

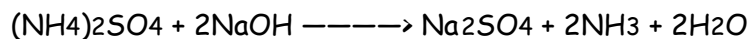
Iniciació a la bromatologia (pràctiques)	Protocols d'anàlisi	Ref: 5.1
PROTEÏNA BRUTA		

OBJECTE I FONAMENTS

El mètode aquí descrit es l'anomenat mètode de Kjeldhal.

Entenem per proteïna bruta el nitrogen total de la mostra expressat com proteïna. El mètode no és apte per substàncies amb enllaços N-N, NO i NO₂.

La mostra és sotmesa a un atac amb àcid sulfúric concentrat, en el decurs del qual el nitrogen passa a forma amoniacal (com sulfat amònic); l'amoni del sulfat amònic passa a amoníac lliure per tractament amb hidròxid de sodi:



i l'amoníac format és separat per destil·lació i arreplegat sobre una quantitat exactament coneguda d'àcid titulat. L'amoníac format es determina per valoració de l'excés d'àcid titulat.

MATERIAL

Aparell semimicro Kjeldhal segons l'esquema adjunt.

Balança analítica.

Bateria digestora de mantes elèctriques.

Bureta de 25 ml.

Campana-vitrina extractora.

Flascó rentador.

Matràs erlenmeyer de 100 ml o de 250 ml.

Matràs Kjeldhal forma pera de coll llarg de 100 ml.

Pipeta de 25 ml

Pipeta de 5 ml.

Proveta de 25 ml.

REACTIUS

Àcid clorhídric 0'1 N, titulat.

Àcid sulfúric concentrat.

Aigua destil·lada.

Dissolució d'hidròxid de sodi 50% p/v.

Indicador mixt Shiro-Thasiro.

Mescla catalítica .

Paper de fumar.

Preparació dels reactius:

INDICADOR MIXTE.- Mesclar dues parts de solució de roig de metilè al 0'2 % amb una part de blau de metilè al 0'2 %, ambdues en alcohol etílic del 96. Guardar en flascó topazi. Viratge: roig violat a verd grisós.

SOLUCIÓ DE SOSA AL 50 % P/V .- Dissoldre 500 grams NaOH i 50 grams de tiosulfat de sodi en aigua fins a 1 litre, agitant contínuament i tot refredant el recipient en bany d'aigua freda, parant compte de no fer esquitxades.

MESCLA CATALÍTICA.- Mesclar i homogeneïtzar 150 grams de sulfat de potassi pa, 4 grams d'òxid cúpric pa i 12 grams de sulfat cúpric cristal·litzat pa. Molturar fins reduir a pols fi i homogeneïtzar la mescla de nou.

METODOLOGIA

- 1.- Pesar, en un paper de fumar, al qual se l'hi haurà separat la part engomada, una quantitat de mostra molturada i homogeneïtzada que contingui entre 100 i 120 mil·ligrams de proteïna bruta.
- 2.- Passar la mostra, embolcallada en el paper de fumar, a l'interior del matràs Kjeldhal.
- 3.- Afegir al voltant de 2'5 grams de mescla catalítica i 6 ml d'àcid sulfúric concentrat . Tapar el matràs amb un embut petit.
- 4.- Escalfar la mostra amb la bateria escalfadora en vitrina-campana i l'extractor engegat; l'escalfament serà suau els 5 primers minuts i fort després. Continuar l'escalfament fins que el líquid sigui de color verd-blau clar i totalment transparent. El temps de digestió varia segons el tipus de mostra (al voltant de $\frac{3}{4}$ d'hora).
- 5.- Refredar, i quan el líquid sigui fred, afegir entre 5 i 10 ml d'aigua destil·lada, rentant el coll del matràs.
- 6.- Passar el líquid al destil·lador, rentant el matràs tres o quatre cops amb petites quantitats d'aigua destil·lada.
- 7.- Amb totes les claus de l'aparell tancades, afegir de 20 a 25 ml de dissolució de sosa, deixant una petita quantitat a l'embut perquè actuï com tancament hidràulic.
- 8.- Rentar l'embut amb aigua destil·lada, deixant passar tot el líquid de rentat, excepte una petita porció que actuarà de tanca hidràulica.
- 9.- Destil·lar i arreplegar l'amoníac en un erlenmeyer de 100 ml, sobre 25 ml de HCl 0'1 N titulat, amb unes gotes d'indicador mixt.
- 10.- Després d'arreplegar uns 40-50 ml de destil·lat, comprovar que ja no destil·la amoníac, mitjançant un paper indicador.
- 11.- Valorar l'excés de l'àcid titulat amb dissolució titulada de NaOH 0'1 N.
- 12.- Periòdicament, efectuar un blanc amb el paper de fumar del tipus emprat. El volum corresponent d'àcid titulat emprat es considera que és el consumit a la valoració del blanc. Cal que el paper de fumar sigui sempre de la mateixa marca i tipus; en cas contrari, s'efectuarà una comprovació en blanc.
- 13.- Un cop acabat el procés, procedir a la neteja de l'aparell, procedint de la següent manera: continuant el pas de vapor, i amb les dues aixetes tancades, omplir amb aigua destil·lada l'embut: l'extrem del refrigerant es submergeix amb uns 100 ml d'aigua destil·lada. Es detura la producció de vapor i s'obre lleugerament l'aixeta de l'embut, tancant-la abans que tota l'aigua passi a l'interior de l'aparell. La reducció de pressió succiona l'aigua del vas a l'interior de l'aparell, netejant-lo. L'aixeta del tub de purga s'obre per buidar el líquid arreplegat a la camisa exterior. Es repeteix el procés tornant a permetre la producció de vapor.

