

18. Ekstrakcyjno-wagowe oznaczanie zawartości tłuszczu surowego w produktach spożywczych

Lipidy stanowią dużą i bardzo zróżnicowaną pod względem chemicznym grupę naturalnych związków organicznych, których wspólną cechą jest lipofilowość [1]. Oznacza to, że o ich przynależności do danej grupy związków nie decyduje budowa chemiczna (obecność jednakowych grup funkcyjnych), jak np. dla peptydów, białek czy sacharydów, lecz rozpuszczalność, czyli zdolność wydobywania ich z materiałów biologicznych poprzez ekstrakcję niepolarnymi rozpuszczalnikami, jak np. eter, chloroform, toluen czy benzyna.

Do grupy lipidów zaliczamy takie związki organiczne jak:

- tłuszcze – estry glicerolu i kwasów tłuszczowych,
- woski – estry wyższych kwasów tłuszczowych i wyższych alkoholi,
- fosfolipidy, cerebrozydy i sulfolipidy – zawierają one oprócz reszt kwasów tłuszczowych i alkoholi reszty innych związków, jak np. aminokwasy, estry kwasu fosforowego czy sacharydów,
- pochodne lipidów – kwasy tłuszczowe, sterydy i steroidy oraz wyższe alkohole i inne związki organiczne.

Lipidy, białka i sacharydy to podstawowe składniki budulcowe organizmów żywych. Są one również, obok protein i sacharydów, podstawowymi składnikami pożywienia, pełniąc nie tylko funkcję energetyczną, ale również są substratami w biosyntezie innych ważnych substancji.

Tłuszcze jadalne różnią się ze względu na ich pochodzenie na tłuszcze roślinne, zwierzęce i modyfikowane, a ze względu na stan skupienia na oleje i tłuszcze stałe. Tłuszcze pozyskuje się w procesach tłoczenia, odwirowania, wytapiania, ekstrakcji lub kombinacji powyższych procesów. Tłuszcze wyodrębnione z surowca organicznego nazywamy tłuszczami surowymi. Należy pamiętać, że zawierają one również inne nietłuszczowe substancje lipofilowe.

Dokładna ilościowa analiza zawartości tłuszczu w produktach żywnościowych [2] jest ważna nie tylko ze względu na znakowanie żywności [3, 4], lecz także dla określenia, czy żywność spełnia standardy identyczności i jednorodności, a także dla zrozumienia efektów jakie wywierają oleje i tłuszcze na funkcjonalne i żywieniowe właściwości pożywienia. Wiarygodność analizy tłuszczu w produktach żywieniowych zależy od wielu czynników, włączając w to odpowiednie pobranie oraz przygotowanie próbki do analizy [5].

Z powodu różnych regulacji prawnych, ważne jest dla producentów żywności, aby podawać zawartość tłuszczu w wytwarzanych porcjach żywności [4]. Międzynarodowe normy badania zawartości tłuszczu w żywności bardzo często opierają się na metodach ekstrakcyjnych [6-17], w tym na metodzie Soxhleta.

Ekstrakcja. Ekstrakcja oznacza przeprowadzenie substancji z jednej fazy, w której jest ona rozpuszczona lub zawieszona, do drugiej ciekłej fazy [18]. Proces ten jest możliwy, ponieważ substancja rozdziela się między obydwie fazy w określonym stosunku. Określa ją prawo podziału

Nernsta: $K = \frac{c_A}{c_B}$. Według prawa Nernsta stosunek stężeń c substancji rozpuszczonej w dwóch nie

mieszających się z sobą i znajdujących się w stanie równowagi ciekłych fazach A i B jest w określonej temperaturze wielkością stałą (współczynnik podziału K). W podanej postaci prawo podziału Nernsta ma zastosowanie tylko do małych stężeń (warunki doskonałe) i do substancji rozpuszczonej, która jest jednakowo zasocjowana w obydwu fazach.

