ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Χημεία Τροφίμων – Εργαστηριακές Ασκήσεις

Προσδιορισμός αζώτου κατά Kjeldahl- Προσδιορισμός ολικής πρωτεΐνης τροφίμων

Αμαλία Γιάννη





Προσδιορισμός αζώτου κατά Kjeldahl

- Η μέθοδος αναπτύχθηκε το 1883 από τον Johann Kjeldahl στα εργαστήρια της Carlsberg (Κοπεγχάγη).
- Εν συντομία, το τρόφιμο υποβάλλεται σε υγρή πέψη (wet digestion) με θερμό πυκνό H_2SO_4, ώστε να μετατραπεί το άζωτο αρχικά σε θειικό αμμώνιο, και στη συνέχεια σε αμμωνία, που μπορεί να προσδιοριστεί με ογκομέτρηση.
- Από τη συγκέντρωση αζώτου του τροφίμου υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεΐνης του τροφίμου (έμμεση μέθοδος).
- Η διαδικασία μπορεί να διακριθεί σε τρία στάδια: **πέψη, εξουδετέρωση-απόσταξη, ογκομέτρηση**

Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern.

Von

J. Kjeldahl.

Unter den quantitativen Bestimmungen der elementaren Bestandtheile der organischen Körper hat die Stickstoffbestimmung eine besondere und wichtige Bedeutung. Während die Feststellung der Kohlenstoff- und Wasserstoffmenge etc. gewöhnlich nur bei rein wissenschaftlichen Untersuchungen Bedeutung hat — zur Bestimmung der Zusammensetzung neuer Verbindungen u. dergl. — hat die Stickstoffbestimmung

Obige Mittheilung wurde zuerst im chemischen Verein zu Kopenhagen am 7. März d. J. als Vortrag publicirt. Gleichzeitig mit der hier vorliegenden Veröffentlichung wird die ausführliche Abhandlung in dänischer Sprache im 5. Heft der »Meddelelser fra Carlsberg Laboratorium« erscheinen.

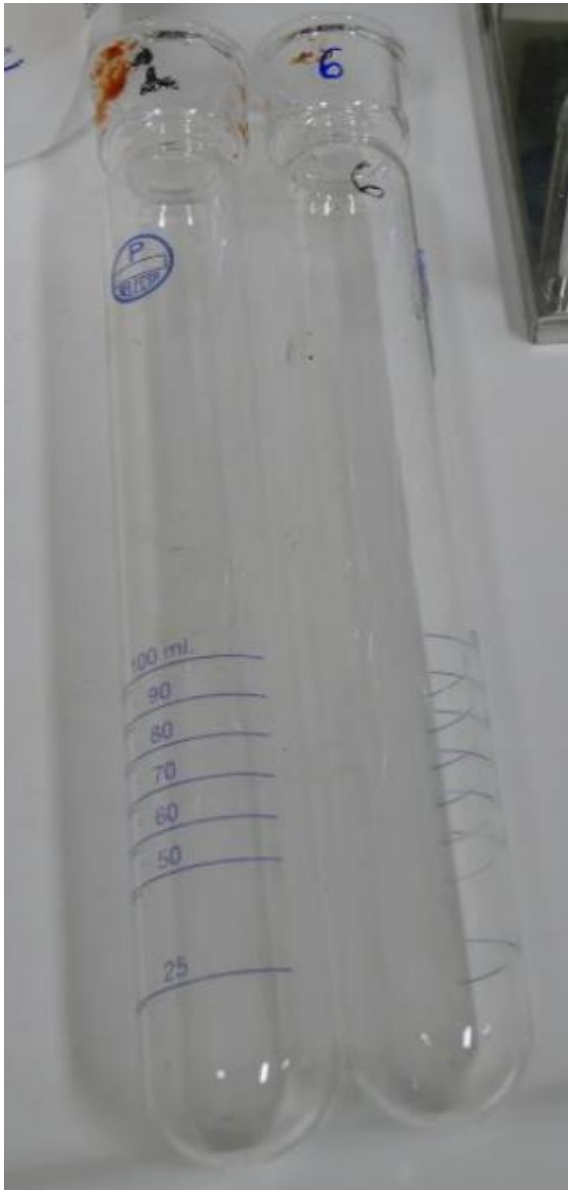
Carlsberg Laboratorium bei Kopenhagen, März 1883.



