



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Agronomická fakulta
Ústav chemie a biochemie

Chemie potravin - laboratorní cvičení

Ing. Andrea Kleckerová

BRNO 2013

**Inovace předmětu probíhá v rámci projektu CZ.1.07/2.2.00/28.0302 Inovace studijních programů AF a ZF MENDELU směřující k vytvoření mezioborové integrace.
Projekt je spolufinancován z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu České republiky**

Seznam úloh

1. **A) Stanovení bílkovin biuretovým činidlem** (spektrofotometricky)
B) Stanovení bílkovin Nesslerovým činidlem (spektrofotometricky)

2. **A) Stanovení hydroxyprolinu** v mase a masných výrobcích (spektrofotometricky)
B) Stanovení škrobu v cereálních a bramborových výrobcích a luštěninách
(polarimetricky)

3. **A) Stanovení laktosy** v mléčných produktech (volumetricky)
B) Stanovení peroxidového čísla v tucích, olejích a potravinách s vyšším obsahem tuku.
(volumetricky)

4. **A) Stanovení celkového tuku** v masných nebo mléčných výrobcích (gravimetricky)
B) Izolace kofeinu z čaje nebo kávy (extrakcí)

5. **A) Stanovení obsahu soli v masných výrobcích** (vyluhovací metoda)
B) Oxidimetrické stanovení alkoholu podle Rebeleina (destilace)

6. **A) Stanovení polyfenolových sloučenin** v rostlinných materiálech (spektrofotometricky)
B) Stanovení antioxidační aktivity polyfenolů v rostlinných materiálech
(spektrofotometricky)

Úloha 1.

A) Stanovení bílkovin biuretovým činidlem (spektrofotometricky)

B) Stanovení bílkovin Nesslerovým činidlem (spektrofotometricky)

1. A) Stanovení bílkovin biuretovým činidlem

(spektrofotometricky)

Princip metody

Celkovou bílkovinu v séru stanovujeme biuretovou reakcí. V alkalickém prostředí v přítomnosti měďnatých solí dávají bílkoviny fialové zbarvení, vhodné k fotometrickému stanovení. V průběhu reakce se vytvářejí komplexní sloučeniny Cu^{2+} s ionty peptidových vazeb. Vzniklý komplex silně absorbuje světlo v oblasti 540 – 560 nm. Intenzita zbarvení komplexu se měří fotometricky a je přímo úměrná koncentraci bílkovin. Biuretovou reakci obecně poskytují látky obsahující v molekule alespoň dvě peptidové vazby (-CO-NH-) nebo dvě skupiny -CO-NH₂. Reakce tedy není specifická pouze pro bílkoviny.

Použitelnost metody

Metoda je méně citlivá, pohybuje se kolem 1-10g bílkoviny/l, je však rychlá (není nutná mineralizace), a proto se jí používá k orientačnímu stanovení bílkovin.

Chemikálie

Biuretové činidlo: roztok- síran měďnatý 13,0 mmol/l, vinan sodno-draselný 32,0 mmol/l, hydroxid sodný 0,6 mol/l

Standard bílkoviny (5g/l)

Pracovní postup

1. Připravte sadu kalibračních roztoků

Do pěti zkumavek napipetujte standard bílkoviny (5 g/l) dle tabulky.

Přidejte 3 ml biuretového činidla a nechte 30 minut při laboratorní teplotě.

H ₂ O ml	Standard (5 g/l) ml
1	0
0,75	0,25
0,5	0,5
0,25	0,75
0	1

2. Vzorek bílku zředíte dvacetkrát destilovanou vodou a přefiltrujte.
Do tří zkumavek napipetujte 0,5 ml zředěného vzorku, přidejte 3 ml biuretového činidla a nechte 30 minut stát při laboratorní teplotě.
3. Po uplynutí 30 minut změřte absorbanci standardů i vzorku při 540 nm proti vzorku bez bílkoviny.
4. Zpracujte kalibrační křivku a vypočítejte koncentraci měřených vzorků.
5. Vypočítejte obsah bílkoviny v bílku.

1. B) Stanovení bílkovin Nesslerovým činidlem

(spektrofotometricky)

Princip metody

Dusík vázaný v bílkovinách se mineralizací s kyselinou sírovou převede v amonnou sůl, která se stanoví spektrofotometricky po reakci s Nesslerovým činidlem.

Použitelnost metody

Metoda je použitelná pro stanovení bílkovin v potravinářských materiálech s menším obsahem dusíku.

Chemikálie a roztoky

- Standardní roztok síranu amonného (připravený dle postupu: 0,4706 g síranu amonného se rozpustí ve vodě a doplní na objem 100 ml)
- Nesslerovo činidlo (připravené dle postupu: 10g jodidu rtuťnatého, 7,5g jodidu draselného a 20g hydroxidu sodného se rozpustí ve 106 ml vody)

Pracovní postup

1. Příprava kalibrační křivky

Standardní roztok síranu amonného zředíme desetkrát destilovanou vodou (10 ml do 100 ml baňky). Takto připravený pracovní roztok obsahuje 0,1 mg dusíku v 1ml roztoku.

Do série 50 ml odměrných baněk odpipetujeme 0 - 60 μg dusíku, přidáme válečkem 30 ml vody, 2ml Nesslerova činidla a doplníme vodou po rysku. Zbarvení měříme po 15 minutách při 450 nm proti vodě.

2. Stanovení obsahu bílkovin ve vzorku

Mineralizát vzorku je připravený a obsahuje 0,2g vaječného bílku v 100 ml roztoku.