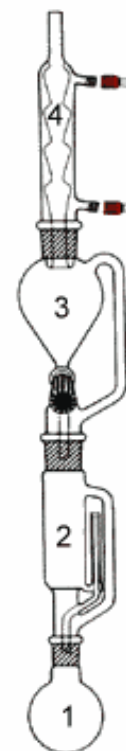
Ekstrakcja jest więc skuteczna wtedy, gdy substancja rozpuszcza się dużo lepiej w jednej dwóch faz, a zatem wartość współczynnika podziału znacznie odbiega od jedności.

W przypadku substancji o współczynniku $K < 100$, tj. wtedy gdy c_A w definicji K oznacza stężenie w fazie ekstrahującej, nie wystarcza już zwykła ekstrakcja, lecz ekstrakcja powtarzana wielokrotnie z użyciem świeżego rozpuszczalnika.

W idealnym przypadku dwie substancje (o współczynnikach K_1 i K_2) rozdzielają się między dwie fazy niezależnie jedna od drugiej. Jeśli różnica między współczynnikami podziału tych substancji jest dostatecznie duża, to można je rozdzielić przez zwykłą ekstrakcję. Stopień trudności rozdzielania określa współczynnik rozdziału $\beta = \frac{K_1}{K_2}$. W sposób zadowalający można rozdzielić dwie substancje

za pomocą ekstrakcji tylko wtedy, gdy $\beta > 100$. Do rozdzielania mieszanin o $\beta < 100$ należy stosować rozdzielanie wielokrotne.

Zasada ekstrakcji ciał stałych metodą Soxhleeta. Metoda Soxhleeta [19] jest jedną z najpowszechniej używanych metod do ekstrakcji tłuszczów z produktów spożywczych i naturalnych. Zgodnie z powyższą metodą tłuszcze są ekstrahowane z ciał stałych poprzez wielokrotne wymywanie ich przy użyciu rozpuszczalników organicznych, takich jak heksan lub niskowrzące etery naftowe. Badaną próbkę rozdrabnia się, suszy i umieszcza w gilze ekstrakcyjnej. Gilzę umieszcza się w komorze ekstraktora (2), który jest zawieszony nad kolbą destylacyjną zawierającą rozpuszczalnik organiczny (1) oraz pod chłodnicą zwrotną (4). Kolbę ogrzewa się do wrzenia, znajdujący się w niej rozpuszczalnik częściowo odparowuje, podąża w górę do chłodnicy, gdzie skrapla się i spływa do komory ekstraktora obmywając badaną substancję. Gdy poziom cieczy w komorze ekstraktora osiągnie wysokość górnego kolanka lewara (syfonu), cały ekstrakt jest zawracany z powrotem do kolby destylacyjnej. Po skończonej wielokrotnej ekstrakcji, która trwa zwykle kilka godzin, usuwa się ekstraktor i oddestylowuje rozpuszczalnik. Niektóre zestawy [20] są dodatkowo wyposażone w rozdzielacz (3), który pozwala odzyskać rozpuszczalnik pod koniec ekstrakcji po zamknięciu kurka pomiędzy rozdzielaczem a komorą ekstraktora bez wcześniejszego demontażu aparatury. Po oddestylowaniu rozpuszczalnika, waży się kolbę wraz z ekstraktem (tłuszcz całkowity) i oblicza jego zawartość w stosunku do masy próbki pierwotnej.



Cel ćwiczenia. Celem niniejszego ćwiczenia jest ekstrakcja wybranej próbki, takiej jak frytki, chipsy, prażynki, ziarna słonecznika, rzepaku lub dyni, pasze zwierzęce i śrutu itp. *n*-heksanem w aparacie Soxhleeta oraz wagowe oznaczenie zawartości wyekstrahowanego tłuszczu całkowitego w stosunku do masy badanej próbki.

CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

Warunki bezpieczeństwa. W toku analizy używane są wysoce łatwopalne lotne rozpuszczalniki organiczne. W tym celu należy zachować wysoką ostrożność, unikać źródeł ognia. Odpady zlewać do odpowiednio oznaczonych pojemników. Ekstrakcję, destylację oraz inne czynności poekstrakcyjne wykonywać tylko i wyłącznie w działającym dygestorium.