- **Kjeldahl J. 1883. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22, 366-382.**

1. Χώνευση (πέψη) των δειγμάτων

- Η πέψη (υγρή χώνευση, wet digestion, ή υγρή καύση wet ashing) γίνεται μέσα σε σωλήνες Kjeldahl σε αφυδατωμένα* δείγματα τροφίμου με πυκνό και θερμό θειικό οξύ παρουσία θειικού χαλκού ($CuSO_4$) ως καταλύτη.
- Προστίθεται επίσης ποσότητα θειικού καλίου (K_2SO_4) για να αυξηθεί το σημείο βρασμού.
- Υπό αυτές τις συνθήκες το οργανικό υλικό οξειδώνεται και όλες οι μορφές οργανικού αζώτου μετατρέπονται σε ιόντα αμμωνίου που παραμένουν στο διάλυμα.



*Για να δράσει οξειδωτικά, το θειϊκό οξύ πρέπει να είναι πυκνό και θερμό, επομένως το δείγμα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία (αφυδατωμένο) για να μην προκαλέσει αραίωση του π. H_2SO_4

Ζύγιση ξηρών δειγμάτων



Δείγμα	Βάρος, W (g)
Μανιτάρια *Pleurotus ostreatus*	0,503
Φασόλια μεσαία βραστά	0,502
Κοτόπουλο στήθος βραστό (αγοράς)	0,501
Κεφαλογραβιέρα Πελοποννήσου	0,504
Παϊδάκια ψητά από κρέας προβάτου	0,502
Ψωμί πιτυρούχο σίτου	0,501



Μεταφορά δειγμάτων σε σωλήνες Kjeldahl





Δισκία Kjeldahl και π.H_2SO_4



π. H_2SO_4

Σωλήνες Kjeldahl

Δισκία Kjeldahl

(προζυγισμένο μίγμα $CuSO_4$ και K_2SO_4)

