

## FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE MESNIH IZDELKOV, MASTI IN OLJA

### 1. FIZIKALNO-KEMIJSKE ANALIZE MESNIH IZDELKOV, MASTI IN OLJA

#### 1.1 Mesni izdelki

##### 1.1.1 Določanje vode

###### **Pribor**

Aluminijaste ali steklene merilne posode s premerom 5 cm in višino 2,5 do 3 cm, s pokrovko.

###### **Postopek**

Posode s pokrovko sušimo pred uporabo najmanj eno uro pri 105 °C v eksikatorju, ohladimo in stehtamo ( $\pm 0,0001$  g). Vanje hitro damo 3 do 5 g ( $\pm 0,001$  g) premešanega zdrobljenega vzorca, ki ga s stekleno palčko čim bolj enakomerno razširimo na dnu posode, pokrijemo s pokrovko in tako stehtamo ( $\pm 0,0001$  g). Posode damo v sušilnico s poševno postavljenim pokrovom in sušimo pri 105 °C 2 do 3 ure. Ko sušenje končamo, pokrijemo skledice s pokrovko, ohladimo v eksikatorju in stehtamo. Sušenje po 30 minutah ponovimo, dokler ne dosežemo konstantne teže (oziroma dokler se teža pri maščobnih izdelkih ne poveča).

Če je zaradi sestave živil to potrebno (visoka vsebina masti in dr.), lahko sušimo z dodatkom peska.

###### **Pribor**

1. posoda (kakor pri prejšnjem postopku) s kratko stekleno palčko, ki je na enem koncu sploščena;
2. s solno kislino opran in izžarjen pesek.

###### **Postopek**

Skledico z 20 do 30 g peska in palčko sušimo in stehtamo kakor prej. V posodo damo približno 3 do 5 g ( $\pm 0,001$  g) pripravljenega vzorca, zmešamo s peskom in sušimo v sušilnici pri 105 °C do konstantne teže, kot je navedeno pri prejšnjem postopku.

Ko je destilacija končana, titriramo odvečno žvepleno kislino z 0,25 n-raztopino natrijevega hidroksida. Lahko uporabimo tudi Tashirojev indikator.

##### 1.1.2 Določanje celotnih beljakovin

###### *A. Makro-postopek*

###### **Pribor**

1. Plinski gorilnik ali električni kuhalnik;
2. Kjeldahlova priprava za destilacijo;
3. Kjeldahlova buča, 500 ml;
4. Erlenmeyerjeva buča, 250 ml;

5. Pergamentni papir (brez dušika) ali celofan;
6. Bireta, 50 ml, 2 (dve);
7. Graduirane pipete, 25, 30 in 50 ml;
8. Steklene kroglice.

### Reagenti

1. Koncentrirana žveplena kislina ( $d = 1,84$ );
2. Kristalni bakrov sulfat;
3. Kalijev sulfat;
4. 33 %-na raztopina natrijevega hidroksida;
5. 1 %-na etanolna raztopina fenolftaleina ali lakmusov papir;
6. 0,25 n-žveplena kislina;
7. 0,25 n-raztopina natrijevega hidroksida;
8. 0,1 %-na etanolna raztopina metilnega rdečila ali Tashirojev indikator (glej pri polmikro postopku);
9. Parafin;
10. Parafinsko olje ali oktilalkohol.

Vse kemikalije morajo biti brez dušika, kar ugotovimo s slepim poskusom. Eventualno porabo kisline za amoniak z uporabljenimi kemikalijami, ki normalno ni večja od 0,1 do 0,2 ml 0,25 n-žveplene kisline, vzamemo kot korekturo pri izračunu dušika v vzorcu.

### Postopek

Če je vzorec popolnoma homogen, zadošča 1 do 1,5 g ( $\pm 0,001$  g) kar hitro stehamo na poprej tariranem koščku pergamentnega papirja ali celofana, velikosti 6 x 6 cm. Stehtani vzorec zavijemo v pergamentni papir ali celofan in damo v Kjeldahlovo bučo, dodamo 1 g bakrovega sulfata, 10 g kalijevega sulfata, 30 ml koncentrirane žveplene kisline in 1 do 2 stekleni kroglici ali porcelanasti črepinji. Če se snov močno peni, lahko dodamo nekaj kapljic oktilalkohola ali parafinskega olja. Nato jo segrevamo in večkrat premešamo v digestoriju, najprej na majhnem ognju, ki ga postopoma povečamo, dokler snov popolnoma ne zogljeni in ne postane tekoča. Pri večji količini in če je vsebina masti visoka, moramo med sežiganjem, ko večji del kisline izhlapi, le-to še dodati. Vsebina v buči in na njenih stenah ne sme biti suh, ker pride do izgub dušika. Segrevamo ob vretju dokler tekočina ni bistra in svetlo zelenomodra.

Ko se buča ohladi, previdno dodamo 300 ml destilirane vode, 2 kapljici raztopine fenolftaleina ali lakmusov papir, ostanek 33 %-ne raztopine natrijevega hidroksida na stenah buče (od uporabljene žveplene kisline) in košček parafina, ki preprečuje penjenje ter takoj spojimo s kondenzatorjem, premešamo in destiliramo. Pred tem pa damo v Erlenmeyerjevo bučo 25 do 50 ml 0,25 n-žveplene kisline in 2 do 3 kapljice raztopine metilnega rdečila.

Ko je destilacija končana, titriramo odvečno žvepleno kislino z 0,25 n-raztopino natrijevega hidroksida. Lahko uporabimo tudi Tashirojev indikator.

### *B. Polmikro postopek (oziroma kombinacija mikro in polmikro postopka)*

#### Pribor

1. Merilna buča, 100 ml;
2. Pipeta, 10 ml (dve);
3. Graduirana pipeta, 10 ml;
4. Erlenmeyerjeva buča, 100 ml;
5. Parnas-Wagnerjeva ali podobna mikro - aparatura;

6. Mikro bireta, 10 ml, po možnosti avtomatična s steklenico;
7. Steklene kroglice.

### Reagenti

1. Koncentrirana žveplena kislina ( $d = 1,84$ );
2. Kristalni bakrov sulfat;
3. Kalijev sulfat;
4. 30 %-na raztopina natrijevega hidroksida ( $d = 1,33$ );
5. 1 %-na etanolna raztopina fenolftaleina;
6. Tashirojev indikator: 4 deli 0,1 %-ne etanolne raztopine metilnega rdečila in 1 del 0,1 %-ne etanolne raztopine metilenskega modrila premešamo in hranimo največ 3 mesece v temni steklenici. Sprememba barve iz zelene v vijoličasto oziroma modro je zelo lahko vidna;
7. 0,02 n-raztopine žveplene ali solne kisline pripravimo tako, da razredčimo 0,1 n-raztopine s sveže prekuhano in ohlajeno destilirano vodo,
8. Nasičena raztopina borne kisline (približno 3,5 %-na raztopina).

### Postopek

Ko je vzorec sežgan tako, kot je opisano v makro postopku, prenesemo vso raztopino v merilno bučo, ki drži 100 ml. Kjeldahlovo bučo nekajkrat izperemo z destilirano vodo (brez dušika), ki smo jo prav tako dodali v merilno bučo, napolnimo skoraj do označbe in premešamo. Ko se ohladi na sobno temperaturo, jo napolnimo do označbe in premešamo. Za destilacijo vzamemo alikvotni del (po velikosti odmerjene količine in pričakovani vsebini dušika). Na primer: 10 ml prenesemo z lijem nad bučo za destilacijo v Parnas-Wagnerjevo aparaturo za destilacijo. Lij izperemo trikrat z 2 do 3 ml vode, dodamo nato eno kapljico raztopine fenolftaleina in 10 ml 30 %-ne raztopine natrijevega hidroksida, s ščipalko zapremo gumijasto cev pod lijem in odpremo prehod vodni pari. V Erlenmeyerjevo bučo, ki je sedaj predložek, odmerimo 10 ml nasičene raztopine borne - kisline. Predložek postavimo na steklo tako, da je destilacijska cev aparature potopljena v kislino, nato skozi kondenzator spustimo vodo in bučo segrevamo, da nastane vodna para. Destiliramo 5 minut, nato predložek spustimo, destilacijo pa nadaljujemo še 2 do 3 minute. Cev izperemo z malo vode, vzamemo bučo s stojala in tako titriramo raztopino amonijevega borata iz mikrobirete z 0,02 n-raztopino žveplene ali solne kisline, dokler se barva ne spremeni. Ko je destilacija končana, prenehamo z gretjem. Ko se aparatura ohladi, izpraznimo destilacijsko bučo v recipient, ker nastane vakuum, tako da je spet pripravljena za drugo analizo. Pri uporabi druge aparature postopamo na ustrezen način.

### Račun

1 ml 0,25 n-kisline ustreza 3,50 mg dušika

1 ml 0,02 n-kisline ustreza 0,28 mg dušika

Vsebina (surovin) beljakovin =  $N \times 6,25$  oziroma drug ustrezen faktor za specialne primere. Faktorje za obračunavanje je potrebno obvezno navesti.

### 1.1.3 Določanje čistih beljakovin

#### Pribor

1. Čaša, 200 ml;
2. Graduiran valj 25 ml (dva);
3. Lij,  $\emptyset$  približno 8 cm;
4. Pipeti, 25 ml (dve);
5. Drug pribor kakor za normalno določanje dušika po Kjeldahlu.

## Reagenti

1. Raztopina bakrovega sulfata: 60 g kristalnega bakrovega sulfata ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) raztopimo v 1 litru vode;
2. Raztopina natrijevega hidroksida: 12,5 g natrijevega hidroksida raztopimo v 1 l vode;
3. 10 %-na raztopina kalijevega ferocianida;
4. 10 %-na raztopina barijevega klorida;
5. Vsi drugi reagenti, ki so navedeni pri določanju dušika po Kjeldahlu.

## Postopek

Približno 50 g ( $\pm 0,1$  g) mesa ali izdelkov posušimo toliko, da jih je mogoče zdrobiti (da gredo skozi sito z 1 mm odprtini). Tako posušeno snov stehamo, da bi mogli dobljene rezultate preračunati na originalni vzorec; 1 do 2 g ( $\pm 0,001$  g) posušene snovi prekuhamo v čaši s 30 ml vode in pustimo še 10 minut v vodni kopeli. Nato dodamo 25 ml raztopine bakrovega sulfata in z mešanjem 25 ml raztopine natrijevega hidroksida. Pri tem nastaja zelenkasta usedlina bazičnih beljakovinskih soli. Pustimo da se usedlina sesede, nato tekočino nad njo previdno odlijemo. Usedlino pa nekajkrat dekantiramo z vodo in končno prenesemo na filtrirni papir. Usedlino na filtru izpiramo z vročo vodo, dokler filtrat ne reagira negativno na baker s kalijevim ferocianidom ali na žvepleno kislino z barijevim kloridom. Filtrirni papir mora biti brez dušika, kar ugotovimo s slepim poskusom. Popolnoma izpran filtrirni papir z usedlino prenesemo v Kjeldahlovo bučo, dodamo 25 ml koncentrirane žveplene kisline in postopek nadaljujemo po Kjeldahlovi metodi.

## Račun

Pri izračunu vsebine čistih beljakovin v originalnem vzorcu moramo upoštevati izgubo teže pri predhodnem sušenju. Vsebino dušika oziroma beljakovin izračunamo tako, kot je navedeno za določanje celotnih beljakovin.

### 1.1.4 Določanje masti

*A. Po Weibullu in Stoldtu*

#### Pribor

1. Soxhletova priprava, 150 do 200 ml;
2. Čaša, 200 ml;
3. Lij,  $\varnothing$  12 do 15 cm;
4. Urno steklo,  $\varnothing$  približno 10 cm (2 kosa);
5. Graduiri valj, 100 ml (dva);
6. Steklena palčka;
7. Filtrirni papir  $\varnothing$  27 cm.

#### Reagenti

1. Koncentrirana solna kislina ( $d = 1,19$ );
2. Petrol eter z vreliščem od 50 do 70 °C;

#### Postopek

V čašo, ki drži 200 ml odmerimo 5 do 10 g ( $\pm 0,01$  g) vzorca (oziroma toliko, da vsebina masti v odmerjenem vzorcu ni večja kot 2 g) in segrevamo 15 minut s 100 ml vode in 60 ml koncentrirane solne kisline v vreli vodni kopeli in od časa do časa premešamo. Medtem ko mešamo s stekleno palčko, ga segrejemo na azbestni mreži, da zavre, pokrijemo z urnim steklom in pustimo da počasi vre, dokler se beljakovine popolnoma ne razkrojijo, za kar je potrebno približno pol ure. Z vročo vodo, s katero smo izprali urno steklo, razredčimo še vročo tekočino in jo filtriramo skozi nagubam vlažni filtrirni papir  $\varnothing$  27 cm. Ostanke na filtru

pazljivo izperemo z vročo vodo, s katero smo predhodno izprali čašo v kateri se je kuhala, dokler filtrat ne reagira več na klorove ione. Po končani filtraciji, ko se je voda dobro odcedila poberemo filtrat skupaj z mastjo in ga damo na urno steklo, na katero smo prej položili dvojno plast filtrirnega papirja in sušimo 2 do 4 ure pri 105 °C. Nato damo filtrat skupaj s podložnim filtrirnim papirjem naravnost v ekstraktor Soxhletove priprave. Urno steklo izperemo s petrol etrom, ki ga vlijemo v Soxhletovo pripravo. Ekstraktor priprave nato spojimo s kondenzatorjem in bučo, ki smo jo predhodno 1 uro sušili s steklenimi kroglicami pri 105 °C in jo stehali. Iz zgornjega dela kondenzatorja vlijemo z malim lijem v pripravo toliko petroletra, da se ekstraktor napolni in čez lonček prelije v bučo. Nato nalijemo petrol eter še do polovice lončka. Velikost buče in ekstraktorja mora biti v takšnem razmerju, da celotna količina topila ne zavzame prostornine, večje od 3/4 prostornine buče. Nato spustimo skozi kondenzator precej močan curek vode, da se para petroletra popolnoma kondenzira, ker pride sicer do velikih izgub. Če se to zgodi in za cirkulacijo ne ostane dovolj petroletra, ga moramo še dodati.