Do 50 ml baňky odpipetujeme 1 ml mineralizátu, přidáme válečkem 30 ml vody a 2 ml Nesslerova činidla a doplníme vodou. Zbarvení změříme po 15 minutách při 450 nm. Vzorek změříme paralelně 2-3krát.

Obsah dusíku odečteme z kalibrační křivky a přepočteme na navážku k mineralizaci. Vynásobením faktorem 6,25 získáme obsah hrubé bílkoviny.

Úloha 2.

A) Stanovení hydroxyprolinu v mase a masných výrobcích (spektrofotometricky)

B) Stanovení škrobu v cereálních a bramborových výrobcích a luštěninách (polarimetricky)

2. A) Stanovení hydroxyprolinu

(spektrofotometricky)

Princip metody

Po kyselé hydrolyze bílkovin kyselinou sírovou se hydroxyprolin oxiduje chloraminem T a oxidační produkt se stanoví spektrofotometricky na základě barevné reakce s *p*-dimethylaminobenzaldehydem.

Hydroxyprolin je charakteristickou aminokyselinou bílkovin pojivové tkáně - kolagenu. Jeho obsah slouží jako ukazatel množství těchto bílkovin. Doporučovaný přepočítávací faktor hydroxyprolinu na bílkoviny pojivové tkáně je 8,00. (Uvedený faktor respektuje i malý podíl kolagenu v nepojivových tkání zvířat).

Použitelnost metody

Metoda je vhodná pro všechny druhy potravinářského materiálu, zvláště živočišného původu.

Chemikálie a roztoky

Zásobní roztok L-hydroxyprolinu, 500 mg/l

chloramin T, p.a.

isopropanol, p.a.

n-propanol, p.a.

kyselina chloristá, p.a. (6+1)

p-dimethylaminobenzaldehyd, p.a.

citrátový pufr, pH 6,0

Příprava roztoků před vlastním stanovením

Roztok chloraminu T

Na předvážkách navažte 0,70 g chloraminu T do 200 ml kádinky s přesností na setinu gramu, rozpust'ete ve 12 ml destilované vody, přidejte se 12,5 ml *n*-propanolu a 25 ml citrátového pufru.

Barevné činidlo

Na předvážkách navažte 0,1 g *p*-dimethylaminobenzaldehydu do 25 ml kádinky s přesností na setinu gramu, rozpust'te ve 3,5 ml kyseliny chloristé (6 + 1) a přidejte 6,5 ml isopropanolu.

Pracovní postup

1. Připravte roztok chloraminu T a barevné činidlo dle výše popsaného postupu
2. Připravte sadu kalibračních roztoků:

Ze zásobního roztoku 4-hydroxyprolinu o koncentraci 500 mg/l připravte 100ml pracovního roztok o koncentraci 50 mg/l.

Z tohoto pracovního roztoku připravte do 50 ml odměrných baněk sadu kalibračních roztoků hydroxyprolinu obsahujících 0, 1, 2, 3, 5 a 10 mg hydroxyprolinu/l.

Do šesti zábrusových zkumavek o objemu 15 - 20 ml postupně pipetujte 2 ml kalibračních standardních roztoků obsahujících 0, 1, 2, 3, 5, 10 mg hydroxyprolinu /l, přidejte 1 ml roztoku chloraminu T a obsah zkumavek promíchejte a nechte stát **20 minut** při laboratorní teplotě. Pak přidejte 1 ml barevného činidla, zkumavky uzavřete a zahřívajte ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu **30 minut**. Nechte zkumavky **10 minut** zchladit a změřte absorbanci roztoku při 560 nm proti blanku = zkumavka 0 (bez hydroxyprolinu).

Stanovení hydroxyprolinu v hydrolyzátu vzorku (2g/100ml)

Do zábrusové zkumavky o objemu 15 - 20 ml postupně napipetujte 2 ml hydrolyzátu vzorku, přidejte 1 ml roztoku chloraminu T a obsah zkumavky nechte stát **20 minut** při laboratorní teplotě. Poté přidejte 1 ml barevného činidla, zkumavku uzavřete a zahřívajte ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu **30 minut**. Nechte zkumavky **10 minut** zchladit a změřte absorbanci roztoku při 560 nm proti blanku. Stanovení proved'te paralelně 2-3 krát.

Zpracujte kalibrační křivku a vypočt'ete koncentraci 4-hydroxyprolinu v mg/l měřených vzorků hydrolyzáatů. Z navážky vzorku pro hydrolyzu vypočt'ete procentický obsah 4-hydroxyprolinu v původním vzorku.

Výpočet obsahu hydroxyprolinu

1) Výpočet obsahu kolagenu v mg

Z hodnot měření kalibračních roztoků se sestrojí graf kalibrační závislosti vynesemím koncentrací (osa x) a odpovídajících absorbancí (osa y). Z regresní rovnice (závislost absorbance na koncentraci (v mg/l) získáme hodnotu koncentrace hydroxyprolinu ve vzorku v jednotkách standardu (mg/l). Tuto koncentraci vynásobíme použitým ředěním (50x, 10x, 2x,...) a z navážky vzorku vypočteme množství hydroxyprolinu na 1g vzorku (v mg).

Obsah kolagenu = obsah 4-hydroxyprolinu x 8,00

2) Výpočet obsah kolagenu v %

Pro výpočet obsahu se použije absorbance pracovního standardního roztoku hydroxyprolinu 0,5 g/l . Výpočet se provede podle vzorce:

- pro ředění 50x: % hydroxyprolinu = $A_{vz} / A_{std} \cdot 0,005 / V_{vz}$

- pro ředění 500x : % hydroxyprolinu = $A_{vz} / A_{std} \cdot 0,05 / V_{vz}$

- pro ředění 5000x : % hydroxyprolinu = $A_{vz} / A_{std} \cdot 0,5 / V_{vz}$

A_{vz} - naměřená absorbance vzorku,

A_{std} - naměřená absorbance standardu (**hodnota odpovídající koncentraci 5mg/l**)

V_{vz} -objem vzorku pipetovaný ke stanovení

Obsah kolagenu [%] = obsah 4-hydroxyprolinu [%] x 8,00

Výsledek se uvádí s přesností na jedno desetinné místo.