Προσθήκη δισκίων Kjeldahl και π.H_2SO_4



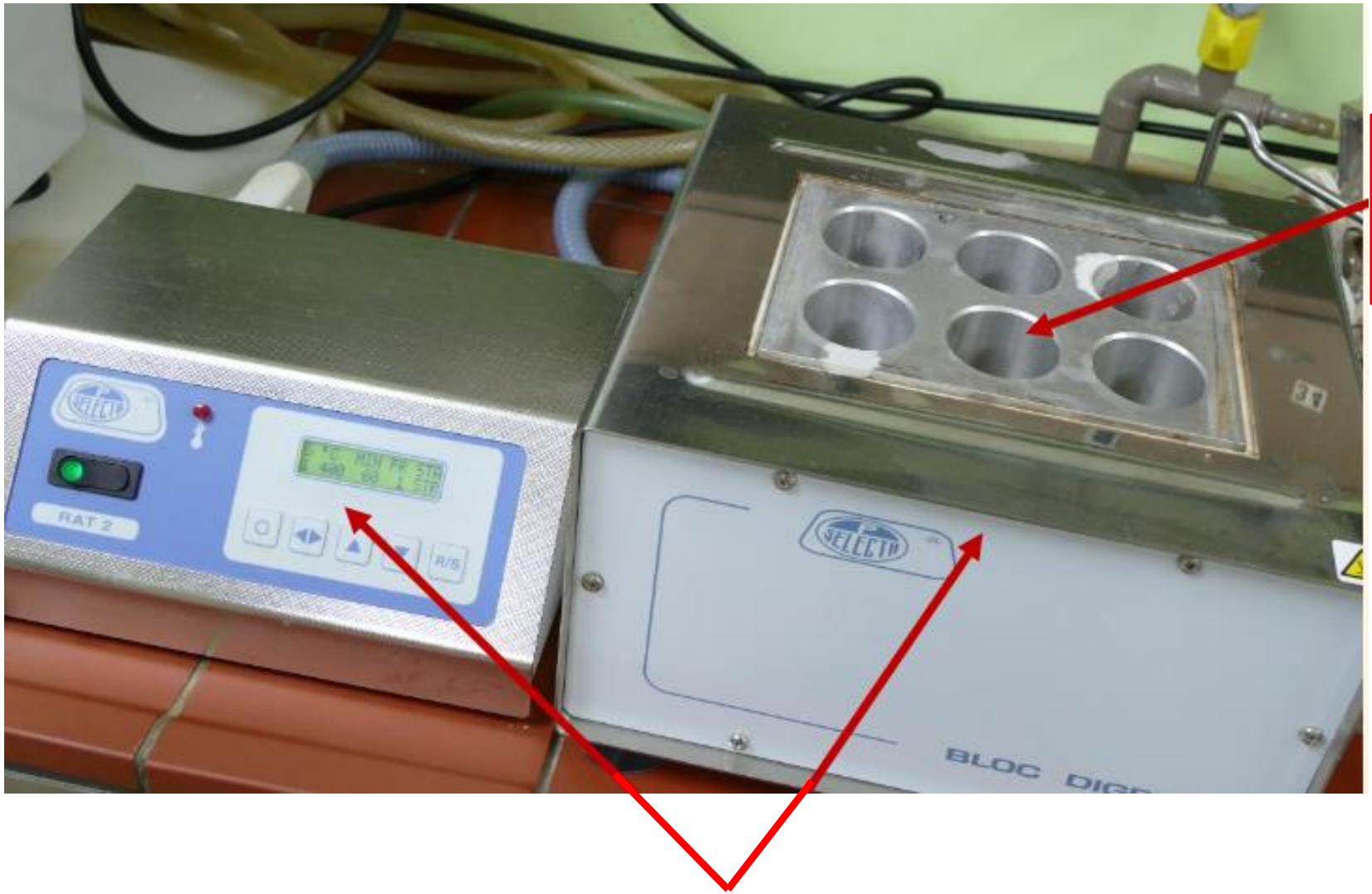


Δείγματα έτοιμα για χώνευση



Παρατηρούμε ότι έχει αρχίσει η δράση του H_2SO_4. Όμως η οξείδωση της οργανικής ύλης των δειγμάτων δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Απαιτείται και θέρμανση.

Συσκευή χώνευσης



Το μπλοκ χώνευσης έχει προγραμματισθεί να θερμάνει στους 400°C επί 60 min.

Τοποθέτηση σωλήνων στη συσκευή χώνευσης - σύνδεση με πλυντρίδα καυσαερίων





Προς πλυντρίδα καυσαερίων

Πλυντρίδα (scrubber) καυσαερίων



Μπλόκ χώνευσης

Έξοδος καθαρού αέρα

Αντλία κενού

Δεξαμενή νερού υδραντλίας.

Πλυντρίδες με διάλυμα Na_2CO_3 και δείκτη. Εξουδετερώνουν όξινα αέρια.

