) [118]: диффундируя через мембрану, аммиак вызывает изменение рН и, следовательно, изменение цвета индикатора.

Детектирование может осуществляться также потенциометрически [119–121], кондуктометрически [122–124] или флуориметрически [125, 126]. Причем в случае флуориметрического способа детектирования интенсивно флуоресцирующий продукт позволяет достичь наномолярного диапазона.

Преимуществами техники ГД-ПИА являются простота автоматизации, высокие селективность и чувствительность.

### 3.4. Хроматография

Для определения иона аммония после разложения по Кьельдалю наиболее часто используют ионную хроматографию (ИХ), применение которой позволяет значительно увеличить скорость анализа по сравнению с традиционным методом, поскольку устраняется необходимость в дистилляции и титровании [17]. Кроме того, для анализа достаточно наномолярных количеств аммония [127] и, следовательно, может быть значительно снижено необходимое для минерализации количество образца; это имеет решающее значение для анализа фармацевтических, биологических объектов и объектов окружающей среды.

Для определения иона  $\text{NH}_4^+$  обычно используют сочетание ИХ с кондуктометрическим детектированием [19, 128, 129–131].

ИХ для определения иона аммония обычно включает разделение на катионообменной колонке с использованием разбавленного раствора сильной кислоты и последующим обнаружением подавленной проводимости. Для обмена анионов элюента и образца на  $\text{OH}^-$ -ионы применяют сильноосновную анионообменную смолу. Подавление фона элюента может осуществляться мембранными системами

подавления. В настоящее время фирма Dionex выпускает так называемый катионный саморегенерирующийся электрохимический подавитель фона элюента (супрессор) CERS (Cation Electrolytically Regenerated Suppressor) [132, 133].

Однако применение ИХ для анализа минерализатов Кьельдаля сталкивается с рядом проблем, вызванных использованием больших количеств сульфата меди в качестве катализатора процесса минерализации. Прежде всего, ионы  $\text{Cu}^{2+}$  в присутствии  $\text{OH}^-$  ионов образуют труднорастворимый гидроксид меди, который может выпасть в осадок, перекрыть поток элюента и засорить CERS. Другая проблема состоит в том, что находящиеся в избытке ионы меди в нейтральных и кислых растворах реагируют с ионами аммония с образованием катионных комплексов  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_n]^{2+}$ ; это приводит к потерям аммония [134]. Кроме того, двухвалентные ионы меди могут сильно связать катионит и привести к необратимому повреждению колонки или к необходимости ее частой очистки.

Чтобы избежать этих проблем при анализе минерализатов Кьельдаля методом ионной хроматографии предлагались разные варианты. Например, применять ИХ с косвенным определением проводимости, не требующим CERS. Однако, из-за высокой фоновой проводимости точное определение возможно лишь для больших количеств образца. В работах [61, 135] вместо меди использовали смесь серной и уксусной кислот в присутствии в качестве катализаторов пероксида водорода или  $\text{Hg}^{2+}$ ; а в [136] традиционную стадию паровой дистилляции заменяли перегонкой с помощью ультразвуковой системы продувки. Авторы работы [137] предложили добавлять к минерализату Кьельдаля и элюенту щавелевую кислоту для связывания меди в стабильный анионный комплекс – биоксалаат меди  $[\text{Cu}(\text{OX})_2]^{2-}$ , который не задерживается в колонке и заменяется в CERS на ионы  $\text{OH}^-$ . В результате не происходит образования купрамина и, следовательно, предотвращаются связанные с этим потери аммония. Для реализации последнего варианта требуются наномолярные количества азота в образцах ( $\geq 10$  мкг белка), обеспечиваются точные результаты в диапазоне 0.01–1.0 мг/мл аммония и требуются очень небольшие количества белка, что делает данный вариант метода ИХ пригодным для анализа фармацевтических, биологических объектов и объектов окружающей среды.

В работе [138] определение азота в органических и некоторых неорганических материалах осуществляется с помощью метода газовой хроматографии, основанного на улавливании уксусной кислотой аммиака, образующегося после добавления к минерализату сильного основания, и последующем хроматографическом определении ацетата аммония.



### 3.5. Блок титрования автоматических анализаторов азота

Из представленных в данном разделе способов детектирования в автоматических анализаторах азота используются два: потенциометрический и спектрофотометрический (табл. 1 и табл. 2).

Такие фирмы как VELP Scientifica, J.P.Selecta и Hanon Instruments отдают предпочтение спектрофотометрическому способу титрования, основанному на точной химической реакции индикаторов, не зависящей от внешних факторов (времени, дрейфа, оператора) и обеспечивающей хорошую точность анализа. Фирма Buchi, например, при проведении колориметрического титрования применяет смешанный индикатор – смесь бромкрезолового зеленого и метилового красного.

Потенциометрический способ применяют в анализаторах Behr Labor-Technik GmbH (Германия), C. Gerhardt (Германия), а также в анализаторах российских фирм ООО ВПК Сибагроприбор и ООО «Вилитек» (Россия). Потенциометрический способ определения конца титрования (титрование до заданной точки) со стеклянным электродом требует ежедневной градуировки и приготовления буферных растворов, что весьма трудоемко и дорого. Некоторые фирмы (среди них Buchi и Foss Tecator) в своих приборах предусматривают возможность использования обоих способов титрования: потенциометрического и колориметрического.

Блок титрования автоматических анализаторов азота может комплектоваться ручными или автоматическими установками для титрования. Многие фирмы (такие, например, как C. Gerhardt, Buchi и Hanon Instruments) выпускают интегрированные варианты дистиллятора и установки для титрования.

## 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ НЕБЕЛКОВОГО АЗОТА

Методом Кьельдаля определяется общий азот, включающий в себя азот, который входит в состав аминокислот, и небелковый азот (non-protein nitrogen - NPN), оставшийся в растворе после удаления белков. В составе NPN различают аминный (азот свободных аминокислот), амидный (азот аспарагина и глутамина), аммиачный азот, азот оснований, нитратный и нитритный азот.

Наличие небелковых азотных соединений в пищевых продуктах завышает истинное содержание белка [57]. Между тем его содержание – определяющий фактор рыночной стоимости основных сельскохозяйственных товаров [139]. После нескольких известных случаев фальсификации молочных продуктов меламином, повлекших за собой массовые заболевания детей и даже смертельные случаи [11], в пищевой промышленности чрезвычайно важной стала задача мониторинга белкового азота вместо общего азота.

Поскольку метод Кьельдаля не может отличить истинный белок от других богатых азотом химических веществ по причине отсутствия специфичности [11], для снижения любого риска фальсификации пищевых продуктов непротеиновым азотом фракцию NPN отделяют. Наиболее часто используемыми осадителями белка являются трихлоруксусная кислота (ТХУ) [140, 141–143], сочетание ТХУ с дезоксихолатом [144]; соли цинка [145], а также дубильные кислоты [142, 146–148]. Отмытый и подсушенный белок анализируют методом Кьельдаля. Небелковый азот находят по разности в содержании общего и белкового азота.

Содержание белка в пищевых продуктах и кормах измеряется косвенно – умножением содержащегося в них азота на коэффициент пересчета. Наиболее распространенным является коэффициент 6.25 [12]. При его введении исходили из предположений, что, во-первых, содержание азота во всех белках составляет 16 % и, во-вторых, весь азот получен из белка. Однако аминокислотный анализ показал, что в различных пищевых белках содержание азота колеблется от 13.4 до 19.1 % [149], и, следовательно, коэффициент пересчета может варьироваться в диапазоне от 5.26 до 7.69 [150].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на более чем вековой возраст, метод Кьельдаля не потерял своей актуальности: он по-прежнему остается стандартным методом определения содержания белка и используется как для градуировки, так и для проверки альтернативных методов определения белка. Процесс автоматизации, затронувший все стадии метода, минимизировал контакт оператора с вредными и опасными веществами, сократил длительность анализа и сделал метод востребованным для контроля широкого круга объектов, в который входят продукты питания, образцы экологического и биологического происхождения, почвы, растения, злаки, семена масличных культур и удобрения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern // *Z. Anal. Chem.* 1883. V. 22. P. 366–382.
2. Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? / V.L.M. Finete [et al.] // *Food Chem.* 2013. V. 141. P. 3649–3655.
3. Schlesier B., Jank H.-W., Schlüter U. Determination of crude protein by Kjeldahl digest and indophenolblue reaction [Rohprotein-Bestimmung durch Kjeldahl-Aufschluß und Indophenolblau-Reaktion] // *Die Kulturpflanze.* 1984. V. 32, № 4. P. 69–78.
4. The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. II. Selection of Direct Kjeldahl Analysis and Its Preliminary Performance Parameters / B. Vinklárková [et al.] // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2015. V. 45. P. 112–118.