2. B) Stanovení škrobu

(polarimetricky)

Princip metody

Škrob se převede v rozpustnou formu působením kyseliny chlorovodíkové a stanoví se polarimetricky.

Použitelnost metody

Metoda je použitelná pro běžné potravinářské suroviny a potraviny obsahující škrob.

Chemikálie a roztoky

kyselina chlorovodíková, 1,13% roztok

Carrezovo činidlo I (150 g hexakvanoželeznatanu draselného trihydrátu rozpuštěno v destilované vodě a zředěno na 1000 ml)

Carrezovo činidlo II (300 g síranu zinečnatého heptahydrátu rozpuštěno v destilované vodě a zředěno na 1000 ml)

Lugolovo činidlo (0,2 g jodu rozpuštěno ve 100 ml 2 % roztoku jodidu draselného)

Pracovní postup

Důkaz škrobu

Na hodinové sklo naneste malé množství vzorku, rozetřete do tenké vrstvy a přidejte několik kapek Lugolova činidla. Jestliže se objeví tmavé zbarvení, je ve vzorku přítomen škrob, pak následně proveďte stanovení škrobu.

Stanovení škrobu (modifikováno)

1. Do 100 ml Erlenmeyerovy baňky navažte 5 g vzorku s přesností na dvě desetinná místa. K navážce vzorku přidejte 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (1,13 %) a obsah baňky důkladně promíchejte. Stěny spláchněte dalšími 25 ml roztoku kyseliny chlorovodíkové (1,13 %), baňku vložte do vroucí vodní lázně a zahřívejte 15 minut. Během prvních 3 minut obsah baňky míchejte a při dalším zahřívání občasně promíchejte. Pak baňku vyjměte z vodní lázně, přidejte 20 ml destilované vody a roztok ochladte.
2. Pipetou přidejte 10 ml Carrezova roztoku I a 10 ml Carrezova roztoku II, roztok se vyčíří. Obsah Erlenmeyerovy baňky kvantitativně přelejte do 100 ml odměrné baňky, Erlenmeyerovu baňku vypláchněte cca 5 ml destilované vody a výplach přelejte do odměrné

baňky. Odměrnou baňku doplňte destilovanou vodou po značku, promíchejte a zfiltrujte. Prvních 5–10 ml filtrátu vylejte. Filtrát změřte v polarizační trubici délky 20 cm s použitím žlutého sodíkového světla o vlnové délce 589,3 nm. Odečtěte minimálně 5 hodnot a vypočítejte průměrný úhel stočení.

Koncentrace škrobu v g/100ml se vypočítá dle vztahu:

$$C = (100 \cdot \alpha) / (l \cdot [\alpha]_D^t)$$

Kde α je průměrná hodnota odečtených stupňů, l délka trubice v dm a $[\alpha]_D^t$ specifická otáčivost škrobu při teplotě 20°C za použití sodíkového světla ($\lambda = 589,3$ nm) pro pšeničný 182,6; žitný 183,9; ječný 181,3; ovesný 181,1; kukuřičný 184,5; rýžový 185,7; bramborový 195,3; amarantový 193,6; neznámý 183,3.

Nalezená koncentrace se přepočítá na navážku a vypočítá se procentický obsah škrobu ve vzorku.

Obsah škrobu v zrninách a bramborách (%): pšenice 59-72, žito 52-57, ječmen 52-62, oves 40-56, rýže 70-80, kukuřice 65-75, fazole 46-54, brambory 17-24

Úloha 3.

A) Stanovení laktosy v mléčných produktech (volumetricky)

B) Stanovení peroxidového čísla v tucích a olejích (volumetricky)

3. A) Stanovení laktosy (volumetricky)

Princip metody

Obsah laktosy se stanoví titrací roztokem thiosíranu sodného podle množství redukováného halogenu, který se uvolní při reakci s chloraminem T a jodidem draselným.

Použitelnost metody

Podle tohoto předpisu se provádí stanovení obsahu laktosy v mléce, sušeném mléce a v sýrech.

Chemikálie a roztoky

- kyselina fosforečná, 8,8% roztok
- kyseliny chlorovodíková, roztok 2 mol/l
- kyselina sírová, roztok 0,5 mol/l
- thiosíran sodný, roztok 0,04 mol/l
- jodid draselný
- dichroman draselný
- chloramin T
- wolframan sodný
- škrob rozpustný
- jodid rtuťnatý
- **Wolframanové činidlo** (připravené: 7 g wolframanu sodného ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) rozpuštěno v 870 ml destilované vody)
- roztok škrobu

Příprava reagensů

Roztok chloraminu T (0,04 mol/l)

0,91 g chloraminu T se rozpustí v destilované vodě a zředí se na 100 ml.