Χώνευση δειγμάτων σε εξέλιξη

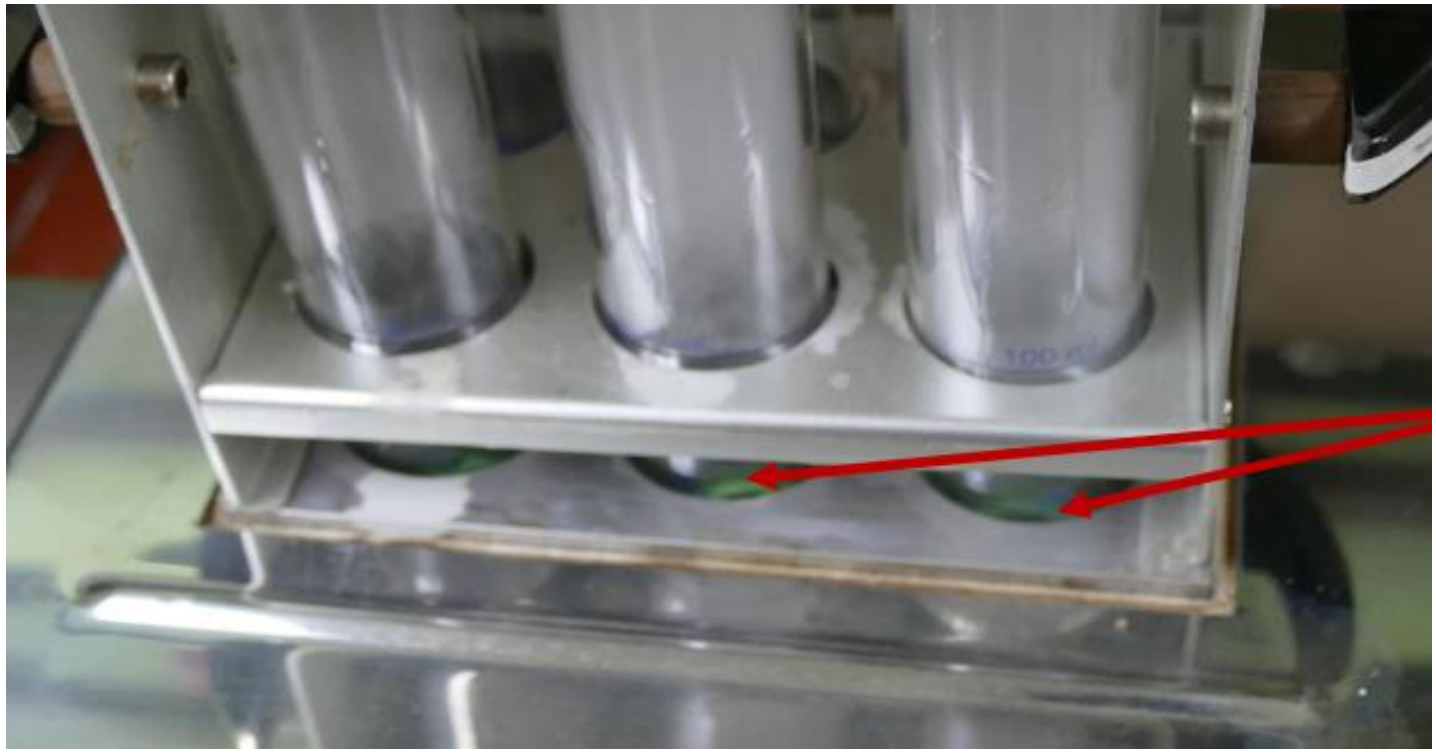


Αντίδραση:

$$\text{N (πεπτιδικού δεσμού)} + \text{π. } H_2SO_4 \xrightarrow{\Theta,Cu} (NH_4)_2SO_4 + SO_2\uparrow + CO_2\uparrow + H_2O \quad (1)$$

Οι σωλήνες Kjeldahl είναι γεμάτοι με υδρατμούς και όξινα αέρια (SO_2 και CO_2) που παράγονται από την πέψη των δειγμάτων. Το θόλωμα οφείλεται κυρίως σε υδρατμούς.

Ολοκλήρωση χώνευσης



Ολοκλήρωση χώνευσης (πέψης)

- Όταν ολοκληρωθεί η πέψη τα δείγματα γίνονται διαυγή και έχουν σμαραγδί χρώμα όσο είναι θερμά. Το χρώμα τους γίνεται αχνό γαλάζιο όταν κρυώσουν (λόγω του $CuSO_4$).
- Η οργανική ύλη έχει μετατραπεί σε ανόργανες μορφές. Όλο το οργανικό άζωτο βρίσκεται πλέον υπό μορφή $(NH_4)_2SO_4$, το οποίο, ως μη πτητική ετεροπολική ένωση, παραμένει στο θερμό διάλυμα.