Segrevanje reguliramo tako, da kondenzirane kapljice petroletra padajo tako hitro, da jih komaj štejemo, vendar pa ne teče v nepretrganem curku. Ekstrahiramo 2 do 3 ure. Ko je ekstrakcija končana, predestiliramo petroleter v vodni kopeli, bučko nato 1 uro sušimo pri 105 °C, kar po navadi zadošča, da dobimo konstantno težo: to kontroliramo s ponovnim sušenjem čez pol ure. Sušenje lahko pospešimo, če bučo sušimo v vodoravni legi in če iz nje z gumijasto pihalko spravimo pare petroletra. Po hlajenju v eksikatorju bučo stehamo in izračunamo odstotek masti.

### *B. Po Grossfeldu*

#### **Pribor**

1. Erlenmeyerjeve buče po 50, 100 in 250 ml;
2. Graduirani valj, 25 ml;
3. Lij za odvajanje, 200 ml;
4. Pipeta, 25 in 100 ml;
5. Lij Ø 5 cm;
6. Povratni kondenzator, kroglasti ali spiralni;
7. Preluknjano urno steklo;
8. Staniol.

#### **Reagenti**

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

#### **Postopek**

Približno 10 g ( $\pm 0,01$  g) za analizo pripravljenega vzorca stehamo na tariranem staniolnem listku in s staniolom prenesemo v bučo, ki drži 250 ml. Dodamo 20 ml koncentrirane solne kisline, nato segrevamo na malem 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 razkrajanju 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  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 - povprečna specifična teža živalske masti.

Metodo določanja masti je treba navesti posebej.

### 1.1.5 Določanje natrijevega klorida po Volhardu

#### Pribor

1. Kohlrauscheva ali merilna buča, 200 ml;
2. čaša, 100 ml;
3. Graduani pipeti, 5 in 10 ml;
4. Pipeta, 20 ml;
5. Erlenmeyerjeva buča, 200 ml;
6. Erlenmeyerjeva buča, 250 ml z brušenim zamaškom;
7. Bireta, 50 ml (dve);
8. Lij  $\varnothing$  7 cm.

#### Reagenti

1. 0,1 n-raztopina srebrovega nitrata: 16,987 g  $\text{AgNO}_3$  p.a., v 1000 ml raztopine. Popolnoma suh  $\text{AgNO}_3$  dobimo s sušenjem pri  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$  v petnajstih minutah;
2. 0,1 raztopina kalijevega ali amonijevega rodanida: približno 0,72 g KCNS ali približno 7,61  $\text{NH}_4\text{CNS}$  v 100 ml raztopine. Točen titer določimo s titiranjem z 0,1 n- $\text{AgNO}_3$  po Volhardu;
3. 10 %-na dušikova kislina;
4. Eter;
5. Nasičena raztopina amonijevega ferisufata  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot \text{Fe}(\text{SO}_4)_3 \cdot 24\text{H}_2\text{O}$ ;
6. Carrezova raztopina:
  - I. 10 %-na raztopina kalijevega ferocianida: 150 g  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$  v 1000 ml,
  - II. 30 %-na raztopina cinkovega sulfata: 300 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  v 1000 ml.

## Postopek

Približno 10 g ( $\pm 0,01$  g) čim bolj zdrobljenega vzorca zmešamo v majhnem kozarčku z malo vode, preneseno v Kohlrauschovo bučo, ki drži 200 ml (buča z razširjenim grlom) ali - če te nimamo - v navadno merilno bučo in dodamo tudi vodo, s katero smo izprali kozarček (vsega približno 100 ml vode). Bučo damo v kipečo vodno kopel in v času 15 minut večkrat premešamo. Ko se buča ohladi se balastne snovi z 10 ml Carrezove raztopine po I in II sesedajo; nato jo dopolnimo do 200 ml in premešamo. Ko se usedlina sesede, jo filtriramo skozi nagubani filtrirni papir. Nekaj prvih ml filtrata odstranimo, 20 ml popolnoma bistrega filtrata (= 1 g vzorca) pa s pipeto nakapljamo v Erlenmeyerjevo bučo, ki drži 250 ml in ima brušen zamašek, dodamo 10 ml 10 %-ne dušikove kisline 25 do 50 ml natančno odmerjene 0,1 n-raztopine srebrovega nitrata (po pričakovani vsebini soli, ki jo mora biti nekaj več) in 5 ml etra. To premešamo in ko se tekočina zbistri, dodamo 5 ml raztopine amonijevega ferisulfata, ostanek srebrovega nitrata pa ponovno titriramo z 0,1 n-raztopine kalijevega ali amonijevega rodanida, dokler se ne pokaže obstojna rdečkasta barva. Po porabljeni količini srebrovega nitrata se izračuna količina natrijevega klorida.

### 1.1.6 Določanje nitrata

#### Pribor

1. Merilna bučka, 200 ml;
2. Graduiran valj, 200 ml;
3. Hehnerjeva ali Nesslerjeva cev, 100 ml (dve);
4. Valj iz nevtralnega stekla, 50 ml (dva);
5. Erlenmeyerjeva buča, 100 in 200 ml;
6. Lij,  $\varnothing$  5 do 6 cm (dva);
7. Porcelanasta skodelica,  $\varnothing$  6 do 8 cm;
8. Graduirane pipete, 1, 2, 5, 20 in 25 ml;
9. Pipeti, 10 in 50 ml.

#### Reagenti

1. 25 %-na raztopina natrijevega karbonata;
2. Sveže pripravljena raztopina brucina: 0,25 g brucina raztopimo v 100 ml koncentrirane žveplene kisline, ki mora biti brez dušikove kisline;
3. 0,01 %-na standardna raztopina kalijevega nitrata: 0,10 g  $\text{KNO}_3$  raztopimo v 1000 ml vode;
4. 5 %-na raztopina sublimata (živosrebrov (II) klorid);
5. 2 %-na solna kislina;
6. 10 % žveplena kislina;
7. Karbamid (urea).

#### Postopek

V merilno bučo, ki drži 200 ml, damo 10 g ( $\pm 0,01$ ) pripravljenega vzorca, dodamo 150 ml vode in 6 kapljic 25 %-ne raztopine natrijevega karbonata in premešamo. Nato jo eno uro in pol pustimo in večkrat pretresemo. Potem jo dopolnimo z vodo do 200 ml, spet premešamo in filtriramo. V filtratu določimo približno vsebino nitrata, da bi lahko za končno določanje napravili potrebno razredčenje, ki ne sme vsebovati več kot 1 mg  $\text{KNO}_3$  v 10 ml. Enake prostornine npr. 10 ml mesnega ekstrakta in 10 ml 0,01 %-ne raztopine kalijevega nitrata zmešamo v valjih, ki držijo po 50 ml, z dvojno količino raztopine brucina. Če je mesni ekstrakt močnejše obarvan kot raztopine kalijevega nitrata ga moramo razredčiti toliko, da vsebuje manj nitrata kot raztopina za primerjanje.

Nato primešamo 50 ml (eventualno razredčenega) mesnega ekstrakta z isto prostornino zmesi enakih delov 5 %-ne raztopine sublimata in 2 %-ne solne kisline. Filtriramo skozi dvojni kvantitativni filtrirni papir. V porcelanasti skodelici mešamo 10 ml bistrega filtrata z 20 ml raztopine brucina 15 sekund in nato prelijemo v Hehnerjev valj, v katerem je 70 ml vode. Enako storimo z raztopino kalijevega nitrata, ki jo vlijemo v drug Hehnerjev valj. Ko se nehajo pojavljati zračni klobučki, premešamo raztopini v valjih. Iz valja z močnejše obarvano raztopino jo izlijemo toliko, da sta obe raztopini enake barve, kadar jih gledamo od zgoraj. Iz odčitane višine stebra raztopine kalijevega nitrata izračunamo vsebino kalijevega nitrata v mesnem ekstraktu in jo preračunamo na meso.

Če vzorec vsebuje nitrite, jih moramo predhodno razkrojiti (ker prav tako reagirajo z brucinom). Ko se beljakovine sesedejo, kuhamo 15 ml filtrata z 2 ml 10 %-ne žveplene kisline in 0,3 g karbamida dokler ne nehajo izhajati dušikovi oksidi. To ohladimo, dopolnimo do 20 ml, v 10 ml pa določimo nitrate, tako kot je opisano.

### 1.1.7 Določanje nitrata

#### Pribor

1. Merilna buča, 100 in 200 ml;
2. Graduirane pipete 1, 5, 10 in 25 ml;
3. Lij Ø 6 do 8 cm;
4. Pipeti 10 in 20 ml;
5. Erlenmeyerjeva buča, 100 ml.

#### Reagenti

1. Nasičena raztopina boraksa  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ;
2. Carrezova raztopina II: 300 g cinkovega sulfata  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  v 1000 ml vode;
3. Razredčeni amoniak: 1 del 25 %-ne raztopine  $\text{NH}_4$  pomešane s 4 deli vode;
4. Približno 0,1 n-solna kislina: 8,6 ml koncentrirane solne kisline v 1000 ml vode;
5. Griessejev reagent
  - I. 0,6 g sulfanilne kisline in 20 ml ledene očetne kisline dopolnimo z vodo do 1000 ml,
  - II. 0,03 g alfa-naftil-amina prekuhamo trikrat z 10 ml vode in filtriramo. Filtrat z dodatkom 20 ml ledene očetne kisline dopolnimo z vodo do 100 ml in ga pustimo v dobro zamašeni temni steklenici v temi.

Reagent pripravljamo neposredno pred uporabo z mešanjem enakih delov I in II.

#### Postopek

V merilno bučo, ki drži 200 ml, odmerimo 10 g ( $\pm 0,01$  g) dobro homogeniziranega vzorca, dodamo 5 ml nasičene boraksove raztopine in približno 150 ml vroče vode, dobro premešamo in segrevamo 15 min v kipeči vodni kopeli. Medtem, ko stresamo, takoj dodamo po kapljicah 1 ml Carrezove raztopine II, dobro ohladimo – mast se mora popolnoma strditi – dopolnimo do oznake z vodo in filtriramo (če je to potrebno, dodamo tekočino večkrat v filter).

S pipeto odmerimo v merilno bučo, ki drži 100 ml, 20 ml bistrega filtrata, dodamo naprej 25 ml razredčenega amoniaka, nato še 10 ml 0,1 n-solne kisline (zaporedja dodatkov se je potrebno brezpogojno držati) in dopolnimo z vodo do 100 ml. V Erlenmeyerjevo bučo, ki drži 100 ml nalijemo s pipeto 10 ml te raztopine, jo pomešamo z 10 ml Griessovega reagenta in pustimo 15 minut v zamašeni buči pri sobni temperaturi. Intenziteto barve rdeče reagenčne raztopine izmerimo s pomočjo fotometra s filtrom S 53 ali s spektrfotometrom pri 530 milimikronih.



Kalibracijska krivulja, izdelana pod temi pogoji je dala s čistim  $\text{NaNO}_2$  ekstinkcijske vrednosti, ki so navedene v tabeli 1.

Tabela 1. Kalibracijska krivulja z  $\text{NaNO}_2$

| (n g $\text{NaNO}_2$ ) 10 ml končne raztopine | $\frac{E}{d}$ |
|---|---------------|
| 1   | 0,028         |
| 2   | 0,059         |
| 5   | 0,155         |
| 10  | 0,307         |
| 20  | 0,598         |
| 30  | 0,903         |
| 40  | 1,150         |
| 50  | 1,405         |

10 ml raztopine vzorca + 10 ml Griessovega reagenta.

Merjenje 15 min potem, ko smo dodali reagent.

Filter: S 53, d = debelina plasti v cm

Med navedenimi vrednostmi je pri odčitavanju opravljena linearna interpolacija.

### 1.1.8 Dokazovanje kondenziranih fosfatov

#### Pribor

1. Možnar, Ø 15 cm s tolkalom;
2. Lij, Ø 10 cm;
3. Čaša, 50 ml;
4. Pribor za kromatografijo na papirju;
5. Papir za kromatografiranje S in S 2040 b. gl. ali Whatman št. 1.

#### Reagenti

1. Topilo: pomešamo 70 ml izopropanola, 20 ml 20 %-ne trikloroacetne kisline, 0,3 ml 25 %-nega amoniaka in 10 ml vode. Ker izopropanol hitro izhlapi je priporočljivo, da reagent pripravimo vsak dan znova.
2. Raztopina za razvijanje I: 15 g kristalnega amonijevega molibdata raztopimo v 100 ml vode in vlijemo v 100 ml dušikove kisline ( $d = 1,2$ ).
3. Raztopina za razvijanje II: 0,05 g benzidina raztopimo ob rahlem segrevanju v 5 ml ledene očetne kisline. Raztopino razredčimo z vodo do 100 ml in nato dodamo 10 ml koncentriranega amoniaka (benzidin deloma kristalizira, raztopina pa je kljub temu uporabna za razvijanje).
4. Trdna trikloroacetna kislina.

#### Postopek

V možnar naribamo 50 g zdrobljenega vzorca s približno 10 g trdne trikloroacetne kisline in če je to potrebno z malo vode. Dobljeno raztopino filtriramo, bistri filtrat pa uporabimo za naraščajoče kromatografiranje. Postopek traja pri tem načinu dela približno 2 uri. Nato kromatogram posušimo s toplim zrakom in ovlažimo z raztopino za razvijanje I. Nato kromatogram sušimo pri sobni temperaturi, dokler ne občutimo več ostrega vonja po dušikovi kislini. Fosfati se pokažejo kot rumeni madeži, ki se potem, ko jih poškopimo z raztopino za razvijanje II, obarvajo intenzivno modro. Prisotni ortofosfati se pojavijo takoj za razredčilom, medtem ko se razni kondenzirani fosfati zaustavijo v medprostoru.

