UNIWERSYTET GDAŃSKI
WYDZIAŁ CHEMII

Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 2

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA W MLEKU METODĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ

Analiza żywności

Gdańsk, 2008

I. Część teoretyczna

1. Wprowadzenie

Białka są głównymi składnikami żywności oraz niezbędnymi składnikami pokarmowym. Są także podstawowym elementem budowy tkanek, a ponadto wchodzą w skład enzymów i hormonów, regulując wiele ważnych procesów organizmu. Zawartość białka w produktach spożywczych jest jednym z czynników określających ich wartość odżywczą. Ilość tego składnika w surowcach wykorzystywanych w przetwórstwie żywności, decyduje często o prawidłowym przebiegu procesu produkcyjnego oraz o jakości gotowego wyrobu.

2. Budowa i właściwości białek

2.1. Struktura białek

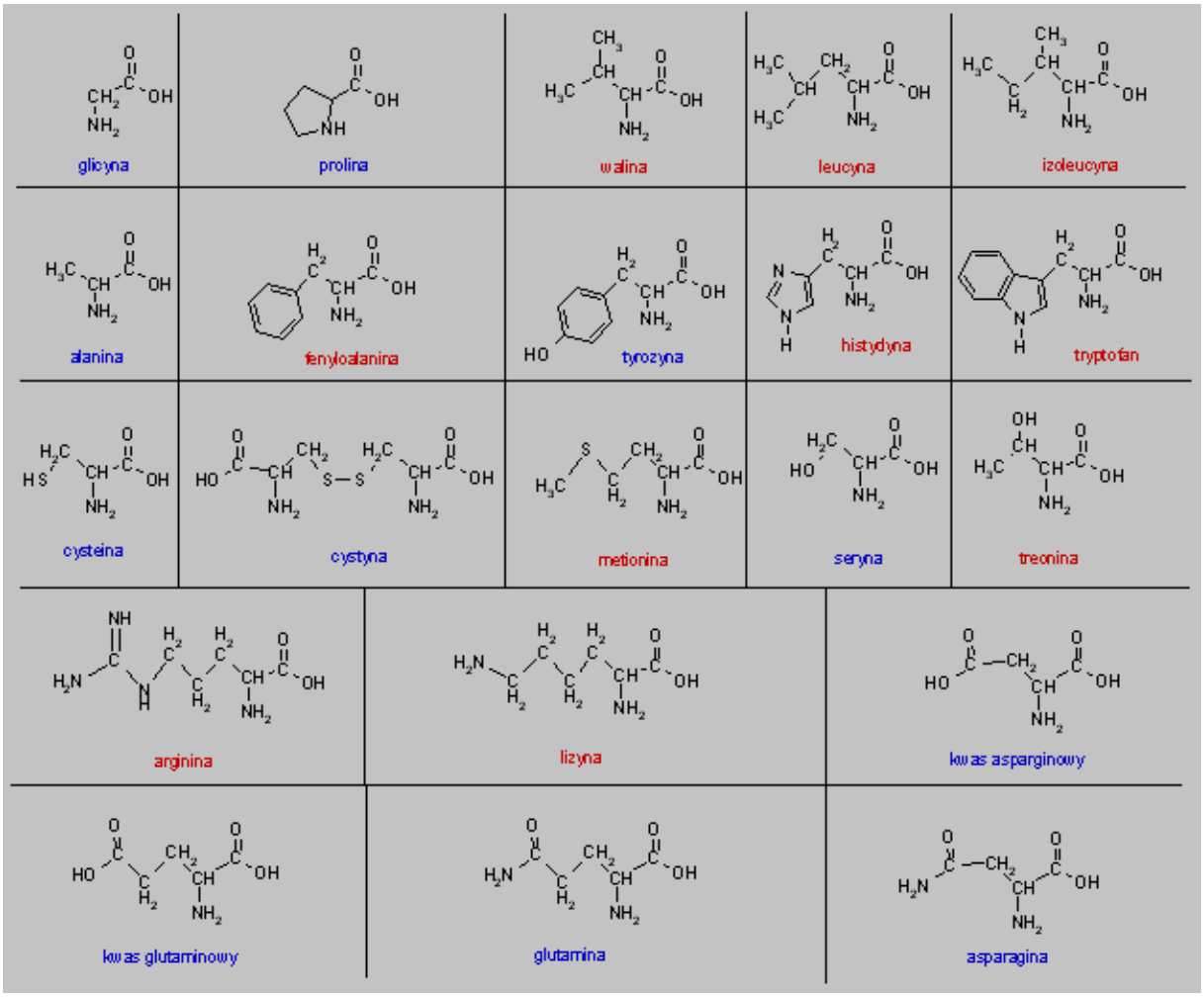
Białka są naturalnymi produktami zbudowanymi z reszt α-L-aminokwasowych (Rys. 1), połączonych w łańcuchy polipeptydowe wiązaniami *trans*-peptydowymi (jedynie przed resztami proliny występuje konfiguracja *cis*). Zawartość procentową podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białek przedstawia Tabela 1.

Tabela 1 Skład procentowy podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białka.

Pierwiastek	Procentowa zawartość w białku
węgiel	50-55%
tlen	20-23%
wodór	6-7%
azot	12-19%
siarka	0,2-3%
fosfor	0-6%

W białkach można znaleźć ponadto jony manganu, cynku, magnezu, żelaza, miedzi, kobaltu i innych metali.

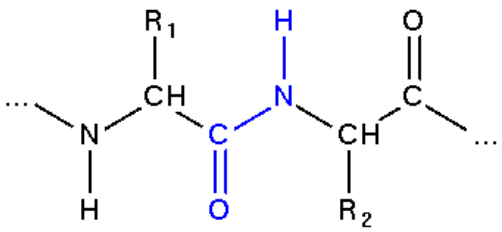
Organizm ludzki nie potrafi syntezować niektórych aminokwasów i muszą być one dostarczane do organizmu w pożywieniu, aby organizm mógł wytworzyć potrzebne białka. Są to tzw. aminokwasy egzogenne, na Rys. 1 zaznaczone kolorem czerwonym.



Rys. 1. Struktura aminokwasów wchodzących w skład białek. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy egzogenne.

Różnorodność białek wynika ze składu i sposobu uszeregowania reszt różnych aminokwasów w cząsteczce (struktury pierwszorzędowej). Chemiczne właściwości i wymiary reszt aminokwasów powiązanych w określonej sekwencji decydują o konformacji białek (kształcie łańcuchów polipeptydowych - strukturze drugorzędowej), o ich przestrzennym ułożeniu w cząsteczce (strukturze trzeciorzędowej), a także o wzajemnym oddziaływaniu podjednostek przy tworzeniu struktur czwartorzędowych. Białka o określonej konformacji mają charakterystyczne właściwości biologiczne oraz cechy funkcjonalne w żywności.

Struktura pierwszorzędowa, jak już wspomniano, określona jest składem i sekwencją aminokwasów tworzących łańcuch polipeptydowy:



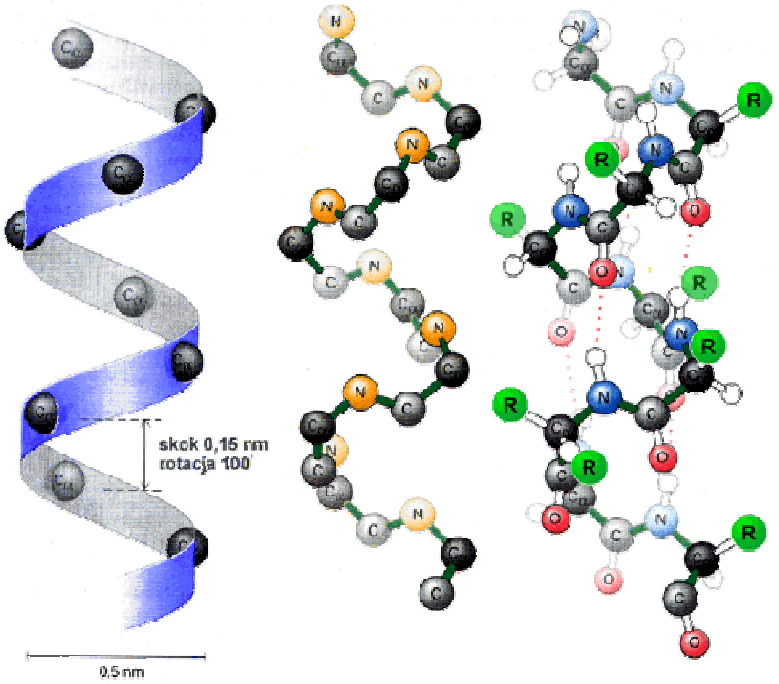
Podany powyżej schemat nie odzwierciedla rzeczywistej struktury łańcucha polipeptydowego. Po pierwsze nie uwzględnia naturalnych kątów między wiązaniami w cząsteczce, po drugie nie obrazuje w pełni właściwości wiązania amidowego, które ma w ok. 40% charakter wiązania podwójnego uniemożliwiającego rotację, a po trzecie nie bierze pod uwagę wielkości i charakteru chemicznego podstawników R - podstawowej struktury aminokwasów składających się na polipeptyd, a dalej cząsteczkę białka. Rodzaj aminokwasów wchodzących w skład białek jest z reguły podobny; zazwyczaj najwięcej jest reszt kwaśnych, a najmniej siarkowych, histydyny i tryptofanu. Niektóre z białek różnią się znacznie składem aminokwasów, np. kolagen i elastyny są bogate w reszty glicyny, alaniny i proliny oraz reszty hydroksyaminokwasów, kreatyna zawiera dużo reszt cystyny, a histony argininę i lizynę. Duży wpływ na konformację białka i jego oddziaływanie ze środowiskiem ma polarność reszt aminokwasów. Niepolarny charakter aminokwasów określa się ilościowo za pomocą ***hydrofobowości*** $\boldsymbol{F_{ta}}$ mierzonej zmianą energii swobodnej przy przeniesieniu aminokwasu z wody do mniej polarnego rozpuszczalnika

$$F_{ta} = RT\ln(N_W A_W / N_{org} A_{org}) \quad (1)$$

gdzie: N_W i N_{org} oznaczają rozpuszczalność odpowiednio w wodzie i rozpuszczalniku organicznym [mol/dm^3], a A_W i A_{org} – współczynniki aktywności.

Bardzo istotne znaczenie w technologii żywności ma także ***hydrofobowość powierzchniowa***, wynikająca z liczby niepolarnych reszt aminokwasów rozmieszczonych na powierzchni cząsteczki, gdyż wpływa ona na funkcjonalne właściwości białka.

