

Določanje maščob in beljakovin

1. Določanje maščob

1.1 Weibull-Stoldtova metoda (moka, jajca, obrok, meso, konz. zelenjava)

Princip:

Hidroliza vzorca s HCl, filtriranje, sušenje in ekstrakcija v Soxhletovem aparatu.

Pribor:

- aparat po Soxhletu
- 200 ml čaša
- steklena palčka
- lij za filtriranje
- urno steklo
- 100 ml merilni valj

Reagenti:

- koncentrirana HCl
- petroleter

Izvedba:

1. Mokri razklop vzorca: V 250 ml čašo odtehtamo 5 do 10 g svežega (moka, meso, mleko, jajca) ali zračno suhega vzorca (obrok, konz. zelenjava), dodamo 100 ml destilirane vode in 80 ml koncentrirane HCl ter segrevamo 15 minut na vreli vodni kopeli. Mešamo s stekleno palčko. Čašo postavimo nato na kuhalnik ali plinski gorilnik, pokrijemo z urnim steklom in pustimo 30 minut rahlo vreti. Še vroče razredčimo z vodo, speremo urno steklo in takoj filtriramo skozi naguban vlažen filtrirni papir. Spiramo z vročo vodo (do negativne reakcije na Cl⁻ ion). Filtrirni papir z vsebino položimo na urno steklo in sušimo 2-4 ure pri 105° C.

2. Ekstrakcija maščobe: Suh filtrirni papir z vsebino damo v ekstrakcijski tulec, pokrijemo z vato, tulec vstavimo v ekstrakcijski nastavek Soxhletovega aparata, namestimo čisto, stehtano bučko in prelijemo s topilom. Topila mora biti dovolj, da se v ekstraktorju lahko pretaka. Ekstrahiramo 4-6 ur, nato topilo oddestiliramo, ostanek v bučki sušimo eno uro pri temp. 105° C, ohladimo in stehtamo.

Račun:

% maščobe v svežem (meso, jajca, mleko) ali zračno suhem vzorcu = $\frac{b-c}{a} \cdot 100$

b = teža bučke z ostankom (g) a = odtehta vzorca (g)

c = teža prazne bučke (g)

Izračunamo odstotek maščob v svežem obroku ali konz. zelenjavi:

% mašč. v obroku = (% maščob v zračni sušini · % suhe snovi)/(100 - B)

1.2 Grossfeldova metoda

Pribor

- Erlenmeyerjeve buče po 50, 100 in 250 ml;
- Graduירani valj, 25 ml;
- Lij za odvajanje, 200 ml;
- Pipeta, 25 in 100 ml;
- Lij Ø 5 cm;
- Povratni kondenzator, kroglasti ali spiralni;
- Preluknjano urno steklo;
- Staniol.

Reagenti

- Trikloretilen (lahko je tudi tehnični). V vodni kopeli mora popolnoma izhlapeti in biti značilnega vonja, ki ne zaudarja po razkroju.
- Koncentrirana solna kislina ($d = 1,19$) ali razredčena žveplena kislina (1 + 1).

Postopek

Približno 10 g ($\pm 0,01$ g) za analizo pripravljenega vzorca stehtamo na tariranem staniolnem listku in s staniolom prenesemo v bučo, ki drži 250 ml. Dodamo 20 ml koncentrirane solne kisline, nato segrevamo na majem ognju in od časa do časa premešamo, dokler se beljakovine popolnoma ne razkrojijo, izločena mast pa plava po površini. Razkroj je končan, ko v tekočini ne plavajo več koščki tkiva. Čez grlo buče lahko poveznemo čašo, lahko pa bučo grejemo s povratnim kondenzatorjem. Sveže meso se lažje razkroji, če namesto solne kisline vzamemo 20 ml zmesi enakih delov vode in koncentrirane žveplene kisline. V tem primeru moramo po razkrojanju dodati 20 ml vode, da bi se gostota nastale tekočine zmanjšala, ker mora biti v nadaljnjem postopku manjša od gostote trikloretilena. Ko se zmes shladi na sobno temperaturo, ji s pipeto dodamo točno 100 ml trikloretilena. Nato bučo spojimo s povratnim kondenzatorjem. Zmes kuhamo 10 minut in jo pustimo, da se ohladi na sobno temperaturo, ne da bi sneli kondenzator. Zmes nato prelijemo v lij za odvajanje. Ko se plasti ločijo, filtriramo spodnjo (trikloretilensko) plast naravnost skozi filtrirni papir (\varnothing 6 do 8 cm) v Erlenmeyerjevo bučo, ki drži 100 ml in skozi preluknjano urno steklo, da preprečimo izhlapevanje trikloretilena.

