

HODNOTENIE TITRAČNEJ METÓDY STANOVENIA TUKOV V POTRAVINÁCH

ONDREJ HEGEDÚS^{a,b}, DANIELA ČEPELOVÁ^b
a ALŽBETA HEGEDÚSOVÁ^c

^a Katedra verejného zdravotníctva, IFBLR, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Trnava, ^b Oddelenie chemických a fyzikálnych analýz, Regionálny úrad verejného zdravotníctva so sídlom v Nitre, Štefánikova trieda 58, 949 63 Nitra, ^c Katedra zeleninárstva, Fakulta záhradníctva a krajinného inžinierstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, Slovensko
ondrej.hegedus@ucm.sk, nr.ocha@uvzsr.sk,
alzbeta.hegedusova@uniag.sk

Došlo 9.6.14, prepracované 5.1.14, prijaté 30.1.15.

Kľúčové slová: poživatiny, tuky, Soxhletová metóda, titračná metóda, štatistické hodnotenie

Úvod

Lipidy (tuky) sú látky rastlinného alebo živočíšneho pôvodu, ktoré tvoria skupinu lipofilných, chemicky rozdielných zlúčenín. Patria sem acylglyceroly, voľné masné kyseliny, vosky, steroidy, zložené tuky, ako aj v tuku rozpustné uhľovodíky, alkoholy, vitamíny a iné¹. Z biochemického hľadiska sú lipidy estery (prípadne zložené amidy) vyšších karboxylových kyselín (masných kyselín nasýtených alebo nenasýtených) a alkoholov, respektíve ich derivátov. Vzhľadom na rozmanitosť skupiny látok, ktorej spoločnou vlastnosťou je ich rozpustnosť v organických rozpúšťadlách, ale len čiastočná rozpustnosť, resp. úplná nerozpustnosť vo vode, patria do skupiny nepolárnych molekúl biogénneho pôvodu.

Vzhľadom na významnosť tukov v ľudskej výžive je dôležité ich kvantitatívne sledovanie v potravinách, k čomu slúžia rôzne analytické metódy.

Postup izolácie tukov sa líši podľa toho, či sa jedná len o stanovenie celkových lipidov, alebo je potrebné stanoviť aj zloženie izolovanej lipidovej frakcie. Celkové lipidy (tuk celkový) predstavujú všetky nepolárne neprchavé látky extrahované zo vzorky nepolárnym rozpúšťadlom (petroléter, hexán, dietyléter a i.) alebo zmesou rozpúšťadiel.

Ak lipidová frakcia je podrobená ďalším analýzám, často je nutné použiť šetrné izolačné metódy. Pre mnoho prípadov stačí postup podľa Soxhleta použitím hexánu, petroléteru, dietyléteru alebo chloroformu ako rozpúšťadiel so zreteľom, že rozpúšťadlo sa musí odstraňovať pri teplote do 60 °C za zníženého tlaku, aby nedochádzalo k rozkladu extraktu. Pre materiál obsahujúci väčšie množ-

stvo vody je vhodná extrakcia polárnejšími sústavami, napr. chloroformom a metanolom (etanolom) alebo dietyléterom a metanolom a pod. Prvá kombinácia je najpoužívanejšia.

V niektorých prípadoch sa osvedčuje frakčná extrakcia, t.j. najprv nepolárnym rozpúšťadlom a vyextrahovaný materiál ďalej polárnym rozpúšťadlovým systémom. Prípadne sa najskôr vyextrahujú neutrálne lipidy acetónom a následne fosfolipidy chloroformom alebo zmesou chloroform – metanol^{1,2}.

Na stanovenie celkového tuku sa najčastejšie využívajú extrakčné metódy s vázkovým stanovením vyextrahovaného tuku³. Takouto metódou je napr. Soxhletova metóda, ktorá je založená na extrakcii tuhej vzorky umiestnenej v extrakčnej patrône kondenzátom pár relatívne nepolárneho rozpúšťadla, po prípadnom uvoľnení tukového podielu kyselinou chlorovodíkovou. Používa sa najmä pre olejniný a podobné materiály bohaté na neutrálne lipidy a s nízkym obsahom vody.