2. Απόσταξη αμμωνίας με υδρατμούς

Όταν ψυχθεί, ο σωλήνας Kjeldahl συνδέεται με συσκευή απόσταξης, το δείγμα γίνεται αλκαλικό με προσθήκη πυκνού διαλύματος (40% w/v) NaOH, οπότε τα ιόντα αμμωνίου μετατρέπονται σε αμμωνία:

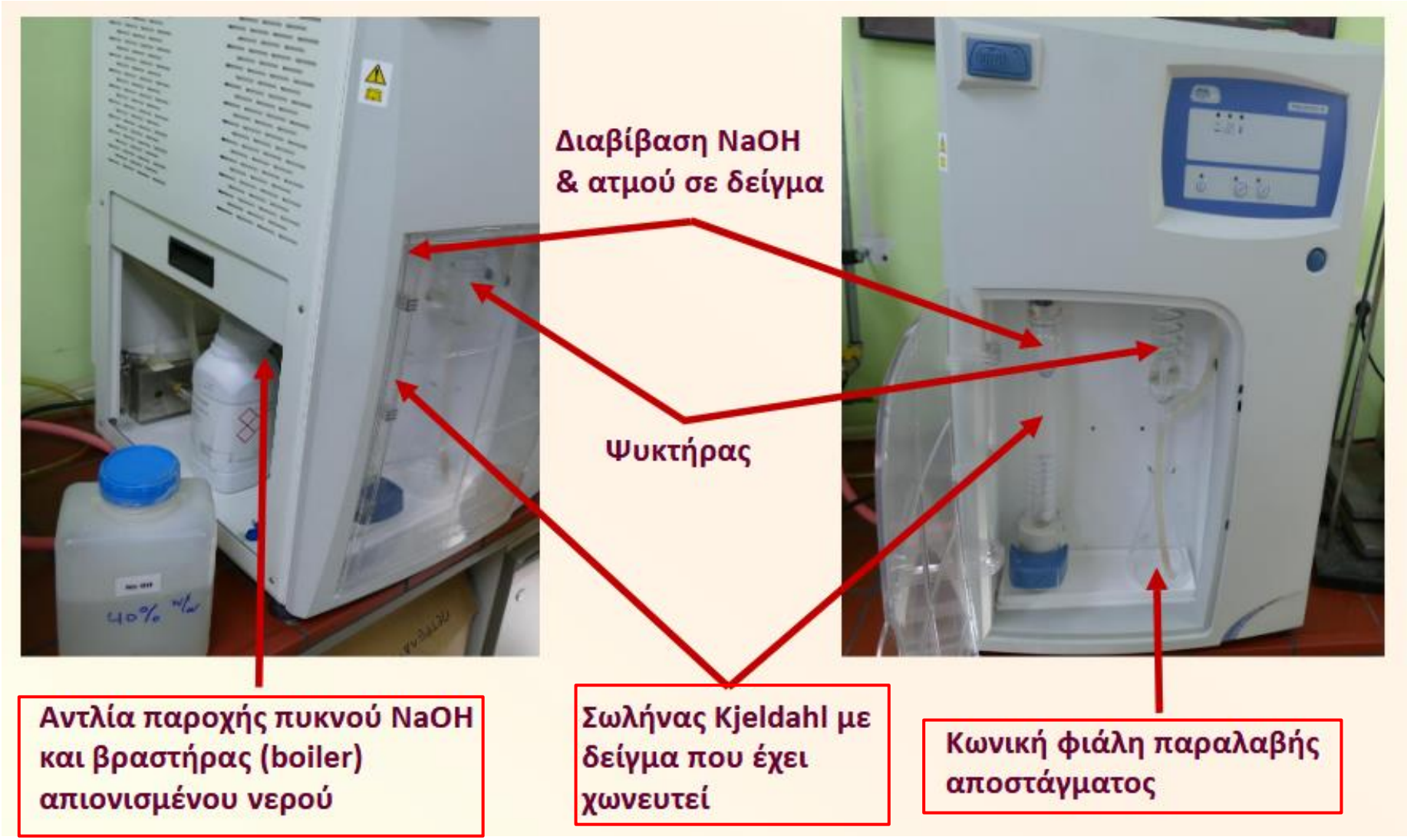
$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \rightarrow 2NH_3 + 2H_2O + Na_2S0_4 \quad (2)$$

Η αμμωνία παραλαμβάνεται με απόσταξη με υδρατμούς σε υποδοχέα που περιέχει 25 mL (περίσσεια) προτύπου HCl 0,5 M.