5. The use of microwaves in the acceleration of digestion and colour development in the determination of total Kjeldahl nitrogen in soil / C.J. Mason [et al.] // *Analyst*. 1999. V. 124, № 11. P. 1719–1726.
6. Bremner J.M., Tabatabai M.A. Use of an ammonia electrode for determination of ammonium in Kjeldahl analysis of soils // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 1972. V. 3, № 2. P. 159–165.
7. Sweeney R.A., Gehrke C.W., Rexroad P.R. Fertilizers // *Anal. Chem.* 1981. V. 53, P. 28–38.
8. Croll B.T., Tomlinson T., Whitfield C.R.W. Determination of Kjeldahl nitrogen in sewage effluents, trade effluents and sewage sludges using a copper - titanium catalyst // *The Analyst*. 1985. V. 110, № 7. P. 861–866.
9. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish / P. Sáez-Plaza [et al.] // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2013. V. 43. P. 178–223.
10. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control / P. Sáez-Plaza [et al.] // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2013. V. 43. P. 224–272.
11. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration (Review) / J.C. Moore [et al.] // *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2010. V. 9, № 4. P. 330–357.
12. Möller J. Kjeldahl-still going strong // *In Focus*. 2009. V. 33, № 1. P. 14–16.
13. Persson J. A., Wennerholm M., O'Halloran S. Handbook for Kjeldahl digestion. A Recent Review of the Classical Method with Improvements Developed by Foss, 4th ed.; Foss: Hilleroed, Denmark. 2008. 84 p.
14. McKenzie H.A. The Kjeldahl determination of nitrogen: Retrospect and prospect // *Trends Anal. Chem.* 1994. V. 13, № 4. P. 138–144.
15. Bradstreet R. B. A Review of the Kjeldahl Determination of Organic Nitrogen // *Chem. Rev.* 1940. V. 27, № 2. P. 331–350.
16. Bradstreet R. B. The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. Academic Press, New York. 1965. P. 147–168.
17. Owusu-Apenten R. K. Kjeldahl Method, Quantitative Aminoacid Analysis and Combustion Analysis. In *Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing*; Marcel Dekker: New York. 2002. Chap. 1, P. 1–45.
18. Amin M., Flowers T.H. Evaluation of Kjeldahl digestion method // *Journal of Research (Science)*. 2004. V. 15, № 2. P. 159–179.
19. Michalski R., Kurzyca I. Determination of nitrogen species (Nitrate, Nitrite and Ammonia Ions) in environmental samples by ion chromatography (Review) // *Pol. J. Environ. Stud.* 2006. V. 15, № 1. P. 5–18.
20. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. [Электронный ресурс]: [https://www.behr-labor.de/shop\\_hacc/50/dokumente/unternehmen/behr\\_Labor\\_Technik\\_Kjeldahl\\_D.pdf](https://www.behr-labor.de/shop_hacc/50/dokumente/unternehmen/behr_Labor_Technik_Kjeldahl_D.pdf) (дата обращения 20.11.2018).
21. [Электронный ресурс]: <http://www.gerhardt.de/en/product-lines/steam-distillation/distillation-systems-vapodestr/> сайт фирмы Gerhardt (дата обращения 20.11.2018).
22. [Электронный ресурс]: <http://www.gerhardt.de/en/product-lines/digestion/kjeldathermr-block-digestion-unit/> сайт фирмы Gerhardt (дата обращения 20.11.2018).
23. [Электронный ресурс]: [www.buchi.com/kjeldahl/](http://www.buchi.com/kjeldahl/) сайт фирмы Buchi (дата обращения 20.11.2018).
24. [Электронный ресурс]: [http://www.velp.com/en/service\\_support/kjeldahl\\_nitrogen/](http://www.velp.com/en/service_support/kjeldahl_nitrogen/) сайт фирмы Velp (дата обращения 20.11.2018).
25. [Электронный ресурс]: [http://www.grupo-selecta.com/pdfs/en/cats/catpdf\\_en\\_16.pdf](http://www.grupo-selecta.com/pdfs/en/cats/catpdf_en_16.pdf) /сайт фирмы Selecta (дата обращения 20.11.2018).
26. [Электронный ресурс]: <http://www.grupo-selecta.com/en/catalogo/productos/121/Kjeldahl%20method%20apparat> /сайт фирмы Selecta (дата обращения 20.11.2018).
27. [Электронный ресурс]: <http://vilitek.ru/products/analizatory-soderzhaniya-belka-zhirov-kletchatki-vlagi/avtomaticheskij-apparat-keldalya-vilitek-akv-20/> сайт фирмы Vilitek (дата обращения 20.11.2018).
28. [Электронный ресурс]: <http://www.obrnutafaza.hr/pdf/mrc/proizvodi/Analyzers.pdf> / сайт фирмы mrc (дата обращения 20.11.2018).
29. [Электронный ресурс]: <https://www.mrclab.com/productsList.aspx?PcatID=1212> / сайт фирмы mrclab (дата обращения 20.11.2018).
30. [Электронный ресурс]: <http://www.vicompr.ru/index.php/catalog/kjeldahl/hanon-k1100f> / сайт фирмы Hanon (дата обращения 20.11.2018).
31. [Электронный ресурс]: <http://www.hanon-rus.ru/index.php/equipment/digestors/hanon-sh220f> / сайт фирмы Hanon (дата обращения 20.11.2018).
32. [Электронный ресурс]: [http://sibagropribor.ru/catalog/metod\\_keldalya/keltrun/#tab1](http://sibagropribor.ru/catalog/metod_keldalya/keltrun/#tab1) / сайт фирмы Sibagropribor (дата обращения 20.11.2018).
33. [Электронный ресурс]: <http://www.optimum-lab.ru/product/kompleks-po-opredeleniju-belkaazota-metodom-keldalja/> сайт фирмы Optimum-lab (дата обращения 20.11.2018).
34. [Электронный ресурс]: [http://foss.su/d/899525/d/laboratornoye\\_oborudovaniye\\_foss.pdf](http://foss.su/d/899525/d/laboratornoye_oborudovaniye_foss.pdf) / сайт фирмы Foss (дата обращения 20.11.2018).
35. [Электронный ресурс]: [https://www.fossanalytics.com/ru-ru/products/digestor\\_2508\\_2520#Technicalspecificationspot](https://www.fossanalytics.com/ru-ru/products/digestor_2508_2520#Technicalspecificationspot) / сайт фирмы Foss (дата обращения 20.11.2018).
36. Химические анализаторы FOSS для лабораторий. [Электронный ресурс]: <http://www.dairynews.ru/upload/iblock/e15/Laboratories%20Foss.pdf> (дата обращения 20.11.2018).
37. [Электронный ресурс]: <http://foodalyt.de/en/> сайт фирмы Foodalyt (дата обращения 20.11.2018).
38. [Электронный ресурс]: [http://foss.su/d/899525/d/laboratornoye\\_melnitsy\\_i\\_gomogenizatory.pdf](http://foss.su/d/899525/d/laboratornoye_melnitsy_i_gomogenizatory.pdf) / сайт фирмы Foss (дата обращения 20.11.2018).
39. [Электронный ресурс]: <http://vilitek.ru/products/laboratornoye-melnitsy-i-drobilki/> / сайт фирмы Vilitek (дата обращения 20.11.2018).
40. [Электронный ресурс]: <http://vilitek.ru/products/nozhevyemelnitsy-periodicheskogo-deystviya-ekspertnogo-urovnya/laboratornoye-melnitsy-dlya-tverdykh-produktov-serii-d/> сайт фирмы Vilitek (дата обращения 20.11.2018).
41. [Электронный ресурс]: <http://www.labfriend.com.au/kjeldahl-weighing-boat-609-parchment-paper-nitrogen-free>; [http://www.wiegand.ru/old/catalogs/hahnemuhle\\_albet\\_catalog\\_2010.pdf](http://www.wiegand.ru/old/catalogs/hahnemuhle_albet_catalog_2010.pdf) / сайт фирмы Labfriend (дата обращения 20.11.2018).
42. [Электронный ресурс]: <http://www.bdl.cz/vyhledavani?q=Kjeldahl> / сайт фирмы BDL.cz (дата обращения 12.04.2019).
43. Burns D.T., Stephen W.I. Kjeldahl centenary meeting // *Anal. Proc.* 1984. V. 21, № 6. P. 210–220.
44. Über die Bestimmung des Stickstoffs / U. Kreisler [et al.] // *Z. Anal. Chem.* 1885. V. 24, № 1. P. 438–459.
45. Ashton F.L. Selenium as a catalyst in the Kjeldahl method as applied to soil and grass analysis // *The Journal of Agricultural Science*. 1936. V. 26, № 2. pp. 239–248.
46. Kane P.F. Comparison of HgO and CuSO<sub>4</sub> as digestion catalysts in manual Kjeldahl determination of crude protein in animal feeds: collaborative study // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984. V. 67, № 5. P. 869–877.