Ďalšou metódou je postup podľa Grossfelda, ktorý sa používa pre pečivo a iné výrobky s vysokým obsahom sacharidov, pričom samotnej extrakcii predchádza uvoľnenie lipidov pridaním kyseliny chlorovodíkovej a následne sa extrahuje podľa Soxhleta. Postup extrakcie podľa Folcha využíva extrakciu zmesou chloroformu a metanolu. Metóda je vhodná najmä pre potraviny živočíšneho pôvodu, kde metanol v extrakčnej zmesi umožní kvantitatívnu extrakciu tých lipidov, ktoré sú viazané na bielkovinové podiely. Postup podľa Röseho a Gottlieba sa používa na stanovenie tuku v mlieku, odstrednom mlieku, nesladenom kondenzovanom mlieku, podmaslí a v srvátke. Jedná sa o presnú rozhodovaciu metódu^{1,2}.

Na stanovenie celkového tuku sa v súčasnosti využívajú aj komerčne vyrábané extrakčné systémy. Douša popisuje odchýlku v obsahu stanoveného tuku, ktorá vzniká vplyvom použitého extrakčného systému. Na automatických kontinuálnych extraktoroch typu Soxtec poukazuje na nižšie výsledky pri vyšších obsahoch tuku v krmivú oproti klasickej Soxhletovej metóde⁴.

V staršej odbornej literatúre boli popísané rýchlejšie, energeticky a prístrojovo nenáročnejšie metódy stanovenia tukov, ktoré sú založené na zmydelnení prítomných tukov, následnej hydrolyze a v konečnom dôsledku titračnom stanovení uvoľnených masných kyselín za použitia neutralizačných indikátorov^{5,6}.

V laboratórnej praxi často sa stretávame s úlohou získať informáciu o novo zavedenej metóde v porovnaní so štandardnou metódou, alebo jednoducho dokázať, že dve rôzne metódy dávajú alebo nedávajú porovnateľné výsledky v sledovanom rozsahu analýzy. V takýchto prípadoch je výhodné porovnať sériu výsledkov analýz podobných vzoriek oboma metódami v širšej koncentračnej oblasti, najlepšie v celom rozsahu porovnávaných metód. Na hodnotenie metód sa využívajú grafické, parametrické i neparametrické postupy⁷⁻⁹. Hodnotenie sa obvykle vykonáva na porovnanie výsledkov získaných dvoma metódami na rôznych vzorkách toho istého alebo podobného zloženia.

V praxi sa na hodnotenie často využíva Youdenova grafická metóda, ktorá je založená na grafickom znázornení odpovedajúcich dvojíc výsledkov získaných oboma metódami, vynášaním výsledkov proti sebe v pravouhlých súradniciach. Pri zhodnosti výsledkov dostaneme množinu bodov rovnomerne rozložených okolo regresnej priamky prechádzajúcou počiatkom so smernicou 1 (cit.¹⁰). Posun priamky alebo iná smernica priamky, okolo ktorej ležia namerané body, poukazuje na to, že metódy nedávajú zhodné výsledky. V praxi je bežné, že regresnej priamke vždy vypočítame určitý (keď aj minimálny) posun a smernica prakticky nikdy nemá hodnotu rovnú 1. Úlohou je určiť, či posun regresnej priamky a odchýlka smernice od hodnoty rovné 1 sú štatisticky významné alebo nie.

Passingova a Bablokova regresia⁸ je neparametrický postup, používaný napríklad v analytickej chémii pre porovnanie dvoch analytických postupov. Je založená na myšlienke spojiť každý bod x_i, y_i s každým bodom x_i, y_i priamkou a vypočítať všetky smernice takto vzniknutých priamok. Procedúra podľa Passinga a Babloka môže zahŕňať konštrukciu intervalov spoľahlivosti pre β_1, β_2 a ďalej testovanie významnosti hypotéz $\beta_1 = 1$ a $\beta_2 = 0$. Podľa autorov jej výsledky sú veľmi odolné voči odľahlým hodnotám (outliers).

Cieľom našej práce bolo stanovenie množstva celkového tuku vo vzorkách stravy extrakčnou vázkovou metódou a titračnou metódou a ich štatistické porovnanie na základe Youdenovej grafickej metódy.

Experimentálna časť

Materiál a metóda

Ako analyzovaný materiál sa použili vzorky rôznych druhov stravy zo školských jedální. Nakoľko charakter zloženia takýchto vzoriek je veľmi rozmanitý, kvôli robustnosti hodnotenia sa do hodnotenia zaradilo 38 vzoriek s najrozličnejším zložením. Bola to strava s diferentným obsahom ovocia a zeleniny, mäsa, mliečnych výrobkov, sacharidov a polysacharidov.

Všetky vzorky boli analyzované paralelne Soxhletovou metódou extrakcie ako štandardnou (metóda A) a titračnou metódou po zmydlení tukov ako porovnávanou (metóda B).

