

# POJEDNOSTAVLJENE METODE ODREĐIVANJA Ca, Mg i P U MLIJEKU\*

Velja SIRNIK,  
Institut za mlekarstvo, Ljubljana

Institut za mlekarstvo, Raziskovalna postaja Rodica, Biotehniške fakultete u Ljubljani, radi između ostalog i na modernizaciji kemijsko-analitičkih metoda određivanja sastojaka mlijeka. Kako su mineralne tvari važne za prehrambenu vrijednost mlijeka, a igraju također i značajnu ulogu kod prerađivanja mlijeka u mlječne proizvode, bio je jedan od zadataka i problem određivanja Ca, Mg i P u mlijeku.

Klasične analitičke metode točne su i pouzdane, ali iziskuju kod izvođenja dosta vremena, pa se zbog toga nastoji pronaći jednostavnije, iako točne metode određivanja, koje bi u prvom redu poslužile rutinskom radu u laboratorijima. Savremenije postupke u vezi s navedenim elementima predstavljaju brzi volumetrijski i fotometrijski postupci, koji vrlo dobro zamjenjuju klasične.

Cilj naših istraživanja bio je, pronaći što jednostavniji analitički postupak određivanja Ca, Mg i P u mlijeku. Dosadašnji rad koncentrirao se u prvom redu na određivanje Ca i P, dok je rad na određivanju Mg u toku. Dosadašnji dobiveni rezultati poklapaju se u dozvoljenim granicama sa rezultatima gravimetrijske metode i može se reći, da će i ova metoda biti upotrebiva za rutinsko određivanje Mg.

Klasične metode određivanja pojedinih elemenata služe se prethodnom pripremom pepela mlijeka, otapanjem pepela i određivanjem pojedinih elemenata po slijedećim postupcima: Ca — permanganometrijski, Mg — gravimetrijski i P — gravimetrijski, volumetrijski ili fotometrijski.

Za određivanje Ca i Mg stoji na raspoloženju niz praktičnih, direktnih kompleksometrijskih metoda. S pomoću njih može se odrediti Ca i Mg, bez prethodne pripreme pepela, dakle direktno u razrijeđenom mlijeku. Kao titraciona otopina upotrebljava se najviše dinatrijeva sol etilendiamintetraacetata skraćeno EDTA. Ovaj kompleks vezuje u dovoljno razrijeđenom mlijeku kompletan Ca i Mg. Različiti autori upotrebljavaju kao indikatore različite, takozvane metalne indikatore. Posebno zanimljiva je metoda prema Ntailianas-Whitny-u (15,16), kod koje se upotrebljava kao indikator za Ca i Mg, kalcein. Princip metode bazira na dodavanju EDTA u suvišku, kojega nakon toga retitriramo sa standardnom otopinom  $\text{CaCl}_2$ . Kod pH vrijednosti rastvora 12—12,5 na EDTA vezuje se Ca i Mg, dok se kod povišenog pH (13—13,5), na kompleks vezani Mg izdvoji u vidu taloga kao  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ . Kod dalje titracije suviška EDTA određuje se još sam Ca.

Na kompleksometrijskim analizama Ca i Mg u mlijeku radili su mnogi autori, koje navodimo u literaturi (1, 2, 4—6, 8—14, 17). Od brojnih fotometrijskih određivanja P u mlijeku u toku rada preispitali smo molibden — metolnu metodu (19) i molibdat — vanadatnu metodu (3).

\*Referat sa IX Seminara za mljekarsku industriju, održanog 10—12. II 1971. Tehnološki fakultet, Zagreb.

## Izbor metode i rezultati

A. Kao metodu određivanja Ca i Mg u mlijeku, odabrali smo metodu po Gehrke-u (7), koja služi za analizu pepela krmiva. Ovu metodu smo, na osnovu rezultata preliminarnih pokusa modificirali tako, da je upotrebiva za direktnu titraciju razrijeđenog mlijeka. Rezultate dobivene na osnovu modificiranog postupka po Gehrke-u, uspoređivali smo s rezultatima permanganometrijske i modificirane kompleksometrijske titracije otopine pepela mlijeka. U tablicama 1 i 2 prikazani su rezultati dobiveni navedenim metodama, to je srednje vrijednosti, u procentima izražene količine Ca, za 34 uzorka mlijeka.

### Usporedba prosječnih količina (‰) Ca u 34 uzorka svježeg mlijeka

Tablica 1

Metoda A	direktna kompleksometrijska titracija razrijeđenog mlijeka	0,140‰ Ca
Metoda B	komplesometrijska titracija HCL — otopine pepela mlijeka	0,138 ‰ Ca
Metoda C	permanganometrijska titracija HCl — otopine pepela mlijeka	0,135 ‰ Ca

### Usporedba rezultata metode A s rezultatima metoda B i C

Tablica 2

	s metodom B	‰	s metodom C	‰
Broj istih rezultata	18	52,94	13	38,24
Broj nesuglasnih rezultata				
za + 0,01 ‰	5	14,70	14	41,18
+ 0,02 ‰	5	14,70	2	5,88
+ 0,03 ‰	0	0,00	1	2,94
— 0,01 ‰	6	17,66	4	11,76

Rezultati za količinu Ca, dobiveni na osnovu prethodne pripreme pepela, nešto su niži od onih, određenih direktnom titracijom mlijeka. Ove razlike pripisuje se gubicima, koji nastaju zbog isparivanja mlijeka i pripreme pepela.