47. Phelps I.K., Daudt H.W. Investigations of the for Determining Nitrogen Kjeldahl method // *J. Assoc. Offic. Agric. Chemists*. 1920. № 3. P. 306–315.
48. Lauro M. F. Use of selenium as catalyst in determination of nitrogen by kjeldahl method // *Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition*. 1931. V. 3, № 4. P. 401–402.
49. Osborne R.A., Wilkie J.B. A Study of the kjeldahl method IV. Metallic catalysts and metallic interferences // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1935. V. 18. P. 604–609.
50. Baker P. R. W. The micro-kjeldahl determination of nitrogen. An investigation of the effects of added salt and catalysts // *Talanta*. 1961. V. 8, № 2-3. P. 57–71.
51. Middleton G., Stuckey R.E. The Standardisation of the Digestion Process in the Kjeldahl Determination of Nitrogen // *J. Pharm. Pharmacol.* 1951. V. 3, № 1. P. 829–842.
52. Rich C.E. The relation of germ content to flour maturation // *Cereal Chem.* 1934. V. 11. P. 220.
53. Osborn R.A., Krasnitz A. A study of the Kjeldahl method // *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.* 1934. V. 17. P. 339–342.
54. Kane P.F.  $\text{CuSO}_4\text{-TiO}_2$  as Kjeldahl digestion catalyst in manual determination of crude protein in animal feeds // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1986. V. 69, № 4. P. 664–666.
55. Kane P.F. Comparison of  $\text{HgO}$  and  $\text{CuSO}_4/\text{TiO}_2$  as catalysts in manual Kjeldahl digestion for determination of crude protein in animal feed: collaborative study // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1987. V. 70, № 5. P. 907–911.
56. Jones M.N., Bradshaw H.D. Copper: An alternative to mercury: more effective than zirconium in kjeldahl digestion of ecological materials // *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 1989. V. 20, № 15-16. P. 1513–1524.
57. Möller J. Protein analysis revisited // *In Focus*. 2010. V. 34, № 2. P. 22–23.
58. Gunning J.W. Über eine Modification der Kjeldahl-Methode // *Z. analyt. Chem.* 1889. V. 28, № 1. P. 188–191.
59. The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. I. A Review of Kjeldahl Methods Adopted by Laboratory Medicine / V. Chromý [et al.] // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2015. V. 45. P. 106–111.
60. Christensen L.M., Fulmer E.I. A Modified Kjeldahl method for the determination of the nitrogen content of yeast // *Plant Physiol.* 1927. V. 2, № 4. P. 455–460.
61. Cai J. B., Wang S.-F. Simultaneous Determination of Total Nitrogen and Metal Elements in Tobaccos by High Performance Ion Chromatography // *J. Chin. Chem. Soc.* 2009. V. 56. P. 671–675.
62. Jacobs S., Butterworth D. The Determination of Nitrogen in Biological Materials // *C R C Crit. Rev. Anal. Chem.* 1978. V. 7, № 4. P. 297–322.
63. Hach C.C., Brayton S.V., Kopelove A.B. A Powerful Kjeldahl Nitrogen Method Using Peroxymonosulfuric Acid // *J. Agric. Food Chem.* 1985. V. 33. P. 1117–1123.
64. Rapid dissolution technique for calorimetric determination of nitrogen in coals / G.A. Norton [et al.] // *Fuel*. 1987. V. 66. P. 996–1001.
65. Kjeldahl Digestion: Infrared or Conventional Heating / H. Hilz [et al.] // *Nachrichten aus der Chemie*. 2012. V. 60, № 9. P. 901–902.
66. Abu-Sarra A., Morris J. S., Koirtyohann S. R. Wet Ashing of Some Biological Samples in a Microwave Oven // *Anal. Chem.* 1975. V. 47, № 8. P. 1475–1477.
67. Кубракова И.В. Микроволновое излучение в аналитической химии: возможности и перспективы использования // *Успехи химии*. 2002. Т. 71. С. 327–340.
68. A simultaneous, direct microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen / C. Domini [et al.] // *Ultrason. Sonochem.* 2009. V. 16, № 4. P. 564–569.
69. Chemat S., Lagha A., Ait Amar H., Chemat F. Ultrasound assisted microwave digestion // *Ultrason. Sonochem.* 2004. V. 11, № 1. P. 5–8.
70. Korn Md., Dos Santos W.P., Korn M., Ferreira S.L. Optimisation of focused-microwave assisted digestion procedure for Kjeldahl nitrogen determination in bean samples by factorial design and Doehlert design // *Talanta*. 2005. V. 65, № 3. P. 710–715.
71. Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: Validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method / B. Beljkaš [et al.] // *Accred. Qual. Assur.* 2010. V. 15, № 10. P. 555–561.
72. Winkler J.W. Beitrag zur titrimetrischen bestimmung des ammoniaks. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1913. V. 26, № 31. P. 231–232.
73. Martín J., Fernández Sarria L, Asuero A.G. The Kjeldahl Titrimetric Finish: On the Ammonia Titration Trapping in Boric Acid // In book: *Advances in Titration Techniques*. 2017. P. 23–58.
74. Ma T. S., Zuazaga G. Determination of Nitrogen by Micro-Kjeldahl Procedure // *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 1942. V. 14. P. 280–282.
75. Marzenko Z., Balcerzak M. Chapter 34 - Nitrogen // *Analytical Spectroscopy Library*. 2000. P. 304–314.
76. Bolleter W.T., Bushman C.J., Tidwell P.W. Spectrophotometric Determination of Ammonia as Indophenol // *Anal. Chem.* 1961. V. 33, № 4. P. 592–594.
77. Analytical challenges and advantages of using flow-based methodologies for ammonia determination in estuarine and marine waters (Review) / L.O. Šraj [et al.] // *TrAC. Trends Anal. Chem.* 2014. V. 59. P. 83–92.
78. Spectrophotometric Method for Microdetermination of Nitrogen in Kjeldahl Digest / M.B. Devani [et al.] // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1989. V. 72. P. 953–956.
79. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences // *J. Agric. Food Chem.* 2004. V. 52, № 3. P. 385–406.
80. Quinn J. R., Boisvert J. G., Wood I. Semi-automated ninhydrin assay of Kjeldahl nitrogen // *Anal. Biochem.* 1974. V. 58. P. 609–614.
81. Danielson N.D., Conroy C. M. Fluorometric determination of hydrazine and ammonia separately or in mixtures // *Talanta*. 1982. V. 29, № 5. P. 401–404.
82. Kitamaki Y., Jin J.-Y., Takeuchi T. Simultaneous determination of inorganic nitrogen species by microcolumn ion chromatography // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1003, № 1-2. P. 197–202.
83. Cathepsin B2 measurement by sensitive fluorometric ammonia analysis / S. Taylor [et al.] // *Anal. Biochem.* 1974. V. 60, № 1. P. 153–162.
84. Goyal S.S., Rains D.W., Huffaker R.C. Determination of Ammonium Ion by Fluorometry or Spectrophotometry after On-Line Derivatization with o-Phthalaldehyde // *Anal. Chem.* 1988. V. 60. P. 175–179.
85. Ross J.W., Riseman J.H., Krueger J. A. Potentiometric gas sensing electrodes // *Pure Appl. Chem.* 1973. V. 36. P. 473–487.
86. Meyerhoff M.E., Fraticelli Y.M. Ion-Selective Electrodes // *Anal. Chem.* 1982. V. 54, № 5. P. 27–44.
87. Verma P., Rastogi R.K., Ramakumar K.L. Determination of trace amounts of nitrogen in uranium based samples by ion chromatography (IC) without Kjeldahl distillation // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V. 596. P. 281–284.
88. Schwarz J., Kaden H., Pausch G. Development of miniaturized potentiometric nitrate- and ammonium selective electrodes for applications in water monitoring // *Fresenius' J. Anal. Chem.* 2000. V. 367, № 4. P. 396–398.