Pracovní postup

1. Do odměrné baňky na **100 ml** se navažte 10 g vzorku (mléko nebo jiný tekutý mléčný produkt) nebo **1 g sušeného mléka**, s přesností na dvě desetinná místa.
2. K navážce vzorku přidejte **25 ml** destilované vody, **40 ml** wolframanového činidla a obsah baňky promíchejte. Po rozpuštění přidejte **1 ml** roztoku kyseliny fosforečné (8,8 %) a **7 ml** roztoku kyseliny sírové a baňku doplňte destilovanou vodou po značku, promíchejte a obsah baňky zfiltrujte.
3. Do Erlenmeyerovy baňky (na 250 ml se zábrusem) napipetujte **10 ml** filtrátu, přidejte **5 ml** roztoku jodidu draselného a **20 ml** roztoku chloraminu T. Baňku uzavřete a nechejte stát **90 minut** v temnu (ve stole) při laboratorní teplotě. Pak zátku opláchněte destilovanou vodou, přidejte **5 ml** roztoku kyseliny chlorovodíkové (2 mol/l) a titrujte odměrným roztokem thiosíranu sodného (0,04 mol/l) do světle žluté barvy.
4. Přidejte cca 1 ml roztoku škrobu a roztok titrujte do odbarvení. Stejným způsobem se provede slepý pokus s použitím 10 ml destilované vody místo 10 ml filtrátu.

Výpočet

Obsah laktosy vyjádřený jako monohydrát laktosy v % se vypočítá podle následujícího vzorce:

$$\text{Obsah laktosy (v \%)} = (V_{\text{bl}} - V_{\text{vz}}) \cdot 7,2 \cdot F / m_{\text{vz}}$$

V_{vz} – spotřeba 0,04 mol/l thiosíranu sodného v ml na vzorek

V_{blk} - spotřeba 0,04 mol/l thiosíranu sodného v ml na slepý pokus

F – korekční faktor na objem sraženiny:

- pro plnotučné mléko 0,992

- pro odstředěné mléko 0,996

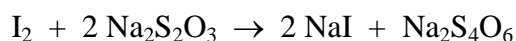
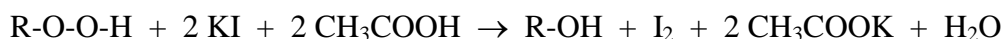
m_{vz} – navážka vzorku

Vypočítat průměr dvou nebo tří stanovení a směrodatnou odchylku.

3. B) Stanovení peroxidového čísla (volumetricky)

Princip metody

Metoda je založena na oxidaci jodidu draselného peroxidy a hydroperoxydy obsaženými ve vzorku tuku nebo oleje v prostředí kyseliny octové a chloroformu (3 + 2). Uvolněný jod je stanoven titračně odměrným roztokem thiosíranu sodného.



Množství látek, které oxidují jodid draselný za předepsaných podmínek se vyjadřuje v milimolech aktivního kyslíku (O) na kg (mmol/kg). Toto množství se označuje jako peroxidové číslo (P.Č.).

Reakci ruší přítomnost látek, které mohou rovněž oxidovat jodid na jod, např. kyslík a naopak přítomnost redukujících látek např. antioxidantů. Uvolněný jod se může rovněž částečně adovat na přítomný tuk.

Použitelnost metody: Metoda je vhodná pro oxidované tuky s výjimkou tuků oxidovaných při vysoké teplotě.

Chemikálie, roztoky, standardní roztoky

- chloroform, p.a. (v digestoři)
- kyselina octová, ledová, min. 99 %, p.a.
- thiosíran sodný, roztok 0,1 mol/l
- škrob rozpustný, roztok
- nasycený roztok jodidu draselného

Pracovní postup

1. Do 250 ml Erlenmeyerovy baňky (se zábrusem) navažte na celofán 3g zkušební vzorku oleje nebo tuku (máslu, sádlo) (s přesností na tři desetinná místa), přidejte 12 ml chloroformu (zkoušený vzorek se rychle rozpustí), 18 ml kyseliny octové a míchejte do úplného rozpuštění.
2. Pak přidejte 1 ml nasyceného roztoku jodidu draselného, baňku ihned uzavřete, roztok promíchejte asi 1 minutu a nechte stát 20 minut v temném místě při laboratorní teplotě (20-25 °C). Potom přidejte 75 ml vody, roztok pečlivě promíchejte a titrujte odměrným roztokem

thiosíranu sodného do změny žlutého zbarvení na téměř bezbarvé. Pak přidejte 1 ml indikátoru (škrobového mazu) a pokračujte v titraci do odbarvení roztoku.

3. Souběžně proveďte za stejných podmínek i slepý pokus (bez tuku), při kterém by spotřeba thiosíranu sodného neměla být větší než 0,2 ml.

Poznámka: Při stanovení zabarvených nebo slabě nažloutlých roztoků přidáváme roztok škrobu před začátkem titrace.

Výpočet:

Peroxidové číslo (P.Č.) se vyjádří v milimolech aktivního kyslíku, tj. uvolňujícího z jodidu jod, ($1/2 \text{ O}_2$) na 1 kg vzorku:

$$\text{P.Č.} = (\mathbf{V}_1 - \mathbf{V}_0) \cdot \mathbf{c} / \mathbf{m}_{\text{vz}}$$

\mathbf{V}_1 je spotřeba odměrného roztoku 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ při vlastním stanovení (v ml),

\mathbf{V}_0 je spotřeba odměrného roztoku 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ při slepém pokusu (v ml),

\mathbf{c} - koncentrace použitého thiosíranu sodného v mmol/l

\mathbf{m}_{vz} - navážka zkoušeného vzorku (v g).

Výsledek stanovení je aritmetický průměr výsledků několika souběžných stanovení aktivního kyslíku (O) mmol/kg s přesností na jedno desetinné místo.

Úloha 4.