### 1.1.9 Določanje škroba (po Grossfeldu)

#### Pribor

1. Priprava za filtriranje: najprej damo v cevko za filtriranje malo steklene volne in jo pritisnemo s palčko. Nato z odstranjevanjem damo z vodno sesalko čeznjo plast azbesta. Tako pripravljeno cev pritrdimo s preluknjanim zamaškom na dovolj široko Erlenmeyerjevo bučo tako, da je njen največji del v buči.

Za filtriranje lahko uporabimo tudi cev z zalito porozno stekleno ploščico (»Jena« 1G3);

2. Buča, 100 ml;
3. Merilna buča, 100 ml;
4. Povratni kondenzator;
5. Lij, Ø 6 cm;
6. Urno steklo;
7. Polarimeter.

#### Reagenti

1. 8 %-na etanolna raztopina kalijevega hidroksida;
2. 96 %-ni etanol;
3. 25 %-na solna kislina;
4. Kremenica.

#### Postopek

V buči, ki drži 100 ml prelijemo 25 g ( $\pm 0,01$  g) čim bolj zdrobljenega vzorca s približno 50 ml 8 %-ne etanolne raztopine kalijevega hidroksida in segrevamo na vodni kopeli s povratnim kondenzatorjem in pogosto premešamo, dokler se vsi delci mesa in masti ne razkrojijo, kar traja včasih tudi nekaj ur. Nato vsebino buče prelijemo v navedeno pripravo za filtriranje in pustimo da prekaplja. Bučo izperemo s 96 %-nim etanolom, ki ga prav tako nalijemo v cev za filtriranje. Neraztopljeni škrob zelo hitro sedimentira, tekočina nad njim pa je temno rumene barve. Cev pokrijemo z urnim steklom, bučo pa damo na vodno kopel, tako da filtrat počasi vre. Pustimo, da tekočina čim bolje prekaplja, na usedlino pa nalijemo čisti etanol. Dodajanje etanola ponavljamo, dokler kapljice niso popolnoma brezbarvne. Ko je etanol popolnoma prekapljal vzamemo cev iz buče in jo damo v merilno bučo, ki drži 100 ml. Škrob prelijemo s 25 %-no solno kislino in premešamo s stekleno palčko. Pri tem se plast filtra (če ni uporabljen filter s porozno ploščico) predre, tako da celotna vsebina cevi preide v bučo. Nato cev še izperemo s solno kislino. V bučo damo za noževno konico kremenice, jo dopolnimo s 25 %-no solno kislino do označbe, premešamo in filtriramo skozi suhi filter. Bister filtrat se v cevi Ø 200 (ali 100 mm) polarimetrira. Po opisanem postopku ustreza vsaka krožna stopinja 0,99 % škroba, če se polarimetrira v cevi, dolgi 200 mm.

**Pripomba** Pri klobasah, ki vsebujejo kri, pogosto opazimo, da je težko natančno prebrati stopnjo polarizacije, čeprav je raztopina prozorna, kar vsekakor povzročajo razkrojni produkti hemoglobina. Ker pa je stopnja odklona škroba zelo visoka, lahko filtrat razredčimo s solno kislino toliko, da ga je mogoče odčitati in to upoštevamo pri izračunu.

### 1.1.10 Določanje mleka v prahu - iz vsebine laktoze

#### Pribor

1. Čaša, 100 ml (dve);
2. Merilna buča, 200 ml (dve);
3. Lij Ø 6 do 7 cm (dva);

4. Erlenmeyerjeva buča, 200 ml (dve);
5. Graduירani valj, 150 do 250 ml;
6. Stekleni filtrirni lonček G4;
7. Pesek;
8. Graduירani pipeti, 1, 5 in 10 ml;
9. Bireta, 50 ml.

### Reagenti

1. 10 %-na raztopina kalijevega ferocianida,
2. Raztopina cinkovega sulfata, hladno nasičena,
3. Fehlingova raztopina I in II,
4. 24 %-na žveplena kislina: 1 prostornina žveplene kisline + 4 deli vode,
5. 20 %-na raztopina kalijevega jodida,
6. 0,1 n-raztopina- natrijevega tiosulfata,
7. 1 %-na raztopina škroba.

### Postopek

V majhnem kozarčku zmešamo 10 g ( $\pm 0,01$  g) dobro zdrobljenega vzorca s približno 10 g peska in s toliko vode, da nastane redka kaša, ki jo brez izgub prenesemo v merilno bučo, ki drži 200 ml in dopolnimo do označbe z vodo. Bučo 5 minut tresemo, jo nato damo v kipečo vodno kopel, kjer ostane 10 minut od trenutka, ko je voda začela znova vreti.

Med segrevanjem bučo nekajkrat pretresemo, nato jo s curkom vode hitro ohladimo in filtriramo. V drugo merilno bučo, ki drži 200 ml, damo 150 ml filtrata, dodamo 5 ml 10 %-ne raztopine kalijevega ferocianida in 1 ml hladno nasičene raztopine cinkovega sulfata, dopolnimo z vodo do 200 ml in premešamo. Po 15 minutah filtriramo. V filtratu določimo Fehlingovo laktozo in jo preračunamo na originalno snov. Vsebina laktoze ustreza dvojni količini prahu iz posnetega mleka.

#### 1.1.11 Dokazovanje umetnega barvila (v vodi topljiva Späthova barvila)

### Pribor

1. Soxhletova priprava za ekstrakcijo;
2. Čaša ali skledica, 100 do 150 ml;
3. Lij  $\varnothing$  6 do 3 cm;
4. Nemastna volna (ekstrahirana z etrom).

### Reagenti

1. Petrol eter (nizko vrelišče);
2. 5 %-na raztopina natrijevega salicilata;
3. 10 %-na žveplena kislina;
4. Etanol;
5. Eter;
6. Pesek, opran s solno kislino in izžarjen.

### Postopek

Malo očiščenega peska zmešamo s 30 do 50 g zdrobljenega vzorca. Sušimo v tulcu za ekstrakcijo v sušilnici 1 do 2 uri pri 100 °C in nato v Soxhletovi pripravi ekstrahiramo s petrol etrom. Iz ekstrahiranega ostanka v tulcu s segrevanjem odstranimo ostali petrol eter, ostanek prenesemo v čašo, ga prelijemo s potrebno količino 5 %-ne raztopine natrijevega salicilata in medtem ko pogosto mešamo s stekleno palčko, segrevamo 1 uro v vodni kopeli. Ekstrakt filtriramo ko je še topel in ga, če je to potrebno še enkrat na enak način titriramo z malo

natrijevega salicilata in filtriramo v prvi filtrat. Če se filtrat obarva rumeno, pomeni, da v izdelku ni umetnega barvila. Če je filtrat obarvan rdeče, ga moramo okisati z žvepleno kislino, dodati nekaj vlaken nemastne volne in segreti 1 uro v vodni kopeli. Volno izperemo najprej z vodo, nato pa z etanolom in etrom. Obarvana volna dokazuje navzočnost umetnega barvila. Nujno je, da rdeče obarvani ekstrakt preizkusimo z volno, ker samo obarvanje ekstrakta še ni dokaz, da je bil izdelek umetno obarvan.

Če preiskujemo samo ovoj klobas, predhodno sušenje ni potrebno, temveč ga samo zdrobimo in ekstrahiramo s petrol etrom neposredno. Če je potrebno določiti, katero umetno barvilo je bilo uporabljeno, nadaljujemo s kromatografijo na papirju.

## **1.2 Masti in olja**

### **1.2.1 Preiskovanje obstojnosti masti**

V steklene skledice (visoke 5 do 10 cm) damo vzorce masti po 50 g in jih pustimo v sušilnici pri 98 °C ( $\pm 0,1$  °C), dokler peroksidno število masti ne prekorači določeno vrednost. Največkrat pustimo vzorce v sušilnici, dokler peroksidno število masti ni 5. Rast peroksidnega števila spremljamo z določanjem peroksida v določenih časovnih presledkih, najpogosteje vsakih 5 ur. Čas v urah, ki je potreben, da ostane mast v sušilnici pri 98 °C, da se doseže vrednost peroksidnega števila, ki je potrebna, jemljemo kot stabilnost masti.

Posebno je treba biti pozoren, da je skledica, v katero dajemo mast, čista, ker se tako izognemo vsaki morebitni pospešitvi ali počasnejši oksidaciji masti zaradi navzočnosti drugih snovi, ki lahko vplivajo na rezultat, tudi če so samo njihovi sledovi.

Posebno priporočljiva je uporaba te metode pri stabilizaciji masti, kjer se z določanjem obstojnosti pred in po dodajanju antioksidanta lahko preizkusi njegova antioksidacijska moč.

### **1.2.2 Določanje vode in hlapnih sestavin**

*A. Metoda določanja vode in hlapnih sestavin v sušilnici pri 100 do 105 °C*

#### **Pribor**

1. Merilna posoda iz stekla ali aluminija, z  $\varnothing$  40 do 50 mm in visoka 20 do 30 mm;
2. Eksikator;
3. Sušilnica (električna, s termoregulatorjem).

#### **Postopek**

Merilno posodo najprej sušimo 30 minut v sušilnici pri temperaturi od 100 do 105 °C, nato pa jo ohladimo v eksikatorju in natančno tehtamo.

V to posodo odmerimo 3 do 5 dobro premešanega vzorca vzorca olja in masti in sušimo pri temperaturi od 100 do 105 °C 30 minut, ohladimo v eksikatorju in tehtamo. Sušenja ponavljamo, le da naslednja sušenja vzorcev trajajo po 15 minut vse dokler razlike med dvema zaporednima tehtanjem niso manjše od 0,005 g. Če se po enem od zadnjih tehtanj teža poveča, vzamemo za obračun najmanjšo težo.

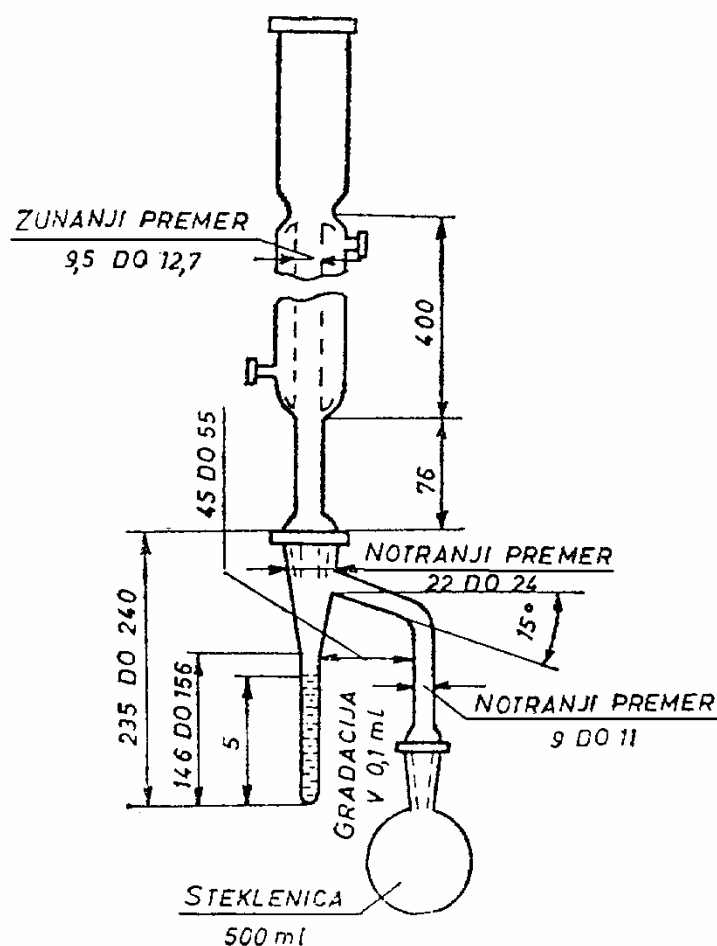
## B. Določanje vsebine vode z destilacijo in organskim topilom

### Pribor

1. Priprava za določanje vode z destilacijo z organskim sredstvom, prikazana na sliki 1, se sestoji iz steklenice, ki se segreva, s povratnim kondenzatorjem, ki je z nastavkom spojen s steklenico; spoji med nastavkom in kondenzatorjem oziroma kondenzatorjem in steklenico so enaki (lahko jih zamenjamo med seboj) in brušeni. V nastavku se izbira in meri kondenzirana voda, po njem se tudi topilo vrne v steklenico. Nastavek je sestavljen iz graduirane cevi in iz upognjene cevi, s katero je spojen s steklenico. Graduirana cev ima prostornino 5 ml. Označbe celih ml morajo biti numerirane s črto okrog cele cevi, polovica ml do dveh tretjin obsega, 0,1 ml pa do polovice cevi. Razlika od označene prostornine ne sme biti večja kot 0,05 ml. Stekljeni kondenzator je na spodnjem delu odrezen pod kotom  $30^\circ$  na vertikalno os, ko po je spojen z nastavkom je razmak med vrhom in višino tekočine na nastavku 6 do 7 mm pri destilaciji.

2. Naprava za segrevanje je navadno laboratorijska oljna kopel ali električni namizni kuhalnik z termostatom za reguliranje temperature.

3. Bakrena žica, dovolj dolga, da gre skozi kondenzator, na spodnjem koncu zavita v spiralo. Premer spirale mora biti tak, da pride v graduirano cev in se lahko premika navzgor in navzdol.



Slika 1. Priprava za določanje vode z destilacijo (mere so v mm)

### Topila

Ksilol ali toluol, nasičen z vodo najmanj osem dni pred uporabo in zavarovan z vodo do trenutka uporabe. Pri uporabi topila je potrebno paziti, da je vsa voda odstranjena in da ne pride v pripravo za destiliranje.