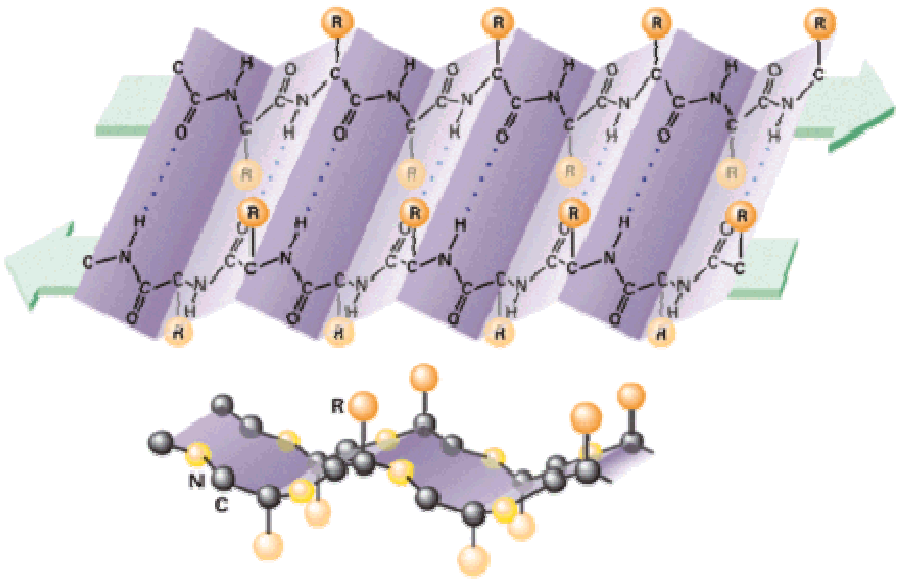
Struktura drugorzędowa - opisuje ułożenie łańcucha polipeptydowego w przestrzeni oraz łańcuchów względem siebie; są to lokalne struktury powstające w wyniku tworzenia się międzypeptydowego wiązania wodorowego pomiędzy tlenem grup karbonylowych C=O i wodorem grup iminowych NH. W wiązaniach wodorowych uczestniczą też odpowiednio usytuowane grupy hydroksylowe, amidowe, imidazolowe, karboksylowe i tiolowe łańcuchów bocznych aminokwasów. Wiązania wodorowe tworzą się także z dipolami wody obecnymi w środowisku. Długie łańcuchy polipeptydowe białek fibrylarnych przyjmują najczęściej regularną strukturę nazwaną ***helisą α*** (Rys. 2).



Rys. 2. Struktura drugorzędowa białka w postaci helisy α.

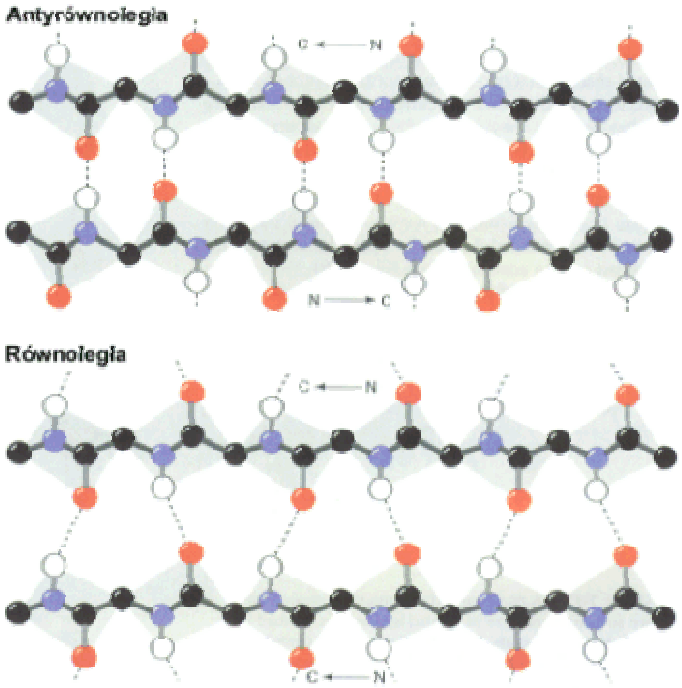
Grupa C=O każdego aminokwasu wiąże się wiązaniem wodorowym z grupą NH, aminokwasu przesuniętego względem niego o cztery reszty aminokwasowe i leżącego bezpośrednio nad nią. Każda reszta aminokwasowa jest przesunięta w stosunku do sąsiedniej o 0,15 nm wzdłuż osi helisy i obrócona o 100° wokół osi. Na jeden obrót helisy przypada zatem 3,6 reszt aminokwasowych. Skok helisy wynosi 0,54 nm. Helisa, podobnie jak każda śruba może być prawo lub lewoskrętna. W białkach występuje głównie struktura helisy prawoskrętnej. Helisa α charakteryzuje się polarnością; jest to dipol z wewnętrznym niepolarnym rdzeniem oraz polarną powierzchnią zewnętrzną (polarne reszty aminokwasowe wystawione na zewnątrz cząsteczki).

W białkach, oprócz struktury helisy α, występuje inny rodzaj struktury drugorzędowej, zwany ***strukturą β***, ***strukturą harmonijkową*** lub ***struktura beta-kartki*** (Rys. 3).



Rys. 3. Struktura drugorzędowa białka w postaci harmonijki (struktura β).

Sąsiadujące ze sobą łańcuchy mogą być ułożone w jednym kierunku (równoległa β harmonijka) lub w kierunku przeciwnym (antyrównoległa β harmonijka) (Rys. 4).



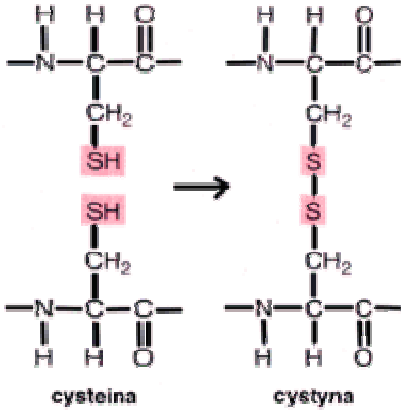
Rys. 4 Stuktura antyrównoległej i równoległej harmonijki β.

W uformowaniu struktury harmonijki β, może brać udział więcej niż jeden łańcuch polipeptydowy. Odległość sąsiednich aminokwasów wzdłuż osi cząsteczki wynosi 0,35 nm. Harmonijkę β stabilizują wiązania wodorowe pomiędzy grupami C=O i NH, leżącymi w

jednej płaszczyźnie obok siebie i niekoniecznie pochodzących ze wspólnego łańcucha polipeptydowego.

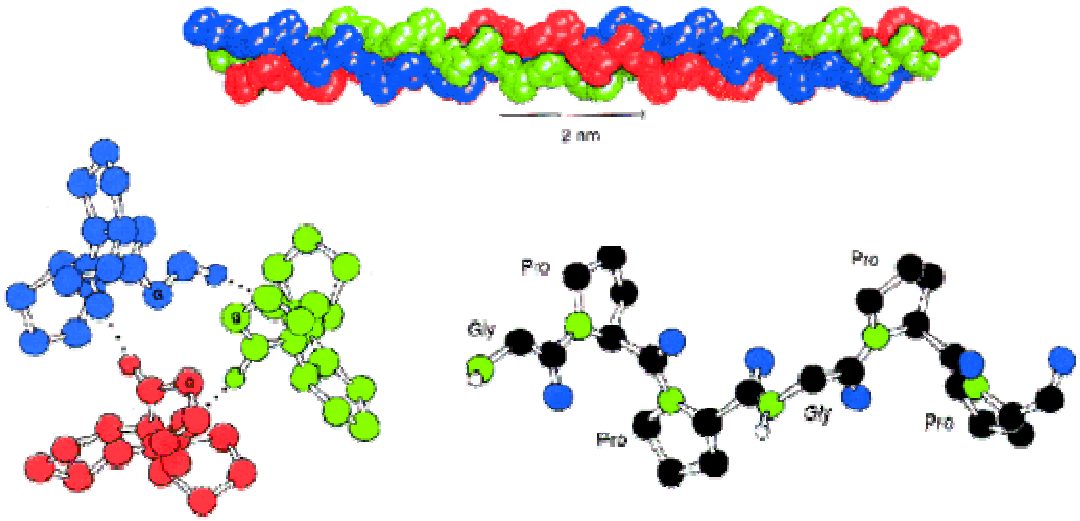
Helisa α i struktura β występują często w różnych rejonach tej samej cząsteczki, a między nimi znajdują się obszary o strukturze nieuporządkowanej.

Trzeci poziom organizacji strukturalnej białek, zwany **strukturą trzeciorzędową**, określa przestrzenne pofałdowanie łańcucha polipeptydowego. Strukturę trzeciorzędową stabilizują oddziaływania między resztami aminokwasowymi występującymi w różnych rejonach cząsteczki. Najtrwalsze są mostki disulfidowe - kowalencyjne wiązania między resztami cysteiny zlokalizowanymi w różnych miejscach cząsteczki.



Oprócz mostków disulfidowych istotną rolę w utrzymywaniu przestrzennego ukształtowania cząsteczek białka odgrywają wiązania wodorowe tworzące się między różnymi obszarami cząsteczki, wiązania hydrofobowe, w których powstaniu uczestniczą bogate w niepolarne reszty aminokwasowe obszary łańcucha (np. fenyloalaninę, leucynę), i mostki solne powstające między resztami aminokwasowymi naładowanymi dodatnio (np. lizyną) a resztami aminokwasowymi naładowanymi ujemnie (np. asparaginą).

Białka zbudowane z więcej niż jednego łańcucha polipeptydowego mają **strukturę czwartorzędową**, która określa wzajemny, na ogół złożony sposób interakcji wszystkich łańcuchów. Białka fibrylarne tworzą struktury czwartorzędowe w postaci np. superheliksów powstałych przez zwinięcie wokół wspólnej osi łańcuchów polipeptydowych, jak np. w kolagenie (Rys. 5). W obrębie pojedynczego łańcucha nie występują wiązania wodorowe, za to każdy z trzech łańcuchów helikalnych jest stabilizowany przez odpychanie się pierścieni pirolidynowych proliny i hydroksyproliny, ponadto tworzone są wiązania wodorowe pomiędzy sąsiadującymi aminokwasami każdego z łańcuchów. Trzy nici skręcają się wokół siebie tworząc strukturę superhelikalnej liny.