Analytické metódy stanovenia tukov

Na prípravu roztokov sa používali chemikálie čistoty p.a. a demineralizovaná voda. Celé množstvo odobratých vzoriek sa zhomogenizovalo v homogenizátore a na samotnú analýzu sa odobralo predpísané množstvo vzorky.

Extrakčná metóda podľa Soxhleta

5 g zhomogenizovanej vzorky sa extrahovalo lipofilným rozpúšťadlom v Soxhletovom extraktore. Do vopred odváženej varnej banky sa pridalo rozpúšťadlo v objeme, ktorý 1,5krát prevyšoval objem extraktora a banka sa pri-

pojila k prístroju. Extrakcia prebiehala v trvaní 7 h. Po ukončení extrakcie a oddestilovaní rozpúšťadla sa vysušila banka s tukom a vážením stanovil obsah tuku¹.

Titračná metóda

Zhomogenizovaná vzorka sa zmydlenila pridaním 10 ml 33% roztoku hydroxidu draselného a 40 ml etanolu obsahujúceho 0,4 % amylalkoholu a 30 minútovým varom pod spätným chladičom, čím vznikol roztok, ktorý obsahoval mydlá odvodené z neutrálnych tukov a mastných kyselín. Po ochladení a pridaní 17 ml 25% HCl sa uvoľnili mastné kyseliny, ktoré po pridaní 50 ml petroléteru sa vyextrahovali vytrepaním. Extrakcia sa urýchlila pridaním NaCl a malého množstva amylalkoholu. Separácia bola kompletná po 5 až 10 minútach. Alikvotná vzorka petroléterovej vrstvy (25 ml) sa odparila do sucha a voľné mastné kyseliny sa rozpustili v neutrálnom etanole a titrovali odmerným roztokom NaOH o koncentrácii 0,1 mol l⁻¹ na indikátor thymolovú modrú do zmeny sfarbenia zo žltej na modrú. Metóda stanovenia celkového obsahu tuku vyžadovala cca 35 minút (cit.^{5,6}).

Hodnotenie zhodnosti výsledkov

Pri štatistickom hodnotení zhodnosti výsledkov analýz sa vychádzalo z Youdenovej grafickej metódy, pričom sa porovnávali výsledky meraní tých istých vzoriek oboma metódami v širokom koncentračnom rozsahu metód. Výsledky analýz sa vyhodnotili ako závislosť výsledkov porovnávanej metódy (titračná metóda) k výsledkom štandardnej metódy (extrakčná metóda). Závislosť bola vyjadrená v lineárnom regresnom modeli. V prípade zhody výsledkov v sledovanom rozsahu, závislosť y (metóda B) na x (metóda A) je lineárna:

$$y = \beta_1 \cdot x + \beta_2 \quad (1)$$

s nulovým posunom $\beta_2 = 0$ a jednotkovou smernicou $\beta_1 = 1$, teda rovnica (1) nadobudne tvar: $y = x$.

Pri hodnotení výsledkov sa testovalo, či regresnou analýzou vypočítané odhady β_1 a β_2 sú štatisticky významne odlišné (alebo neodlišné) od požadovaných hodnôt pre zhodu výsledkov oboch metód ($\beta_1 = 1$ a $\beta_2 = 0$). Testovala sa hypotéza:

$H_0: \beta_2 = 0$ a $\beta_1 = 1$, proti alternatíve $H_1: \beta_2 \neq 0$ a $\beta_1 \neq 1$.

Lineárnou regresiou vypočítaný odhad posunu regresnej priamky β_2 má byť v oblasti:

$$b_2 - t_{1-\alpha/2}(n-2) \cdot \sqrt{s_{b_2}} \leq \beta_2 \leq b_2 + t_{1-\alpha/2}(n-2) \cdot \sqrt{s_{b_2}} \quad (2)$$

Ak vypočítaný interval zahŕňa aj nulu, tak úsek β_2 sa nedá považovať za významne odlišnú od nuly.

Podobne pre smernicu:

$$b_1 - t_{1-\alpha/2}(n-2) \cdot \sqrt{s_{b_1}} \leq \beta_1 \leq b_1 + t_{1-\alpha/2}(n-2) \cdot \sqrt{s_{b_1}} \quad (3)$$

kde b_1 je odhad smernice regresnej priamky, b_2 je odhad posunu regresnej priamky, $t_{1-\alpha/2}(n-2)$ je kvantil (kritická hodnota), s_{b_2} je smerodajná odchýlka odhadu β_2 , s_{b_1} je smerodajná odchýlka odhadu β_1 .