## Postopek

Notranjost priprave očistimo s kromovo žvepleno kislino, dobro izperemo z vodo in pred uporabo posušimo. Količino vzorca za preskus jemljemo glede na količino pričakovane vsebine vode:

| Pričakovana vsebina vode | Količina vzorca (približno) |
|--------------------------|-----------------------------|
| manj kot 1 %             | 200 g                       |
| 1 do 5 %                 | 100 g                       |
| več kot 5 %              | ustrezna manjša količina    |

Stehtan vzorec za preskušanje prenesemo v steklenico za destilacijo in dodamo toliko ml topila, kolikor gramov je težak vzorec, če pa smo imeli manj kot 100 g vzorca, pa dodamo 100 ml topila. Vsebino s stresanjem premešamo, nato vržemo vanjo nekaj steklenih kroglic, da bi bilo vrenje bolj enakomerno. Pripravo sestavimo, graduirano cev pa napolnimo skozi kondenzator s topilom, dokler se ne začne prelivati v steklenico za destilacijo. Na vrh kondenzatorja narahlo položimo kosem vate, da preprečimo kondenzacijo atmosferske vlage v cevi. Steklenico segrevamo toliko, da predestilira približno 100 kapljic kondenzata v minuti. Ko je večji del vode predestilirana, povečamo hitrost destiliranja na približno 200 kapljic v minuti in nadaljujemo, dokler se voda ne zbira več v graduirani cevi. Med destiliranjem pazljivo speremo kapljice vode s sten kondenzatorja s 5 ml topila. Preostalo vodo v graduirani cevi lahko ločimo od ksilola ali toluola s previdnim premikanjem spiralne bakrene žice skozi kondenzator v graduirano cev. Destiliramo, dokler se voda, ki se je zbrala v graduirani cevi v teku 30 minut, ne poveča več. Kondenzator izperemo s topilom in pri tem uporabljamo spiralno žico, da izločimo vodne kapljice. Graduirano cev potopimo v vodo s približno 20 °C za najmanj 15 minut, oziroma dokler se plast ksilola ali toluola ne zbistri, nato pa odčitamo prostornino izločene vode.

## Račun

Vsebino vode  $x$  izračunamo po formuli:

$$x = \frac{100 \cdot a}{b} \%$$

kjer je:

$a$  – prostornina vode v graduirani cevi v ml,

$b$  – teža vzorca, vzetega za določanje vode.

### *C. Določanje vode po temperaturi motnosti (samo za svinjsko mast)*

V epruveti previdno stopimo približno 10 g masti. Vanjo damo toplomer. Mast segrejemo do 50-52 °C in jo, če je popolnoma bistra s stresanjem ohladimo na 40 °C. Če ostane tudi pri tej temperaturi popolnoma bistra, vsebuje manj kot 0,15 % vode, če pa se skali, je vsebina med 0,15 in 0,20 %. Če je mast na 52 °C vidno motna in se ne zbistri niti pri 95 °C, je vsebina vode večja kot 0,45 %. V tem primeru določimo količino vode gravimetrično.

Če je mast pri 95 °C bistra, jo s tresenjem postopoma hladimo dokler se ne skali. Po temperaturi, na kateri se je mast skalila, odčitamo vsebino vode po tabeli 2.

Tabela 2. Vsebina vode v masti glede na temperaturo skalitve le-te

| Temperatura motnosti (°C) | 40,5 | 53,0 | 64,5 | 75,2 | 85,8 | 90,8 | 93,5 |
|---------------------------|------|------|------|------|------|------|------|
| Vsebina vode %            | 0,15 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,35 | 0,40 | 0,45 |

### 1.2.3 Določanje nečistoče (nemastnih sestavin)

#### Pribor

Lonček za filtriranje s poroznim dnom (npr. "Jena" 3G4), izpran s kislino, vodo in ustreznim topilom, osušen 100 do 105 °C, ohlajen in stehtan.

#### Reagenti

Sveže predestiliran trikloretilen ali petrol-eter, ki je v vodni kopeli izhlapel brez ostanka.

#### Postopek

V 100 ml topila raztopimo 5 do 10 g olja ali masti ( $\pm 0,01$  g) in nekajkrat dobro premešamo v steklenici ustrezne prostornine. Ko se stopi, filtriramo skozi lonček za filtriranje. Steklenico in lonček za filtriranje z usedlino izpiramo s topilom, dokler popolnoma ne odstranimo preostalega olja ali masti (dokler nekaj kapljic filtrata na filtrirnem papirju po izhlapevanju ne pušča več mastnega madeža). Takrat lonček za filtriranje z usedlino sušimo pri 105 °C do konstantne teže (približno 30 minut), shladimo in stehtamo. Razlika med dvema določitvama ne sme biti večja kot 0,05 %.

#### Račun

Vsebino v topilu netopnih sestavin (x) izračunamo po formuli:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 100}{c} \%$$

kjer je:

a – teža lončka za filtriranje z usedlino v gramih,

b – teža praznega lončka v gramih,

c – stehtano olje ali mast v gramih.

### 1.2.4 Določanje saponifikacijskega števila

#### Pribor

1. Erlenmeyerjeva buča, 150 in 200 ml;
2. Zračni kondenzator (steklena cev dolga 1 m);
3. Bireta, 50 ml, z gradacijo 0,1 ml;
4. Merilna posodica.

#### Reagenti

1. 0,5 n-raztopina kalijevega hidroksida v etanolu, pripravljena tako: 30 g kalijevega hidroksida p.a. raztopimo v 50 do 60 ml destilirane vode in dolijemo 96 vol%-ni etanol do 1000 ml; pustimo ga čez noč, nato bistro raztopino odlijemo od usedline in vlijemo v steklenico iz temnega stekla z gumijastim zamaškom;
2. 0,5 n-raztopina solne kisline;
3. 1 %-na raztopina fenolftaleina v etanolu.

**Opomba:** Če da vzorec olja ali masti pri titriranju obarvane milne raztopine, lahko namesto raztopine fenolftaleina uporabimo kot indikator 2,5 %-no etanolno raztopino bazičnega modrila 6B.

## Postopek

Če vzorec za preiskus ni tekoč, ga stopimo in prefiltriramo, da bi odstranili nečistoče in sledove vode. Od izmešanega vzorca stehtamo (natančnost  $\pm 0,0001$  g) približno 2,0 g olja oziroma masti v Erlenmeyerjevi buči. Nato dodamo s pipeto 25 ml etanolne raztopine kalijevega hidroksida, steklenico spojimo z zračnim kondenzatorjem, postavimo v vodno kopel in kuhamo najmanj eno uro z občasnim tresenjem oziroma dokler saponifikacija ni končana.

Ob enem pod enakimi pogoji in na enak način opravimo slepi preskus, samo brez olja in masti. Ko je saponifikacija končana dodamo še vroči bistri raztopini 0,5 n-raztopino solne kisline, dokler se barva ne spremeni.

## Račun

Saponifikacijsko število (x) izračunamo po formuli:

$$x = \frac{(a - b) \cdot 28,055}{c}$$

kjer je:

a – število porabljenih ml 0,5 n-raztopine solne kisline (HCl) za slepi poskus,

b – število za vzorec porabljenih ml 0,5 n-raztopine HCl,

c – teža olja in masti v g.

## 1.2.5 Določanje prostih maščobnih kislin

### Splošna pojasnila

količino prostih maščobnih kislin v olju ali masti lahko izrazimo kot:

- kislinsko število,
- kislinsko stopnjo ali
- odstotek oleinske kisline.

**Opomba:** Za kokosovo olje in olje iz palmovih pečk lahko opravimo obračun tudi na lavrinsko kislino, za ricinusovo olje na ricinolno ter za palmovo olje na palmitinsko kislino, kar je potrebno v poročilu posebej navesti.

Kislinsko število pove, koliko mg kalijevega hidroksida je potrebno za nevtralizacijo prostih maščobnih kislin, ki jih vsebuje 100 g olja ali masti.

Odstotek oleinske (lavrinske, ricinolne ali palmitinske) kisline pove v utežnih odstotkih, koliko je v preizkušenem olju ene od teh kislin.

Vse te podatke dobimo po enakem postopku za določanje, zato lahko preračunamo enega v drugega.

1 ml n-KOH = 56,1 mg KOH,  
= 282 mg oleinske kisline,  
= 200 mg lavrinske kisline,  
= 298 mg ricinolne kisline,  
= 256 mg palmitinske kisline.

## Določanje prostih maščobnih kislin

### Pribor

1. Erlenmeyerjeva buča, 200 ml;
2. Bireta, 25 ali 50 ml z gradacijo 0,1 ml;
3. Laboratorijska tehtnica, natančnosti 0,01 g;
4. Vodna kopel.



## Reagenti

1. 0,1 n-vodna raztopina bazičnega hidroksida (NaOH ali KOH);
2. Nevtralizirana zmes etiletra in 96 vol%-nega etanola (1:1);
3. 1 %-na raztopina fenolftaleina v 96 vol%-nem etanolu ali 2,5 % raztopina bazičnega modrila 6B v 96 vol%-nem etanolu.

## Postopek

V Erlenmeyerjevi buči, ki drži 200 ml, stehtamo 5 do 10 g olja ali masti (natančnost  $\pm 0,01$ g), ki jo če ni tekoča, s segrevanjem raztopimo v vodni kopeli, prelijemo s 50 ml nevtralne zmesi etrovega etanola in pretresemo, nato dodamo nekaj kapljic raztopine fenolftaleina ali bazičnega modrila 6B in titiramo z 0,1 n-raztopino bazičnega hidroksida, dokler ne spremeni barve. Če se pri titriranju barva škali, dodamo še 5 do 10 ml zmesi etrovega etanola in stresamo, da se tekočina zbistri. Če je to potrebno, steklenico z vsebino malo segrevamo v vodni kopeli, shladimo na sobno temperaturo in nato končamo titriranje.

**Opomba:** Pri titriranju z 0,1 n-vodno raztopino kalijevega hidroksida, mora biti količina etanola v zmesi etrovega etanola za 1/5 večja od količine uporabljene 0,1 n-raztopine kalijevega hidroksida, da bi se izognili hidrolizi mila, ki nastaja pri tem. Za titriranje temnih olj (pri katerih ni mogoče določiti konca titracije) vzamemo večjo količino topila in raztopino bazičnega modrila 6B kot indikator.

## Račun

$$\begin{aligned} \text{kislinska stopnja} &= \frac{10 \cdot b}{a} \\ \text{kislinsko število} &= \frac{10 \cdot b}{a} \cdot 0,561 \\ \text{odstotek oleinske kisline} &= \frac{10 \cdot b}{a} \cdot 0,282 \\ \text{odstotek lavrinske kisline} &= \frac{10 \cdot b}{a} \cdot 0,200 \\ \text{odstotek ricinolne kisline} &= \frac{10 \cdot b}{a} \cdot 0,298 \\ \text{odstotek palmitinske kisline} &= \frac{10 \cdot b}{a} \cdot 0,256 \end{aligned}$$

kjer je:

a – stehtana mast,

b – poraba 0,1 n-raztopine alkalnega hidroksida.

Razlika med vzporednimi titracijami ne sme biti večja kot 0,1 ml.

**Opomba:** Če vsebuje preiskovani vzorec olja ali masti mineralne kisline, jih je potrebno posebej določiti, ekvivalentno količino raztopine 0,1 n-hidroksida pa odbijemo od celotnega porabljenega hidroksida za nevtralizacijo, iz razlike porabe hidroksidov izračunamo vsebino prostih maščobnih kislin.

## 1.2.6 Določanje Whelerjevega peroksidnega števila – modificirana metoda po Hadornu, Bieferju in Suterju

### Pribor

1. Erlenmeyerjeva bučka, 100 ml (dve);
2. Graduirane pipete, 1, 10 in 20 ml;
3. Bireta, 10 ml (dve).

## Reagenti

1. Zmes ledene očetne kisline in kloroforma (3 + 2);
2. Hladilno nasičena raztopina kalijevega jodida, sveže pripravljena: 14 g kalijevega jodida raztopimo v 10 ml sveže prekuhane in ohlajene vode;
3. 0,01 n-raztopina natrijevega tiosulfata;
4. 1 %-na raztopina škroba.

## Postopek

V Erlenmeyerjevi bučki za 100 ml stehtamo približno 1 g masti ali olja s tekočino ( $\pm 5$  mg). Pri serijskih analizah, kjer ni nujna največja natančnost, zadošča, da namesto da olje merimo, vzamemo merilno pipeto, izmerjeno "na izliv" 1,1 ml. Pri tem napaka znaša največ  $\pm 5$  % in jo lahko pri olju z nizkim peroksidnim številom (po 10) zanemarimo. Dodamo 10 ml zmesi ledene očetne kisline in kloroforma, premešamo in takoj, ko sta mast ali olje enakomerno raztopljeni, z bireto dodamo 0,2 ml raztopine kalijevega jodida. Nato z roko točno eno minuto stresamo, razredčimo z 20 ml vode, dodamo 0,5 ml raztopine škroba in takoj titriramo z 0,01 n-raztopino natrijevega tiosulfata. Na analogen način opravimo slepi poskus z reagenti, samo brez olja ali masti.

## Račun

$$\text{Peroksidno število} = \frac{(a - b) \cdot 5}{c}$$

kjer je:

- a – ml 0,01 n- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  v glavnem poskusu,
- b – ml 0,01 n- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  v slepem poskusu,
- c – stehtana količina.

Opomba: nasičena raztopina kalijevega jodida na zraku ni dolgo obstojna. Čim prej ga moramo še svežega uporabiti, njegovo slepo vrednost pa je potrebno od časa do časa kontrolirati (približno vsako uro). Zaradi tega ni priporočljivo, da dodajamo raztopino kalijevega jodida s pipeto. Ko ponavljamo vsesavanje raztopine, se ta stalno meša z zrakom in postane že po kratkem času zaradi oksidacije rumena. Če raztopina kalijevega jodida v bireti miruje, ostane dlje časa brezbarvna.

### 1.2.7 Določanje jodnega števila - po Hanušu

#### Pribor

1. Erlenmeyerjeva bučka s steklenim zamaškom, 300 ml;
2. Bireta, 50 ml z graduacijo 0,1 ml;
3. Posodica za tehtanje vzorcev

#### Reagenti

1. 10 %-na raztopina kalijevega jodida p.a. (brez jodata);
2. Kloroform p.a.;
3. 0,1 n-raztopina natrijevega tiosulfata;
4. Sveže pripravljena 1 %-na raztopina topnega škroba;
5. Raztopina jodovega monobromida, ki jo pripravimo tako: 13 g čistega joda p.a. raztopimo v 60 ml ledene očetne kisline, nato pa dodamo 8 g broma, premešamo in dopolnimo do 1 litra z isto očetno kislino ali 20,7 jodovega monobromida p.a. raztopimo v ledeni očetni kislini p.a. in raztopino razredčimo s to kislino do 1000 ml.