Rys. 5. Struktura trójniciowej helisy.

Innym przykładem czwartorzędowej struktury białka jest hemoglobina, zbudowana z czterech łańcuchów - dwóch łańcuchów α i dwóch β. O białkach takich mówi się, że mają budowę podjednostkową; w skład podjednostki wchodzić może jeden lub kilka łańcuchów białkowych.

Pod wpływem wielu czynników fizycznych i chemicznych następuje nieodwracalne zniszczenie struktury białka zwane procesem ***denaturacji***. Denaturacja białka dotyczy zmian w II, III- i IV-rzędowej strukturze białka natywnego, które prowadzą do utraty aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy charakterystycznej przy zachowaniu jego struktury pierwszorzędowej. Podczas denaturacji niszczone są wiązania wodorowe, a w obecności odczynników redukujących zerwaniu ulegają wiązania disulfidowe. Denaturacja może być procesem odwracalnym (tzw. renaturacja) lub nieodwracalnym. Podczas denaturacji zachodzą zmiany rozpuszczalności i przesunięcie punktu izoelektrycznego. Rozwinięcie łańcucha peptydowego może prowadzić do wzrostu lepkości, a także zmian absorpcji w nadfiolecie. Obserwuje się również często procesy agregacji i wytrącania, co jest związane ze zmianami stopnia hydratacji i rozpuszczalności białek. Najważniejszymi metodami fizycznymi denaturacji są: ogrzewanie, silne mieszanie, wytrząsanie, naświetlanie promieniowaniem nadfioletowym, rentgenowskim i jonizującym lub działanie ultradźwiękami. Denaturacja chemiczna zachodzi pod wpływem związków, które są zdolne do rozerwania wiązań wodorowych, na przykład pod wpływem roztworu mocznika o stężeniu 6-8 mol/dm^3 lub chlorku guanidyny o stężeniu 4 mol/dm^3, na skutek działania kwasów lub zasad (wartość pH poniżej 3 lub powyżej 9), soli metali ciężkich, a także 1% roztworu dodecylosiarczanu sodu (SDS) .

2.2. Właściwości białek

Struktura białek warunkuje ich fizyczne, chemiczne, a co z tym ściśle związane, biologiczne właściwości poszczególnych białek. Podstawowe struktury aminokwasów tworzących białko zawierają różne grupy funkcyjne - kwasowe, zasadowe, pierścienie aromatyczne, grupy alkoholowe, atomy siarki itp., stąd w zależności od pH roztworu w jakim się znajdują przybierają - jako całość - ładunek ujemny lub dodatni. Ładunek cząsteczki białka w roztworze o określonym stężeniu jonów wodorowych zależy od ilościowego stosunku aminokwasów zasadowych (lizyny, histydyny i argininy) i aminokwasów kwasowych (kwasu glutaminowego i asparaginowego). Od sumarycznego ładunku cząsteczki zależy z kolei jej stabilność w środowisku o różnym pH. W środowisku o wysokim stężeniu jonów wodorowych (niskie pH) cząsteczka białka zyskuje ładunek dodatni, podczas gdy w środowisku o niskim stężeniu jonów wodorowych (wysokie pH) ma ładunek ujemny. Wartość pH, przy którym sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi 0, nosi nazwę ***punktu izoelektrycznego***. W punkcie izoelektrycznym białko nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej oraz charakteryzuje się najniższą rozpuszczalnością w wodzie.

Białka nie posiadają charakterystycznej dla siebie temperatury topnienia. Na ogół są rozpuszczalne w wodzie. Niektóre z nich mogą rozpuszczać się w rozcieńczonych kwasach lub zasadach, jeszcze inne w rozpuszczalnikach organicznych. Posiadają zdolność wiązania cząsteczek wody. Efekt ten nazywamy ***hydratacją.*** Na rozpuszczalność polipeptydów ma wpływ stężenie soli nieorganicznych. Ich małe stężenie wpływa dodatnio na rozpuszczalność, jednak przy pewnym stężeniu następuje uszkodzenie otoczki solwatacyjnej, co powoduje wypadanie białek. Proces ten nie narusza struktury białka, jest odwracalny i nosi nazwę *wysalania białek.*

Właściwości funkcjonalne białek - wynikające z ich oddziaływań z wodą, innymi białkami, sacharydami, lipidami i jonami - umożliwiają osiągnięcie pożądanych cech sensorycznych żywności. Takie cechy funkcjonalne jak: lepkość, żelowanie, pęcznienie, zwilżanie się, rehydratacja, utrzymywanie wody, rozpuszczalność, pienienie się, tworzenie błon, ciast, włókien i emulsji, stabilizowanie emulsji powodują, że białka mogą wpływać na barwę, soczystość i teksturę produktów spożywczych, Odgrywają również istotną rolę przy rozdrabianiu, mieszaniu i formowaniu artykułów żywnościowych.

2.3. Podział białek

Ze względu na budowę i skład białka dzielimy na **białka proste** (zbudowane wyłącznie z aminokwasów) i **białka złożone** (posiadają obok aminokwasów, także części niebiałkowe, tzw. grupy prostetyczne.)

Białka proste dzielimy dodatkowo na:

- ***protaminy*** - posiadają charakter silnie zasadowy, charakteryzują się dużą zawartością argininy oraz brakiem aminokwasów zawierających siarkę, są dobrze rozpuszczalne w wodzie. Najbardziej znanymi protaminami są klupeina, salmina, cyprynina, ezocyna, gallina;
- ***histony*** - posiadają silny charakter zasadowy; są dobrze rozpuszczalne w wodzie, a także w środowisku słabo kwaśnym; w połączeniu z kwasem dezoksyrybonukleinowym są składnikami jąder komórkowych, występują także w czerwonych ciałkach krwi;
- ***albuminy*** - białka obojętne, spełniają szereg ważnych funkcji biologicznych: są enzymami, hormonami i innymi biologicznie czynnymi związkami. Dobrze rozpuszczają się w wodzie i rozcieńczonych roztworach soli; łatwo koagulują. Znajdują się w osoczu krwi, mleku oraz w mięśniach.
- ***globuliny*** - źle rozpuszczalne w wodzie, natomiast dobrze w rozcieńczonych roztworach soli; występują w dość dużych ilościach w płynach ustrojowych oraz tkance mięśniowej. Przedstawicielem tej klasy białek jest fibrynogen osocza, miozyny oraz immunoglobuliny;
- ***prolaminy*** - typowe białka roślinne, występują w nasionach. Ich charakterystyczną właściwością jest zdolność rozpuszczania się w 70% etanolu;
- ***gluteiny*** - typowe białka roślinne; posiadają zdolność rozpuszczania się w rozcieńczonych kwasach i zasadach; zawierają duże ilości kwasu glutaminowego, glutaminy oraz proliny.
- ***skleroproteiny*** - nierozpuszczalne wodzie i rozcieńczonych roztworach soli; posiadają włóknistą budowę dzięki czemu pełnią funkcję podporowe; do tej grupy białek należy kreatyna**;**

Białka złożone, ze względu na charakter grupy prostetycznej, dzielimy na:

- ***nukleoproteidy*** - połączone z nukleotydami i kwasami nukleinowymi; występują w jądrach komórkowych; rybonukleoproteidy są zlokalizowane przede wszystkim w cytoplazmie: w rybosomach, mikrosomach i mitochondriach, w niewielkich ilościach

także w jądrach komórkowych. Wirusy są zbudowane prawie wyłącznie z nukleoproteidów.

- ***fosfoproteidy*** **-** połączone z resztami kwasu fosforowego (ok. 1%); posiadają charakter kwaśny, zazwyczaj są połączone z kationami metali; należy do nich kazeina mleka, witelina żółtka jaja czy ichtulina ikry ryb;
- ***chromoproteidy-*** białka połączone z barwnikami. Należą tu hemoproteidy (hemoglobina, mioglobina, cytochromy katalaza, peroksydaza) zawierające układ hemowy oraz flawoproteidy.
- ***metaloproteidy-*** białka połączone z jednym lub kilkoma kationami metali np. Fe, Cu, Co, Ca, Mg, Mo czy Zn; atomy metalu stanowią grupę czynną wielu enzymów;
- ***glikoproteidy*** **-** ich grupę prostetyczną stanowią cukry, należą tu m.in. mukopolisacharydy (ślina). Glikoproteidy występują też w substancji ocznej i płynie torebek stawowych;
- ***lipoproteidy*** **-** połączenia białek z tłuszczami prostymi lub złożonymi, np. sterydami, kwasami tłuszczowymi. Lipoproteidy są nośnikami cholesterolu (LDL, HDL, VLDL). Wchodzą na przykład w skład błony komórkowej.

Inny podział białek związany jest z łatwością rozpuszczania się wodzie:

- **białka rozpuszczalne w wodzie** zwane inaczej hydrofilowymi, ze względu na kształt nazywane są także **globularnymi;** najczęściej spotykane są w cytoplazmie;
- **białka** nierozpuszczalne w wodzie, zwane też hydrofobowymi lub **fibrylarnymi,** przyjmują kształt włókien, znajdują się w błonach komórkowych.

W związku z podstawową funkcją biologiczną białka dzielimy na:

- **białka transportujące** - jest to m.in. hemoglobin, albumina osocza, lipoproteina;
- **białka magazynujące** - występujące np. w nasionach roślin;
- **białka strukturalne** - m.in. glikoproteiny, elastyna, kolagen i keratyna;
- **białka regulatorowe** - niektóre hormony jak insulina, glukagon czy hormon wzrostu ;
- t**oksyny** – występujące np. w jadzie węża;
- **przeciwciała**;
- **enzymy** - m.in. transferazy, hydrolazy, liazy;
- **białka aparatu kurczliwego** - aktyna i miozyna.

2.4. Białka w produktach spożywczych

Bogatym źródłem białka są jaja, mleko i produkty mleczne, mięso zwierząt hodowlanych oraz ryby. Wymienione produkty zawierają białka o wysokiej wartości odżywczej, tzw. białka pełnowartościowe, w skład których wchodzą wszystkie egzogenne aminokwasy w proporcjach zapewniających ich maksymalne wykorzystanie przez organizm ludzki. Większość artykułów pochodzenia roślinnego zaliczana jest do produktów niskobiałkowych, gdyż obecne w nich białka są niepełnowartościowe i posiadają niższą wartość odżywczą. Wprawdzie nasiona roślin strączkowych (szczególnie soi) zawierają znaczne ilości białka, ale jest ono niepełnowartościowe z powodu niewystarczającej zawartości metioniny. Także wartość odżywcza zbóż jest ograniczona z powodu niedostatecznej zawartości lizyny.