S pipeto odmerimo od bistrega filtrata točno 25 ml v suho in stehtano ($\pm 0,0001$ g) Erlenmeyerjevo bučo, ki drži 50 ml. Namesto da odmerimo s pipeto, lahko odmerimo trikloretilen z merilno bučo, ki drži 25 ml. V tem primeru moramo prazno merilno bučo dva do trikrat izprati s 3 do 5 ml trikloretilena, ki ga prav tako dodamo odmerjeni količini trikloretilena v Erlenmeyerjevi buči. V vodni kopeli se predestilira ali izhlapi do suhega stanja ali z neposrednim gretjem skoraj do suhega. Paziti je treba, da se mast ne prežge, nato pa trikloretilen sušimo v sušilnici pri 105 °C še eno uro. Po hlajenju v eksikatorju ga stehtamo.

Račun

Če je bil postopek tak, kot je opisano zgoraj, t.j. ekstrahirano s 100 ml, mast pa izločena iz 25 ml trikloretilenskega ekstrakta, potem je:

$$\text{vsebina masti} = \frac{100}{g} \cdot \frac{91a}{22,75 - a}$$

pri čemer je:

a - stehtan ostanek - 25 ml trikloretilenskega ekstrakta

g - odmerjena količina

0,91 - poprečna specifična teža živalske masti.

2. Določanje beljakovin

2.1 Kjeldahlova metoda

(moka, jajca, obrok, meso, konz. zelenjava)

Princip:

Metoda temelji na določanju beljakovin neposredno prek dušika (ob upoštevanju, da je ves dušik, prisoten v živilu, beljakovinski). Za preračunavanje dušika v beljakovine uporabljamo ustrezne faktorje.

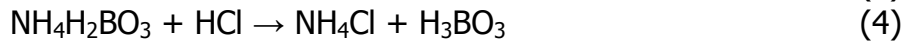
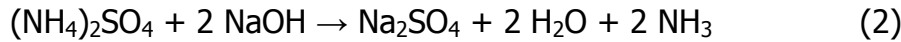
$$\% \text{ beljakovin} = \% \text{ N} \times F$$

Preglednica 1. Empirični faktorji za preračunavanje dušika v beljakovine

živilo	X (% N v beljakovini)	empirični faktor F (100/X)
mandlji	19,30	5,18
ječmen, oves, rž	17,15	5,83
otrobi	15,85	6,31
čokolada	16,00	6,25
koruza	16,00	6,25
jajca in jajčni izdelki	16,00	6,25
ribe	16,00	6,25
ribe in morski sadeži	16,00	6,25
sadje in izdelki iz sadja	16,00	6,25
želatina	18,02	5,55
glutamat	7,46	13,40
mlečni nadomestki za otroke	15,66	6,38
meso	16,00	6,25
mlečni izdelki	15,66	6,38
oreški (razen mandljev in arašidov)	18,87	5,30
oljna semena (razen arašidov)	18,87	5,30
testenine	17,54	5,70
slasčice	16,00	6,25
arašidi	18,32	5,46
riž	16,81	5,95
soja in izdelki iz soje	17,51	5,71
zelenjava in zelenjavni izdelki (razen soje)	16,00	6,25
pšenica	17,54	5,70
polnozrnati izdelki	17,15	5,83
splošni faktor za druge vzorce	16,00	6,25

1.) Vzorec razklopimo z mokrim sežigom s pomočjo kisline (H₂SO₄), katalizatorja in visoke temperature.

- 2.)** Z destilacijo z vodno paro ob dodatku močne baze sprostimo NH_3 , ki ga lovimo:
- v prebitek borove kisline in nato **3.)** titriramo amonijev borat s standardno klorovodikovo kislino ali
 - v določeno količino kisline znane koncentracije; prebitek kisline pa **3.)** titriramo z bazo znane koncentracije.