## Postopek

V posodici za tehtanje vzorcev stehtamo od 0,2 do 0,5 g olja ali masti ( $\pm 0,0002$  g), katerih jodno število se giblje v mejah do 100, oziroma 0,1 do 0,2 g tiste substance, katere jodno število je večje od 100. Posodico damo v suho Erlenmeyerjevo bučko, 300 ml, substanco razkrojimo z 10 do 15 ml kloroforma, s pipeto dodamo 25 ml raztopine jodovega monobromida, dobro pretresemo in pustimo v zamašeni Erlenmeyerjevi bučki v temnem prostoru 30 minut. Nato dodamo 15 g kalijevega jodida in približno 150 ml destilirane vode ter titriramo z 0,1 n-raztopino natrijevega tiosulfata, dokler barva ni svetlo rumena. Potem dodamo 1 do 2 ml raztopine škroba in nadaljujemo titriranje, dokler modra barva ne izgine. Vzoredno opravljamo na enak način slepi poskus samo brez olja ali masti.

## Račun

$$\text{Jodno število} = \frac{(a - b) \cdot 0,01269}{c} \cdot 100$$

kjer je:

a – število za slepi poskus porabljenih ml 0,1 n-raztopine natrijevega tiosulfata;

b – število za titriranje olja in masti porabljenih ml 0,1 n-raztopine natrijevega tiosulfata;

c – teža stehtanega vzorca olja in masti v gramih 1 ml 0,1 n- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 = 0,01269$  g joda.

## 1.2.8 Določanje razmiljenih snovi

### Pribor

1. Erlenmeyerjeva bučka, 200 do 300 ml, s povratnim zračnim kondenzatorjem;
2. Lij za odvajanje, 500 ml;
3. Vodna kopel.

### Reagenti

1. Etanolna raztopina kalijevega hidroksida, ki jo pripravimo tako: raztopimo približno 35 do 40 g kalijevega hidroksida p.a. v 10 ml destilirane vode, razredčimo do 500 ml z 96 vol%-nim etanolom. Pustimo ga čez noč, dekantiramo bistro tekočino, damo v steklenico in zamašimo z gumijastim zamaškom.
2. Petrol-eter (vrelišče 40 do 60 °C);
3. Etanol 96 vol%-ni in 50 vol%-ni;
4. Fenolftalein 1 %-na raztopina v 96 %-nem etanolu.

## Postopek

V Erlenmeyerjevi bučki stehtamo približno 5 g dobro zmešanega olja ali masti ( $\pm 0,1$ ), dodamo 50 ml etanolne raztopine KOH in nekaj koščkov plovca. Steklenico spojimo s povratnim zračnim kondenzatorjem in pustimo da počasi vre 1 uro. Nato dodamo 50 ml destilirane vode in, če je raztopina motna, segrevanje ponovimo.

Po hlajenju pri 20 do 25 °C prelijemo vsebino iz Erlenmeyerjeve bučke v lij za odvajanje. Steklenico nekajkrat izperemo s petrol etrom, ki ga prav tako prenesemo v lij za odvajanje tako, da je celoten petrol eter za izpiranje 50 ml. Lij zamašimo, 1 minuto močno stresamo in pustimo, dokler plasti ne odstopijo.

Milno raztopino vlijemo v drug lij za odvajanje iste velikosti kot prvi, ponovno dodamo 50 ml petrol etra, dobro stresamo in pustimo, da plasti odstopijo, nato pa zlijemo milno raztopino v poprej uporabljeno Erlenmeyerjevo bučko. Petrol etrov ekstrakt iz drugega lija prelijemo skozi zgornjo odprtino v prvega.

Izloženo milno raztopino olja vlijemo znova v drug lij, ponovno dodamo 50 ml petrol etra in preiskujemo kot prej. Če nastane pri stresanju milne raztopine s petrol etrom emulzija, dodamo še 5 do 10 ml etanola. Spojino treh petrol etrovih ekstraktov operemo s slabo bazičnim 50 %-nim etanolom, nato jih ponovno operemo s 25 %-nega etanola (brez lugov), da bi odstranili ostanek mila, vse dokler tekočina za izpiranje, poprej razredčena z dva do trikrat večjo količino vode, ne neha rožnato barvati s fenolftaleinom. Izpran petrol etrov ekstrakt prenesemo v poprej posušeno in stehano steklenico za destiliranje, predestiliramo petrol eter, dobljeni ostanek pa sušimo pri 100 do 105 °C. Tehtamo po vsakih 15 minutah sušenja. Sušenje je končano, ko teža med dvema zadnjima tehtanjema ni večja kot 0,0002 g. Iz teže suhega ostanka izračunamo vsebino razmiljenih snovi.

### 1.2.9 Določanje Bömerjevega diferenčnega števila

#### Reagenti

1. Eter,
2. 05 n-raztopina kalijevega hidroksida v etanolu,
3. 25 %-na solna kislina

#### Priprava gliceridov

##### **Postopek**

V čaši, ki drži približno 150 ml, raztopimo 50 g stopljene in filtrirane bistre masti v 50 ml etra. Raztopino pokrijemo z urnim steklom, ohladimo na 15 °C in ob pogostem mešanju pustimo, da kristalizira. Po 1 uri izsesamo izloženo kristalno kašo skozi Büchner-jev lij, v katerega damo filtrirni papir. Čim več tekočine odstranimo s pritiskanjem s tolkalom ali podobno pripravo. Kristalno maso nato ponovno razkrojimo v 50 ml etra v isti čaši kakor prvokrat in pustimo, da na enak način ponovno kristalizira. Po 1 uri filtriramo na enak način kot prvič in iz kristalne kaše spet odstranimo čim več tekočine. Ko so kristali suhi, določimo tališče (glej dalje). Čista svinjska mast daje po tem postopku gliceride, ki se najpogosteje talijo pri 63 do 64 °C, medtem ko svinjska mast s primesjo govejega ali ovčjega loja redno daje gliceride z nižjim tališčem. Če je tališče gliceridov pod 61 °C, kristaliziramo še enkrat, preden začnemo pripravljati maščobne kisline, oziroma ponavljamo kristalizacijo na enak način, dokler ne dobimo gliceridov s tališčem nad 61 °C. Praviloma zadošča dvakratna kristalizacija. Če preizkušamo mehke masti, ki vsebujejo dosti oleina, iz katerih se gliceridi zelo težko ali sploh ne izločajo, podaljšamo kristalizacijo še za pol do 1 uro pri nižji temperaturi (5 do 10 °C), ali pa za razkrajanje mašti uporabimo zmes iz 3 do 4 delov etra in enega dela alkohola, ali še bolje brezvodni aceton. Če uporabimo eno izmed zadnjih dveh raztopin za prvo kristalizacijo, je druga kristalizacija vedno z etrom, da bi zagotovo odstranili gliceride oleinske kisline.

#### Priprava maščobnih kislin

##### **Postopek**

Iz enega dela gliceridov, dobljenih na zgoraj opisani način, izločimo maščobne kisline. Pri tem je posebej pomembno, da ima tisti del gliceridov, iz katerega izločamo maščobne kisline, popolnoma enako sestavo kot del gliceridov, za katerega določamo tališče. V ta namen najprej razdrobimo 0,1 do 0,2 g gliceridov v majhnem možnarju v popolnoma homogen prah. Približno polovico tega namilimo v majhnem kozarcu z 10 ml 0,5 n-raztopine alkoholnega kalijevega hidroksida, s 5 do 10 minutnim kuhanjem na mrežici ob močnejšem vrenju. Nato prenesemo milno raztopino s 100 ml vode v lij za odvajanje. Raztopini, ki mora biti popolnoma bistra, dodamo 3 ml 25 %-ne kisline, premešamo, da se maščobne kisline sprostijo in stresamo s 25 ml etra. Ko plasti popolnoma odstopijo, pustimo spodnjo vodno raztopino, etrovo plast pa peremo dvakrat s 25 ml vode. Vodno plast vsakokrat pustimo da odteče, etrovo raztopino pa po drugem pranju filtriramo skozi suhi filtrirni papir v majhen kozarec. Nato eter izhlapi v vodni kopeli, preostale maščobne kisline pa se sušijo pol do 1 uro pri 100 °C. Po hlajenju maščobne kisline zdrobimo v fin homogen prah v kozarcu z nožem ali spatulo, ali v skledici z majhnim tolkalom.

## Določanje tališča

### **Postopek**

Da bi dosegli zanesljive rezultate je nujno, da določamo tališče gliceridov in njihovih maščobnih kislin pod popolnoma enakimi pogoji. To najbolje dosežemo z istočasnim določanjem tališča obeh snovi. Prvo določanje tališča gliceridov je bilo samo informativno, da smo ugotovili, ali je ponovna kristalizacija potrebna ali ne. Tališče določamo smotrno z uporabo toplomera, z lestvico od 40 do 70 °C in razdelitvijo, na desetinke stopinj.

Tališče določimo v cevkah iz tankega stekla enake debeline, v obliki črke U z notranjim premerom približno 0,75 mm. En krak cevke je pri odprtini razširjen kot lij. Skozi razširjeno odprtino vsujemo prah, ki ga s pomočjo platinaste žice (če je nimamo pa s pomočjo tenke vlečene steklene palčke) po možnosti potisnemo navzdol. Iz prahu nastane strnjen stebrič, visok 2 do 3 mm, ki je 0,5 do 1 cm nad upognjenim delom cevke. V eno cevko za določanje tališča damo glicerid, v drugo pa (vendar ne v drugi krak iste cevke) - njegovo prosto maščobno kislino. Nato pritrdimo prazne krake cevk z majhnim gumijastim prstanom (košček gumijaste cevi, širok 1 mm) na toplomer tako, da sta stebrička prahu v višini rezervoarja z živim srebrom. Toplomer s cevkami damo v čašo, ki drži 200 ml, v kateri je koncentrirana žveplena kislina ali parafinsko olje. Živo srebro in kapilare morajo biti v sredini tekočine (konci kapilar morajo biti izven nje). Nato začnemo postopoma segrevati. Od 50 °C navzgor smemo povišati temperaturo samo za 1,5 do 2 °C v eni minuti. Tekočino za segrevanje moramo nenehno mešati s toplomerom, ki je pritrdjen tako, da ga je mogoče premikati, da bi bila temperatura segrevane tekočine popolnoma enakomerna. Za tališče štejemo temperaturo, pri kateri postanejo substance popolnoma bistre. Določanje tališča moramo ponoviti z novim poskusom na enak način. V dveh poskusih se ne sme razlikovati za več kot 0,2 °C, za nadaljnji obračun pa vzamemo srednjo vrednost obeh preizkusov. Če je stebrič živega srebra v toplomeru, ki gleda iz tekočine velik, upoštevamo za tališče korekturo tako, kot je označeno pri določanju tališča masti.

Ko tališče gliceridov označimo s  $T_g$ , njihovih maščobnih kislin s  $T_k$ , diferenco tališč ( $T_g - T_k$ ) z  $d$ , imajo gliceridi s tališčem med 61 °C do vključno 65 °C naslednje razmerje:  $T_g + 2d = 71$ .

Če je vrednost za  $T_g + 2d$  manjša od 71 je s tem dokazano, da je preiskovani vzorec vseboval goveji loj ali njemu podobne masti (npr. ovčji loj, hidrogenirano olje).

Pri gliceridih s tališčem med 60 in 61 °C ne sme biti razlika med tališči njihovih maščobnih kislin manjša od 5 °C. Pri gliceridih s tališčem od 61 do 65 °C ne sme biti razlika pri čisti svinjski masti manjša kot je navedeno v tabeli 3, pri gliceridih s tališčem od 65 do 68,5 °C pa ne sme biti manjša od 3 °C.

Tabela 3. Razlika tališč maščobnih kislin pri čisti svinjski masti

| Tališče gliceridov | Razlika tališč | Tališče gliceridov | Razlika tališč | Tališče gliceridov | Razlika tališč | Tališče gliceridov | Razlika tališč |
|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|
| 61,0               | 5,0            | 62,0               | 4,5            | 63,0               | 4,0            | 64,0               | 3,5            |
| 61,1               | 4,95           | 62,1               | 4,45           | 63,1               | 3,95           | 64,1               | 3,45           |
| 61,2               | 4,9            | 62,2               | 4,4            | 63,2               | 3,9            | 64,2               | 3,4            |
| 61,3               | 4,85           | 62,3               | 4,35           | 63,3               | 3,85           | 64,3               | 3,35           |
| 61,4               | 4,8            | 62,4               | 4,3            | 63,4               | 3,8            | 64,4               | 3,3            |
| 61,5               | 4,75           | 62,5               | 4,25           | 63,5               | 3,75           | 64,5               | 3,25           |
| 61,6               | 4,7            | 62,6               | 4,2            | 63,6               | 3,7            | 64,6               | 3,2            |
| 61,7               | 4,65           | 62,7               | 4,15           | 63,7               | 3,65           | 64,7               | 3,15           |
| 61,8               | 4,6            | 62,8               | 4,1            | 63,8               | 3,6            | 64,8               | 3,1            |
| 61,9               | 4,55           | 62,9               | 4,05           | 63,9               | 3,55           | 64,9               | 3,05           |

Če pride do razlik, manjših kot je navedeno za posamezne gliceride, štejemo, da je dokazana primes loja. Če je vrednost za  $T_g + 2d$  samo malo nad ali pod 71, je potrebno še enkrat iz etra prekristalizirati gliceride. Izločenim gliceridom in na enak način izločenim maščobnim kislinam ponovno določimo tališče. Če je tudi sedaj vrednost za  $T_g + 2d$  manjša od 71, štejemo, da je primes govejega ali ovčjega loja dokazana.