Sprzęt	Odczynniki
<ul style="list-style-type: none"> - ekstraktor Soxhleeta, - chłodnica Allihn'a, - węże gumowe, - kolba okrągłodenna ze szlifem na 1000 ml, - butelka ze szlifem na 500 ml, - elektryczna łaźnia grzejna, - statyw laboratoryjny, - łapa do chłodnicy + łącznik, - gilza ekstrakcyjna, - odtłuszczona wata bawełniana, - kulki szklane, - moździerz z tłuczkiem, - krystalizator, - waga analityczna, - łyżko-szpatułki laboratoryjne, 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>n</i>-heksan $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, - bezwodny siarczan sodu Na_2SO_4 wysuszony w $150\text{ }^\circ\text{C}$, - gazowy azot N_2.

- podstawka PP pod kolbę okrągłodenną,
- hot-łapka gumowa.

PROCEDURA

Przygotowanie próbki. Badaną próbkę umieścić w moździerzu, a następnie dokładnie ją rozgnieść i rozetrzeć na jednolitą masę.

Odważyć na wadze analitycznej w krystalizatorze około 40 g (z dokładnością do ± 1 mg) przygotowanej do badań próbki m_0 (wynik zapisać w dzienniku laboratoryjnym), a następnie zmieszać z około 10 g bezwodnego siarczanu sodowego. Próbkę przenieść ilościowo do gilzy ekstrakcyjnej, resztki zetrzeć watą bawełnianą, którą również należy umieścić w gilzie. Gilzę zatkać odtłuszczoną watą bawełnianą. Należy zwrócić uwagę, aby gilza była wypełniona próbką najwyżej do $\frac{3}{4}$ wysokości.

Wykonanie analizy. Umieścić kilka kulek szklanych w suchej i czystej kolbie ekstrakcyjnej, a następnie całość zważyć na wadze analitycznej z dokładnością do ± 1 mg. Wynik zapisać w dzienniku laboratoryjnym (m_1). Umieścić kolbę w łaźni grzejnej i wlać ostrożnie około 350 ml n-heksanu. Połączyć kolbę z aparatem Soxhleta. W ekstraktorze umieścić gilzę ekstrakcyjną zawierającą badaną próbkę. Ekstraktor połączyć z chłodnicą. Węże gumowe doprowadzające wodę do chłodnicy podłączyć tak, aby wejście wody znajdowało się na dole, a wyjście u góry chłodnicy. Poprosić prowadzącego ćwiczenia o sprawdzenie poprawności zmontowania aparatury.

Włączyć dopływ wody do chłodnicy, a następnie podłączyć przewód elektryczny płaszcza grzejnego do źródła zasilania. Ekstrahować próbkę przez 2 – 2,5 godziny w celu zebrania frakcji w heksanie. Wyregulować urządzenie grzewcze tak, by otrzymać około 10 przelewów na godzinę.

Po zakończeniu ekstrakcji (około 40 minut przed końcem zajęć) oddestylować rozpuszczalnik do butelki szklanej otwierając kurek u dołu aparatu Soxhleta, aż kolba destylacyjna będzie niemal wolna od rozpuszczalnika. Odłączyć zasilanie, wyłączyć dopływ wody i odczekać, aż całość ostygnie. Zdjąć chłodnicę i aparat Soxhleta i przełożyć kolbę z ekstraktem na podstawkę PP do kolb okrągłodennych używając hot-łapki. Przedmuchać ekstrakt przez około 10 minut strumieniem azotu. Kolbę ostudzić i zważyć na wadze analitycznej z dokładnością do ± 1 mg. Wynik zapisać w dzienniku laboratoryjnym (m_2).

Obliczenia. Obliczenie zawartości tłuszczu surowego, H , wyrażonego w gramach na 100 g próbki (lub w procentach), wykonać według poniższego wzoru:

$$H = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \cdot 100 \quad \left[\frac{g}{100g} \text{ lub } \% \right]$$

gdzie:

m_0 – masa badanej próbki,

m_1 – masa pustej i czystej kolby zawierającej kulki szklane,

m_2 – masa kolby zawierającej ekstrakt i kulki szklane po wysuszeniu i ostudzeniu do temperatury pokojowej.