89. Jackson D.T., Nelson P.N. Preparation and properties of some ionselectivemembranes: A review (Review) // *J. Mol. Struct.* 2019. V. 1182, № 4. P. 241–259.
90. Design and Synthesis of a More Highly Selective Ammonium Ionophore than Nonactin and its Application as an Ion-Sensing Component for an Ion-Selective Electrode / K. Suzuki [et al.] // *Anal. Chem.* 2000. V. 72. P. 2200–2205.
91. Tuning and dissecting electronic and steric effects in ammonium receptors: Nonactin vs artificial receptors. / J. Chin [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124, № 19. P. 5374–5379.
92. Remarkably selective  $\text{NH}_4^+$  binding and fluorescence sensing by tripodal tris(pyrazolyl) receptors derived from 1,3,5-triethylbenzene: Structural and theoretical insights on the role of ion pairing / T.M. Jonah [et al.] // *New J. Chem.* 2017. V. 41, № 24. P. 14835–14838.
93. A Rational Approach to Selective Recognition of  $\text{NH}_4^+$  over  $\text{K}^+$  / J. Chin [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999. V. 38. N. 18. P. 2756–2759.
94. Reusch C.F., Cussler E.L. Selective membrane transport // *AIChE J.* 1973. V. 19, № 4. P. 736–741.
95. Thiazole-containing benzo-crown ethers: A new class of ammonium-selective ionophores / H.-S. Kim [et al.] // *Anal. Chem.* 2000. V. 72, № 19. P. 4683–4688.
96. Späth A., Knig B. Molecular recognition of organic ammonium ions in solution using synthetic receptors (Review) // *Beilstein J. Org. Chem.* 2010. V. 6, № 32. P. 3–111.
97. Molecular Recognition. Selective Ammonium Cryptates of Synthetic Receptor Molecules Possessing a Tetrahedral Recognition Site / E.J. Graf [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* 1982. V. 104. P. 1672–1678.
98. Tuning and dissecting electronic and steric effects in ammonium receptors: Nonactin vs artificial receptors / J. Chin [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124, № 19. P. 5374–5379.
99.  $^{13}\text{C}$  NMR study of the ion-binding selectivity of a new ammonium ionophore / W.G. McGimpsey [et al.] // *Magn. Reson. Chem.* 2008. V. 46. P. 955–961.
100. Benco J.S., Nienaber H.A., McGimpsey W.G. Synthesis of an ammonium ionophore and its application in a planar ion-selective electrode // *Anal. Chem.* 2003. V. 75, № 1. P. 152–156.
101. Tripodal receptors for cation and anion sensors / B. Kuswandi // *Sensors.* 2006. V. 6, № 8. P. 978–1017.
102. Crystalline Ammonium Complexes of Trimethyl- and Triethylbenzene-Based Tripodal Compounds Bearing Pyrazole and Indazole Groups / M.M. Schulze [et al.] // *Eur. J. Org. Chem.* 2018. V. 2018, № 31. P. 4317–4330.
103. Casadellà A., Schaeztle O., Loos K. Ammonium across a selective polymer inclusion membrane: characterization, transport, and selectivity // *Macromol. Rapid Commun.* 2016. V. 37. P. 858–864.
104. A microscale Kjeldahl nitrogen determination for environmental waters / P. Campins-Falco [et al.] // *Talanta.* 2008. V. 75, № 4. P. 1123–1126.
105. Růžička J., Hansen E. H. Flow Injection Analyses Part I. A new Concept of Fast Continuous Flow Analysis // *Anal. Chim. Acta.* 1975. V. 78. P. 145–157.
106. Flow injection analysis. Part III. Comparison of continuous flow spectrophotometry and potentiometry for the rapid determination of the total nitrogen content in plant digests / J.W.B. Stewart [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 1976. V. 81, № 2. P. 371–386.
107. Evaluation of flow injection methods for ammonium determination in wastewater samples / A. Cerdà [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 1995. V. 311. P. 165–173.
108. Ion exchange in flow injection analysis. Determination of ammonium ions at the mg L<sup>-1</sup> level in natural waters with pulsed Nessler reagent / F.H. Bergamin [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 1980. V. 117. P. 81–89.
109. Determination of ammonia in beers by pervaporation flow injection analysis and spectrophotometric detection / L. Wang [et al.] // *Talanta.* 2003. V. 60. P. 1269–1275.
110. Pervaporation-flow injection determination of ammonia in the presence of surfactants / L. Wang [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2000. V. 416, № 2. P. 177–184.
111. Kerouel R., Aminot A. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis // *Mar. Chem.* 1997. V. 57. P. 267–275.
112. Genfa Z., Dasgupta P.K. Fluorimetric measurement of aqueous ammonium ion in a flow injection system // *Anal. Chem.* 1989. V. 61. P. 408–412.
113. Spectrophotometric determination of ammonia nitrogen in water by flow injection analysis based on  $\text{NH}_3$ -o-phthalaldehyde- $\text{Na}_2\text{SO}_3$  reaction / Y. Liang [et al.] // *Anal. Chem. Res.* 2016. V. 10. P. 1–8.
114. Aminot A., Kerouel R., Birot D. A flow injection-fluorometric method for the determination of ammonium in fresh and saline waters with a view to in situ analyses // *Water Res.* 2001. V. 35, № 7. P. 1777–1785.
115. Determination of ammonium in seawater by purge-and-trap and flow injection with fluorescence detection / Y. Zhu [et al.] // *Anal. Lett.* 2016. V. 49, № 5. P. 665–675.
116. A multi-commuted flow injection system with a multi-channel propulsion unit placed before detection: Spectrophotometric determination of ammonium / S.M. Oliveira [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 600, № 1-2. P. 29–34.
117. Tryzell R., Karlberg B. Calibration methods for determination of ammonium and excess acid in Kjeldahl digests by flow injection analysis // *Anal. Chim. Acta.* 1997. V. 343, № 3. P. 183–190.
118. A gas-diffusion flow injection method coupled with on-line solid-liquid extraction for the de-termination of ammonium in solid samples / I.I. Timofeeva [et al.] // *Talanta.* 2015. V. 142. P. 140–144.
119. Hunter D.A., Uglow R.F. A technique for the measurement of total ammonia in small volumes of seawater and hemolymph // *Ophelia.* 1993. V. 37. P. 31–40.
120. Lima J.F.C.C., Delerue-Matos C., Carmo Vaz M. Flow-injection analysis of Kjeldahl nitrogen in milk and dairy products by potentiometric detection // *Anal. Chim. Acta.* 1999. V. 385, № 1-3. P. 6–9.
121. Stepwise injection potentiometric determination of ammonium-ions in water / A.V. Bulatov [et al.] // *J. Flow Injection Anal.* 2009. V. 26, № 1. P. 49–52.
122. Pasquini C., De Faria L.C. Flow-injection determination of ammonia in kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry // *Anal. Chim. Acta.* 1987. V. 193. N. 19. P. 19–27.
123. Junsomboon J., Jakmunee J. Flow injection conductometric system with gas diffusion separation for the determination of Kjeldahl nitrogen in milk and chicken meat // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 627, № 2. P. 232–238.
124. Yanu P., Jakmunee J. Down scaled Kjeldahl digestion and flow injection conductometric system for determination of protein content in some traditional northern Thai foods // *Food Chem.* 2017. V. 230, № 1. P. 572–577.
125. Flow-injection analysis with fluorescence detection for the determination of trace levels of ammonium in seawater / R.J. Watson [et al.] // *Environ. Monit.* 2005. V. 7. P. 37–42.
126. Amornthamarong, N., Zhang, J.-Z., Ortner, P.B. An autonomous batch analyzer for the determination of trace ammonium in natural waters using fluorometric detection // *Analytical Methods.* 2011. V. 3, № 7. P. 1501–1506.

127. Small H. Ion Chromatography. New York. Plenum Publishing. 1989. 276 p.
128. Michalski R. Ion Chromatography Applications in Waste water Analysis // *Separations*. 2018. V. 5, № 16. P. 1–12.
129. Michalski R. Applications of Ion Chromatography for the Determination of Inorganic Cations // *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2009. V. 39, № 4. P. 230–250.
130. Small H., Stevens T.S., Bauman W.C. Novel Ion Exchange Chromatographic Method Using Conductometric Detection // *Anal. Chem.* 1975. V. 47. P. 1801–1806.
131. Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К Ионная хроматография. М.: Мир, 1984. 221 с.
132. Salt Converter-Cation Electrolytically Regenerated Suppressor 500 (Dionex SC-CERS 500) 031849 Revision 04 • December 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-031849-IC-SC-CERS-500-Man031849-EN.pdf>
133. Suppressor design and detection for ion chromatography. In book: Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products / K. Srinivasan [et al.]. New York, NY: Wiley, 2012. P. 91–105.
134. Trevani L.N., Roberts J.C., Tremaine P.R. Copper (II)-ammonia complexation equilibria in aqueous solutions at temperatures from 30 to 250°C by visible spectroscopy // *J. Solution Chem.* 2001. V. 30, № 7. P. 585–622.
135. Determination of total nitrogen in food, environmental and other samples by ion chromatography after Kjeldahl digestion / P.E. Jackson [et al.] // *J. Chromatogr.* 1991. V. 546. P. 405–410.
136. A simplified version of the total Kjeldahl nitrogen method using an ammonia extraction ultrasound-assisted purge-and-trap system and ion chromatography for analyses of geological samples / F.V.M. Pontes [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 632. P. 284–288.
137. Protein Nitrogen Determination by Kjeldahl Digestion and Ion Chromatography / H. Wang [et al.] // *J. Pharm. Sci.* 2016. V. 105, № 6. P. 1851–1857.
138. Moldoveanu S. Chromatographie détermination of total nitrogen following the kjeldahl oxidation // *J. Chromatogr. Sci.* 1988. V. 26, № 1. P. 12–14.
139. Krotz L., Ciceri E., Giazzi G. Protein Determination in Cereals and Seeds // *Food Quality*. 2008. V. 15, № 4. P. 37–39.
140. Rowland, S. J. The protein distribution in normal and abnormal milk // *Journal of Dairy Research*. 1938. V. 357, № 9. P. 47–57.
141. A non-protein nitrogen index for discriminating raw milk protein adulteration via the Kjeldahl method / P. Gao [et al.] // *Analytical Methods*. 2015. V. 7. P. 9166–9170.
142. Non-protein nitrogen determination: A screening tool for nitrogenous compound adulteration of milk powder / J.W. DeVries [et al.] // *International Dairy Journal*. 2017. V. 68. P. 46–51.
143. Sinaga S.M., Lubis I.Y., Silalahi J. Analysis of Total Protein and Non-Protein Nitrogen in Pakkat (Calamus caesius Blume.) as a Traditional Food of Mandailing Natal by using Kjeldahl Method // *Int. J. Pharm. Tech Res.* 2016. V. 9, № 12. P. 543–549.
144. Handbook of Pharmaceutical Excipient / Edited by Rowe R.C., Sheskey P.J., Owen S.C. London: APhA/Pharmaceutical Press; 2009. 888 p. [Электронный ресурс]: <https://trove.nla.gov.au/version/208133392> (дата обращения 20.11.2018).
145. Scott L.D. Rapid methods for the quantitative determination of total protein and non-protein nitrogen in human and cow's milk // *Biochem. J.* 1934. V. 28. P. 1193–1197.
146. Courtney A.M., Brown A. The protein and non-protein fractions of some samples of woman's milk // *Archives of Disease in Childhood*. 1930. V. 5. P. 36–41.
147. Silanikove N., Perevolotsky A., Provenza F.D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative post-ingestive effects in ruminants // *Animal Feed Science and Technology*. 2001. V. 91. P. 69–81.
148. Turley D.J., Kelly M.T., Smyth M.R. High-performance liquid chromatographic method for the comparison of tanning capacity of tannic acid batches used in the manufacture of pregnancy testing kits // *J. Chromatogr. A*. 1990. V. 513. P. 263–269.
149. Chang S.K.C. Protein Analysis. In: Food Analysis. Editors: S.S. Nielsen. Springer Science+Business Media, LLC 2010. P. 133–146.
150. Krul E.S. Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors: A Review with a Focus on Soy Protein JAOCS // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2019. V. 96. № 4. P. 339–364.