Dla wybranych produktów żywnościowych przedstawiono zawartość białka oraz jego wartość odżywczą wyznaczoną za pomocą wskaźnika aminokwasu ograniczającego (Tabela 2). Wskaźnik aminokwasu ograniczającego określa stopień wykorzystania aminokwasów danego białka do budowy białek ustrojowych, określa się go po porównaniu składu białka ze wzorcem FAO (zgodnie z Kodeksem Żywieniowym Światowej Organizacji Zdrowia FAO/WHO). Białka pełnowartościowe charakteryzują się wysoką wartością wskaźnika aminokwasu ograniczającego.

Tabela 2. Zawartość białka i jego wartość odżywcza w wybranych produktach spożywczych (*Maria Małecka, Wybrane metody analizy żywności, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003*).

Rodzaj produktu	Średnia zawartość białka w g/100 g produktu	Wskaźnik aminokwasu ograniczającego wg wzorca FAO
Jaja całe	12,0	100,0
Wołowina	21,0	100,0
Dorsz	16,0	99,0
Mleko krowie	3,0	98,0
Soja	35,0	78,0
Kasza jęczmienna	8,8	67,0
Fasola	22,0	55,0
Ziemniaki	1,7	54,0
Pieczywo pszenne	5,8	46,8
Pomidory	0,9	34,8
Pomarańcze	0,9	28,9
Orzechy włoskie	16,0	22,0

2.4.1. Białka zawarte w mleku

Skład mleka różnych gatunków zwierząt różni się dość znacznie (Tabela 3). Mniejsze różnice występują między poszczególnymi rasami i osobnikami. Mleko niektórych ssaków nie nadaje się do bezpośredniej konsumpcji przez człowieka, np. mleko fok zawiera 12 razy więcej tłuszczu, a także więcej białka niż mleko krowie. Istotnym składnikiem mleka jest laktoza - disacharyd nadający mleku charakterystyczny słodkawy posmak.

Tabela 3. Średni skład mleka różnych zwierząt (g/100 ml) (*D. Miller Ben Shaul, Skład mleka dzikich zwierząt. Analiza mleka zwierząt i metody chowu. International Zoo Yearbook, 1959).*

Gatunek	Tłuszcz	Białko	Laktoza
Słoń	22,1	3,2	7,4
Szympans	3,7	1,2	7,0
Człowiek	4,0	1,3	6,5
Koń	1,6	2,7	6,2
Owca	9,0	4,7	5,8
Zebra	4,8	3,0	5,3
Wielbłąd	5,4	3,8	5,1
Świnia	5,0	3,7	5,0
Kot	5,0	7,2	4,9
Krowa	3,7	3,3	4,8
Kangur	4,0	3,9	4,7
Koza	4,1	3,7	4,2
Pies	11,8	8,7	3,3
Szczur	12,0	9,2	3,3
Niedźwiedź polarny	9,5	9,6	3,0
Szara foka	53,2	11,2	2,6
Bóbr	19,8	9,0	2,2
Królik	10,5	15,5	2,0
Delfin	34,9	10,6	0,9

Białka mleka dzieli się ze względu na ich budowę, rolę biologiczną i właściwości funkcjonalne na kazeiny, białka serwatki oraz otoczki kuleczek tłuszczowych (Tabela 4).

Tabela 4 Zawartość białek w mleku krowim (http://www.food-info.net/pl/qa/qa-fp1.htm).

Białko	g/kg białka	Udział w całkowitej zawartości białka
Kazeina		
α-s1-kazeina	10.0	30.6
α-s2-kazeina	2.6	8.0
β-kazeina	10.1	30.8
κ-kazeina	3.3	10.1
Całkowita zawartość kazeiny	26.0	79.5
Białka serwatki		
α-laktoalbumina	1.2	3.7
β-laktoglobulina	3.2	9.8
Albumina surowicy krwi	0.4	1.2
Immunoglobuliny	0.7	2.1
Pozostałe	0.8	2.4
Całkowita zawartość białek serwatki	6.3	19.3
Kuleczki tłuszczowe	0.4	1.2
Całkowita zawartość białka	32.7	100

Kazeiny są heterogeniczną grupą fosfoprotein, złożoną z 20 składników; są to najważniejsze białka mleka krowiego, jego zawartość wynosi 2,4-2,6%. Kazeiny strącają się z surowego, odtłuszczonego mleka w temp. 20ºC przy pH 4,6; w mleku występują w postaci miceli tworzących roztwór koloidalny. Kuliste micele mają kształt maliny (średnica 20-300 nm), a ich masa micelarna wynosi 10^7-10^{10}. Micele posiadają porowatą strukturę i są wyraźnie widoczne pod mikroskopem; cząstki miceli wypełniają mniej niż połowę jej objętości. Taka budowa sprzyja wiązaniu wody, jonów, laktozy i enzymów. W 1 ml mleka jest około $7 \cdot 10^{13}$ miceli, które stanowią łącznie od 5 do 6% objętości mleka. Micele utworzone są z podjednostek złożonych z 25-30 cząsteczek kazeiny α, β, κ, których domeny hydrofobowe są zwrócone do wnętrza, a hydrofilowe w kierunku rozpuszczalnika. W mleku krowim 40% kazeiny stanowi frakcja α, 30% frakcja β, a dalsze 10% frakcja κ. W skład każdej miceli wchodzi od 300 do 500 podjednostek połączonych jonami wapniowymi, fosforanowymi i cytrynianowymi.

Białka serwatki. Serwatka, tzw. odciek pozostający po strąceniu kazein z chudego mleka, jest mieszaniną czterech głównych składników stanowiących około 80% frakcji (β-laktoglobuliny, α-laktoalbuminy, immunoglobulin oraz albumin osocza) oraz wielu innych występujących w małych ilościach, w tym dużej liczby enzymów. W mleku występują w rozproszeniu i są bardzo trudne do wydzielenia w postaci skrzepu. Białka te nie zawierają fosforu, natomiast są bogate w lizynę. β-laktoglobulina ulega denaturacji podczas silnego ogrzania, co ma niekorzystny wpływ na wydzielanie skrzepu przy pomocy podpuszczki. α-Laktoalbumina jest bardziej odporna na wysokie temperatury; pasteryzacja (80-90°C) nie powoduje jej koagulacji, stąd pozostaje ona w serwatce. Cząsteczki albuminy osocza w środowisku kwaśnym asocjują. Immunoglobuliny (makroglobuliny) są złożoną mieszaniną białek o dużej masie cząsteczkowej i właściwościach odpornościowych. W dużych ilościach występują w siarze. Obserwuje się je również u krów z zapaleniem wymienia (mastitis). Mleko mastitisowe to mleko od krów z zapaleniem wymienia. Produkowane są przez komórki plazmatyczne występujące w gruczołach mlecznych. Wyróżnia się podstawowe 3 grupy immunoglobulin: typu G (IgG), które stanowią 90% całości globulin mleka bydła (u ludzi dominują IgA), o masie cząsteczkowej 150-170 tys., typu M (IgM) o masie cząsteczkowej 0,9-1 mln. oraz typu A (IgA) o masie cząsteczkowej 300-500 tys. Pasteryzacja mleka niszczy tę frakcję białek.

W mleku zidentyfikowano około 60 rodzimych enzymów we frakcji kazein, wśród białek serwatki i w białkowej otoczce kuleczek tłuszczowych. Niektóre z nich mają istotne znaczenie w technologii mleczarstwa (m.in. peroksydaza, fosfataza alkaliczna, plazmina, lipazy).

3. Metody oznaczania zawartości białka

Ilościowe oznaczanie ilości białka w produktach żywnościowych opiera się głównie na obecności w ich strukturze atomów azotu i przeprowadza się metodami bezpośrednimi i pośrednimi.

Do bezpośrednich metod oznaczania białka należą metody spektrofotometryczne (metoda biuretowa i metoda Lovry'ego), nefelometryczne oraz refraktometryczne.

Metody pośrednie (np. metoda Kjeldahla) polegają najczęściej na określeniu zawartości azotu, a następnie przeliczeniu go na białko przy użyciu odpowiednich współczynników przeliczeniowych. W produktach spożywczych oznacza się tzw, azot ogólny, w skład którego obok azotu białkowego wchodzi azot pochodzący z produktów odbudowy białek, a także azot z innych związków organicznych. Przeciętna zawartość azotu w białkach wynosi około 16%, dlatego też dla tzw. białka surowego współczynnik przeliczeniowy wynosi 6,25 (100:16=6,25). Ponieważ białka produktów spożywczych różnią się między sobą zarówno składem jakościowym jak i ilościowym białek, odmienna jest także zawarta w nich ilość azotu. Dlatego też dla poszczególnych produktów spożywczych stosuje się różne wskaźniki przeliczeniowe, i tak np. dla białka jaja kurzego – 6,67, białka mleka – 6,38, białka mięsa – 6,25 czy dla białka żyta, pszenicy i owsa – 5,70. Stosowane mnożniki podaje się obok oznaczonej zawartości białka, np. dla mleka N 6,38. Metody pośrednie można stosować tylko wówczas gdy badany produkt nie zawiera innych związków azotowych lub zawiera ich bardzo mało.

Według innego podziału metody oznaczania białka dzielą się na następujące grupy:

- metoda Kjeldahla,
- metody oparte na wbudowaniu barwnika do białka,
- miareczkowanie formolowe,
- metody spektrofotometryczne,
- metody immunologiczne.

3.1. Metoda Kjeldahla

Najczęściej stosowaną metodą oznaczania azotu w artykułach spożywczych jest - znana od 1883 i niewiele modyfikowana - metoda Kjeldahla; jest to także metoda referencyjna. Polega ona na przeprowadzenie mineralizacji produktu ze stężonym kwasem siarkowym(VI) („na mokro"), zalkalizowaniu roztworu, a następnie oddestylowaniu i jakościowym oznaczeniu powstałego amoniaku. Analiza przebiega w trzech etapach:

- mineralizacja próbki,
- destylacja amoniaku z parą wodną,
- miareczkowanie.