Η NH_3 εξουδετερώνει μέρος του προτύπου HCl, και η περίσσεια του HCl προσδιορίζεται στη συνέχεια με τιτλοδότηση με NaOH 0,5 M:

$$NH_3 + HCl \rightarrow NH_4Cl \quad (3)$$

Συσκευή απόσταξης αμμωνίας με υδρατμούς



Απόσταξη αμμωνίας

Υποδοχέας αποστάγματος. Περιέχει πρότυπο HCl 0,5M και δείκτη ερυθρό του μεθυλίου.



Σωλήνας Kjeldahl με δείγμα που έχει χωνευθεί, πριν την προσθήκη NaOH



Σωλήνας Kjeldahl μετά την προσθήκη NaOH και έναρξη διαβίβασης υδρατμών (έχει εξουδετερωθεί το H_2SO_4 και σχηματίζονται υδροξείδια μετάλλων)

Ολοκλήρωση απόσταξης αμμωνίας



Η διάρκεια της απόσταξης ελέγχεται με χρονοδιακόπτη που διακόπτει την διαβίβαση υδρατμού. Με το τέλος της απόσταξης:

(α) ο σωλήνας Kjeldahl έχει σχεδόν γεμίσει με υγρό λόγω συμπύκνωσης των υδρατμών που διαβιβάζονταν από τον βραστήρα της συσκευής.

(β) έχει αυξηθεί και το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης λόγω συμπύκνωσης του αποστάγματος με την αμμωνία.

(γ) Όλη η NH_3 έχει αντιδράσει με το HCl του υποδοχέα και έχει μετατραπεί σε NH_4Cl.

3. Ογκομέτρηση

Η NH_3 που παράχθηκε από το Ν του δείγματος θα προσδιορισθεί έμμεσα με ογκομέτρηση του HCl που περίσσεψε στον υποδοχέα, με NaOH. Μια ογκομέτρηση αυτού του τύπου λέγεται <u>οπισθογκομέτρηση (</u>back titration).

Γνωρίζουμε ότι αρχικά είχαμε 25 mL HCl 0,5 M στον υποδοχέα του αποστάγματος.



Ένα μέρος του εξουδετερώθηκε από την NH_3. Το υπόλοιπο (περίσσεια) θα το βρούμε με ογκομέτρηση με πρότυπο NaOH 0,5 M και έτσι θα γνωρίζουμε την ποσότητα του HCl που έχει αντιδράσει με την NH_3 άρα και την ποσότητα NH_3. Το αποτέλεσμα της οπισθογκομέτρησης θα κυμανθεί μεταξύ των 0 mL αν όλο το HCl αντιδράσει με την NH_3 και 25 mL αν το δείγμα δεν περιέχει άζωτο οπότε δεν θα παραχθεί και NH_3.