CÀLCULS

Per expressar el resultat com contingut en nitrogen:

$$\%N = \frac{(V \cdot N - V' \cdot N') \cdot 14}{m} \cdot 100$$

a on:

% N = Contingut de nitrogen de la mostra, expressat en %

V = Volum, en ml de l'àcid titulat.

N = Normalitat de l'àcid titulat.

V' = Volum de base titulada emprat a la valoració.

N' = Normalitat de la base emprada a la valoració.

m = massa pesada de mostra, en mil·ligrams.

si la normalitat de la base = normalitat de l'àcid = 0'1000 N i el volum de l'àcid es de 25 ml, l'expressió anterior quedarà de la forma:

$$\%N = \frac{(25 - V') \cdot 14}{m} \cdot 100$$

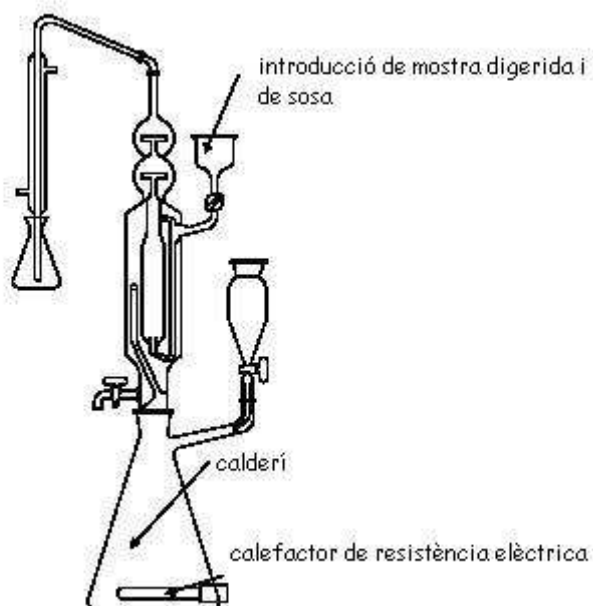
per expressar el resultat en contingut de proteïna bruta, cal multiplicar el contingut de nitrogen per un factor que depèn del tipus de mostra, i que, en general, té un valor que oscil·la al voltant de 6'25.

OBSERVACIONS

Hi han altres tipus de mescles catalítiques (les més emprades, a més de l'esmentada, són a base de seleni o de mercuri). L'objectiu de les mescles catalítiques es escurçar el temps de digestió, que de no usar-se mescla catalítica, es perllongaria varies hores. Cal tenir en compte que la majoria de les mescles catalítiques són tòxiques, i s'ha d'anar en compte de no respirar els seus vapors i evitar contacte amb la pell.

Per la dosificació de la mescla catalítica, podem fer una estimació experimental del volum aproximat de 2'5 grams i estalviar-nos haver de pesar-la cada cop.

Aparell Kjeldhal semimicro per determinació de nitrogen:



Qüestionari 5.1.- Determinació de la proteïna bruta

- 1.- Escriure les reaccions que tenen lloc en el decurs de la pràctica.
- 2.- Fer l'esquema gràfic del procediment analític.
- 3.- Deduir raonadament la fórmula utilitzada en els càlculs.
- 4.- Calcular el factor de conversió de nitrogen a proteïna per una mostra d'un petit pèptid format per la següent seqüència d'aminoàcids:
glicina-alanina-glicina-glicina
- 5.- Confeccionar el corresponent "butlletí d'anàlisi".