## REFERENCES

- Kjeldahl J. Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Z. Anal. Chem.*, 1883, vol. 22, pp. 366–382. doi: 10.1007/BF01338151.
- Finete V.L.M., Gouvêa M.M., Marques F.F.C., Netto A.D.P. Is it possible to screen for milk or whey protein adulteration with melamine, urea and ammonium sulphate, combining Kjeldahl and classical spectrophotometric methods? *Food Chem.*, 2013, vol. 141, pp. 3649–3655. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.046.
- Schlesier B., Jank H.-W., Schlüter U. Determination of crude protein by Kjeldahl digest and indophenolblue reaction [Rohprotein-Bestimmung durch Kjeldahl-Aufschluß und Indophenolblau-Reaktion]. *Die Kulturpflanze*, 1984, vol. 32, no. 4, pp. 69–78. doi: 10.1007/BF02002070.
- Vinklárková B., Chromý V., Šprongl L., Bittová M., Rikanová M., Ohnůtková I., Žaludová L. The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. II. Selection of Direct Kjeldahl Analysis and Its Preliminary Performance Parameters. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2015, vol. 45, pp. 112–118. doi: 10.1080/10408347.2014.892821.
- Mason C.J., Coe G., Edwards M., Riby P.G. The use of microwaves in the acceleration of digestion and colour development in the determination of total Kjeldahl nitrogen in soil. *Analyst*, 1999, vol. 124, no. 11, pp. 1719–1726. doi: 10.1039/a903623g.
- Bremner J.M., Tabatabai M.A. Use of an ammonia electrode for determination of ammonium in Kjeldahl analysis of soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 1972, vol. 3, no. 2, pp. 159–165. doi: 10.1080/00103627209366361.
- Sweeney R.A., Gehrke C.W., Rexroad P.R. Fertilizers. *Anal. Chem.*, 1981, vol. 53, pp. 28–38. doi: 10.1021/ac00228a003.
- Croll B.T., Tomlinson T., Whitfield C.R.W. Determination of Kjeldahl nitrogen in sewage effluents, trade effluents and sewage sludges using a copper - titanium catalyst. *The Analyst*, 1985, vol. 110, no. 7, pp. 861–866. doi: 10.1039/AN9851000861.
- Sáez-Plaza P., Michałowski T., Navas M.J., Asuero A.G., Wybraniec S. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2013, vol. 43, pp. 178–223. doi: 10.1080/10408347.2012.751786
- Sáez-Plaza P., Navas M.J., Wybraniec S., Michałowski T., Asuero A.G. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part II. Sample Preparation, Working Scale, Instrumental Finish, and Quality Control. *Crit. Rev.*

- Anal. Chem.*, 2013, vol. 43, pp. 224–272. doi:10.1080/10408347.2012.751787.
11. Moore J.C., DeVries J.W., Lipp M., Griffiths J.C., Abernethy D.R. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 2010, vol. 9, no. 4, pp. 330–357. doi: 10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x
  12. Möller J. Kjeldahl-still going strong. *In Focus*, 2009, vol. 33, no. 1, pp.14–16.
  13. Persson J. A., Wennerholm M., O'Halloran S. Handbook for Kjeldahl digestion. A Recent Review of the Classical Method with Improvements Developed by Foss. 4th ed.; Foss: Hilleroed, Denmark, 2008, 84 p. <https://docslide.net/documents/handbook-for-kjeldahl-digestion-562e65c87fccc.html>.
  14. McKenzie H.A. The Kjeldahl determination of nitrogen: Retrospect and prospect. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 1994, vol. 13, no. 4, pp.138–144. doi: 10.1016/0165-9936(94)87028-4
  15. Bradstreet R. B. A Review of the Kjeldahl Determination of Organic Nitrogen. *Chem. Rev.*, 1940, vol. 27, no. 2, pp. 331–350. doi: 10.1021/cr60087a002.
  16. Bradstreet R. B. The Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. Academic Press, New York, 1965. pp. 147–168.
  17. Owusu-Apenten R. K. Kjeldahl Method, Quantitative Aminoacid Analysis and Combustion Analysis. In Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing. New York, Marcel Dekker, 2002; Chap. 1, pp. 1–45.
  18. Amin M., Flowers T.H. Evaluation of Kjeldahl digestion method. *Journal of Research (Science)*, 2004, vol. 15, no. 2, pp. 159–179.
  19. Michalski R., Kurzyca I. Determination of nitrogen species (Nitrate, Nitrite and Ammonia Ions) in environmental samples by ion chromatography. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2006, vol. 15, no. 1, pp. 5–18.
  20. Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl. Available at: [https://www.behr-labor.de/shop\\_hacc/50/dokumente/unternehmen/behr\\_Labor\\_Technik\\_Kjeldahl\\_D.pdf](https://www.behr-labor.de/shop_hacc/50/dokumente/unternehmen/behr_Labor_Technik_Kjeldahl_D.pdf) (Accessed 20.11.2018).
  21. Gerhardt. Available at: <http://www.gerhardt.de/en/product-lines/steam-distillation/distillation-systems-vapodestr/> (Accessed 20.11.2018).
  22. Gerhardt. Available at: <http://www.gerhardt.de/en/product-lines/digestion/kjeldathermr-block-digestion-unit/> (Accessed 20.11.2018).
  23. Buchi. Available at: [www.buchi.com/kjeldahl](http://www.buchi.com/kjeldahl) (Accessed 20.11.2018).
  24. Velp. Available at: [http://www.velp.com/en/service\\_support/kjeldahl\\_nitrogen](http://www.velp.com/en/service_support/kjeldahl_nitrogen) (Accessed 20.11.2018).
  25. Selecta. Available at: [http://www.grupo-selecta.com/pdfs/en/cats/catpdf\\_en\\_16.pdf](http://www.grupo-selecta.com/pdfs/en/cats/catpdf_en_16.pdf) (Accessed 20.11.2018).
  26. Selecta. Available at: <http://www.grupo-selecta.com/en/catalogo/productos/121/Kjeldahl%20method%20apparatus> (Accessed 20.11.2018).
  27. Vilitex. Available at: <http://vilitex.ru/products/analizatory-soderzhaniya-belka-zhirov-kletchatki-vlagi/avtomaticheskij-apparat-keldalya-vilitex-akv-20/> (Accessed 20.11.2018).
  28. MRC Available at: <http://www.obrnutafaza.hr/pdf/mrc/proizvodii/Analyzers.pdf> (Accessed 20.11.2018).
  29. MRCLAB Available at: <https://www.mrclab.com/productsList.aspx?PcatID=1212> (Accessed 20.11.2018).
  30. Hanon Available at: <http://www.vicomp.ru/index.php/catalog/kjeldahl/hanon-k1100f> (Accessed 20.11.2018).
  31. Hanon Available at: <http://www.hanon-rus.ru/index.php/equipment/digestors/hanon-sh220f> (Accessed 20.11.2018).
  32. Sibagropribor. Available at: [http://sibagropribor.ru/catalog/metod\\_keldalya/keltrun/#tab1](http://sibagropribor.ru/catalog/metod_keldalya/keltrun/#tab1) (Accessed 20.11.2018).
  33. Optimum-lab. Available at: <http://www.optimum-lab.ru/product/kompleks-po-opredeleniju-belkaazota-metodom-keldalja/> (Accessed 20.11.2018).
  34. FOSS. Available at: [http://foss.su/d/899525/d/laboratornoye\\_oborudovaniye\\_foss.pdf](http://foss.su/d/899525/d/laboratornoye_oborudovaniye_foss.pdf) (Accessed 20.11.2018).
  35. FOSS. Available at: [https://www.fossanalytics.com/ru-ru/products/digestor\\_2508\\_2520#Technicalspecificationspot](https://www.fossanalytics.com/ru-ru/products/digestor_2508_2520#Technicalspecificationspot) (Accessed 20.11.2018).
  36. Himicheskie analizatory FOSS dlja laboratorij. Available at: <http://www.dairynews.ru/upload/iblock/e15/Laboratories%20Foss.pdf> (Accessed 20.11.2018).
  37. FoodALYT. Available at: <http://foodalyt.de/en/> (Accessed 20.11.2018).
  38. FOSS. Available at: [http://foss.su/d/899525/d/laboratornyye\\_melnitsy\\_i\\_gomogenizatory.pdf](http://foss.su/d/899525/d/laboratornyye_melnitsy_i_gomogenizatory.pdf) (Accessed 20.11.2018).
  39. Vilitex. Available at: <http://vilitex.ru/products/laboratornye-melnitsy-i-drobilki/> (Accessed 20.11.2018).
  40. Vilitex. Available at: <http://vilitex.ru/products/nozhevye-melnitsy-periodicheskogo-deystviya-ekspertnogo-urovnya/laboratornye-melnitsy-dlya-tverdykh-produktov-serii-d/> (Accessed 20.11.2018).
  41. LabFriend. Available at: <http://www.labfriend.com.au/kjeldahl-weighing-boat-609-parchment-paper-nitrogen-free;ALBET>. Available at: [http://www.wiegand.ru/old/catalogs/hahnemuhle\\_albet\\_catalog\\_2010.pdf](http://www.wiegand.ru/old/catalogs/hahnemuhle_albet_catalog_2010.pdf) (Accessed 20.11.2018).
  42. BDL.cz. Available at: <http://www.bdl.cz/vyhledavani?q=Kjeldahl> (Accessed 12.04.2019).
  43. Burns D.T., Stephen W.I. Kjeldahl centenary meeting // *Anal. Proc.* 1984. vol. 21, no. 6. pp. 210–220. doi: 10.1039/AP9842100210.
  44. Kreuzler U., Kissling B., Bamsay W., Loges G., Arnold C., Dafert F.W., Wilfarth H. Über die Bestimmung des Stickstoffs. *Z. Anal. Chem.*, 1885, vol. 24, no. 1, pp. 438–459. doi: 10.1007/BF01366755.
  45. Ashton F.L. Selenium as a catalyst in the Kjeldahl method as applied to soil and grass analysis. *The Journal of Agricultural Science*, 1936, vol. 26, no. 2, pp. 239–248. <https://doi.org/10.1017/S0021859600021924>.
  46. Kane P.F. Comparison of HgO and CuSO<sub>4</sub> as digestion catalysts in manual Kjeldahl determination of crude protein in animal feeds: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1984. vol. 67, no. 5, pp. 869–877. PubMed: 3680131.
  47. Phelps I.K., Daudt H.W. Investigations of the for Determining Nitrogen Kjeldahl method. *J. Assoc. Offic. Agric. Chemists*, 1920, no. 3, pp. 306–315.
  48. Lauro, M. F. Use of selenium as catalyst in determination of nitrogen by kjeldahl method. *Industrial and Engineering Chemistry - Analytical Edition*, 1931, vol. 3, no. 4, pp. 401–402. doi: 10.1021/ac50076a033.
  49. Osborne R.A., Wilkie J.B. A Study of the kjeldahl method IV. Metallic catalysts and metallic interferences. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1935, vol 18, pp. 604–609.
  50. Baker P. R. W. The micro-kjeldahl determination of nitrogen. An investigation of the effects of added salt and catalysts. *Talanta*, 1961, vol. 8, no. 2-3, pp. 57–71. doi: 10.1016/0039-9140(61)80040-4.
  51. Middleton G., Stuckey R.E. The Standardisation of the Digestion Process in the Kjeldahl Determination of Nitrogen. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1951, vol. 3, no. 1, pp. 829–842. doi: 10.1111/j.2042-7158.1951.tb13127.x.
  52. Rich C.E. The relation of germ content to flour maturation. *Cereal Chem.* 1934, vol. 11, p. 220
  53. Osborn R.A., Krasnitz A. A study of the Kjeldahl method. *J. Assoc. Offic. Agr. Chem.*, 1934, vol. 17, pp. 339–342. <https://archive.org/details/in.ernet.dli.2015.26508/page/n347>