A) Stanovení celkového tuku v masných nebo mléčných výrobcích (gravimetricky)

B) Izolace kofeinu z čaje nebo kávy (extrakcí)

4. A) Stanovení celkového tuku metodou Schmid-Bondzynski-Rafzlauff

(gravimetricky)

Princip metody

Materiál se hydrolyzuje kyselinou chlorovodíkovou, tuk se z hydrolyzátu vyextrahuje organickým rozpouštědlem a stanoví vážkově.

Použitelnost metody

Metoda je vhodná pro stanovení tuku v různých živočišných materiálech a v sýrech. Pro ostatní mléčné výrobky je vhodnější metoda Röseova a Gottliebova (J. Davídek, Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, Praha, 1977)

Chemikálie a roztoky

- kyselina chlorovodíková, p.a., 25% roztok
- ethanol (je polární, mísí se z vodou)
- dichlormethan (nemísí se s vodou a je těžší než voda)

Pracovní postup

1. 5g rozmělněného vzorku navážíme s přesností na tři desetinná místa na celofán do suché baňky s rovným dnem, do které pak vložíme skleněné kuličky nebo kousky porcelánu. Do baňky přilijeme 8-10 ml 25 % HCl a udržujeme ve vroucí vodní lázni za stálého protřepávání tak dlouho, dokud se vzorek úplně nerozpustí. Probíhá rozklad bílkovin. Baňku pak necháme ve vroucí lázni ještě asi 20 minut a pak ji postupně ochladíme na teplotu laboratoře.
2. Zmineralizovaný vzorek převedeme do 100 ml děličky a mineralizační baňku vypláchneme postupně 10 ml ethanolu a 20 ml dichlormethanu a výplachy vlijeme do děličky. Pak mineralizační baňku vypláchneme ještě jednou 20 ml dichlormethanu a výplach přilijeme do děličky, uzavřeme ji zátkou a protřepáváme za současného převrácení po dobu jedné minuty.
3. Děličku ponecháme v klidu tak dlouho, až dolní organická vrstva (obsahující tuk) bude čirá a zřetelně oddělená od vrstvy vodné. Vyjmeme zátku, opláchneme trochou (cca 2 ml)

dichlormethanu tak, aby stékal do děličky. Odpustíme spodní organickou vrstvu do suché čisté zvážené kádinky s širokým dnem. Vodnou vrstvu extrahujeme dalšími 40 ml dichlormethanu. Protřepáváme jednu minutu, necháme oddělit vrstvy stáním a odpustíme spodní organickou vrstvu s vyextrahovaným tukem do zvážené kádinky s prvním extrahovaným podílem.

4. Organickou vrstvu (obsahující vyextrahovaný tuk) ze dvou extrakcí necháme ve 250 ml zvážené kádince odpařovat v digestoři na topné desce (nebo vodní lázni) při teplotě 50-60 °C. Jakmile je rozpouštědlo odpařeno, baňku zvážíme a necháme stát ještě 10-20 minut bez zahřívání v digestoři a opět zvážíme. Hmotnost by se neměla již výrazněji změnit (sušení do konstantní hmotnosti).
5. Odpařovat se nesmí na vodní lázni zahřívané plynovým kahanem (je akutní nebezpečí vznícení par).

Výpočet

Obsah tuku (v % m/m): **% celkového tuku** = $(m_2 - m_1) \cdot 100 / m_{vz}$

Kde je: m_1 - hmotnost prázdné extrakční baňky v g

m_2 - hmotnost extrakční baňky s tukem v g

m_{vz} - navážka vzorku v g

4. B) Izolace kofeinu z čaje nebo kávy

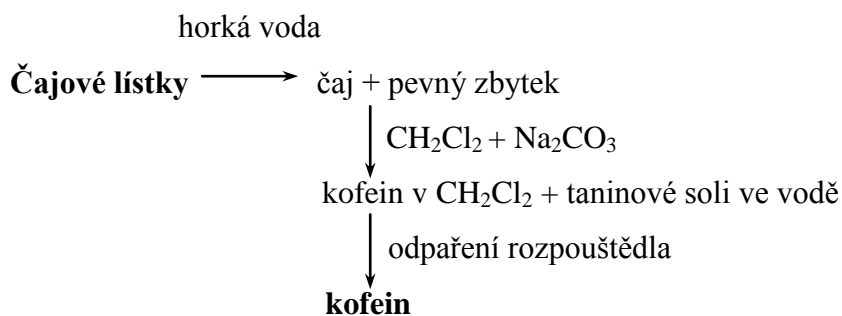
Princip metody

Kofein je purinový derivát patřící k alkaloidům, který se spolu s dalšími, jako je theobromin a theofilin, nachází v kávě, čaji a kakau. Metoda využívá výhodu rozpustnosti dané látky určitým rozpouštědlem. V tomto případě je kofein dobře rozpustný v horké vodě a je tak snadno separovatelný od celulosy, která tvoří hlavní složky čaje a kávy. Horkou vodou se však také rozpouštějí taniny, vysokomolekulární látky s kyselými vlastnostmi. Ty tvoří s bazickými látkami, jako např. jako Na_2CO_3 sůl, která je rozpustná ve vodě, ale nerozpustná v organických rozpouštědlech, jako chloroform nebo dichlormethan. Kofein je poměrně dobře rozpustný v organickém rozpouštědle dichlormethanu. Proto kofein může být extrahován z roztoku čaje pomocí dichlormethanu, kdežto sodné soli taninu zůstávají nerozpustné ve vodném roztoku. Odpařením dichlormethanového extraktu tak získáme hrubý kofein, který může být dočištěn sublimací.