Podczas *mineralizacji* próby w kolbie Kjeldahla następuje utlenianie związków organicznych do ditlenku węgla, wody i amoniaku. Mineralizację prowadzi się przy pomocy stężonego kwasu siarkowego w obecności katalizatorów. Jako katalizatory najczęściej stosuje się siarczan(VI) miedzi(II) lub rtęci(II), albo mieszaninę selenowo-miedziową. Czasami stosuje się środki podwyższające temperaturę spalania, np. siarczan(VI) sodu lub potasu oraz środki utleniające. Powstały w czasie mineralizacji amoniak tworzy w środowisku kwasu siarkowego(VI) sól amonową:

$$2NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$$

Sumaryczny przebieg powyższych reakcji przedstawia następujący schemat:

$$n \text{ białko-C-}NH_2 + x\ H_2SO_4 \rightarrow x\ CO_2 + y\ (NH_4)_2SO_4 + z\ SO_2$$

Siarczan(VI) amonu rozkłada się po zalkalizowaniu roztworu wodorotlenkiem sodu:

$$(NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \rightarrow 2\ NH_3 + Na_2SO_4 + 2\ H_2O$$

Wydzielony amoniak oddestylowuje się do odbieralnika zawierającego roztwór słabego kwasu, np. kwasu borowego występującego w nadmiarze. Następuje wiązanie amoniaku w formę soli amonowej kwasu borowego

$$NH_3 + H_3BO_3 \rightarrow NH_4H_2BO_3$$

Związany amoniak jest następnie oznaczany przez miareczkowanie mianowanym roztworem silnego kwasu, np. kwasu solnego lub kwasu siarkowego.

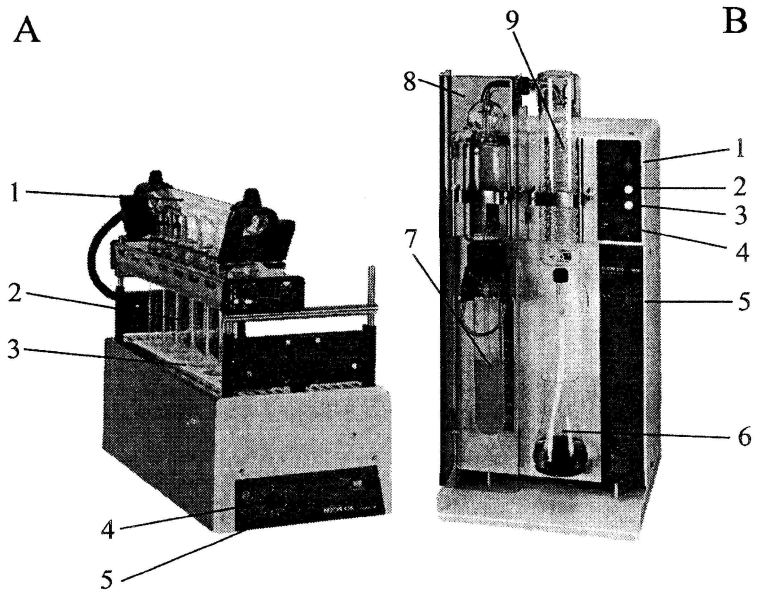
$$NH_4H_2BO_3 + HCl \rightarrow NH_4Cl + H_3BO_3$$

$$2\ NH_4H_2BO_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 + 2\ H_3BO_3$$

Ilość azotu w próbie oblicza się z ilości mililitrów kwasu zużytego do miareczkowania.

Metodą Kjeldahla, oprócz azotu zawartego w białkach, oznaczany jest azot pochodzący z innych związków (z jonów amonowych, grup amidowych, aminowych oraz iminowych); nie oznaczany jest azot pochodzący z azotanów(III), azotanów(V) oraz azot aromatycznych pierścieni heterocyklicznych. Do oznaczeń należy pobrać taką próbę, aby zawierała około 0,02 g azotu (z reguły jest to około 0,5-1,5 g produktu).

Zasada metody Kjeldahla została wykorzystana do skonstruowania automatycznego urządzenia służącego do oznaczania azotu. Zestaw obejmuje aparat do mineralizacji, jednostkę do destylacji lub destylacji i automatycznego miareczkowania i pozwala na wykonanie ponad stu analiz dziennie (Rys. 6).



Rys. 6. Zestaw do oznaczania białka metodą Kjeldahla firmy Chi: A – jednostka do mineralizacji,: 1 – odprowadzenie oparów kwasu siarkowego(VI), 2 – termoodporne probówki ze mineralizowanymi próbkami, 4 – płaszcz grzejny, 5 – włącznik; B- aparat do destylacji z parą wodną: 1 – włącznik, 2 – przycisk Start, 3 – przycisk dozujący roztwór NaOH, 4 – pokrętło ustawienia czasu destylacji, 5 – regulacja natężenia pary wodnej, 6 – odbieralnik destylatu, 7 – probówka z destylowaną próbką, 8 – osłona, 9 – chłodnica wodna (Mirosława Klepacka, Analiza żywności, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005).

3.2. Metody oparte na wbudowaniu barwników

Do oznaczania białka stosuje się także metody oparte na tworzeniu barwnych kompleksów białek z pewnymi organicznymi barwnikami, np. czernią amidową 10B, oranżem G, błękitem Coomassie G-250, które mogą być ilościowo wbudowane do białek. W pewnych ściśle określonych warunkach, zwykle poniżej punktu izoelektycznego białka, białko i barwnik reagują ilościowo tworząc nierozpuszczalne kompleksy, które można oddzielić poprzez wirowanie lub sączenie od reszty roztworu. Natężenie barwy uzyskanego roztworu zależy od ilości barwnika niezwiązanego z białkiem (barwnik dodawany jest w nadmiarze), czyli jest odwrotnie proporcjonalne do ilości białka w analizowanej próbce.

Zasada wbudowywania się czerni amidowej 10B do białek została wykorzystana w aparacie Pro-Milk, stosowanym do szybkiego oznaczania białek mleka w przemyśle mleczarskim.

3.3. Miareczkowanie formolowe

Metoda formolowa polega na miareczkowym oznaczeniu ilości jonów wodorowych uwolnionych na skutek reakcji formaldehydu z resztami zasadowymi aminokwasów w łańcuchu białkowym. Rezultatem tej reakcji jest przemiana grup $–NH_2$ w grupy $–N=CH_2$. Prowadzi to do uwalniania jonów wodorowych, które miareczkuje się ściśle mianowanym roztworem wodorotlenku sodu.

Oznaczenie prowadzi się w dwóch etapach. W pierwszym etapie miareczkuje się próbkę wodorotlenkiem sodu wobec fenoloftaleiny (do pH > 8,3); zostają zobojętnione wszystkie wolne grupy α-aminowe. W drugim etapie dodaje się formalinę (także zobojętnioną), która powoduje uwalnianie jonów wodorowych z grup ε-aminowych lizyny (grupy te nie mogą być zobojętnione w pierwszym etapie miareczkowania, ponieważ aż do pH 9,8 występują wyłącznie w formie zjonizowanej). Uwolnione jony wodorowe miareczkuje się ponownie roztworem NaOH. Udział aminokwasów, w tym lizyny, jest w białku stały (uwarunkowany genetycznie), dlatego też ilość jonów wodorowych uwalnianych po dodaniu formaliny jest proporcjonalna do ilości białka w produkcie.

3.4. Metody spektrofotometryczne

Do metod spektrofotometrycznych należy przede wszystkim metoda biuretowa oraz metoda Lovry'ego.

W ***metodzie biuretowej*** wykorzystano reakcję zachodzącą w środowisku zasadowym pomiędzy wiązaniami peptydowymi a jonami miedzi Cu^{2+}, w wyniku której powstają barwne kompleksy. Stosowanie tej metody jest ograniczone obecnością soli amonowych, które również dają reakcję barwną z jonami miedzi.

Metoda Lovry'ego służy do oznaczania białek rozcieńczonych. Oznaczenie przebiega w dwóch etapach; w pierwszym następuje przyłączenie jonów miedzi do białka (reakcja biuretowa), w drugim etapie kompleks białkowo-miedziowy redukuje odczynnik Folina-Ciocolteau fosforomolibdeniano-fosforowolframowy. W wyniku reakcji tworzy się barwny kompleks, którego absorbancja (mierzona przy 750 nm) jest proporcjonalna do stężenia białka.

Metody spektrofotometryczne wykorzystuje się do oznaczania frakcji rozpuszczalnej w białkach, które decydują o właściwościach funkcjonalnych surowca. Ma to szczególne znaczenie w analizie jakości preparatów białek roślinnych i zwierzęcych oraz przy ocenie mięsa ryb składowanego przez dłuższy czas w warunkach zamrażalniczych.

Oznaczanie ilości białka rozpuszczalnego polega na wyekstrahowaniu białka z próbki za pomocą odpowiedniego buforu, a następnie określeniu ilości białka za pomocą

bezpośredniego pomiaru spektrofotometryczngo uzyskanego roztworu, bądź po przeprowadzeniu go w barwny kompleks stosując odczynnik biuretowy (stężenie białka 1-10 mg/ml) czy odczynnik Folina-Ciocolteau (stężenie białka 10-100 μg/ml).

Także analizy ilościowe ***metodą spektrofotometrii w zakresie nadfioletu (UV)*** pozwalają oznaczyć zawartość białka w analizowanym produkcie. Białka, zawierają aminokwasy aromatyczne (fenyloalaniną, tryptofan oraz tyrozyna), które wykazują zdolność pochłaniania wiązki światła monochromatycznego z zakresu UV, stąd mierzona absorbancja jest proporcjonalna do zawartości białka w próbce.

Również ***promieniowanie w zakresie podczerwieni (IR)*** wykorzystywane jest do oznaczania zawartości białka. Selektywne pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego z tego zakresu przez odpowiednie grupy białek było podstawą konstrukcji urządzeń o nazwie Infratec firmy Tecator, w których oprócz białek ogółem oznaczana jest woda, tłuszcz i kolagen w mięsie.

3.5. Metody immunologiczne

Ostatnio coraz częściej do oznaczania białek stosuje się metodę immunoenzymatyczną (ELISA), która polega na utworzeniu połączeń specyficznych przeciwciał z analizowanym białkiem oraz odpowiednim enzymem. Enzym ten, reagując z bezbarwnym substratem, przeprowadza go w barwny związek, którego stężenie można oznaczyć spektrofotometrycznie. Metoda ELISA jest bardzo czułą metodą, pozwalającą oznaczyć nie tylko poszczególne klasy białek w badanym produkcie, ale także określić stopień ich denaturacji. Z uwagi na to, że oznaczenie końcowe polega na pomiarze absorbancji metoda ta zaliczana jest także do metod spektrofotometrycznych.