54. Kane P.F. CuSO<sub>4</sub>-TiO<sub>2</sub> as Kjeldahl digestion catalyst in manual determination of crude protein in animal feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1986, vol. 69, no. 4, pp. 664–666.
55. Kane P.F. Comparison of HgO and CuSO<sub>4</sub>/TiO<sub>2</sub> as catalysts in manual Kjeldahl digestion for determination of crude protein in animal feed: collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1987, vol. 70, no. 5, pp. 907–911.
56. Jones M.N., Bradshaw H.D. Copper: An alternative to mercury; more effective than zirconium in Kjeldahl digestion of ecological materials. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1989, vol. 20, no. 15–16, pp. 1513–1524. doi: 10.1080/00103628909368165.
57. Möller J. Protein analysis revisited. *In Focus*, 2010, vol. 34, no. 2, pp.:22–23.
58. Gunning J.W. Über eine Modification der Kjeldahl-Methode. *Z. analyt. Chem.*, 1889, vol. 28, no. 1, pp. 188–191. doi: 10.1007/BF01375926.
59. Chromý V., Vinklářková B., Šprongl L., Bittová M. The Kjeldahl Method as a Primary Reference Procedure for Total Protein in Certified Reference Materials Used in Clinical Chemistry. I. A Review of Kjeldahl Methods Adopted by Laboratory Medicine. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2015, vol. 45, pp. 106–111. doi: 10.1080/10408347.2014.892820.
60. Christensen L.M., Fulmer E.I. A Modified Kjeldahl method for the determination of the nitrogen content of yeast. *Plant Physiol.*, 1927, vol. 2, no. 4, pp. 455–460.
61. Cai J. B., Wang S.-F. Simultaneous Determination of Total Nitrogen and Metal Elements in Tobaccos by High Performance Ion Chromatography. *J. Chin. Chem. Soc.*, 2009, vol. 56, pp. 671–675. doi: 10.1002/jccs.200900100.
62. Jacobs S., Butterworth D. The Determination of Nitrogen in Biological Materials. *C R C Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1978, vol. 7, no. 4, pp. 297–322. doi: 10.1080/10408347808542703.
63. Hach C.C., Brayton S.V., Kopelove A.B. A Powerful Kjeldahl Nitrogen Method Using Peroxymonosulfuric Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 1985, vol. 33, pp. 1117–1123. doi: 10.1021/jf00066a025.
64. Norton G.A., Adams N.S., Markuszewski R., Brayton S.V. Rapid dissolution technique for calorimetric determination of nitrogen in coals // *Fuel*, 1987, vol. 66, pp. 996–1001. doi: 10.1016/0016-2361(87)90342-5.
65. Hiltz H., Eilers A., Markle G., Beninga C., Rieger E.M. Kjeldahl Digestion: Infrared or Conventional Heating. *Nachrichten aus der Chemie*, 2012, vol. 60, no. 9, pp. 901–902. doi: 10.1002/nadc.201290317.
66. Abu-Sarra A., Morris J. S., Koirtiyohann S. R. Wet Ashing of Some Biological Samples in a Microwave Oven. *Anal. Chem.*, 1975, vol. 47, no. 8, pp. 1475–1477.
67. Kubrakova I.V. Microwave radiation in analytical chemistry: The scope and prospects for application. *Russian Chemical Reviews*, 2002, vol. 71, no. 4, pp. 283–294. doi: 10.1070/RC2002v071n04ABEH000699. <https://iopscience.iop.org/article/10.1070/RC2002v071n04ABEH000699/pdf>.
68. Domini C., Vidal L., Cravotto G., Canals A. A simultaneous, direct microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen. *Ultrason. Sonochem.*, 2009, vol. 16, no. 4, pp. 564–569. doi:10.1016/j.ultsonch.2008.12.006.
69. Chemat S., Lagha A., Ait Amar H., Chemat F. Ultrasound assisted microwave digestion. *Ultrason Sonochem.*, 2004, vol. 11, no. 1, pp. 5–8. doi: 10.1016/S1350-4177(03)00128-7.
70. Korn Md., Dos Santos W.P., Korn M., Ferreira S.L. Optimisation of focused-microwave assisted digestion procedure for Kjeldahl nitrogen determination in bean samples by factorial design and Doehlert design. *Talanta*, 2005, vol. 65, no. 3, pp. 710–715. doi: 10.1016/j.talanta.2004.07.047.
71. Beljkaš B., Matić J., Milovanović I., Jovanov P., Mišan A., Šarić L. Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: Validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method. *Accred. Qual. Assur.*, 2010, vol. 15, no. 10, pp. 555–561. doi: 10.1007/s00769-010-0677-6.
72. Winkler J.W. Beitrag zur titrimetrischen bestimmung des ammoniaks. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1913, vol. 26, no. 31, pp. 231–232.
73. Martín J., Fernández Sarria L, Asuero A.G. The Kjeldahl Titrimetric Finish: On the Ammonia Titration Trapping in Boric Acid. In book: *Advances in Titration Techniques*, 2017. pp. 23–58. doi: 10.5772/intechopen.68826.
74. Ma T. S., Zuazaga G. Determination of Nitrogen by Micro-Kjeldahl Procedure. *Ind. Eng. Chem. Anal.*, Ed. 1942, vol. 14, pp. 280–282.
75. Marczenko Z., Balcerzak M. Chapter 34 - Nitrogen // *Analytical Spectroscopy Library*. 2000. pp. 304–314. doi: 10.1016/S0926-4345(00)80098-X.
76. Bolleter W.T., Bushman C.J., Tidwell P.W. Spectrophotometric Determination of Ammonia as Indophenol. *Anal. Chem.*, 1961, vol. 33, no. 4, pp. 592–594.
77. Šraj L.O., Almeida M.I.G.S., Swearer S.E., Kolev S.D., McKelvie I.D. Analytical challenges and advantages of using flow-based methodologies for ammonia determination in estuarine and marine waters (Review). *TrAC. Trends Anal. Chem.*, 2014, vol. 59, pp. 83–92. doi: 10.1016/j.trac.2014.03.012.
78. Devani M.B., Shishoo C.J., Shah S.A., Suhagia B.N. Spectrophotometric Method for Microdetermination of Nitrogen in Kjeldahl Digest. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1989, vol. 72, pp. 953–956.
79. Friedman M. Applications of the Ninhydrin Reaction for Analysis of Amino Acids, Peptides, and Proteins to Agricultural and Biomedical Sciences. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, vol. 52, no. 3, pp. 385–406. doi: 10.1021/jf030490p.
80. Quinn J.R., Boisvert J.G., Wood I. Semi-automated ninhydrin assay of Kjeldahl nitrogen. *Anal. Biochem.*, 1974, vol. 58, pp. 609–614. doi: 10.1016/0003-2697(74)90230-9
81. Danielson N.D., Conroy C. M. Fluorometric determination of hydrazine and ammonia separately or in mixtures. *Talanta*, 1982, vol. 29, no. 5, pp. 401–404. doi: 10.1016/0039-9140(82)80176-8.
82. Kitamaki Y., Jin J.-Y., Takeuchi T. Simultaneous determination of inorganic nitrogen species by microcolumn ion chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2003, vol. 1003, no. 1–2, pp. 197–202. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00836-7.
83. Taylor S., Ninjoor V., Dowd D.M., Tappel A.L. Cathepsin B2 measurement by sensitive fluorometric ammonia analysis. *Anal. Biochem*, 1974, vol. 60, no. 1, pp.153–162. doi: 10.1016/0003-2697(74)90140-7.
84. Goyal S.S., Rains D.W., Huffaker R.C. Determination of Ammonium Ion by Fluorometry or Spectrophotometry after On-Line Derivatization with o-Phthalaldehyde. *Anal. Chem.*, 1988, vol. 60, pp. 175–179. doi: 10.1021/ac00153a016.
85. Ross J.W., Riseman J.H., Krueger J. A. Potentiometric gas sensing electrodes. *Pure Appl. Chem.*, 1973, vol. 36, no. 4, pp. 473–487. doi: 10.1351/pac197336040473.
86. Meyerhoff M.E., Fraticelli Y.M. Ion-Selective Electrodes. *Anal. Chem.*, 1982, vol. 54, no. 5, pp. 27–44. doi: 10.1021/ac00242a004.
87. Verma P., Rastogi R.K., Ramakumar K.L. Determination of trace amounts of nitrogen in uranium based samples by ion chromatography (IC) without Kjeldahl distillation. *Anal. Chim. Acta*, 2007, vol. 596 pp. 281–284. doi:10.1016/j.aca.2007.06.019.
88. Schwarz J., Kaden H., Pausch G. Development of miniaturized potentiometric nitrate- and ammonium selective