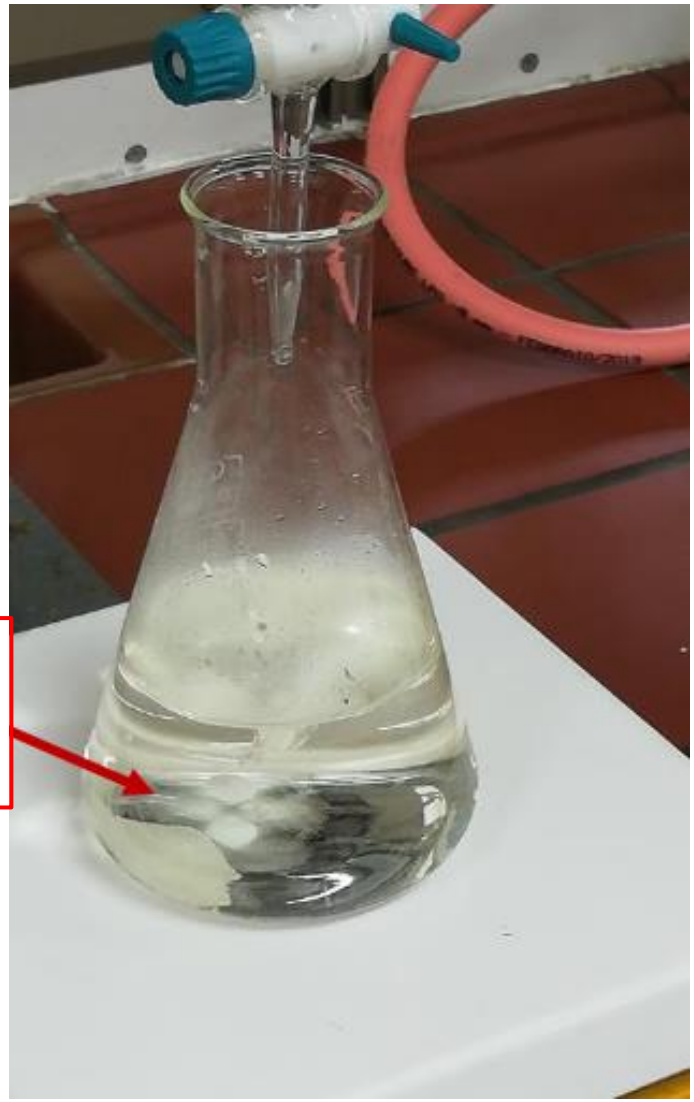
Οπισθογκομέτρηση



Αρχικά: Απόσταγμα με NH_4Cl και περίσσεια HCl.

Δείκτης: ερυθρό μεθυλίου

Τέλος ογκομέτρησης με NaOH 0,5M



Πορεία και αντιδράσεις

1. Πέψη

Το δείγμα τροφίμου ζυγίζεται (**W g**), μεταφέρεται σε γυάλινο σωλήνα πέψεως και στη συνέχεια υποβάλλεται σε υγρή χώνευση (πέψη) με θέρμανση, παρουσία θειικού οξέος (οξειδωτικό αντιδραστήριο), **θειικού καλίου** (για να επιταχυνθεί η αντίδραση με αύξηση του σημείου βρασμού) και **θειικού χαλκού** ως καταλύτη. Η πέψη μετατρέπει το σύνολο του αζώτου στο δείγμα τροφίμου (εκτός από το άζωτο που είναι υπό μορφή νιτρικών ή νιτρωδών) σε θειικό αμμώνιο και τις άλλες οργανικές ενώσεις σε CO_2 και H_2O.

$$\text{N (τρόφιμο)} \rightarrow (NH_4)_2SO_4 \quad (1)$$

2. Εξουδετέρωση - Απόσταξη με υδρατμούς

Αφού ολοκληρωθεί η πέψη, η φιάλη πέψης συνδέεται με τη συσκευή απόσταξης. Το διάλυμα στη φιάλη πέψης καθίσταται αλκαλικό με προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου, το οποίο μετατρέπει το θειικό αμμώνιο σε αέρια αμμωνία:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\,NaOH \rightarrow 2NH_3 + 2H_2O + Na_2S0_4 \quad (2)$$

Πορεία και αντιδράσεις

Η αμμωνία που σχηματίζεται απελευθερώνεται από το διάλυμα με απόσταξη με υδρατμούς και μεταφέρεται από τη φιάλη πέψης σε κωνική φιάλη που περιέχει ακριβώς **25 mL** 0,5 Μ υδροχλωρικού οξέος. Η αμμωνία αντιδρά με το HCl στη φιάλη υποδοχής και εξουδετερώνει ένα μέρος του:

$$NH_3 + HCl \rightarrow NH_4Cl \quad (3)$$

3. Τιτλοδότηση

Η περίσσεια του HCl προσδιορίζεται με *οπισθογκομέτρηση* (back titration) με πρότυπο διάλυμα NaOH 0,5 Μ.