4. Spektrofotometria UV/Vis

4.1. Wprowadzenie

W metodach spektroskopowych sygnał analityczny powstaje w wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego lub korpuskularnego na badana próbkę. Promieniowanie elektromagnetyczne zachodzi wskutek okresowych zmian pola elektromagnetycznego rozchodzących się w przestrzeni ze skończoną prędkością i związanych z przenoszeniem energii. Promieniowanie elektromagnetyczne składa się z fotonów, czyli kwantów promieniowania (kwantów energii). Charakterystyczną ich własnością jest energia

$$E = h \cdot \nu \qquad (2)$$

gdzie: E - energia fotonu wyrażona w jednostkach energii (zgodnie z układem SI w dżulach, poprzednio w ergach lub w kaloriach: 1J = 10^7 erg = 0,2389 cal); h - stała uniwersalna Plancka - $6{,}626 \cdot 10^{-34}$ J·s ($6{,}626 \cdot 10^{-27}$erg·s, $1{,}583 \cdot 10^{-34}$ cal·s); ν - częstotliwość drgań promieniowania emitowanego lub absorbowanego, wyrażona w hercach (Hz).

Promieniowanie elektromagnetyczne określa się także przy pomocy długości fali

$$\lambda = \frac{c}{\nu} \qquad (3)$$

gdzie: c - prędkość światła w próżni ($3 \cdot 10^8$ m/s). Wzory (2) i (3) można przekształcić

$$E = h\frac{c}{\lambda} \qquad (4)$$

Spektroskopia molekularna (cząsteczkowa) obejmuje badanie widm cząsteczkowych. W ogólnym pojęciu widma cząsteczkowego są zawarte trzy rodzaje widm promieniowania elektromagnetycznego: widmo rotacyjne, widmo oscylacyjno-rotacyjne oraz elektronowo-oscylacyjno-rotacyjne danej cząsteczki.

Całkowitą energię cząsteczki E można zatem przedstawić jako sumę trzech składników odpowiadających trzem rodzajom ruchu w cząsteczce:

$$E = E_e + E_{os} + E_{rot} \qquad (5)$$

gdzie: E_e - energia elektronowa (związana z ruchem elektronów),

E_{os} - energia oscylacyjna (związana z ruchem oscylacyjnym),

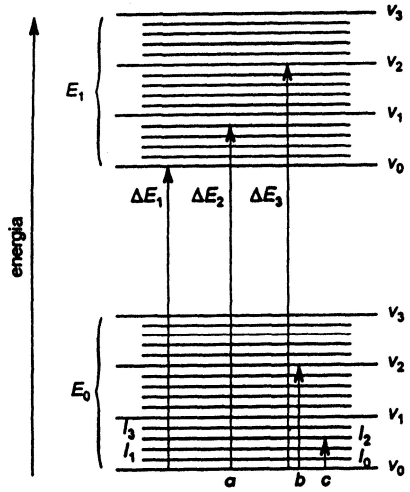
E_{rot} - energia rotacyjna (związana z ruchem rotacyjnym).

Energia elektronowa w cząsteczce (wartość podobna jak w atomie) jest wielokrotnie większa od energii oscylacyjnej, a ta z kolei jest większa od energii rotacyjnej. Różnice pomiędzy poziomami elektronowymi wynoszą kilka elektronowoltów, pomiędzy poziomami oscylacyjnymi dziesiąte i setne części eV, a pomiędzy poziomami rotacyjnymi tysięczne części eV. Stosunek wartości poszczególnych rodzajów energii jest w przybliżeniu następujący:

$$E_e : E_{os} : E_{rot} = 1000 : 10 : 1$$

Znaczne różnice wartości poszczególnych rodzajów energii powodują, że odpowiednie widma pojawiają się w różnych zakresach spektralnych. Pochłonięcie kwantów promieniowania z zakresu dalekiej podczerwieni jako najmniej energetycznego może powodować tylko zmiany energii rotacji; powstaje wtedy widmo rotacyjne. Zaabsorbowana energia nie wystarcza do zmiany energii oscylacji i energii elektronowej. Promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni, o większej energii, powoduje przejścia pomiędzy poziomami

oscylacyjnymi. Ponieważ zmianom energii oscylacyjnej towarzyszą zmiany energii rotacyjnej, powstają widma oscylacyjno-rotacyjne. Zmiany energii elektronowej może wywołać tylko zaabsorbowanie promieniowania z zakresu widzialnego i nadfioletu. Ponieważ zmianom tej energii towarzyszą zazwyczaj zmiany energii oscylacyjnej i rotacyjnej, powstaje widmo elektronowo-oscylacyjno-rotacyjne (Rys. 7).



Rys. 7 Schemat przejść elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych w cząsteczce dwuatomowej. E - poziomy elektronowe, v- poziomy oscylacyjne, I - poziomy rotacyjne, a - przejścia elektronowe, b - przejścia oscylacyjne, c - przejścia rotacyjne.

Energie rotacji, oscylacji i elektronowa mogą przyjmować tylko wartości określone warunkami kwantowymi, z których podstawowe można sformułować następująco:

- Aby nastąpiła absorpcja promieniowania muszą istnieć takie dwa stany kwantowe cząsteczki ψ_m i ψ_n , których różnica energii odpowiada energii promieniowania padającego $h\nu$:

$$E_n - E_m = h\nu_{n,m} = \Delta E \qquad (6)$$

Dla 1 mola substancji ΔE przyjmie wartość:

$$\Delta E = h \cdot \nu \, N_A = \frac{hcN_A}{\lambda} = \frac{1{,}2 \cdot 10^8}{\lambda} J/mol \qquad (7)$$

gdzie: N_A - stała Avogadra, h - stała Plancka, λ - długość fali w nm, ν - częstotliwość promieniowania.

- Absorpcja promieniowania musi być związana ze zmianą momentu dipolowego cząsteczki μ. W sposób ilościowy warunek ten opisuje tzw. moment przejścia między stanami elektronowymi, określający prawdopodobieństwo absorpcji dopasowanego, zgodnie z poprzednim warunkiem, fotonu:

$$R_{n,m} = \int \Psi_n \cdot \mu \cdot \Psi_m d\tau \qquad (8)$$

gdzie: $R_{n,m}$ - moment przejścia, Ψ_n, Ψ_m - elektronowe funkcje stanów, między którymi zachodzi przejście elektronów, μ - moment dipolowy cząsteczki, $d\tau$ - element objętości.

Przejście elektronowe dozwolone jest wtedy, gdy $R_{n,m} \neq 0$. Przejścia spełniające reguły wyboru noszą nazwę przejść dozwolonych, a niespełniające reguł wyboru - przejść wzbronionych. Miarą intensywności pasma absorpcji jest wartość molowego współczynnika absorpcji ε_{max}, przy długości fali w maksimum absorpcji λ_{max}. Wartość ε_{max} jest miarą prawdopodobieństwa przejścia i dla przejść wzbronionych ε przyjmuje małe wartości (rzędu kilku l/mol·cm) a dla przejść dozwolonych wartości duże (do $1{,}5 \cdot 10^5$ l/mol·cm).

4.2. Prawa absorpcji

Promieniowanie elektromagnetyczne, przechodząc przez roztwór, może ulegać: absorpcji, odbiciu i rozproszeniu. Natężenie wiązki padającej wyraża się wzorem:

$$I_o = I_a + I_t + I_r \qquad (9)$$

gdzie: I_a - natężenie promieniowania zaabsorbowanego przez roztwór,

I_t - natężenie promieniowania przechodzącego przez roztwór,

I_r -natężenie promieniowania odbitego i rozproszonego.

Ponieważ pomiary absorpcji promieniowania wykonuje się najczęściej w stosunku do roztworu porównawczego (odnośnika), którego skład powinien być zbliżony do składu próbki i który znajduje się w identycznych kuwetach, promieniowanie odbite i rozproszone (I_r) w obu przypadkach jest jednakowe i może być pominięte. Roztwór odnośnika w warunkach pomiaru nie absorbuje promieniowania, gdyż nie zawiera substancji oznaczanej i można przyjąć, że natężenie wiązki promieniowania przechodzącej przez roztwór odnośnika jest równe natężeniu wiązki padającej na roztwór badanej próbki. Stosunek natężenia promieniowania przechodzącego przez próbkę (I_t) do natężenia promieniowania padającego na próbkę (I_a) (równego natężeniu promieniowania przechodzącego przez odnośnik), nazywamy transmitancją lub przepuszczalnością i oznaczamy

$$T = \frac{I_t}{I_o} \qquad (10)$$

Transmitancję najczęściej wyrażamy w procentach

$$T = \frac{I_t}{I_o} \cdot 100\% \qquad (11)$$

Może ona przybierać wartości od 0% do 100%.

Natężenie promieniowania zaabsorbowanego zależy od stężenia roztworu i od grubości warstwy absorbującej. Matematycznie zależność tę opisuje prawo Lamberta-Beera, które w postaci logarytmicznej przyjmuje postać

$$A = \lg \frac{I_o}{I_t} = kcl \qquad (12)$$

Logarytm dziesiętny stosunku natężenia wiązki promieniowania przechodzącego przez odnośnik (I_o) do natężenia wiązki promieniowania przechodzącego przez badaną próbkę (I_t) nazywany jest absorbancją. Przyjmuje ona wartości z przedziału od 0 do nieskończoności.

Gdy stężenie roztworu jest wyrażone w mol/l, a grubość warstwy jest wyrażona w cm, współczynnik proporcjonalności k nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji (ε). Wzór (12) przyjmuje wówczas postać:

$$A = \varepsilon\, l\, c \qquad (13)$$

Jest to podstawowe prawo spektrofotometrii absorpcyjnej.

Zależność między absorbancją a transmitancją wyraża zależność:

$$A = \lg \frac{1}{T} \qquad (14)$$

lub gdy transmitancja jest wyrażona w procentach

$$A = \lg \frac{100\%}{T} \qquad (15)$$

Zależność odwrotną tj. transmitancji od absorbancji wyraża wzór

$$T = \frac{1}{10^A} \quad \text{a w procentach} \quad T = \frac{100}{10^A} \qquad (16)$$

Czułość metody spektrofotometrycznej określa współczynnik proporcjonalności z prawa Lamberta-Beera:

- molowy współczynnik absorpcji właściwej (ε) dla stężenia wyrażonego w mol/l, którego jednostką jest l/(mol· cm);
- masowy współczynnik absorpcji (a) dla stężenia (ρ) wyrażonego w g/l, którego jednostką jest l/(g · cm). Liczbowo współczynnik absorpcji właściwej jest równy absorbancji roztworu substancji oznaczanej o stężeniu 1 g/l, w kuwecie o grubości 1 cm.

$$a = \frac{\varepsilon}{M} \qquad (17)$$

Absorpcję właściwą wyraża się w ml/(μg · cm); jest ona wtedy liczbowo równa absorbancji roztworu oznaczanej substancji o stężeniu 1 μg/ml (dawniej ppm) w kuwecie o grubości warstwy 1 cm.