- electrodes for applications in water monitoring. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2000, vol. 367, no. 4, pp. 396–398. doi: 10.1007/s002160000367.
89. Jackson D.T., Nelson P.N. Preparation and properties of some ionselectivemembranes: A review (Review). *J. Mol. Struct.*, 2019, vol. 1182, no.4, pp. 241–259. doi: 10.1016/j.molstruc.2019.01.050.
90. Suzuki K., Siswanta D., Otsuka T., Amno T., Ikeda T., Hisamono H., Yashihara R., Ohba S. Design and Synthesis of a More Highly Selective Ammonium Ionophore than Nonactin and its Application as an Ion-Sensing Component for an Ion-Selective Electrode. *Anal. Chem.*, 2000, vol. 72, pp. 2200–2205.
91. Chin J., Oh J., Jon S.Y., Park S.H., Walsdorff C., Stranix B., Ghousoub Lee S. J., Chung H. J., Park S.-M., Kim K. Tuning and dissecting electronic and steric effects in ammonium receptors: Nonactin vs artificial receptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, no. 19, pp. 5374–5379. doi: 10.1021/ja0174175.
92. Jonah T.M., Mathivathanan L., Morozov A.N., Mebel A.M., Raptis R.G., Kavallieratos K. Remarkably selective  $\text{NH}_4^+$  binding and fluorescence sensing by tripodal tris(pyrazolyl) receptors derived from 1,3,5-triethylbenzene: Structural and theoretical insights on the role of ion pairing. *New J. Chem.*, 2017, vol. 41, no. 24, pp. 14835–14838. doi: 10.1039/c7nj03213g.
93. Chin J., Walsdorff C., Stranix B., Oh J., Chung H. J., Park S.-M., Kim K., A Rational Approach to Selective Recognition of  $\text{NH}_4^+$  over  $\text{K}^+$ . *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, vol. 38, no. 18, pp. 2756–2759. doi: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990917)38:18<2756::AID-ANIE2756>3.0.CO;2-6.
94. Reusch C.F., Cussler E.L. Selective membrane transport. *AIChE J.*, 1973, vol. 19, no. 4, pp. 736–741. doi: 10.1002/aic.690190409.
95. Kim H.-S., Park H.J., Oh H.J., Koh Y.K., Choi J.-H., Lee D.-H., Ch G.S., Nam H. Thiazole-containing benzo-crown ethers: A new class of ammonium-selective ionophores. *Anal. Chem.*, 2000, vol. 72, no. 19, pp. 4683–4688. doi: 10.1021/ac000177b.
96. Späth A., Knig B. Molecular recognition of organic ammonium ions in solution using synthetic receptors (Review). *Beilstein J. Org. Chem.*, 2010, vol. 6, no. 32, pp. 3–111. doi:10.3762/bjoc.6.32.
97. Graf E., Kintzinger J.P., Lehn J.M., LeMoigne J. Molecular Recognition. Selective Ammonium Cryptates of Synthetic Receptor Molecules Possessing a Tetrahedral Recognition Site. *J. Am. Chem. Soc.* 1982, vol. 104, pp. 1672–1678. doi: 10.1021/ja00370a037.
98. Chin J., Oh, J., Jon S.Y., Park S.H., Walsdorff C., Stranix B., Ghousoub A., Lee S.J., Chung H.J., Park S.-M., Kim K. Tuning and dissecting electronic and steric effects in ammonium receptors: Nonactin vs artificial receptors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, vol. 124, no. 19, pp. 5374–5379. doi: 10.1021/ja0174175.
99. McGimpsey W.G., Soto E., Driscoll P.F., Nowak C., Benco J.S., Cooper C.G.F., Lambert C.R.  $^{13}\text{C}$  NMR study of the ion-binding selectivity of a new ammonium ionophore. *Magn. Reson. Chem.* 2008, vol. 46, pp. 955–961. doi: 10.1002/mrc.2287.
100. Benco J.S., Nienaber H.A., McGimpsey W.G. Synthesis of an ammonium ionophore and its application in a planar ion-selective electrode. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, no. 1, pp. 152–156. doi: 10.1021/ac0257851.
101. Kuswandi B., Nuriman, Verboom W., Reinhoudt D.N. Tripodal receptors for cation and anion sensors, *Sensors*, 2006, vol. 6, no. 8, pp. 978–1017. doi: 10.3390/s6080978.
102. Schulze M.M., Koch N., Seichter W., Mazik M. Crystal-line Ammonium Complexes of Trimethyl- and Triethylbenzene-Based Tripodal Compounds Bearing Pyrazole and Indazole Groups. *Eur. J. Org. Chem.* 2018, Vol. 2018, no. 31, pp. 4317–4330. doi: 10.1002/efoc.201800480.
103. Casadellà A., Schaetzle O., Loos K. Ammonium a cross a selective polymer inclusion membrane: characterization, transport, and selectivity. *Macromol. Rapid Commun.*, 2016, vol. 37, pp. 858–864. doi: 10.1002/marc.201600032.
104. Campins-Falco P., Meseguer-Lloret S., Climent-Santamaria T., Molins-Legua C. A microscale Kjeldahl nitrogen determination for environmental waters. *Talanta*, 2008, vol. 75, no. 4, pp. 1123–1126. doi:10.1016/j.talanta.2008.01.037.
105. Růžička J., Hansen E. H. Flow Injection Analyses Part I. A new Concept of Fast Continuous Flow Analysis. *Anal. Chim. Acta*, 1975, vol. 78, pp. 145–157. doi: 10.1016/S0003-2670(01)84761-9.
106. Stewart J.W.B., Růžička J., Bergamin F.H., Zagatto E.A. Flow injection analysis. Part III. Comparison of continuous flow spectrophotometry and potentiometry for the rapid determination of the total nitrogen content in plant digests. *Anal. Chim. Acta*, 1976, vol. 81, no. 2, pp. 371–386. doi: 10.1016/S0003-2670(01)82035-3.
107. Cerdà A., Oms M.T., Forteza R., Cerdà V. Evaluation of flow injection methods for ammonium determination in waste-water samples. *Anal. Chim. Acta*, 1995, vol. 311, pp. 165–173. doi: 10.1016/0003-2670(95)00182-Y.
108. Bergamin F. H., Reis B. F., Jacintho A. O., Zagatto E.A.G. Ion exchange in flow injection analysis. Determination of ammonium ions at the mg L<sup>-1</sup> level in natural waters with pulsed Nessler reagent. *Anal. Chim. Acta*, 1980, vol. 117, pp. 81–89. doi: 10.1016/0003-2670(80)87007-3.
109. Wang L., Cardwell T.J., Luque de Castro M.D., Cattrall R.W., Kolev S.D. Determination of ammonia in beers by pervaporation flow injection analysis and spectrophotometric detection. *Talanta*, 2003, vol. 60, pp. 1269–1275. doi: 10.1016/S0039-9140(03)00235-2.
110. Wang L., Cardwell T.J., Cattrall R.W., Luque De Castro M.D., Kolev S.D. Pervaporation-flow injection determination of ammonia in the presence of surfactants. *Anal. Chim. Acta*, 2000, vol. 416, no. 2, pp. 177–184. doi: 10.1016/S0003-2670(00)00901-6.
111. Kerouel R., Aminot A. Fluorometric determination of ammonia in sea and estuarine waters by direct segmented flow analysis. *Mar. Chem.*, 1997, vol. 57, pp. 267–275. doi: 10.1016/S0304-4203(97)00040-6.
112. Genfa Z., Dasgupta P.K. Fluorimetric measurement of aqueous ammonium ion in a flow injection system. *Anal. Chem.*, 1989, vol. 61, pp. 408–412. doi: 10.1021/ac00180a006.
113. Liang Y., Yan C., Guo Q., Xu J., Hu H. Spectrophotometric determination of ammonia nitrogen in water by flow injection analysis based on  $\text{NH}_3$ -o-phthalaldehyde- $\text{Na}_2\text{SO}_3$  reaction. *Anal. Chem. Res.*, 2016, vol. 10, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.ancr.2016.10.001.
114. Aminot A., Kerouel R., Birot D. A flow injection-fluorometric method for the determination of ammonium in fresh and saline waters with a view to in situ analyses. *Water Res.*, 2001, vol. 35, no. 7, pp. 1777–1785. doi: 10.1016/S0043-1354(00)00429-2.
115. Zhu Y., Yuan D., Lin H., Zhou T. Determination of ammonium in seawater by purge-and-trap and flow injection with fluorescence detection. *Anal. Lett.*, 2016, vol. 49, no. 5, pp. 665–675. doi: 10.1080/00032719.2015.1041027.
116. Oliveira S.M., Lopes T.I.M.S., T'oth I.V., Rangel A.O.S.S. A multi-commuted flow injection system with a multi-channel propulsion unit placed before detection: Spectrophotometric determination of ammonium, *Anal. Chim. Acta*, 2007, vol. 600, no. 1-2, pp. 29–34. doi: 10.1016/j.aca.2007.01.019.
117. Tryzell R., Karlberg B. Calibration methods for determination of ammonium and excess acid in Kjeldahl digests by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, 1997, vol. 343, no. 3, pp. 183–190. doi: 10.1016/S0003-2670(97)00069-X.