Použitelnost metody

Metoda se hodí pro stanovení kofeinu v čaji a kávě

Izolační schéma:



Chemikálie

- dichlormethan (je hořlavý a těžší než voda)
- uhličitan sodný, bezvodý
- síran sodný, bezvodý

Pracovní postup

1. Do kádinky o objemu 150-250 ml navážíme 5-7 g kávy nebo čaje a zalijeme 50 ml destilované vody a přidáme 2 g bezvodého uhličitanu sodného. Kádinku zakryjeme hodinovým sklem, opatrně zahříváme na síťce nad kahanem s mírným plamenem a udržujeme **20 minut** při mírném varu.
2. Horký extrakt zfiltrujeme do 100 ml Erlenmeyerovy baňky a vychladíme na laboratorní teplotu.
3. Vychlazený extrakt přelijeme do 150 ml děličky umístěné na stojánku.
4. Opatrně přidáme **50 ml** dichlormethanu do děličky a zazátkujeme.
5. Pak děličku vytáhneme ze stojanu, uchopíme jednou rukou za hrdlo se zátkou a druhou rukou za výtokovou stopku u kohoutku. Obsah děličky opakovaným převrácením a opatrným protřepáváním promícháme. Podle potřeby vzniklé plyny při převrácené děličce vypustíme pootočením kohoutku.
6. Děličku vsuneme zpět do držáku stojánku. Po několika minutách se vytvoří dvě oddělené vrstvy: vrchní vodná a spodní vrstva organického rozpouštědla (obsahuje kofein). Vytvoří-li se emulze, může být odstraněna jemným mícháním obsahu nebo jemným mícháním emulze skleněnou tyčinkou.
7. Opatrně vypustíme spodní vrstvu kohoutkem do 100 ml kádinky nebo Erlenmeyerovy baňky. Pak přidáme do děličky ještě cca 20 ml dichlormethanu a znovu promícháme. Necháme oddělit vrstvy a opět odpustíme spodní vrstvu s kofeinem do kádinky.
8. Přidáme 0,5 g bezvodého síranu sodného do roztoku kofeinu a promícháme. Bezvodá sůl naváže přítomné poslední zbytky vody avšak se nerozpustí.
9. Zvážíme 250 ml kádinku s širokým dnem a zfiltrujeme do ní roztok dichlormethanu s kofeinem. Zbytek soli spláchneme na filtrační papír 2 ml dichlormethanu.
10. Odstraníme dichlormethan odpařením pomocí opatrného zahřívání v digestoři **na topné desce** při 50-60 °C (aby roztok nezpěnil). Zvážíme kádinku s hrubým kofeinem a vypočítáme jeho hmotnost a procentický výtěžek.

Výpočet:

Obsah kofeinu (v % m/m): **% celkového kofeinu** = $(m_2 - m_1) \cdot 100 / m_{vz}$

Kde je: m_1 - hmotnost prázdné extrakční baňky v g

m_2 - hmotnost extrakční baňky s tukem v g

m_{vz} - navážka vzorku v g

Úloha 5.

A) Stanovení obsahu soli v masných výrobcích (vyluhovací metoda)

B) Oxidometrické stanovení alkoholu podle Rebeleina (destilace)

5. A) Stanovení obsahu soli v masných výrobcích

(vyluhovací metoda)

Princip metody

Metoda slouží ke stanovení obsahu soli v potravinách živočišného původu.

Obsah chloridů se stanoví titračně roztokem dusičnanu stříbrného za přítomnosti chromanu draselného jako indikátoru.

Chemikálie

0,1 mol/l standardní roztok NaCl

0,1 mol/l odměrný roztok AgNO₃

krystalický NaHCO₃

10% roztok K₂CrO₄

Pracovní postup

1. Příprava vzorků

Do kádinky navažte 25g vzorku masného výrobku, přidejte 100 ml horké destilované vody a vzorek rozmixováním zhomogenizujte. Vzorek kvantitativně převed'te do odměrné baňky na 250 ml a kádinku vypláchněte dalšími 100 ml destilované vody. Směs promíchejte a zahřívějte na vodní lázni 15 min. Po ochlazení na pokojovou teplotu baňku doplňte vodou po značku a zfiltrujte přes skládaný filtr. 20 ml filtrátu přeneste pipetou do kónické baňky a neutralizujte několika krystalky hydrogenuličitanu sodného při použití lakmusového papírku. Po neutralizaci přidejte 1 ml chromanu draselného a odměrným válcem 100 ml destilované vody. Titrujte odměrným roztokem dusičnanu stříbrného (0,1 mol/l) do stálého načervenalého zbarvení.

2. Příprava kalibrační křivky

Do kónické baňky na 250 ml napipetujte 5, 10, 15, 20, 25 ml standardního roztoku chloridu sodného o koncentraci 0.1 mol/l. Po přidání 1 ml chromanu draselného a 100 ml destilované vody titrujte roztokem dusičnanu stříbrného ($c = 0,1 \text{ mol/l}$) a hodnoty vynesete do grafu.

Výpočet a vyhodnocení

Obsah chloridu v přepočtu na chlorid sodný v % vypočítejte podle vzorce:

$$x = \frac{v \cdot M \cdot c}{m} \cdot \frac{V_1}{V_2} \cdot 0,1$$

kde v = objem odměrného roztoku dusičnanu stříbrného v ml

c = koncentrace odměrného roztoku v mol/l

M = molární hmotnost NaCl = 58,45g/mol

V_1 = objem vodného výluhu vzorku v ml

V_2 = objem filtrátu použitého k analýze v ml

m = navážka vzorku v g

Obsah NaCl v g odečtete z kalibrační křivky, přepočtete taktéž na obsah soli ve vzorku. Výsledky získané z kalibrační křivky a z výpočtu ze vzorce porovnejte.