Έστω ότι καταναλώθηκαν **α** mL NaOH για την οπισθογκομέτρηση.

$$HCl + NaOH \rightarrow NaCl + H_2O$$

Υπολογισμοί

1. Υπολογισμός % αζώτου επί ξηρού:

$$N\ (\%\ d.w) = (V-\alpha)\times 0{,}7/W \qquad (1)$$

Όπου V=25 mL (όγκος του HCl 0,5 M στην κωνική), α=mL NaOH 0,5 M που καταναλώθηκαν στην οπισθογκομέτρηση και W= βάρος δείγματος σε g

2. Υπολογισμός % πρωτεΐνης επί ξηρού:

$$Pr\ (\%\ d.w.) = N \times C \qquad (2)$$

Όπου C= κατάλληλος συντελεστής:

$C_{\text{γάλα}}$= 6,38, $C_{\text{κρέας}}$= 6,25, $C_{\text{άλευρα /ζυμαρικά}}$= 5,7

Συχνά χρησιμοποιείται ο συντελεστής C=6,25 (βασίζεται στη μέση περιεκτικότητα των πρωτεϊνών σε άζωτο = 16%).

Ειδικά στα μανιτάρια που περιέχουν σημαντική ποσότητα μη πρωτεϊνικού N (χιτίνη), χρησιμοποιείται συντελεστής C=4,38.

3. Μετατροπή πρωτεΐνης d.w. σε πρωτεΐνη f.w. (d.w.= επί ξηρού βάρους , f.w. = επί νωπού βάρους)

$$Pr\ (\%f.w.) = Pr\ (\%d.w.)\times(100-\text{ΥΓΡΑΣΙΑ})/100 \qquad (3)$$

Αποτελέσματα

α/α	Τρόφιμο [1]	Βάρος (W g)	Όγκος NaoH (α mL)	N (% d.w.)	Πρωτεΐνη (% d.w.)	Υγρασία (%)	Πρωτεΐνη (% f.w.)	Πρωτεΐνη από βάσεις δεδομένων [2]
1	Μανιτάρια *Pleurotous*	0,503	21,7			90,0		
2	Φασόλια μεσαία βραστά	0,502	22,3			68,4		
3	Κοτόπουλο στήθος βραστό (αγοράς)	0,501	15,2			73,1		
4	Κεφαλογραβιέρα Πελοποννήσου	0,504	20,4			36,3		
5	Παϊδάκια ψητά από κρέας προβάτου	0,502	18,6			49,8		
6	Ψωμί πιτυρούχο σίτου	0,501	23,1			28,7		

[1] Ξηρά (αφυδατωμένα) δείγματα
[2] από βάση δεδομένων ελληνικών τροφίμων. Για τα μανιτάρια θα χρησιμοποιηθεί η βάση USDA.
d.w.= επί ξηρού βάρους (dry weight)
f.w.= επί νωπού βάρους (fresh weight)

Ασκήσεις

1. Από τα δεδομένα του πίνακα να υπολογίσετε:
   (α) το % άζωτο επί ξηρού (d.w.),
   (β) την % πρωτεΐνη επί ξηρού (d.w.), και
   (γ) την % πρωτεΐνη επί νωπού (f.w.) για τα δείγματα τροφίμων

2. Να αναφέρετε πιθανές αιτίες για τυχόν διαφορές μεταξύ των τιμών περιεχόμενης πρωτεΐνης που προσδιορίσαμε στο Εργαστήριο και αυτών που δίνονται στις βάσεις σύστασης τροφίμων (τελευταία στήλη του πίνακα).

ΣΗΜΕΙΩΣΗ

Για να συγκρίνετε τα δεδομένα των δειγμάτων που αναλύθηκαν στο Εργαστήριο με αυτά των βάσεων δεδομένων, θα πρέπει η πρωτεΐνη τους να υπολογισθεί με τον συντελεστή 6,25.

Η βάση δεδομένων των ελληνικών τροφίμων, στη δημιουργία της οποίας συμμετείχε το Εργαστήριό μας, έχει αναρτηθεί στο e-class/Χημεία Τροφίμων/Εγγραφα και υπάρχουν οδηγίες για να αποκτήσετε πρόσβαση.