Wszystkie masy wyrażono w gramach.

Sprawozdanie

Sprawozdanie powinno zawierać następujące elementy:

- imię i nazwisko osoby przeprowadzającej analizę,
- datę analizy,
- wszystkie niezbędne informacje pozwalające na zidentyfikowanie próbki,
- krótki opis przygotowania próbki, analizy oraz wykonywanych czynności,
- wyniki analizy (jeżeli możliwe porównanie wyniku wykonanej analizy oraz zawartości tłuszczu podanej przez producenta),
- komentarz.

LITERATURA

1. Aleksander Kołodziejczyk, Naturalne związki organiczne, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004.
2. Beverly Swaile, Soxhlet extraction of fat from french fries, University of Cincinnati, <http://www.terrificscience.org/lessonpdfs/SoxhletExtraction.pdf>
3. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych, Dziennik Ustaw 2007 nr 137 poz. 966.
4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 25 lipca 2007 r. w sprawie znakowania żywności wartością odżywczą, Dziennik Ustaw 2007 nr 137 poz. 967.
5. Polska Norma PN-EN ISO 6498:2012 Pasze – Wskazówki do przygotowania próbek.
6. Polska Norma PN-ISO 6492:2005 Pasze – Oznaczanie zawartości tłuszczu.
7. Polska Norma PN-EN ISO 659:2010 Nasiona oleiste – Oznaczanie zawartości oleju (Metoda odwoławcza).
8. Polska Norma PN-EN ISO 734-1:2008 Śruta nasion oleistych – Oznaczanie zawartości oleju – Część 1: Metoda ekstrakcji heksanem (lub benzyną lekką).
9. Polska Norma PN-EN ISO 734-2:2010 Śruta nasion oleistych – Oznaczanie zawartości oleju – Część 2: Szybka metoda ekstrakcji.
10. Polska Norma PN-EN ISO 11085:2010 Ziarno zbóż, przetwory wyprodukowane na bazie zbóż i pasze – Oznaczanie zawartości tłuszczu surowego i tłuszczu całkowitego metodą ekstrakcji Randalla.
11. International Standard ISO 1443:1973 Meat and meat products – Determination of total fat content.
12. Polska Norma PN-ISO 1444:2000 Mięso i przetwory mięsne – Oznaczanie zawartości tłuszczu wolnego.
13. Polska Norma PN-EN ISO 1735:2006 Sery i przetwory topione z serów – Oznaczanie zawartości tłuszczu – Metoda grawimetryczna (Metoda odwoławcza).
14. Polska Norma PN-EN ISO 1211:2011 Mleko – Oznaczanie zawartości tłuszczu – Metoda grawimetryczna (Metoda odniesienia).
15. Polska Norma PN-EN ISO 1736:2010 Mleko w proszku i przetwory mleczne w proszku – Oznaczanie zawartości tłuszczu – Metoda grawimetryczna (Metoda odniesienia).
16. Polska Norma PN-EN ISO 7208:2010 Mleko odtłuszczone, serwatka i maślanka – Oznaczanie zawartości tłuszczu – Metoda grawimetryczna (Metoda odniesienia).
17. Polska Norma PN-EN 1163:1999 Pierze i puch – Metody badań – Oznaczanie zawartości oleju i tłuszczu.
18. Preparatyka organiczna, Bolesław Bochwic (red.), Państwowe Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1971.
19. Franz Ritter von Soxhlet, Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes, Dingler's Polytechnisches Journal **232** (1879) 461-465.
20. <http://www.cyberlipid.org/extract/extr0010.htm>.

Sprawozdanie

Imię i nazwisko:		Data:	
Temat:	Ekstrakcyjno-wagowe oznaczanie zawartości tłuszczu surowego w produktach spożywczych		
Rodzaj badanej próbki:			
masa próbki wzięta do analizy [g]			
masa kolby ekstrakcyjnej z kulkami wrzennymi [g]			
masa kolby ekstrakcyjnej z kulkami wrzennymi i ekstraktem [g]			
masa ekstraktu [g]			
zawartość tłuszczu w badanej próbce [%]			