Kemizem:

Če enačbi (3) in (4) združimo:



iz te enačbe sledi:

$$1 \text{ mol HCl} = 1 \text{ mol N} = 14 \text{ g N}$$

$$1 \text{ ml } 0,1 \text{ M HCl} = 0,0014 \text{ g N}$$

Pribor:

- blok za razklop vzorca (Digestion Unit Büchi)
- enota za odvod zdravju škodljivih hlapov (Scrubber Büchi)
- destilacijska enota (Distillation Unit Büchi)
- titracijska enota (Titrino Büchi)
- sežigne epruvete
- papirnate tehtirne ladjice

Reagenti:

- koncentrirana H_2SO_4
- katalizator KJELTABS Cu/3,5 (3,5 g K_2SO_4 + 0,4 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$)
- nasičena raztopina H_3BO_3 (ca 3 %)
- 30 % raztopina NaOH
- ca 15 % raztopina NaOH
- indikator bromtimolmodro
- 0,1 M HCl

Izvedba:

Delo razdelimo na tri faze:

- mokri sežig pripravljenega homoniziranega vzorca,
- destilacija,
- titracija.

1.) V sežigno epruveto odtehtamo ca 1 – 1,3 g vzorca (ne manj kot 1 g, razen v izjemnih primerih). Če imamo moker vzorec, ga natehtamo na papirnato tehtirno ladjico in damo vse skupaj v epruveto. Če imamo tekoč vzorec, ga tehtamo v čašo in stehamo tudi ostanek v čaši po prelitju vzorca v sežigno epruveto.

Preglednica 2. Postopki pri posameznih živilih

Vzorec	Odtehta	Predpostopek	Št. paralelk
Sok	10 ml v čašo in tehtanje na mg natančno	odparevanje	2
Mleko	1000 mg	odparevanje	2
Jajca	1000-1500 mg		2
Moka	1400 mg		2
Obrok	1000 mg		2
Med	3 g + 10 ml vode v majhni čaši (25 ml)	kvantitativen prenos raztopine v sežigno epruveto, odparevanje	3
Mesni izdelki	700-800 mg		3
Voda	15 ml v čašo in tehtanje na mg natančno	odparevanje	3
Konz. zelenjava	1000 mg		3

Opomba: na vajah bomo analizirali izdelke, ki so napisani odebeljeno

V epruveto dodamo 2 tableti bakrovega katalizatorja (pri medu samo 1,5 tablete) in 20 ml koncentrirane H_2SO_4 . Epruvete postavimo v stojalo in pokrijemo s steklenimi zvonci. Vse skupaj postavimo v ogreto enoto za razklop (Digestion Unit), kjer je temperatura 370 °C. Z vodno črpalko odvajamo zdravju škodljive hlape prek enote imenovane Scrubber, kjer se del hlapov utekočini, preostanek se nevtralizira v ca 15 % raztopini NaOH in končno vodi prek aktivnega oglja. Sežig je končan po 1 uri.

2.) Vzorec ohladimo v epruveti na sobno temeptraturu. Epruveto postavimo v destilacijsko enoto (Distillation Unit), kjer poteče doziranje 50 ml destilirane vode in 70 ml baze (NaOH) v vzorec. V destilacijsko predložko se dozira 60 ml borove kisline (H_3BO_4). Nato se začne uvajati para v vzorec. Destilacija traja 4 minute.

3.) Raztopino nastalega amonijevega borata v predložki titriramo z 0,1 M HCl do vrednosti pH 4,65. Titracija poteče avtomatsko po vnosu zatehte vzorca (v mg) v titracijsko enoto (Titrino). V končni točki titracije se zabeleži poraba kisline, iz katere se izračuna vsebnost dušika v vzorcu (v g/100 g) ter vsebnost beljakovin v vzorcu (v g/100 g; uporabi se splošni empirični faktor za preračun dušika v beljakovine, ki je enak 6,25). Kadar analiziramo živilo, katerega empirični faktor je različen od 6,25, je potrebno vsebnost beljakovin ročno izračunati iz vsebnosti dušika z uporabo ustreznega faktorja za to živilo.

Račun:

$$\% \text{ beljakovin} = \frac{\text{ml } 0,1 \text{ M HCl} \cdot 1,4 \cdot f}{\text{mg (odtehta)}} \cdot 100 \cdot 6,25$$

$$f = \frac{\text{točna molarost HCl}}{0,1 \text{ M HCl}}$$

$$\% \text{ beljakovin} = \% \text{ N} \cdot F$$

ml HCl = poraba ml 0,1 M HCl

1,4 = ekvivalent (1 ml 0,1 M HCl1,4 mg N)

6,25 = F = splošni empirični faktor za preračun N v beljakovine

f – faktor molarosti HCl