Ak vypočítaný interval zahŕňa aj jednotku, tak úsek β_1 sa nedá považovať za významne odlišnú od jedna^{9,11}.

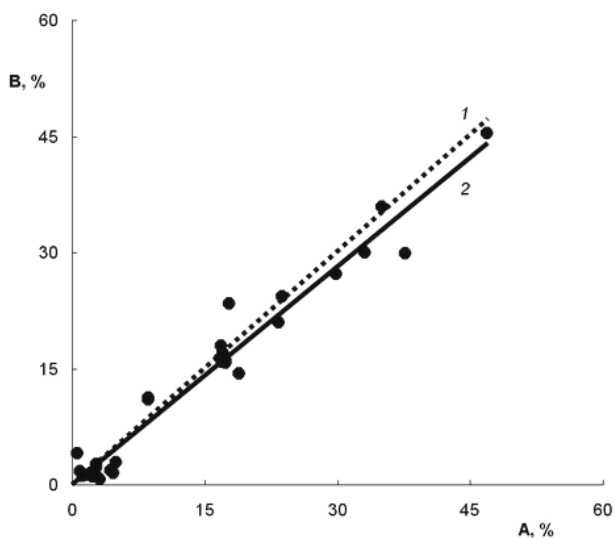
Výsledky a diskusia

Metódy stanovenia celkového tuku v jednotlivých komoditách sú predmetmi viacerých technických noriem. V technickej norme predpísaný postup sa väčšinou vzťahuje len na jednu alebo obmedzený počet komodít. Nakoľko sa jedná väčšinou o stanovenie prostredníctvom extrakcie, normované metódy sú ekonomicky náročné z hľadiska spotreby vody, elektriny a rozpúšťadiel, pričom sa nedá zanedbať ani vplyv na zdravie obslužného personálu, z pohľadu použitia vyšších objemov extrakčných zmesí – rozpúšťadiel. Časová a energetická náročnosť metódy sa dostáva do popredia najmä vtedy, keď za relatívne krátke časové obdobie je nutné analyzovať veľký počet vzoriek. Takáto situácia sa môže vyskytnúť na úradoch verejného zdravotníctva pri výkone štátneho dozoru po odbere vzoriek stravy v zariadeniach spoločného stravovania.

Titračná metóda stanovenia tukov časovú a energetickú náročnosť extrakčných vázkových metód vo veľkej miere eliminuje. Otázkou ostáva vzájomná nahraditeľnosť uvedených metód pri stanovení obsahu tukov v analyzovaných vzorkách stravy.

Pri porovnaní metód ako štandardná metóda sa použila Soxhletová metóda (metóda A), porovnávaná metóda bola metóda titračná (metóda B). Na hodnotenie rovnocennosti výsledkov oboch metód použitá Youdenová grafická metóda prehľadne znázorňuje rozloženie hodnôt analytických výsledkov získaných obojmi metódami v širokom koncentračnom rozsahu. Výsledky analýz znázorňuje obr. 1.

Youdenovú grafickú metódu je možné úspešne využívať na zisťovanie konštantnej a proporcionálnej sústavnej chyby.



Obr. 1. Grafické vyhodnotenie stanovených hodnôt tuku štandardnou Soxhletovou metódou (A) a porovnávanou titračnou metódou (B); 1 regresná priamka s nulovým posunom a jednotkovou smernicou, 2 regresná priamka vypočítaná zo stanovených hodnôt obsahu tuku

chyby testovanej analytickej metódy. Pokiaľ odhad smernice regresnej priamky sa líši od $b_1 = 1$, výsledky sú zatiaľčené sústavnou proporcionálnou chybou. Ak posun regresnej priamky $b_2 \neq 0$, pričom b_1 môže vykazovať hodnotu 1, táto skutočnosť poukazuje na výskyt konštantnej sústavnej chyby.

Z grafického znázornenia výsledkov analýz obojmi metódami vyplýva, že výsledky získané titračnou metódou so zvyšujúcou sa koncentráciou tuku vo vzorke sa znižujú oproti štandardnej extrakčnej metóde, teda grafické hodnotenie poukazuje na možnosť existencie proporcionálnej chyby.