Původ metody: ČSN 57 0167

5. B) Oxidimetrické stanovení alkoholu podle Rebeleina

(destilace)

Princip

Ethanol se ze vzorku vína nejprve předestiluje do předlohy s chromanem draselným a kyselinou dusičnou. Ethanol jako oxidovadlo vyloučí z jodidu draselného jod, jehož množství se zjistí nepřímou jodometrickou titrací odměrným roztokem thiosíranu sodného na škrobový maz jako indikátor.

Pomůcky

Erlenmayerova baňka (500 ml), pipety (1 a 10 ml), 2x destilační baňka (100 ml), byreta (25 ml), kádinka 100ml, destilační aparatura.

Chemikálie

0,3474 mol/l roztok K_2CrO_4

0,3474 mol/l roztok $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$

30% roztok KI

65% HNO_3 (v digestoři)

0,5 % škrobový maz

Postup

1. Příprava slepého pokusu

Do erlenmayerovy baňky o objemu 500ml napipetujte 10 ml roztoku K_2CrO_4 , přidejte 25 ml konc. HNO_3 , 250 ml destilované vody a 10 ml roztoku KI. Titrujte odměrným roztokem roztokem thiosíranu sodného. Ke konci titrace přidejte 10 ml škrobového mazu a dotitrujte do světle modré barvy. (Pozor, spotřeba může být vyšší než 25 ml). Spotřebu odměrného roztoku označíte za spotřebu A.

2. Příprava vzorku pro destilaci

Do erlenmayerovy baňky (100ml) se zábrusem pipetujte 10 ml roztoku K_2CrO_4 a přidejte 25 ml konc. HNO_3 . Baňku umístěte pod destilační přístroj tak, aby trubice z chladiče zasahovala pod hladinu oxidační směsi až na dno baňky. Do druhé erlenmayerovy baňky (100ml) se zábrusem pipetujte 1 ml testovaného vína, přidejte 12 ml destilované vody a tři varné kuličky. Baňku uchyťte do destilační aparatury a od počátku destilace měřte 3 minuty. Trubicí destilačního přístroje opláchněte destilovanou vodou do baňky s roztokem K_2CrO_4 . Roztok z této baňky kvantitativně převed'te do erlenmayerovy baňky (500ml), baňku vypláchněte ještě dalšími 250 ml destilované vody a přidejte 10 ml roztoku KI. Titrujte roztokem thiosíranu sodného. Ke konci titrace přidejte 10 ml škrobového mazu a dotitrujte do světle modré barvy. Spotřebu odměrného roztoku označíte za spotřebu B.

Vyhodnocení:

$(1 - B / A) \cdot 15,2 = \% \text{ obj. alkoholu vyjádřená na dvě desetinná místa}$

$(1 - B / A) \cdot 120 = \text{koncentrace (g.l}^{-1}\text{) alkoholu vyjádřená na jedno desetinné místo.}$

Úloha 6.

A) Stanovení polyfenolových sloučenin v rostlinných materiálech (spektrofotometricky)

B) Stanovení antioxidační aktivity polyfenolů v rostlinných materiálech (spektrofotometricky)

6. A) Stanovení polyfenolových sloučenin v ovocných šťávách, pívu a vínu

(spektrofotometricky)

Stanovení celkových fenolových sloučenin není metodicky problematické, standardně se nejčastěji používá Folin-Ciocalteuova metoda (FCM).

Princip metody

FCM metoda (Folin-Ciocalteuova metoda, FCM)

Základem metody je oxidace fenolů molybdato-wolframovým reagentem, při níž se tvoří barevný produkt s absorbcí λ_{\max} 745-750 nm. Je založena na redukci fosfowolfrato-fosfomolybdatového komplexu, pravděpodobného složení $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_{40})^{4-}/(\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) + \text{H}_3\text{PO}_4 + \text{HCl}$ (FCR, reagent).

Folin-Ciocalteuova reakce je nespecifická pro fenolové látky a reagent může být redukován i mnoha nefenolovými sloučeninami (vitaminem C, ionty Cu^+ aj.). Fenolové sloučeniny reagují jen v alkalickém prostředí, cca pH 10.

Použitelnost metody

Metoda byla a je po mnoho let používána pro měření celkových koncentrací fenolových látek v přírodních produktech, vzorcích zeleniny a ovoce, zrnin, ovocných šťáv, piva a vína.

Chemikálie

Folin-Ciocalteuvův reagent FCR (10x ředěný)

uhličitan sodný 7,5 %

Kyselina gallová, 10mmol/l

Pracovní postup

1. Stanovení kalibrační závislosti

Do 6 zkumavek napipetujte po 500 μl FCR a postupně se zvyšující množství **1 mmol/l gallové kyseliny**, tj. 0, 20, 40, 60, 80, a 100 μl . (Zásobní roztok kyseliny gallové má koncentraci 10 mmol/l !). Přidejte destilovanou vodu v opačném množství tj. 100, 80, 60, 40, 20 a 0 μl . Roztoky promíchejte a nechte 10 minut reagovat. Pak přidejte 400 μl 7,5% roztoku Na_2CO_3 . Za 30 minut změřte absorbanci při 765 nm proti slepému pokusu (0 μl kyseliny gallové). Sestrojte závislost absorbance na koncentraci gallové kyseliny.