### 1.2.10 Določanje Reichert-Meisslovega števila

#### Pribor

1. Polenskejeva aparatura, sestavljena tako:
  - a) buča z ravnim dnom, 300 ml, iz nevtralnega, odpornega stekla (dve),
  - b) specialni nastavek za destilacijo,
  - c) Liebigov kondenzator, dolg 52 cm, dolžina plašča 30 cm, z varnostnim prstanom;
2. Azbestna plošča z izrezom  $\varnothing$  6,5 cm;
3. Čaša, 100 ml;
4. Visoka čaša, 1000 ml, ali visok lonec;
5. Graduirani pipeti, 2 in 5 ml;
6. Graduirani valji, 25, 50 in 100 ml;
7. Merilna buča, 100 do 110 ml, (dve);
8. Steklen lij,  $\varnothing$  5 cm (dva);
9. Pipeta 100 ml (dve);
10. Toplomer do 100 °C;
11. Erlenmeyerjeva buča, 200 ml (štiri);
12. Bireta, 50 ml.

#### Reagenti

1. 50 %-na raztopina kalijevega hidroksida (100 g kalijevega hidroksida raztopimo v 100 ml vode, pustimo, da se karbonat sesede, nato pa odlijemo bistro tekočino);
2. Glicerin;
3. Razredčena žveplena kislina (25 ml koncentrirane kisline v 1 litru);
4. 1 %-na alkoholna raztopina fenolftaleina (nevtralna);
5. 0,1 n-raztopina natrijevega hidroksida;
6. Plovec v prahu.

#### Postopek

V buči iz nevtralnega stekla, ki drži 300 ml, stehtamo 5 g ( $\pm$  0,01 g) masti. Nato dodamo 2 ml 50 %-nega kalijevega hidroksida (brez ogljikovega dioksida) in 4 ml glicerina. Ob nenehnem mešanju saponificiramo, segrevamo na slabem ognju, dokler tekočina ne postane popolnoma bistra, ponavadi po 5 minutah. Ko se tekočina shladi na 80 °C do 90 °C, dodamo 90 ml prekuhane vode približno iste temperature. Raztopina mora biti brezbarvna ali rumenkasto obarvana, sicer ni uporabna za preizkušanje (navadno dajo žarke in pokvarjene masti temno raztopino). V bučo nato dodamo 50 ml raztopljene žveplene kisline, malo plovec v prahu (0,6 do 0,7 g) in raztopino takoj destiliramo v predpisanem aparatu. Destilat prestrežemo v merilno bučo, ki drži 110 ml. Buča za destilacijo stoji na azbestni plošči, z izrezom 6,5 cm in se segreje na prostem plamenu. Še pred začetkom destiliranja uravnamo plamene plina tako, da v 19 do 21 minutah dobimo 110 ml destilata. Destilat shladimo, toda ne sme biti niti topel niti hladen, temveč mora kapljati s temperaturo 20 do 23 °C. Ko predestiliramo 110 ml, plamen odstranimo, posodo z destilatom pa takoj nadomestimo z merilnim valjem, ki drži 25 ml.

Bučo z destilatom damo čim globlje v vodo s 15 °C in hladimo brez mešanja 10 minut. Nato jo zamašimo, obrnemo štiri do petkrat brez močnejšega stresanja in filtriramo skozi suh in gladek filtrirni papir s premerom 8 cm, 100 ml filtrata filtriramo z dodatkom 4 kapljic 1 %-ne nevtralne alkoholne raztopine fenolftaleina in z 0,1 n-natrijevega hidroksida do rdečkaste barve. Na enak način opravimo slepi poskus brez masti.

### **Račun**

$$\text{Reichert-Meisslovo število} = 1,1 (a-b)$$

(pomnožimo z 1,1 ker od 110 ml filtrata vzamemo za titracijo 100 ml).

kjer je:

a = poraba ml 0,1 n-natrijevega hidroksida, za glavni poskus;

b = poraba ml 0,1 n-natrijevega hidroksida za slepi poskus.

### **Primer**

Stehtano surovo maslo = 5,00 g

Za nevtralizacijo 100 ml destilata je porabljen 24,80 ml 0,1 n-natrijevega hidroksida.

Za slepi poskus je porabljen 0,13 ml 0,1 n-natrijevega hidroksida.

Iz tega izračunamo porabo za 110 ml destilata = 27,28 ml 0,1 n-natrijevega hidroksida. Torej:

Reichert-Meisslovo število = 27,28 - 0,13 = 27,15

### **1.2.10.1 Določanje Polenskejevega števila**

#### **Pribor**

1. Ves pribor, ki je naveden za določanje Reichert-Meisslovega števila;
2. Erlenmeyerjeva buča, 100 ml.

#### **Reagenti**

1. 90 %-ni nevtralni alkohol;
2. 1 %-na alkoholna raztopina fenolftaleina (nevtralna);
3. 0,1 n-raztopina natrijevega hidroksida.

#### **Postopek**

Določanje Polenskejevega števila se nadaljuje po določanju Reichert-Meisslovega števila. Na filtru je že največji del netopnih kislin, toda majhen del je še ostal v cevi za hlajenje, v predložku s 110 ml in v predloženem valju, ki drži 25 ml. Da popolnoma odstranimo topne kisline, izperemo najprej cev za hlajenje, predložek, valj in filter trikrat s 15 ml vode. Šele ko se predhodno nalita voda popolnoma odcedi, lahko v filter dolijemo vode.

Ko je izpiranje z vodo končano, damo lij na čisto bučo, ki drži 100 ml, nato pa trikrat ponovimo izpiranje na enak način s 15 ml nevtralnega 90 %-nega alkohola t.j. izperemo cev za hlajenje, obe posodi za prestrezanje destilata in filter. V alkoholnem filtratu so sedaj raztopljene tiste maščobne kisline, ki se v vodi ne topijo. Z dodatkom 3 kapljic raztopine fenolftaleina titriramo z 0,1 n-natrijevega hidroksida do jasne rdečkaste barve.

#### **Račun**

Polenskejevo število = število porabljenih ml 0,1 n-natrijevega hidroksida.

Razlika med dvema vzporednima analizama pri določanju Polenskejevega števila ne sme biti večja:

|                           |                    |
|---------------------------|--------------------|
| Pri Polenskejevem številu | do 2 za 10 %       |
| " " " "                   | nad 2 do 5 za 8 %  |
| " " " "                   | nad 5 do 10 za 5 % |
| " " " "                   | nad 10 za 4 %      |

Razliko v obeh konstantah pri nekaterih masteh kaže tabela 4.

Tabela 4. Reichert-Meisslovo število in Polenskejevo število za nekatere vrste masti

| Vrsta masti      | Reichert-Meisslovo število | Polenskejevo število |
|------------------|----------------------------|----------------------|
| Surovo maslo     | 23,3 - 30,1                | 1,5 - 3,0            |
| Kokosova maščoba | 6,8 - 7,7                  | 16,8 - 17,8          |
| Oleomargarin     | 0,5                        | 0,53                 |
| Svinjska mast    | 0,35                       | 0,5                  |
| Loj              | 0,55                       | 0,56                 |

### 1.2.10.2 Ugotovitve iz Reichert-Meisslovega in Polenskejevega števila

Reichert-Meisslovo in Polenskejevo število sta v določenem razmerju. Z rastočim Reichert-Meisslovim številom se poveča Polenskejevo število za približno 1,2 pri surovem maslu z Reichert-Meisslovim številom 20 vse do 3,0 pri surovem maslu z Reichert-Meisslovim številom 30. V glavnem je Polenskejevo število približno 1/10 Reichert-Meisslovega. Razmerje teh vrednosti je prikazano v tabeli 5.

Tabela 5. Razmerje med Reichert-Meisslovim in Polenskejevim številom

| Reichert-Meisslovo število | Ustrezno Polenskejevo število | Največje dovoljeno Polenskejevo število |
|----------------------------|-------------------------------|---|
| 20 - 21                    | 1,3 - 1,4                     | 1,9                                     |
| 21 - 22                    | 1,4 - 1,5                     | 2,0                                     |
| 22 - 23                    | 1,5 - 1,6                     | 2,1                                     |
| 23 - 24                    | 1,6 - 1,7                     | 2,2                                     |
| 24 - 25                    | 1,7 - 1,8                     | 2,3                                     |
| 25 - 26                    | 1,8 - 1,9                     | 2,4                                     |
| 26 - 27                    | 1,9 - 2,0                     | 2,5                                     |
| 27 - 28                    | 2,0 - 2,2                     | 2,7                                     |
| 28 - 29                    | 2,2 - 2,5                     | 3,0                                     |
| 29 - 30                    | 2,5 - 3,0                     | 3,5                                     |
| 30 - 31                    | 3,0 - 3,5                     | 4,0                                     |
| 31 - 32                    | 3,5 - 4,0                     | 4,5                                     |
| 32 - 33                    | 4,0 - 4,5                     | 5,0                                     |

Ko Polenskejevo število presega največjo dovoljeno mejo sklepamo, da surovo maslo, ki smo ga preiskovali, vsebuje primešano kokosovo ali palmino maščobo.

### 1.2.11 Določanje Kirschnerjevega števila

#### Pribor

1. Polenskejeva aparatura;
2. Lij, Ø približno 5 cm;
3. Graduirana pipeta, 25 ml;
4. Graduirani valj; 150 do 200 ml;
5. Erlenmeyerjeva buča, 200 ml;
6. Bireta, 50 ml.



## Reagenti

1. Srebrov sulfat, zdrobljen v fini prah;
2. Razredčena žveplena kislina: 25 ml koncentrirana  $H_2SO_4$  v 1 litru vode;
3. Plovec v grobem prahu;
4. 0,1 n-raztopina natrijevega hidroksida;
5. 1 %-na etanolna raztopina fenolftaleina (nevtralna).

## Postopek

Titrirano tekočino po določitvi Reichert-Meisslovega števila dopolnimo z vodo do 130 ml, dodamo 0,5 g srebrovega sulfata in pustimo medtem, ko včasih premešamo, najmanj 1 uro v temnem prostoru, kjer ga nato filtriramo skozi suh filtrirni papir. V bučo za destilacijo damo 120 ml filtrata, dodamo 25 ml razredčene žveplene kisline in približno 0,1 g plovca ter destiliramo 110 ml od tega pa 100 ml titriramo kot pri določanju RM števila.

## Račun

$$\text{Kirschnerjevo število} = a \cdot 1,19$$

kjer je:

a = porabljeno število ml 0,1 n-natrijevega hidroksida.

### 1.2.12 Določanje števila maslene kisline

*A) Postopek I (makro)*

#### Pribor

1. Buča z ravnim dnom, 500 ml iz nevtralnega, odpornega stekla (dve);
2. Graduירani valj, 250 ml;
3. Stekljeni lij,  $\varnothing$  7 do 9 cm (dva);
4. Graduירana pipeta, 10 ml (dve);
5. Pipeta, 25 ml (dve);
6. Pribor za določanje Reichert-Meisslovega števila.

#### Reagenti

1. Raztopina kalijevega hidroksida ( $d = 1,5$ ); 750 g KOH raztopimo v 1 litru vode;
2. Glicerol ( $d = 1,26$ );
3. 10 %-na raztopina kalijevega sulfata (nasičena) ( $d = 1,08$ );
4. Razredčena žveplena kislina (1 + 3);
5. Raztopina kokosovega mila: 100 g kokosove maščobe previdno namilimo z 100 ml glicerola in 40 ml KOH v merilni buči, ki drži 1000 ml, iz nevtralnega stekla, dokler se ne neha peniti in raztopina ne postane bistra. Po ohladitvi pod  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  jo razredčimo z vodo do oznake;
6. Čista izžarjena kremenica;
7. Plovec v prahu;
8. 0,1 n-raztopina natrijevega hidroksida;
9. 1 %-na etanolna raztopina fenolftaleina.

#### Postopek

Približno 5 g ( $\pm 0,0001$  g) filtrirane maščobe namilimo v buči, ki drži 300 ml, z 2 ml kalijevega hidroksida in 10 ml glicerola nad odprtim slabim ognjem, pri čemer bučo ves čas obračamo, dokler tekočina ne postane bistra. Potem kratek čas stoji, nato tekočino ohladimo pod  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  in še topli dodamo 150 ml raztopine kalijevega sulfata, čim bolj točno odmerjene v graduירanem valju in ohladimo na  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nato s stresanjem zaporedoma dodamo 5 ml žveplene kisline, 10 ml raztopine kokosovega mila in 0,5 g kremenice, pustimo 10 minut ob

pogostem mešanju in filtriramo skozi suh, naguban filtrirni papir v Erlenmeyerjevo bučo. V bučo, ki drži 500 ml damo 125 ml bistrega filtrata, dodamo 50 ml vode in malo plovca s Polenskejevo aparaturo predestiliramo v merilno bučo natančno 110 ml v 20 minutah. Destilat kvantitativno ob izpiranju z malo vode prenesemo v bučo, ki drži 200 ml (brez filtriranja) in titriramo z 0,1 n-raztopino natrijevega hidroksida s fenolftaleinom do rdečkaste barve.

Enako opravimo slepi poskus z vsemi uporabljenimi reagenti, toda brez maslene maščobe.

### **Račun**

Razlika med porabljenim številom ml 0,1 n-NaOH pri glavnem in slepem poskusu; pomnožena s faktorjem 1,40 da število maslene kisline pri čemer moramo upoštevati popravek 0,1 n-NaOH in stehtano količino, če ni bila točno 5,000 g. Iz števila maslene kisline (a) in saponifikacijskega števila (b) dobimo odstotek maslene maščobe (x) po empirični formuli

$$X = 5,09 \cdot a - 0,085 \cdot (b - 200)$$

v kateri je za saponifikacijo število čistega surovega masla in drugih maščob (razen kokosove) vzeta vrednost 200.

**Pripomba** Število maslene kisline je pri masleni maščobi približno 20, pri kokosovi maščobi približno 0,9. Če je stehtano manj kot 5 g, je število maslene kisline nekaj večje pri masleni in kokosovi maščobi, če pa je stehtano več, je to število malo manjše pri kokosovi maščobi, pri masleni maščobi pa še manjše.