118. Timofeeva I.I., Bulatov A.V., Moskvin A.L., Kolev S.D. A gas-diffusion flow injection method coupled with online solid-liquid extraction for the de-termination of ammonium in solid samples. *Talanta*, 2015, vol. 142, pp. 140-144. doi: 10.1016/j.talanta.2015.04.051.
119. Hunter D.A., Uglow R.F. A technique for the measurement of total ammonia in small volumes of seawater and hemolymph. *Ophelia*, 1993, vol. 37, pp. 31-40. doi: 10.1080/00785326.1993.10430375.
120. Lima J.F.C.C., Delerue-Matos C., Carmo Vaz M. Flow-injection analysis of Kjeldahl nitrogen in milk and dairy products by potentiometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 1999, vol. 385, no. 1-3, pp. 6-9. doi: 10.1016/S0003-2670(98)00687-4.
121. Bulatov A.V., Ivasenko P.A., Moskvin A.L., Moskvin L.N. Stepwise injection potentiometric determination of ammonium-ions in waters. *J. Flow Injection Anal.*, 2009, vol. 26, no. 1, pp. 49-52. doi: [https://doi.org/10.24688/jfia.26.1\\_49](https://doi.org/10.24688/jfia.26.1_49).
122. Pasquini C., De Faria L.C. Flow-injection determination of ammonia in kjeldahl digests by gas diffusion and conductometry. *Anal. Chim. Acta*, 1987, vol. 193, no. 19, pp. 19-27. doi: 10.1016/S0003-2670(00)86134-6.
123. Junsomboon J., Jakmunee J. Flow injection conductometric system with gas diffusion separation for the determination of Kjeldahl nitrogen in milk and chicken meat. *Anal. Chim. Acta*, 2008, vol. 627, no. 2, pp. 232-238. doi: 10.1016/j.aca.2008.08.012.
124. Yanu P., Jakmunee J. Down scaled Kjeldahl digestion and flow injection conductometric system for determination of protein content in some traditional northern Thai foods. *Food Chem.*, 2017, vol. 230, no. 1, pp. 572-577. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.142>.
125. Watson R.J., Butler E.C.V., Clementson L.A., Berry K.M. Flow-injection analysis with fluorescence detection for the determination of trace levels of ammonium in seawater. *Environ. Monit.*, 2005, vol. 7, pp. 37-42. doi: 10.1039/b405924g.
126. Amornthammarong N., Zhang J.-Z., Ortnr P.B. An autonomous batch analyzer for the determination of trace ammonium in natural waters using fluorometric detection. *Analytical Methods*, 2011, vol. 3, no. 7, pp. 1501-1506. doi: 10.1039/c1ay05095h.
127. Small H. *Ion Chromatography*. New York, Plenum Publishing, 1989, 276 p. doi: 10.1007/978-1-4899-2542-8.
128. Michalski R. *Ion Chromatography Applications in Waste water Analysis // Separations*, 2018, vol. 5, no. 16. doi: 10.3390/separations5010016.
129. Michalski R. Applications of Ion Chromatography for the Determination of Inorganic Cations. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2009, vol. 39, no. 4, pp. 230-250. <https://doi.org/10.1080/10408340903032453>.
130. Small H., Stevens T.S., Bauman W.C. Novel Ion Exchange Chromatographic Method Using Conductometric Detection. *Anal. Chem.*, 1975, vol. 47, pp. 1801-1806. doi: 10.1021/ac60361a017.
131. Fritz J.S., Gjerde D.T., Pohlandt C. *Ion Chromatography*, Dr. Alfred Huthig Verlag, Heidelberg-Basel-New York. 1982.
132. Salt Converter-Cation Electrolytically Regenerated Suppressor 500 (Dionex SC-CERS 500) 031849 Revision 04 • December 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/manuals/Man-031849-IC-SC-CERS-500-Man031849-EN.pdf>.
133. Srinivasan K., Bhardwaj S., Lin R., Pohl C. Suppressor design and detection for ion chromatography. In book: Applications of Ion Chromatography for Pharmaceutical and Biological Products. New York, NY: Wiley, 2012. pp. 91-105. doi: 10.1002/9781118147009.ch4.
134. Trevani L.N., Roberts J.C., Tremaine P.R. Copper (II)-ammonia complexation equilibria in aqueous solutions at temperatures from 30 to 250°C by visible spectroscopy. *J. Solution Chem.*, 2001, vol. 30, no. 7, pp. 585-622. doi: 10.1023/A:1010453412802.
135. Jackson P.E., Krol J., Heckenberg A.L., Mientjes M., Staal W. Determination of total nitrogen in food, environmental and other samples by ion chromatography after Kjeldahl digestion. *J. Chromatogr.*, 1991, vol. 546, pp. 405-410. doi: 10.1016/S0021-9673(01)93039-0.
136. Pontes F.V.M., Carneiro M.C., Vaitsman D.S., da Rocha G.P., da Silva L.I.D., Neto A.A., Monteiro M.I.C. A simplified version of the total Kjeldahl nitrogen method using an ammonia extraction ultrasound-assisted purge-and-trap system and ion chromatography for analyses of geological samples. *Anal. Chim. Acta*. 2009; vol. 632, pp. 284-288. doi: 10.1016/j.aca.2008.11.011.
137. Wang H., Pampati N., McCormick W.M., Bhattacharyya L. Protein Nitrogen Determination by Kjeldahl Digestion and Ion Chromatography. *J. Pharm. Sci.*, 2016, vol. 105, no. 6, pp. 1851-1857. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.03.039>.
138. Moldoveanu S. Chromatographie détermination of total nitrogen following the kjeldahl oxidation. *J. Chromatogr. Sci.*, 1988, vol. 26, no. 1, pp. 12-14. doi: 10.1093/chromsci/26.1.12.
139. Krotz L., Cicerci E., Giuzzi G. Protein Determination in Cereals and Seeds. *Food Quality 2008*, 15 (4), pp. 37-39.
140. Rowland S.J. The protein distribution in normal and abnormal milk. *J. Dairy Res.*, 1938, vol. 357, no. 9, pp. 47-57. doi: 10.1017/S0022029900002302.
141. Gao P., Li Z., Zan L., Yue T., Shi B. A non-protein nitrogen index for discriminating raw milk protein adulteration via the Kjeldahl method. *Analytical Methods*, 2015, vol. 7, pp. 9166-9170. doi: 10.1039/c5ay01422k.
142. DeVries J.W., Greene G.W., Payne A., Zbylut S., Scholl P.F., Wehling P., Evers J.M., Moore J.C. Non-protein nitrogen determination: A screening tool for nitrogenous compound adulteration of milk powder. *International Dairy Journal*, 2017, vol. 68, pp. 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.003>.
143. Sinaga S.M., Lubis I.Y., Silalahi J. Analysis of Total Protein and Non-Protein Nitrogen in Pakkat (Calamus caesius Blume.) as a Traditional Food of Mandailing Natal by using Kjeldahl Method. *Int. J. Pharm. Tech Res.* 2016, vol. 9, no. 12, pp. 543-549.
144. Handbook of Pharmaceutical Excipient / Edited by Rowe R.C., Sheskey P.J., Owen S.C. London: APhA/Pharmaceutical Press, 2009. 888 p. Available at: <https://trove.nla.gov.au/version/208133392> (Accessed 20.11.2018).
145. Scott L.D. Rapid methods for the quantitative determination of total protein and non-protein nitrogen in human and cow's milk. *Biochem. J.*, 1934, vol. 28, pp. 1193-1197.
146. Courtney A.M., Brown A. The protein and non-protein fractions of some samples of woman's milk. *Archives of Disease in Childhood*, 1930, vol. 5, pp. 36-41.
147. Silanikove N., Perevolotsky A., Provenza F.D. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 2001, vol. 91, pp. 69-81. doi: 10.1016/S0377-8401(01)00234-6.
148. Turley D.J., Kelly M.T., Smyth M.R. High-performance liquid chromatographic method for the comparison of tanning capacity of tannic acid batches used in the manufacture of pregnancy testing kits. *J. Chromatogr. A*, 1990, vol. 513, pp. 263-269. doi: 10.1016/S0021-9673(01)89443-7.
149. Chang S.K.C. Protein Analysis. In: Food Analysis, 2010, pp. 133-146. doi: 10.1007/978-1-4419-1478-1\_9.
150. Krul E.S. Calculation of Nitrogen-to-Protein Conversion Factors: A Review with a Focus on Soy Protein JAOCS. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2019, vol. 96, no. 4, pp. 339-364. doi: 10.1002/aocs.12196.