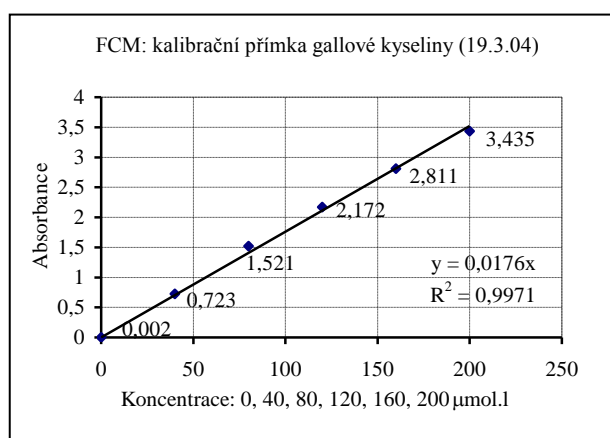
2. Stanovení fenolových látek ve vzorku

Reakce se provede obdobně jako se standardem. Do zkumavky nepipetujte 500 μl FCR a místo kyseliny gallové nepipetujte 20 μl měřeného vzorku. Přidejte 80 μl destilované vody. Vzorek připravte ve 3 opakováních. Roztoky promíchejte a nechte 10 minut reagovat. Pak přidejte 400 μl 7,5% roztoku Na_2CO_3 . Za 30 minut změřte absorbanci při 765 nm proti slepému pokusu (0 μl kyseliny gallové).

Sestrojte závislost absorbance na koncentraci gallové kyseliny.

Výsledek se uvádí v mmol/l ekvivalentu gallové kyseliny (EG), nebo v mg (EG) s přepočtem na molekulovou hmotnost gallové kyseliny (M_r 170,2).

V extraktech ovoce a zeleniny může výsledek ovlivňovat přítomnost askorbové kyseliny. Vliv sacharidů je vzhledem k jejich nižší reaktivitě s činidlem méně významný.



Kalibrační závislost gallové kyseliny

6. B) Stanovení antioxidační aktivity/kapacity

(spektrofotometricky)

Pro určení antioxidační kapacity rostlinných extraktů se nejvíce používají metody TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), DPPH• (s 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyllový radikál) a FRAP (Ferric reducing antioxidant power), které jsou založeny na oxidačně-redukční reakci a to schopnosti antioxidantu poskytovat vodíkový radikál H•: $Aox-H + R• \rightarrow Aox• + RH$ (Aox = antioxidant)

Princip metody

Metoda TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) bývá také označována jako TAA metoda (Total Antioxidant Activity). TEAC metoda je jednou z nejčastěji používaných metod k určení množství radikálů, které mohou být zneškodněny nějakým antioxidantem, tj. celkové antioxidační kapacity. Je založena na neutralizaci radikálkationtu vzniklého jedoelektronovou oxidací syntetického chromoforu ABTS, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzo-thiazolin-6-sulfonátu) na radikál ABTS^{•+}. Antioxidant reaguje s kationradikálem ABTS^{•+} a reakcí se snižuje hodnota absorbance při 734 nm. Antioxidační aktivita je přímo úměrná snížení absorbance reakčního roztoku se vzorkem.

Použitelnost metody

Metoda může být použita pro vzorky potravin, séra, plasmy a jiných tělních tekutin.

Chemikálie a roztoky

- pracovního roztoku ABTS^{•+}
- roztok PBS – fosfátový pufr ($Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O + NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O + NaCl$)
- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina), 5 mmol/l

Pracovní postup

1. Stanovení kalibrační závislosti

Do 6 zkumavek napipetujte 950 μ l pracovního roztoku ABTS^{•+} a přidejte postupně 0, 10, 20, 30, 40 a 50 μ l **1mmol/l Troloxu**. (Zásobní roztok Troloxu má koncentraci 5 mmol/l !). Přidejte

doplňující množství destilované vody, tj. 50, 40, 30, 20, 10 a 0 μl . Protřepejte, nechte 20 min reagovat a proměřte absorbance při 734 nm. Sestrojte kalibrační závislost (viz obr.).

2. Vlastní stanovení vzorků

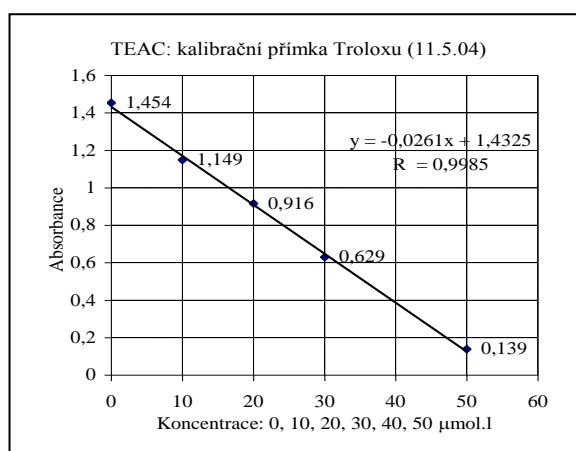
Do zkumavky napipetujte 950 μl pracovního roztoku ABTS^{•+} a podle intenzity reakce přidejte 10 až 50 μl vzorku, promíchejte a po 20 minutách měřte absorbanci při 734 nm. Měřte proti roztoku PBS.

Antioxidační kapacita se vyjadřuje ekvivalentem ke standardu tj. v mmol/l Troloxu, tj. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC). Protože reakce probíhá v pufovaném prostředí a s malým objemem vzorku, není závislá na pH pokud není extrémní.

1 mmol/l Troloxu = 1 mmol/l testovaných polyfenolů

Příklad ředění a pipetovaného množství vzorků:

Piva	5-10x ředit, 20 - 50 μl
Vína bílá	5x ředit, 20 -50 μl
Vína světle červená	20x ředit, 20 - 50 μl
Vína tmavě červená	50x ředit, 20 - 50 μl
Ovocné šťávy	2-5x ředit, 20-50 μl



Kalibrační závislost Troloxu

Mendelova univerzita v Brně
Brno 2013

Neprošlo jazykovou úpravou.