Jeżeli w badanym roztworze znajduje się kilka składników, oznaczanie spektrofotometryczne można wykonać poprawnie tylko wtedy, gdy spełnione jest prawo addytywności absorbancji, wg którego absorbancja mieszaniny jest równa sumie absorbancji poszczególnych składników, a absorbancja pojedynczego składnika jest taka, jakby tylko on jeden znajdował się w badanej próbce. Matematycznie prawo to określają następujące wzory:

$$A = A_1 + A_2 + \ldots A_n = \sum_{i=1}^{n} A_i \qquad (18)$$

$$A = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \ldots \varepsilon_n c_n l = \sum_{i=1}^{n} \varepsilon_i c_i l \qquad (19)$$

a dla stężenia masowego;

$$A = a_1 \rho_1 l + a_2 \rho_2 l + \ldots a_n c \rho_n l = \sum_{i=1}^{n} a_i \rho_i l \qquad (20)$$

gdzie: A - absorbancja mieszaniny,

A_1, A_2, A_n - absorbancje poszczególnych składników,

c_1, c_2 , c_n - stężenia molowe poszczególnych składników,

ε_1, ε_2, ε_n - molowe współczynniki absorpcji poszczególnych składników,

a_1, a_2, a_n - współczynniki absorpcji właściwej poszczególnych składników,

ρ_1, ρ_2, ρ_n - stężenia masowe poszczególnych składników.

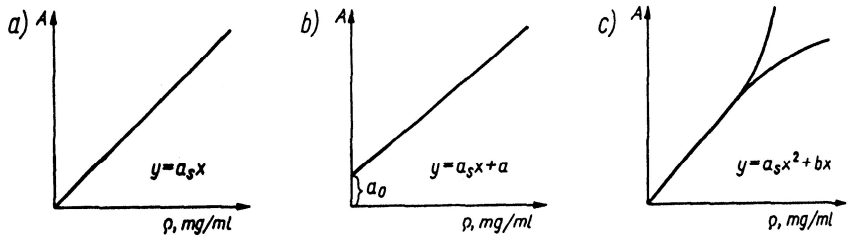
4.3. Analiza ilościowa

Najczęściej do wykonywania ilościowych oznaczeń spektrofotometrycznych jest stosowana metoda krzywej wzorcowej (krzywej kalibracyjnej). Krzywą wzorcową nazywamy przedstawioną graficznie zależność absorbancji od stężenia substancji wzorcowej. Wykonanie takiego wykresu umożliwia bezpośrednie odczytywanie szukanych stężeń na podstawie zmierzonych wartości absorbancji oznaczanych próbek. Prostoliniowy przebieg tej zależności w badanym zakresie świadczy o spełnieniu przez układ prawa Lamberta-Beera. Współczynnik kierunkowy otrzymanej prostej (tangens kąta nachylenia) jest to współczynnik absorpcji oznaczanej substancji (przy jednostkowej grubości warstwy pochłaniającej). W celu wykreślenia krzywej wzorcowej przygotowuje się 5 - 6 roztworów wzorcowych o coraz większych stężeniach tak dobranych, aby różniły się o około 30% i obejmowały swym zakresem stężenia oznaczanych roztworów.

Nie wystarczy jednorazowe sporządzenie krzywej wzorcowej. Zmiany warunków pracy i temperatury, partii odczynników, wskazań przyrządu powodują przesunięcie się

krzywej lub zmianę kąta jej nachylenia. W zależności od tego jak duże są te odchylenia, należy każdorazowo sporządzać krzywą pracy w danym dniu pomiaru, albo korzystać z jednej krzywej wyznaczonej na podstawie kilku serii pomiarów.

Krzywa wzorcowa może przechodzić lub nie przechodzić przez początek układu współrzędnych (Rys. 8).



Rys. 8. Rodzaje krzywych wzorcowych dla układów jednoskładnikowych a) układ spełniający prawo Lamberta-Beera, b) układ spełniający prawo Lamberta-Beera zawierający stałe podłoże, c) układ niespełniający prawa Lamberta-Beera

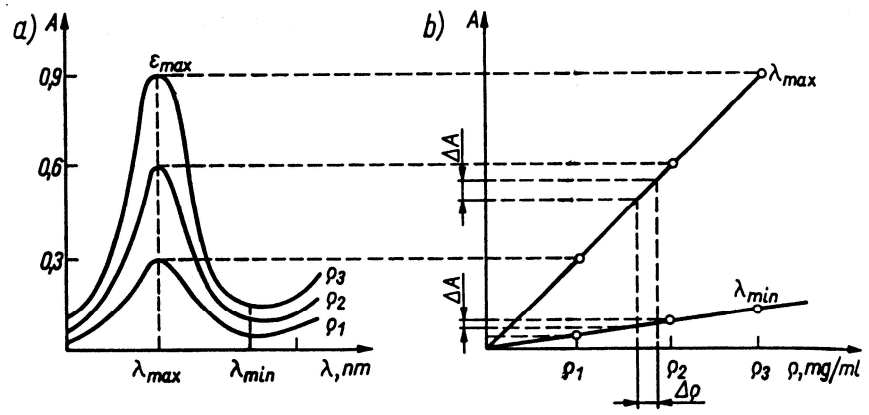
Przypadek a), gdy $y = a_s x$ spełnione jest prawo Lamberta-Beera; po oznaczeniu absorbancji badanego roztworu A_x stężenie substancji oznaczanej odczytuje się wprost z krzywej wzorcowej (a_s - współczynnik absorpcji właściwej). Przesunięcie prostej kalibracyjnej wzdłuż osi A (przypadek b) bywa spowodowane obecnością , oprócz składnika oznaczanego, innych substancji absorbujących (podłoża, tła). Jeżeli absorbancja podłoża nie zależy od składnika oznaczanego, to eliminuje się jego wpływ przez odjęcie ustalonej wartości a_o albo wprowadza się jako odnośnik ślepą próbę. Jeżeli układ nie spełnia prawa Lamberta-Beera (przypadek c), można również prowadzić oznaczanie korzystając z krzywej wzorcowej, jednakże wymaga to zwiększenia liczby roztworów wzorcowych tak, aby ich stężenia nie różniły się więcej niż 10%.

4.3.1. Wybór długości fali i stężeń roztworów wzorcowych

W spektrometrii ilościowej należy dokonać wyboru:

- analitycznej długości fali przy której będą wykonane pomiary,
- odpowiednich stężeń substancji oznaczanej,
- metody pomiaru.

Analityczną długość fali λ wybiera się na podstawie krzywej absorpcji (Rys. 9)



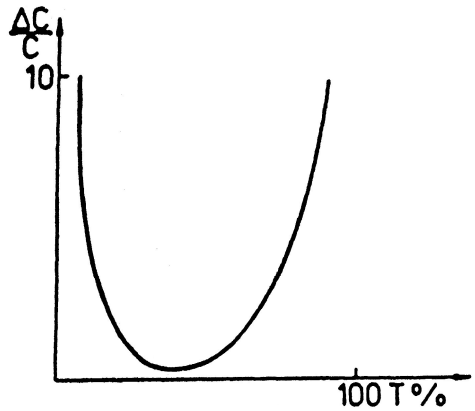
Rys. 9. Porównanie dokładności pomiaru absorbancji roztworu dla różnych długości fali: a) krzywe absorpcji, b) zależność absorbancji od stężenia przy λ_{max} i λ_{min}.

Pomiary wykonywane przy λ_{max} odznaczają się największa dokładnością i czułością. Z Rys. 9 widać, że zmiana stężenia w przedziale ρ_1 - ρ_2 o $\Delta\rho$ powoduje zmianę absorbancji o ΔA. Przy λ_{max} wartość ΔA jest znacznie większa niż przy λ_{min}. Chociaż praktyczny błąd pomiaru absorbancji jest w przybliżeniu jednakowy (±0,01), jest oczywiste, że dla dużych wartości ΔA dokładność pomiaru będzie największa. Dla jednakowych błędów pomiaru absorbancji błąd oznaczenia $\Delta\rho$ będzie dużo większy przy λ_{min} niż przy λ_{max}.

Bardzo małe stężenia substancji barwnej w roztworze są oznaczane z dużym błędem, gdyż przepuszczalność roztworu badanego jest podobna do przepuszczalności roztworu odniesienia i najczęściej bliska 100%. W przypadku intensywnie zabarwionych roztworów tylko mała część promieniowania przechodzi przez roztwór, co także powoduje zwiększenie wyników pomiaru. W celu wyboru najkorzystniejszego stężenia warstwy absorbującej należy znaleźć takie wartości A (T), aby przy danym błędzie ΔA (ΔT) błąd względny wyznaczenia stężenia $\frac{\Delta c}{c}$ był najmniejszy. Zależność błędu $\frac{\Delta c}{c}$ od transmisji można wyrazić następującym równaniem:

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{0{,}434}{T \log T} \Delta T \qquad (21)$$

Graficznie zależność błędu względnego stężenia od transmisji przedstawia Rys. 10.



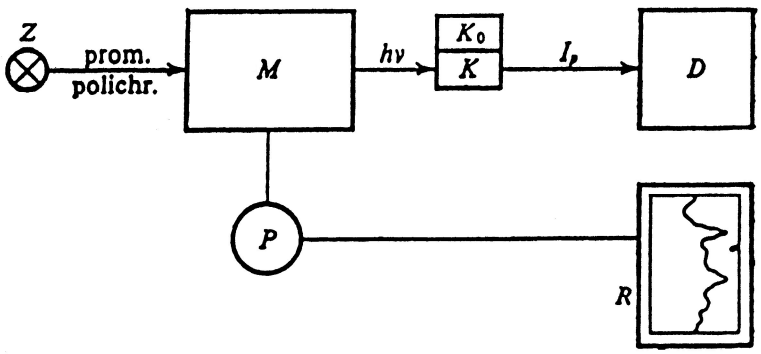
Rys. 10. Zależność między błędem względnym pomiaru a mierzonymi wartościami absorbancji.