### *B) Postopek II (polmikro)*

#### **Pribor**

1. Erlenmeyerjeva buča, 50 in 100 ml;
2. Graduirane pipete, 1, 5 in 20 ml;
3. Beckelovi cecki 11 in 12,5 ml;
4. Čaša 25 ml;
5. Bireta 25 ml;
6. Stekleni lij Ø 5 do 6 cm.

#### **Reagenti**

1. Etanolna raztopina kalijevega hidroksida: 40 ml 47 %-ne vodne raztopine kalijevega hidroksida in 40 vode dopolnimo s 96 %-nim etanolom do 1 litra,
2. Glicerol (d = 1,23),
3. Nasičena raztopina kalijevega sulfata (10 %-na, d = 1,08),
4. Razredčena žveplena kislina (1 + 3),
5. Raztopine kokosovega mila: kot pri makro postopku,
6. 7 in 9 kot pri makro postopku,
7. 0,01 n-raztopina natrijevega hidroksida.

## Postopek

V Erlenmeyerjevi buči, ki drži 50 ml, segrejemo 500 do 550 mg masti s 5 ml etanolne raztopine kalijevega hidroksida do slabega vretja, ko se mast stopi pa dodamo 1 ml glicerola. Kuhamo dalje do močnejšega penjenja. Nato damo bučo v sušilnico, kjer ostane 1 uro v vodoravni legi. Po sušenju takoj dodamo, medtem ko močno stresamo, s pipeto 15 ml nasičene raztopine kalijevega sulfata, pustimo, da se ohladi na 20 °C in dodamo vsakokrat ob stresanju 0,5 ml razredčene žveplene kisline, 1 ml raztopine kokosovega mila in 0,1 g očiščene kremenice. Filtriramo skozi naguban filtrirni papir Ø 10 cm (npr. S. in S. št. 588) v Beckelovo cevko, dokler filtrat ne pride do označbe 12,5 ml. Nato ga prelijemo v Erlenmeyerjevo bučo, ki drži 100 ml, izperemo s 5 ml vode, dodamo plovec v grobem prahu, destiliramo 11 ml v predložku, prelijemo v čašo in titriramo z 0,01 n-natrijevim hidroksidom s fenolftaleinom kot indikatorjem. Istočasno opravimo slepi poskus s 500 mg kakavovega masla.

## Račun

Razlika med porabljenim številom ml 0,01-n-NaOH pri glavnem in slepem poskusu, pomnožena s faktorjem iz tabele 6, da število maslene kisline.

Tabela 6. Faktorji za izračunavanje maslene kisline

| Stehtano<br>mg | Faktor | Stehtano<br>mg | Faktor | Stehtano<br>mg | Faktor | Stehtano<br>mg | Faktor |
|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| 500-501        | 1,40   | 510-513        | 1,37   | 522-525        | 1,34   | 534-537        | 1,31   |
| 502-505        | 1,39   | 514-517        | 1,36   | 526-529        | 1,33   | 538-541        | 1,30   |
| 506-509        | 1,38   | 518-521        | 1,35   | 530-533        | 1,32   | 542-545        | 1,29   |
|                |        |                |        |                |        | 546-550        | 1,28   |

### 1.2.13 Določanje niklja (Ni) v hidrogeniziranih maščobah

Postopek določanja niklja obsega:

- 1) sežiganje vzorca;
- 2) pridobivanje pepelne raztopine;
- 3) določanje niklja v vzorcu;
- 4) izdelavo kalibracijske krivulje.

#### Sežiganje vzorca

#### Reagent

- 1) Magnezijev nitrat ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ) p.a.

#### Postopek

V porcelanskem lončku, ki drži 50 ml (50 x 55) stehtamo približno 10 do 30 g dobro premešanega vzorca (odvisno od pričakovanega Ni) in posušimo v sušilnici pri 105 °C. Nato dodamo 0,2 do 0,3 g  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  in previdno segrevamo na majhnem ognju. Ko se vzorec segreje do temperature plamenišča, se plini vnamejo. Med gorenjem lonček počasi segrevamo tako, da olje nenehno gori s sajastim plamenom visokim 3 do 5 cm. Zgorevanje traja 2,5 do 3 ure. Ostanek žarimo dalje v električni peči na 500 °C do konstantne teže.

## Pridobivanje pepelne raztopine

### **Reagenti**

1. 50 %-na dušikova kislina p.a;
2. koncentrirana raztopina amoniaka p.a;
3. 1 %-na raztopina amoniaka p.a.

### **Postopek**

Ohlajenemu pepelu dodamo 1 do 2 ml 50 %-ne dušikove kisline in počasi segrevamo na gorilniku. Dekantiramo v čašo, ki drži 100 ml. Izpiranje ponovimo nekajkrat z 1 do 2 ml 50 %-ne dušikove kisline, da se nikelj popolnoma raztopi. Pepelno raztopino nevtraliziramo s koncentrirano raztopino  $\text{NH}_4\text{OH}$  z indikatorskim papirjem.

Nevtralno ali slabo bazično raztopino prefiltriramo (filtrirni papir Schleicher & Schüll ali filtrirni papir, izpran s kislino) v merilno bučo, ki drži 50 ml, filtrirni papir operemo z 1 %-nim amoniakom, filtrat pa dopolnimo do označbe z bidestilirano vodo.

## Določanje niklja v vzorcu

### **Reagenti**

1. 10 %-na limonska kislina p.a. (hranimo jo na ledu);
2. Nasičena bromova voda p.a., vsakokrat sveže pripravljena;
3. Dimetilglikoksin p.a. 1 %-na raztopina v 95 %-nem etanolu;
4. Koncentrirana raztopina  $\text{NH}_4\text{OH}$  p.a.;
8.  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  p.a.

### **Postopek**

Po pričakovanem niklju vlijemo s pipeto 5 do 20 ml pepelne raztopine v merilno bučo, ki drži 50 ml in jo razredčimo z bidestilirano vodo na približno 25 ml. Nato dodamo 2 ml 10 %-ne raztopine limonske kisline in po kapljicah sveže pripravljeno, nasičeno bromovo vodo, ob nenehnem stresanju, dokler se ne pokaže jasna rumena barva in dodamo nato še 2 kapljici. Zatem dodamo 5 ml koncentriranega amonijevega hidroksida in 2 ml etanolne raztopine dimetilglikoksina dobro premešamo in dopolnimo z bidestilirano vodo do označbe. V 10 do 30 minutah fotometriramo s slepim poskusom pri 455 milimikronih v kivetu s  $\varnothing$  1 cm.

### **Priprava kalibracijske krivulje**

Stehtamo natančno 4,78 g  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  p.a. in raztopimo v bidestilirani vodi. Dodamo 1 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  koncentrirane p.a. in dopolnimo do 1 litra. S pipeto vlijemo 10 ml te raztopine v merilno bučo, ki drži 1 liter in dopolnimo do označbe z bidestilirano vodo. Kalibracijsko krivuljo pripravimo tako, da standardno raztopino razredčimo do raznih koncentracij niklja v mejah od 20 do 180 mikrogramov.

Raztopine za fotometriranje pripravimo v merilnih bučah, ki drže 50 ml. V bučo vlijemo s pipeto določeno količino standardne raztopine in razredčimo z bidestilirano vodo na približno 25 ml. Dalje postopamo tako, kot je opisano pri preiskovanju vzorca.

Rezultate merjenja ekstinkcije standardne raztopine vnesemo v tabelo ali diagram.

Z uporabo tehnike najmanjših kvadratov lahko izračunamo enačbo linearne regresije na ustaljen način.

Količino niklja v preiskovanem vzorcu določimo s pomočjo kalibracijskega diagrama ali tabele za standard, upoštevajoč vrednost slepega poskusa kot tudi vsa razredčenja, ki smo jih opravili v preiskovanem poskusu.

V navadi je, da se rezultat izkaže kot količina Ni v mikrogramih na gram vzorca.

### 1.2.14 Določanje tališča masti - metoda v zaprti kapilari

Tališče masti določamo v kapilarnih cevkah s tankimi stenami, s premerom 1 mm, dolgimi pa 10 cm. Na enem koncu polnimo zaprto kapilarno cev tako, da odprti konec nekajkrat pritisnemo v dobro premešan vzorec masti, stebriček masti, ki je v cevki, pa s tanko izvlečeno palčko, ki lahko gre v kapilarno cevko, potlačimo. Vzorec lahko pripravimo tudi tako, da oba konca odprte in segrete kapilarne cevke potopimo v raztopljeno mast, vzamemo potrebno količino masti in nato en konec kapilare zamašimo. Če preizkus pripravljamo na takšen način mora biti kapilarna cevka z mastjo preden začnemo določati tališče, na hladnem prostoru (najbolje na ledu) 15 do 24 ur.

Stebriček masti v kapilarni cevki mora biti visok 10 do 20 mm, odvisno od velikosti živosrebrnega rezervoarja v toplomeru.

Kapilaro pritrdimo na toplomer z gumijastim prstanom, tako da je stebriček masti v višini živosrebrnega rezervoarja. Toplomer s kapilaro zamašimo, damo v prazno širšo epruveto, ki je s ščipalko pritrjena na stojalo. Epruveta mora biti potopljena v širšo čašo z vodo. Vodo počasi ob stalnem mešanju (mešalka je iz žice) segrevamo, da se temperatura poveča v eni minuti največ za 1 °C. Za tališče štejemo temperaturo na kateri postane stebriček masti popolnoma prozoren in bister. Za merjenje moramo uporabiti natančen toplomer, ki je razdeljen na 0,2 °C.

Če za določanje tališča ne uporabljamo skrajšanih toplomerov moramo, da bi bile meritve natančne, upoštevati popravek za živosrebrni stebriček, ki je izven tekočine, po naslednji formuli:

$$T = t + n (t - t_1) \cdot 0,000154$$

kjer je:

T - popravek tališča,

t - odčitano tališče,

n - dolžina živosrebrnega stebrička, ki je izven tekočine v temperaturnih stopinjah,

t<sub>1</sub> - srednja temperatura zraka, ki jo izmerimo z drugim toplomerom tako, da ga držimo pri sredini živosrebrnega stebrička, ki je izven tekočine.

### 1.2.15 Določanje antioksidantov (galati in NDGA)

#### Pribor

1. Liji za odvajanje, 125 ml;
2. Graduirani valji, 50 ml;
3. Merilne buče, 25 ml;
4. Pipete, 1, 2 in 5 ml.

#### Reagenti

1. Petrol-eter (vrelišče od 40 do 60 °C), bromovo število pod 1;
2. Čisti metanol, brez aldehydov;
3. Izo-amil alkohol;
4. Ferosulfat;
5. Natrijev-kalijev-tartrat;
6. 1 %-na vodna raztopina fero sulfata in 0,5 % tartrata;
7. Natrijev acetat, 1 %-na vodna raztopina.

## Postopek

V 50 ml petrol-etra raztopimo 10 g masti ali olja, nato ekstrahiramo z 20 ml, nato pa še s 4 ml metanola. Spojene ekstrakte zmešamo v liju za odvajanje, dodamo 1 ml vode in metanolno raztopino vlijemo v merilno bučo, ki drži 25 ml.

V lij za odvajanje dodamo na 5 ml ekstrakta 0,5 ml raztopine ferosulfat-tartrata in 20 ml raztopine natrijevega acetata. Zmes pretresemo in po 10 minutah dodamo 10 ml zmesi izoamilalkohol : petrol-eter (1:1). Po dekantaciji se spodnja plast loči in ekstrahira z novo količino zmesi izo-amil-alkohol : petrol-etra. Iz spojenih ekstraktov odstranimo vodo in nato prelijemo v bučo, ki drži 25 ml. Da dobimo bistro raztopino, dodamo 2 ml metanola in dopolnimo z izo-amil-alkoholom.

Optično gostoto te raztopine merimo pri 550 milimikronih glede na izo-amil-alkohol, to je E. Slepí poskus opravimo brez dodatka raztopine ferosulfat-tartrata, to je E<sub>0</sub>.

Za kalibriranje je potrebna raztopina čistega galata znane koncentracije (5 mg v 100 ml metanola). Vzamemo 5 ml te raztopine in jo obdelamo tako, kot je poprej opisano: to je optična gostota E<sub>t</sub>.

Vsebino galata dobimo po formuli:

$$\text{vsebina galata (mg \%)} = \frac{E - E_0}{E_t} \cdot \frac{Pt \cdot 5}{10 \cdot p},$$

kjer je:

p = teža vzorca (masti) v gramih,

Pt = teža čistega galata v 5 ml metanolne raztopine, v gramih.

## Natančnost

Približno 5 % relativne vrednosti.

**Pripomba** Askorbinska, limonska in fosforna kislina preprečujejo določanje. Če je prisoten kakšen nižji galat (etil ali propil), ga lahko ekstrahiramo z vodo in določamo direktno v vodni raztopini, dodamo reagent (0,5 ml) in do 25 ml dopolnimo z raztopino natrijevega acetata. Nato izmerimo optično gostoto pri 530 milimikronih.

### A. Metode z 2,6 diklorkinonklorimidom

Ta metoda modro obarva BHA (max. pri 610 - 620 milimikronih) in rdeče obarva NDGA (max, pri 430 milimikronih) in PG (pri 435 milimikronih). Metodo v glavnem uporabljamo za določanje BHA.

## Pribor

1. Liji za odvajanje, 250 ml;
2. Graduirani valji, 100 ml;
3. Merilne buče z brušenim zamaškom, 10, 125 in 200 ml;
4. Pipete 1, 2 in 5 ml;
5. Whatman papir št. 54.

## Reagenti

1. 2,6 diklorkinonklorimid, 0,01 %-na raztopina v sveže destiliranem absolutnem etanolu;
2. Puferska raztopina: 2 %-na raztopina natrijevega borata (Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O);
3. Zmes iz enega prostorninskega dela petrol-etra, z vreliščem od 30 do 60 °C in trije prostorninski deli petrol-etra z vreliščem od 10 do 100 °C, izperemo z 1/10 prostornine žveplene kisline z vodo in nato z 1 %-no raztopino kalijevega hidroksida ter končno predestiliramo;

4. 72 %-ni etanol, ki ga dobimo iz absolutnega, sveže destiliranega etanola s kalijevim permanganatom (0,1 %-nim) in kalijevim hidroksidom (0,2 %-nim).