Pri dokazovaní existencie proporcionálnej chyby sa vychádzalo z odhadov parametrov β_1 a β_2 . Odhady parametrov lineárnej regresnej závislosti sú:

- odhad smernice regresnej priamky, b_1 je 0,939,
- odhad posunu regresnej priamky, b_2 je $-0,075$,
- koeficient determinácie, R^2 je 0,964,
- počet paralelných analýz, n_A a n_B bol 38.

Riešením vzťahov (2) a (3) sme zisťovali, kedy je možné považovať odhad smernice b_1 rovný 1 a odhad posunu b_2 rovný 0? Nakoľko v praxi vždy počítame s určitým rozptylom testovaných parametrov, pre náš prípad sú dôležité konfidenčné oblasti, v ktorých leží hodnota β_1 a β_2 so zvolenou hladinou významnosti $\alpha = 0,05$. Hranicné hodnoty parametrov regresnej priamky β_1 a β_2 sú nasledovné:

- dolná hranica smernice regresnej priamky, β_{1min} je 0,873,
- horná hranica smernice regresnej priamky, β_{1max} je 1,005,
- dolná hranica posunu regresnej priamky, β_{2min} je $-1,302$,
- horná hranica posunu regresnej priamky, β_{2max} je 1,153.

Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že vypočítaný interval pre posun β_2 zahrňuje aj nulu, tak úsek b_2 sa nedá považovať za významne odlišný od nuly. Podobne, vypočítaný interval pre β_1 zahrňuje aj jednotku, tak odhad smernice b_1 sa nedá považovať za významne odlišný od jedna. Pre náš prípad to znamená, že medzi porovnávanými metódami, v popísaných podmienkach a koncentračnom rozsahu stanovenia, nie je štatisticky významný rozdiel.

Záver

Cieľom práce bolo hodnotiť zhodnosť výsledkov analýz metód stanovenia celkového tuku vo vzorkách stravy získaných dvoma nezávislými metódami. Ako štandardná metóda sa použila Soxhletova extrakčná metóda, ktorá je časovo a ekonomicky náročná, ako porovnávaná metóda slúžila časovo i ekonomicky menej náročná titračná metóda stanovenia tukov v širokom koncentračnom rozsahu. Porovnaním výsledkov analýz v koncentračnom rozsahu 0,6 až 46 % (m/m) tuku možno konštatovať, že porovnávaná titračná metóda je časovo, prístrojovo a ekonomicky menej náročná, a v sledovanom koncentračnom rozsahu dáva zhodné výsledky ako Soxhletova extrakčná metóda.

LITERATÚRA

1. Pribela A., v kniže: *Analýza potravín*, str. 45. Edičné stredisko STU, Bratislava 1996.
2. Davídek J., Hrdlička J., Karvánek M., Pokorný J., Seifert J., Velišek J., v kniže: *Laboratorní příručka analýzy potravin*, str. 264. SNTL, Praha 1981.
3. *Standard Methods of the Oils and Fats Division of the IUPAC*, 5. vyd., Met. I.B.2 Butterworths, London 1964.
4. Douša M.: *Feed Food Anal.* 2000, 1.
5. Van de Kamer J. H., Bokkel Huinink H., Weijers H. A.: *J. Biol. Chem.* 177, 347 (1949).
6. Adachi S.: *Tohoku J. Agric. Res.* 7, 325 (1957).
7. Youden W. J., Steiner E. H.: *Statistical Manual of the AOAC-Association of Official Analytical Chemists*. Washington D.C. 1975.
8. Passing H., Bablok W.: *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 22, 431 (1984).
9. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat. Konstrukce intervalu spolehlivosti*. Plus, spol. s r. o., Praha 1994.
10. Eckschlager K., Horsák I., Kodejš Z., v kniže: *Vyhodnocování analytických výsledku a metod*. str. 44. SNTL Alfa, Praha 1980.
11. Hegedús O., Šmotlákova Z., Hegedúsová A.: *Slov. J. Health Sci.* 3, 25 (2012).

O. Hegedús^{a,b}, D. Čepelová^b, and A. Hegedúsová^c
(^a *Department of Public Health, Institute the Physiotherapy, Balneology and Therapeutic Rehabilitation University of SS. Cyril and Methodius Trnava*, ^b *Department of Laboratories, Regional Authority of Public Health, Nitra*, ^c *Department of Vegetables-Production, Horticulture and Landscape Engineering Faculty, Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovak Republic*): **The Evaluation of Titrimetric Method for Determination of Fats in Foodstuffs**

A titrimetric method of determination of free and fixed fats in foodstuffs after their saponification was compared with a standard extraction method. Both the methods gave the same results in a wide concentration range. The former was less time-consuming and less expensive.