Pomiary absorbancji wykonuje się napełniając kuwetę pomiarową roztworem próbki badanej, a kuwetę odniesienia - odnośnikiem, którym jest najczęściej rozpuszczalnik na ogół w metodach bezpośrednich lub ślepa próba (w metodach pośrednich). Metody spektrofotometryczne bezpośrednie są to metody, których podstawą jest selektywna absorpcja oznaczanego składnika. Metody pośrednie to te, w których pomiary absorpcji prowadzi się dopiero po spowodowaniu absorpcji (najczęściej w reakcji powstawania barwnego związku), której wartość jest proporcjonalna do stężenia oznaczanego składnika.

Przygotowując robocze roztwory wzorcowe przez rozcieńczenie wzorcowego roztworu podstawowego, najkorzystniej jest tak dobrać stężenia, aby otrzymać optymalny dla danego spektrofotometru zakres wartości mierzonej absorbancji. Najczęściej używany zakres wartości pomiarowych dla aparatów punktowych wynosi 0,2 - 0,8 wartości absorbancji. Należy obliczyć - na podstawie zależności $c = A/\varepsilon \cdot l$ (jeżeli wartość ε jest znana) - stężenie odpowiadające założonym wartościom absorbancji.

4.4. Aparatura

Do pomiarów absorpcji służą spektrofotometry. Rys. 11 przedstawia blokowy schemat spektrofotometru.



Rys. 11. Blokowy schemat spektrofotometru optycznego: *Z* - źródło promieniowania ciągłego, *M* - monochromator, *K* - kuweta z badanym roztworem, K_o - kuweta z rozpuszczalnikiem (odnośnik), *D* - układ detektora, *R* - rejestrator, *P*- synchroniczny przesuw taśmy rejestratora i bębna monochromatora.

Źródło *Z* wysyła ciągłe promieniowanie elektromagnetyczne. Wyodrębniona przez monochromator *M* monochromatyczna wiązka promieniowania przechodzi na przemian przez kuwetę *K* z badaną substancją i przez identyczną kuwetę porównawcza K_o (z odnośnikiem). Kuweta K_o w przypadku pomiarów absorpcji roztworów jest wypełniona ta samą cieczą, w której rozpuszczono substancję badaną. W niektórych przyrządach (tzw. spektrofotometry dwuwiązkowe) promieniowanie wychodzące z monochromatora jest dzielone na dwie wiązki o jednakowym natężeniu, z których jedna przechodzi przez *K* a druga, jednocześnie, przez K_o. W obu przypadkach, w układzie detektora *D*, następuje pomiar natężenia wiązki, która przeszła przez kuwetę *K* (I_p) i przechodzącej prze kuwetę K_o (I_o). Rejestrator *R* kreśli widmo absorpcyjne badanej substancji w postaci krzywej $A = f(\lambda)$.

4.5. Możliwości i ograniczenia spektrofotometrycznej analizy ilościowej

4.5.1. Czułość

Czułość metody definiuje się jako najmniejsze oznaczalne stężenie substancji lub najmniejsza różnica w stężeniach substancji, którą można oznaczyć za pomocą danej metody. Dla metod spektrofotometrycznych obiektywnym, liczbowym wyrażeniem czułości jest molowy współczynnik absorpcji (ε). Molowy współczynnik absorpcji nie może przekroczyć wartości $1{,}5 \cdot 10^5$ (ta wartość wynika z teorii). Najmniejsze stężenie substancji (mol/l) oznaczalne spektrofotometrycznie można obliczyć ze wzoru Lamberta-Beera. Przy założeniu, że $A = 0{,}02$ (minimalna absorbancja, którą można zmierzyć), $l = 2$ cm (grubość kuwety), $\varepsilon = 10^4$ (molowy współczynnik absorpcji średnio czułej metody spektrofotometrycznej)

$$c = \frac{0{,}02}{2 \cdot 10^4} = 10^{-6}\ M \qquad (21)$$

Jeśli przyjąć masę molową substancji jako przykładowo równą 200 g/mol to minimalne oznaczalne stężenie tej substancji (dla średnio czułej metody, $\varepsilon = 10^4$, i klasycznego spektrofotometru) wyniesie

$$c = \frac{10^{-6} \cdot 2 \cdot 10^2}{10^3} = 2 \cdot 10^{-7}\ \text{g/ml} = 0{,}2\ \mu\text{g/ml} = 0{,}2\ \text{ppm}$$

4.5.2 Technika pomiarów

Technika pomiarów w zakresie UV/Vis jest prosta, a aparatura łatwo dostępna. Większość stosowanych rozpuszczalników jest tania i łatwa do oczyszczenia (typowe z nich to heksan, metanol, woda).

4.5.3. Zastosowanie spektrofotometrii UV/Vis

Metoda może być stosowana do oznaczania zawartości śladowych oraz do oznaczania czystości głównego składnika.

4.5.4 Wady metody spektrofotometrii UV/Vis

Zasadniczą wadą tej metody jest duży błąd, który przeciętnie wynosi 5 - 10%, a podczas oznaczania śladów (do 10^{-5} %), ze wstępnym zagęszczaniem, wielkość błędu może wynosić do 30%.

II. Część doświadczalna

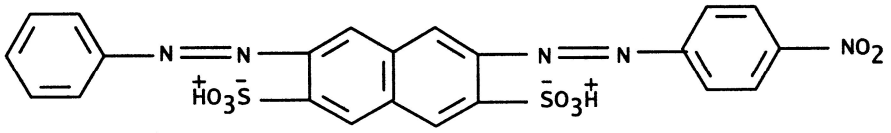
2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości białka w mleku metodą spektrofotometryczną.

2.2. Zasada metody

Metoda wykorzystuje zdolność czerni amidowej 10B do wbudowywania się w strukturę białka i tworzenia nierozpuszczalnego kompleksu. Czerń amidowa 10B jest barwnikiem diazowym, pochodną kwasu 8-amino-1-naftolo-3,6-disulfonowego, p-nitroaniliny i aniliny. Posiada dwie grupy sulfonowe, które w środowisku o pH niższym od

punktu izoelektycznego białek są zdysocjowane (aniony) i wiążą się z grupami kationowymi białek.



Rys. 12. Czerń amidowa 10B.

Kompleks ten można usunąć przez odwirowanie lub sączenie. Ilość wytrąconego związku jest proporcjonalna do zawartości białka. Nadmiar czerni amidowej pozostaje w roztworze i zabarwia go, a intensywność tego zabarwienia jest odwrotnie proporcjonalna do ilości białka w analizowanym produkcie. Czerń amidowa 10B nie wiąże się z niebiałkowymi związkami azotowymi.

2.3. Odczynniki, sprzęt i aparatura

Odczynniki:

- Podstawowy roztwór czerni amidowej 10B: w kolbie miarowej poj. 1000 ml, zawierającej około 300 ml wody destylowanej, rozpuścić 3,17 g kwasu cytrynowego, 0,4156 g fosforanu disodowego ($Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$) i 0,088 g czerni amidowej 10B. Całość starannie wymieszać i rozpuścić, po czym uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Roztwór powinien wykazywać pH 2,35.
- Kazeina.

Sprzęt:

- bibuła filtracyjna 6 szt.,
- lejek 6 szt.,
- łopatka 1 szt.,
- folia aluminiowa 1 szt.,
- pipeta poj. 2,0 ml 1 szt.,
- pipeta poj. 10 ml 1 szt.,
- zlewka 6 szt.,
- probówki wirówkowe poj. 10 ml z korkami 12 szt.,
- wirówka laboratoryjna 1 szt.,
- spektrofotometr 1 szt.,
- waga analityczna 1 szt.

2.4. Wykonanie oznaczenia

2.4.1. Analiza próbki mleka

Do grubościennej probówki wirówkowej odmierzyć 2,0 ml mleka i dodać 8 ml podstawowego roztworu czerni amidowej 10B. Probówkę zatkać korkiem, wytrząsać 5 minut, po czym odkorkować i wyważyć wobec drugiej probówki wirówkowej zawierającej wodę. Odwirować przez 10 min. przy prędkości 4000 obr./min. Roztwór przesączyć przez bibułę filtracyjną. Zmierzyć absorbancję przy długości fali λ = 590 nm w odniesieniu do wody destylowanej.

2.4.2. Sporządzenie i analiza roztworów wzorcowych kazeiny

Odważyć na wadze analitycznej z dokładnością 0,1 mg odpowiednio: 7 mg, 10 mg, 13 mg, 16 mg i 19 mg kazeiny (na folii aluminiowej). Odważki wprowadzić do pięciu osobnych probówek wirówkowych, po czym do każdej z nich dodać 2 ml wody destylowanej i 8 ml roztworu podstawowego czerni amidowej 10B. Probówki zatkać korkiem, wytrząsać 5 minut, a następnie odkorkować i wyważyć wobec probówek wirówkowych zawierających wodę. Odwirować przez 10 min. przy prędkości 4000 obr./min. Roztwory przesączyć przez bibułę filtracyjną. Analizę roztworów wzorcowych kazeiny wykonać identycznie jak dla próbki badanej.

2.5. Opracowanie wyników

Sprawozdanie powinno zawierać część teoretyczną i praktyczną. W części praktycznej przedstawić procedurę sporządzania roztworów kalibracyjnych oraz dokładnie opisać dalsze postępowanie analityczne.

Ze zmierzonych wartości absorbancji roztworów wzorcowych wyznaczyć wartości średnie. Na papierze milimetrowym wykreślić zależność $A = f(c)$; wyznaczyć równanie krzywej kalibracyjnej metodą najmniejszych kwadratów.

Zmierzyć wartość absorbancji próbki mleka 5-krotnie. Nanieść wartości absorbancji na wykres krzywej kalibracyjnej i odczytać odpowiadające im stężenia; stężenie białka w mleku wyznaczyć także z równania krzywej kalibracyjnej.

Wyznaczyć średnią zawartość białka w badanej próbce; przeprowadzić statystyczną ocenę wyników za pomocą testu t-Studenta na poziomie ufności 0,95.

Skomentować uzyskane wyniki.

Literatura

1. Sikorski Zdzisław E.(red.), *Chemia Żywności*, wyd. 4, WNT, Warszawa, 2002.
2. Klepacka Mirosława (red.), *Analiza żywności*, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005.
3. Małecka Maria (red.), *Wybrane metody analizy żywności*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003.
4. Budsławski Józef., Drabant Z., *Metody analizy żywności*, WNT, Warszawa 1972.
5. Ewing GW, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 1980.
6. Cygański A, *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, WNT, Warszawa, 1993.
7. Szczepaniak W., *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 1996.
8. Minczewski J., Marczewski Z., *Chemia analityczna, tom III*, PWN, Warszawa, 1986.