### **Postopek**

Približno 1 g masti raztopimo v 50 ml petrol-etra, pripravljene tako, kot je opisano zgoraj, v liju za odvajanje. To mešamo 3 minute s 25 ml 72 %-nega etanola, kar ponovimo trikrat; nato opravimo četrto ekstrakcijo s 50 ml etanola ob eno-minutnem mešanju. Vse ekstrakte spojimo in dopolnimo do 125 ali 200 ml ter filtriramo skozi Whatman papir št. 54.

S pipeto nakapljamo 1 do 6 ml ekstrakta, glede na predvideno količino v merilno bučo, ki drži 10 ml, dodamo 2 ml reagenta, premešamo, nato pa dodamo 2 ml puferske raztopine. Pripravimo slepi poskus, ki vsebuje 6 ml 72 %-nega etanola in reagenta.

Po 15 minutah izmerimo absorbcijo pri 620 milimikronih, glede na slepi poskus.

Količino BHA izračunamo s primerjanjem s kalibracijsko krivuljo, ki je izdelana z enakim antioksidantom ali isto zmesjo izomer (3-BHA da absorbcijo petkrat močnejšo od 2-BHA).

Beerov zakon lahko uporabimo v mejah od 10 do 50 mikrogramov.

### **Natančnost**

1 do 2 % relativne vrednosti.

## **1.2.16 Dokazovanje antioksidantov BHA, BHT, DG, OG, PG**

### *A. Ekstrakcija antioksidantov iz olja*

To ekstrakcijo opravimo v Erlenmeyerjevi bučki, ki drži 300 ml z brušenim zamaškom, v električnem mešalniku.

Olju, ki vsebuje antioksidante, dodamo 100 ml 96 %-nega etanola in stresamo 1 uro. Nato vsebino Erlenmeyerjeve buče prelijemo v lij za odvajanje in potem ko plasti odstopijo, alkoholni ekstrakt skozi majhen lij in s topilom ovlažen filtrirni papir filtriramo v merilno bučo, ki drži 100 ml. Dobljeni ekstrakt označimo kot ekstrakt A.

Ekstrakcijo ponovimo z drugih 100 ml čistega topila na enak način. Dobljeni ekstrakt označimo kot: ekstrakt B.

V prvem ekstraktu (A) ekstrahiramo galate, BHA v prvem (A) in drugem (B) dokler ne moremo BHT na ta način popolnoma ekstrahirati iz olja.

BHT lahko popolnoma ekstrahiramo iz olja z ekstrakcijo s pomočjo pregrete vodne pare (250 °C).

### *B. Izločanje antioksidantov*

#### **Aparatura in reagenti**

1. Steklene plošče debele 3 mm, s ploščino 20 x 20 cm;
2. Kromatografske kadi;
3. Steklene brizgalke;
4. Električni mešalnik;
5. Steklena aparatura za destilacijo topil;
6. Mikropipete za kromatografijo (10 ml);
7. Graduirani valji z brušenim zamaškom, 10 ml;
8. Ravne plastične žlice in plastična folija;
9. Stahlov silikagel G;
10. Prečiščeni etanol p.a. 96 % (prečiščevanje opravimo z destilacijo v stekleni aparaturi, z dodatkom 1 g KOH in 0,5 g KMnO<sub>4</sub> s 500 ml etanola);

11. 72 %-ni etanol p.a.;
12. 95 %-ni metanol p.a.;
13. 75 %-ni metanol p.a.;
14. Petrol-eter;
15. Parafinsko olje;
16. 2,6 diklorkinonklorimid (DCQC), 0,5 %-na raztopina v etanolu.

## **Postopek**

Izločanje fenolnih antioksidantov na tanki plasti je sestavljeno iz naslednjih operacij:

### 1) Priprava tanke plasti

Pred uporabo moramo ploščo dobro oprati najprej v detergentu, nato v navadni vodi, destilirani vodi in končno izprati z etanolom.

Adsorbens pripravimo za uporabo tako, da je razmerje med silikagelom G, t. j. adsorbensom in vodo 1 : 2,5.

Stehtamo 20 g silikagela, postopoma dodamo 50 ml vode in močno stresamo nekaj minut. Ko dodamo vso vodo, mešamo zmes 1 uro v mešalniku.

Tako pripravljen adsorbens za pripravo tanke plasti mora pred uporabo stati najmanj 24 ur. Tanka plast je pripravljena z nanašanjem adsorbensa na stekleno ploščo, v debelini 0,3 mm. Tako pripravljeno ploščo sušimo na zraku 15 minut in nato 20 minut v sušilnici pri temperaturi 110 °C.

Po hlajenju plošče impregniramo z zmesjo parafinskega olja in petrol-etra (1 : 9) v kromatografskih kadeh. Impregniramo 3/4 plošče tj. 15 cm od roba plošče.

### 2) Kromatografija na tanki plasti

Kromatografske kadi napolnimo s 95 %-nim metanolom in pokrijemo s steklenimi ploščami, da bi bil zrak v kadi nasičen s topilom.

V kadi mora biti toliko topila, da je plošča za kromatografijo potopljena do 0,5 cm.

Raztopino antioksidantov nanašamo na ploščo z mikropipeto, ki ima top vrh, da se ne bi poškodovala plast silikagela. Nanašati začnemo 3 cm od spodnjega roba plošče. Na ploščo nanese nekaj pik, ki so oddaljene med seboj 2 do 3 cm. Kadar gre za dvodimenzionalno kromatografijo, zmes antioksidantov nanese v eni piki in kromatografiramo v dveh smereh.

Ploščo z nanesenimi antioksidanti damo v kad zaradi razvijanja, ki traja nekaj ur t, j. dokler razkrojilo ne doseže višino 15 cm od roba plošče.

Plošče vzamemo iz kadi in jih nato sušimo na zraku.

### 3) Razvijanje s kromatografom

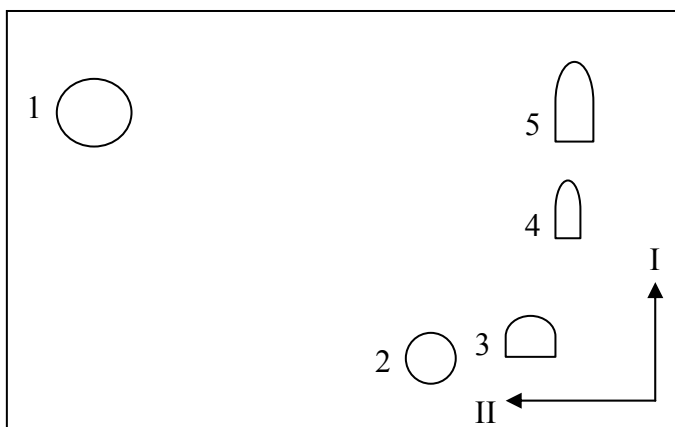
Suhe plošče poškopimo z ustreznim razvijalcem. Galati niso razviti na plošči s škropljenjem z razvijalom, ker so že sami obarvani, kar omogoča njihovo ločitev.

BHA in BHT poškopimo z DCQC-jem. Antioksidant BHA da modro barvo, ki se takoj pokaže in mora takoj odstraniti ker se hitro širi in če dalj časa stoji, spremeni v temnejšo barvo. Antioksidant BHT se pokaže kot rumen madež s temnim robom šele 10 minut po škropljenju. Madeži BHT so obstojni dalj časa.

Zmes antioksidantov kromatografiramo v dveh smereh: prvi dan se vrši kromatografija v eni smeri in kromatogram nato suši, drugi dan pa v drugi smeri.

Tako dosežemo fiksiranje galatov, BHA in BHT pa sta šla v drugo smer, kar omogoča njuno izločanje iz galatov.





Slika 2. Kromatogram zmesi antioksidantov v etanolu 1-BHA, 2-BHT, 3-DG, 4-OG, 5-PG

### 1.2.17 Razlikovanje rastlinskih in živalskih maščob - Bömerjeva in Fitsterolova acetatna metoda

#### Reagenti:

1. 1 %-na raztopina digitonina v etanolu;
2. 200 g kalijevega hidroksida raztopimo v 70 %-nem etanolu in dopolnimo do 1 litra;
3. 25 %-na solna kislina;
4. Kloroform;
5. Anhidrid očetne kisline;
6. 50 %-ni etanol;
7. Absolutni etanol.

#### Postopek

##### 1) Izločanje sterina z digitoninom

V pokriti čaši ali buči, ki drži 500 ml, saponificiramo 50 g masti ali olja s 100 ml etanolnega kalijevega hidroksida. Saponificiramo v kipeči vodni kopeli s pogostim mešanjem v teku 30 minut. Po končani saponifikaciji, kar spoznamo po tem, da na površini ne plavajo mastne kapljice, razredčimo raztopino z enako prostornino vroče vode. Nato dodamo 50 ml 25 %-ne solne kisline, da sprostimo iz mila maščobne kisline. Segrevanje nadaljujemo dokler se maščobne kisline ne zberejo na površini, v obliki oljne plasti. Nato še vroče filtriramo skozi lij za vročo filtracijo in skozi gost in gladek filtrirni papir. Da bi preprečili prehajanje motne tekočine, nalijemo najprej do polovice filtra vročo vodo, ko pa ta odteče, dolijemo tekočino z maščobnimi kislinami. Ko je vodna plast odtekla, prebodemo filter s stekleno palčko, maščobne raztopljene kisline pa filtriramo skozi drugi suhi filter, spet v lij za segrevanje in čašah, ki drže 200 ml. Prefiltrirane maščobne kisline morajo biti bistre. Nato jih segrejemo pri 70 °C ter pri tem ob mešanju s palčko dodamo v tankem curku 25 ml 1 %-ne etanolne raztopine digitonina. Temperatura zmesi v vodni kopeli je ves čas 70 °C; zmes od časa do časa premešamo. Takoj ali po določenem času se digitonin-steridi sesedejo. Če se v 1 uri še niso sesedli štejemo, da je bil poskus na fitosterin negativen oziroma da rastlinsko olje ni prisotno. Če je nastala usedlina, dodamo po 1 uri še vedno topli zmesi 20 ml kloroforma in takoj filtriramo skozi mali in predhodno segreti Büchnerjev lij z gostim filtrirnim papirjem ali skozi lonček s porozno ploščico (ki je pred tem segret). Sesedek takrat izperemo s 5 do 10 ml toplega kloroforma in nato nekajkrat z etrom. Filter z usedlino sušimo 10 minut na 100 °C in ponovno izperemo z etrom, da popolnoma odstranimo še eventualne ostanke maščobnih kislin. Nato ponovno sušimo na 100 °C.

## 2) Dokazovanje fitosterina

Digitonin-steridi so na filtru v obliki kot papir tanke plasti. Posnamemo jih s filtra, prenesemo v epruveto, v katero smo dali glede na njihovo količino 3 do 5 ml anhidrida očetne kisline. V epruveto damo cev za hlajenje in segrevamo, da raztopina vre 10 minut. Nato dodamo še v vročo raztopino štirikratno količino 50 %-nega etanola in hladimo tako da damo epruveto v hladno vodo. Po 15 minutah filtriramo sterinacetat skozi mali filter in nekajkrat izperemo s 50 %-nim etanolom. Izprano usedlino na filtru raztopimo v majhni količini etra, ki jo prefiltriramo v majhno stekleno skledico kjer izhlapi in postane suha. Suhi ostanek raztopimo v 1 ml vročega absolutnega etanola. Ko se shladi, prefiltriramo sesedene kristale z vsesavanjem skozi mali filter, po možnosti s platinastim stožcem, ki ima na vrhu veliko število majhnih luknjic. Filtriramo lahko tudi skozi mali (mikro) filtrirni lonček. Sesedene kristale prekristaliziramo na enak način še dva ali trikrat. Po tretji kristalizaciji damo kristalno kašo na krožnik iz neglaziranega porcelana, pritisnemo s filtrirnim papirjem, da se posuši in vsakokrat določimo tališče na ustaljen način. Če se kristali (fitosterin-acetat) pri 116 °C (korig.) še ne topijo, lahko računamo, da so bile v preiskovani masti rastlinske maščobe, če pa se topijo pri 117 °C (korig.) ali višji temperaturi, je dodatek rastlinskih maščob dokazan ker se sterini živalskih maščob topijo pod označeno temperaturo.

Kristalizacijo fitosterinov opravimo lažje takole:

Posušeni fitosterin acetat raztopimo v čim manjši količini vročega absolutnega etanola. Nato dodamo 2 kapljici vode, če pa se raztopina skali, jo segrejemo, da bi se zbistrla. Nato ob stalnem mešanju s stekleno palčko snov kristalizira. Kristali se zbirajo na majhnem gladkem filtru, nato jih dvakrat izperemo z hladnim absolutnim etanolom, sušimo 30 minut na 100 °C in nato določimo tališče. Če je bilo prvo tališče pod 117 °C, se kristali ponovno kristalizirajo iz absolutnega etanola in spet določimo tališče.

Živalske maščobe vsebujejo 0,1 do 0,5, ribja olja do 2 % holesterola medtem ko rastlinske maščobe vsebujejo 0,1 do 1,2 % fitosterina.

**Pripomba** Holesterol-acetat se topi pri 114,3 °C (korig.) tališče fitosterinacetata pa je najmanj za 10 °C višje, npr. acetat stigmasterina se topi pri 141 °C, sterin-acetat iz kokosove masti pri 129 °C, iz lanenega olja pa pri 129,8 °C. Če je zadnja frakcija kristala pri 116 °C popolnoma bistro raztopljen, gre za čisti holesterol. To pomeni, da je preiskovana mast živalskega izvora, brez primesi rastlinskih maščob.

Če je med določanjem tališča stebriček živega srebra v toplomeru izven tekočine za segrevanje, je treba opraviti popravek temperature tako, kot je opisano pri določanju tališča masti.

Uporabljeni digitonin moramo pred prvo uporabo kontrolirati tako da napravimo poskus s 50 g živalske maščobe, ki ji dodamo 2 g rastlinskega olja. S tem poskusom moramo dobiti sterinacetate s tališčem nad 116 °C.