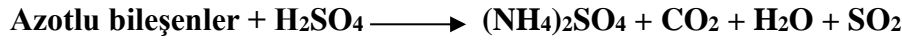


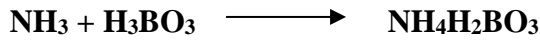
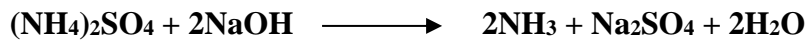
Protein Tayini (Makro Kjeldahl Yöntemi)

Genel ilke

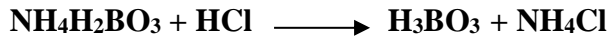
Protein tayininde, belirli miktarda örnek konsantre sülfürik asitle katalizör eşliğinde ve yüksek sıcaklıkta reaksiyona sokularak, organik kökenli azot indirgenir ve amonyum sülfat halinde bağlanır.



Eklenen yoğun sodyum hidroksit çözeltisiyle amonyum tuzlarından serbest bırakılan amonyak, buhar destilasyonu ile içerisinde asit çözeltisi bulunan destilasyon kabında toplanır.



Destilatın titre edilmesiyle asit tarafından tutulan azot miktarı hesaplanır ve elde edilen değer 6,25 katsayısı ile çarpılarak % protein miktarı bulunur.



Gerekli Malzemeler

Ekipman

Makro Kjeldahl cihazı
Kjeldahl balonu (750 mL lik)
Erlenmayer (250 mL lik)
Ölçü silindiri (100 mL lik)
Büret (50 mL lik)
Azot içermeyen filtre kağıdı
Çinko taşı

Kimyasal Maddeler

Derişik sülfürik asit
Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi, %50'lik
Borik asit (H₃BO₃) çözeltisi, %3,5'lik
Ayarlı 0,1 N HCl çözeltisi
Katalizör karışımı (1 kısım bakır sülfat (CuSO₄.5H₂O), 10 kısım potasyum sülfat (K₂SO₄))
İndikatör karışımı

Çözeltilerin hazırlanışı

NaOH (%50) : 50 g NaOH hassas bir şekilde tartılır ve bir miktar destile su içerisinde çözüldürüldükten sonra 50 mL'lik balon jojeye aktararak çizgisine tamamlanır.

Borik asit (%3,5) : 3,5 g borik asit hassas bir şekilde tartılır ve bir miktar destile su içerisinde çözüldürüldükten sonra 100 mL’lik balon jojeye aktarılarak çizgisine tamamlanır.

0,1 N HCl: Yoğunluğu 1,19 g/cm³ olan %37’lik HCl’den 8,29 mL alınır ve 1000 mL’lik balon jojeye aktarılarak yavaşça çizgisine tamamlanır. Çözeltinin normalitesinin kesin olarak bilinmesi gerekir. Bu amaçla normalitesi kesin olarak bilinen NaOH çözeltisi kullanılabilir. Normalitesi belirlenecek HCl’den 10 ml bir erlene aktarılır ve NaOH ile titre edilir. Aşağıdaki formül kullanılarak HCl’nin normalitesi hesaplanır.

$$N_{HCl} \times V_{HCl} = N_{NaOH} \times V_{NaOH}$$

Bir diğer yöntemde ise ayarlama işlemi primer standart olan Na₂CO₃ ile yapılır. Na₂CO₃ deney öncesi 110 °C da 2 saat kurutulur ve desikatörde oda sıcaklığına soğutulur. 0.100-0,1500 g arası Na₂CO₃ hassas olarak tartılır ve virgülden sonra 4 haneli olacak şekilde kaydedilir. 50 ml destile suda çözülür. Üzerine indikatör olarak 3-4 damla bromkresol yeşili damlatılır ve HCl ile titre edilir. Titrasyon çözeltinin mavi renginin yeşile döndüğü ilk ana kadar devam ettirilir. Çözelti 1-2 dakika kaynatılır rengin yine mavi olması gerekir. Çözelti soğuduktan sonra tekrar çözeltinin rengi yeşil olana kadar titrasyona devam edilir. Harcanan HCl asit miktarı kaydedilir. Kaynama işlemi yapıldığında rengin maviye dönmeyişi başlangıçtaki asidin fazla kaçtığını gösterir ve deney tekrar edilir. HCl’nin normalitesi aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$N = (M \times 1000 / 53,0) / V_{titrant}$$

M : Tartılan NaCO₃’ın ağırlığı (g)

V_{titrant} : Dönüm noktasına kadar harcanan HCl miktarı (ml)

N : HCl çözeltisinin kesin normalitesi

53 : NaCO₃ ’ın eşdeğer ağırlığı= (Molekül ağırlığı / Tesir değeri) = (106,0 / 2) =53

İndikatör karışımı: %95’lik etil alkolde hazırlanmış %0.1’lik bir kısım metil kırmızısı ve %95’lik etil alkolde hazırlanmış %0.1’lik beş kısım brom krezol yeşili ile hazırlanır.

Analizin yapılışı

1. Yakma aşaması: 1-2 g et örneği, azot içermeyen filtre kağıdına tartılır ve filtre kağıdı katlanarak Kjeldahl balonuna aktarılır. Üzerine bir spatül katalizör karışımı ve 25 mL konsantre

H₂SO₄ ilave edilir. Balon Kjeldahl yakma düzeneğine yerleştirilir ve sıcaklık kademeli olarak artırılarak içerik tamamen berrak yeşil renkte olana kadar yakılır.

2. Destilasyon aşaması: Oda sıcaklığına soğutulan balon içeriğine yaklaşık 100 mL destile su yavaşça ilave edilir ve soğutulur. Balon içerisine %50'lik NaOH çözeltisinden 80 mL ve birkaç çinko taşı ilave edilir. Balon çalkalanmadan Kjeldahl destilasyon ünitesine yerleştirilir. Destilasyon ünitesinin çıkış ucuna, içerisinde 3-4 damla indikatör karışımı eklenmiş 100 mL %3,5'luk borik asit çözeltisi bulunan erlenmayer yerleştirilir. Kjeldahl balonu dikkatlice karıştırılır ve NaOH çözeltisi ortama dağılarak ortamı kuvvetli bir şekilde bazik hale getirir. Renk değişimi ile (koyu kahve-siyah) bu durum gözlenebilir. Eğer renk değişmemiş ise ortamın yeterince bazikleşmediği anlaşılır ve bir miktar daha NaOH ilave edilir. Isıtıcı çalıştırılır. Kaynama ile beraber destilasyon başlar ve işlem erlenmayerde yaklaşık 150 mL destilat toplanıncaya kadar devam ettirilir. Bu noktada erlenmayerdeki çözeltinin renginin pembeden yeşile döndüğü gözlenebilir.

3. Titrasyon aşaması: Destilat, 0.1 N HCl çözeltisi ile pembe renge titre edilir.

Hesaplama

Protein miktarı % olarak aşağıdaki formülle hesaplanır.

$$\% \text{ Azot (N)} = \frac{V_{\text{asit}} \times N_{\text{asit}} \times 1,4}{M}$$

$$\% \text{ Protein} = \% \text{ N} \times 6,25$$

V_{asit} : Titrasyonda harcanan HCl miktarı (mL)

N_{asit} : Titrasyonda kullanılan HCl'in normalitesi

M : Örnek miktarı (g)

6.25 : Azotun proteine dönüştürülme faktörü