S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti, da je modificirana metoda direktnog određivanja Ca u svježem mlijeku pouzdana i zbog jednostavne laboratorijske tehnike praktična, u prvom redu za rutinske analize.

S obzirom na navedeno dajemo u nastavku metodiku određivanja Ca i Mg u svježem mlijeku.

### Određivanje Ca

10 ml svježeg mlijeka otpipetira se u 100 ml odmjernu tikvicu i dopuni do marke s bidestiliranom vodom. 10 ml tako pripremljenog razrjeđenja (1 ml mlijeka), otpipetira se u Erlenmajerovu tikvicu i dodaje se bidestilirane vode do cca 50 ml. Slijedi dodavanje 3 ml pufera (5n KOH u 6,6‰ KCN) i za nožev vrh mješavine praška indikatora (0,1 g kalceina, 1 g uglja, 10 g KCl). Promiješana proba titrira se uz stalno miješanje sa 0.002 M EDTA (električna sijalica, na crnoj podlozi i pozadini), dok ne prestane zelena fluorescencija. 1 ml 0.002 M EDTA odgovara 0.08 mg Ca.

Ca standard za određivanje tačne M EDTA pripremi se na slijedeći način: 2,5023 g CaCO<sub>3</sub>, sušenog na temperaturi 110°C, otopi se u 6 n HCl i razredi do 1000 ml. 1 ml ove otopine odgovara 1 mg Ca.

### Određivanje Ca i Mg zajedno

50 ml razrijeđenog mlijeka (iz 1000 ml odmjerne tikvice) razredi se s bidestiliranom vodom do cca 100 ml u Erlenmajerovoj tikvici. Dodaje se 5 ml pufera za pH 10 (67,5 g NH<sub>4</sub>Cl otopi se u 200 ml vode, doda se 570 ml NH<sub>3</sub> konc. i razredi destiliranom vodom do 1000 ml). Dodaje se 2 ml KCN (2 g KCN na 100 ml destilirane vode) i na kraju još 5 kapi indikatora (0,2 g NH<sub>2</sub>OH · HCl). Uzorak se titrira sa 0,01 M EDTA, dok vinsko crvena boja ne prelazi u modru. Kod titracije otopina se temeljito miješa. Upotrebljeni ml EDTA (preračunati na tačno 0,01 M) minus upotrebljeni ml EDTA za titraciju Ca (preračunati na tačno 0,002 M) daju potrošnju EDTA za Mg. 1 ml 0,01 M EDTA odgovara 0,2432 mg Mg).

B. Kod izbora metodike određivanja ukupnog P u mlijeku ne može se izbjeći priprema pepela. Nakon više preliminarnih pokusa odabrali smo vlažno spaljivanje mlijeka sa Se-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i dodatkom H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, koji se pokazao kao najbrži i dao je bezbojne i bistre rastvore.

Posebnu pažnju obratili smo izboru fotometrijske metode, to jest bojadisanju neutraliziranog i razrijeđenog rastvora. Kod toga se pokazalo kod molibdat-metodne metode jako variranje intenziteta boje, koja je bila posebno osjetljiva na starost reagenata i vrijeme fotometriiranja. S druge strane postignuti su vrlo dobri rezultati s molibdat-vanadatnom metodom, koja je davala i s više mjeseci starim reagentima, kao i kod ponovnog mjerenja nakon više sati, praktički iste rezultate. U tablici 3 navodimo rezultate ukupnog P za 8 uzoraka mlijeka, dobivenih molibdat-vanadatnom metodom i to paralelno sa suhim i vlažnim spaljivanjem mlijeka.

### Rezultati za ukupni P u mlijeku (molibdat-vanadatna fotometrijska metoda, vlažno i suho spaljivanje)

Tablica 3

Broj uzoraka	1	2	3	4	5	6	7	8	$\bar{X}$
Vlažno spaljivanje mg P/100 ml mlijeka	88	88	86	88	85	86	88	90	87,4
Suho spaljivanje: mg P/100 ml mlijeka	92	89	84	90	82	90	84	90	87,6
Razlika									0,2
Postotak razlike									0,24 <sup>0/0</sup>

S obzirom na dobro poklapanje rezultata opredijelili smo se za slijedeći postupak fotometrijskog određivanja P u svježem mlijeku:

Rastvor: 2 ml mlijeka otpipetira se u 100 ml Kjeldahlovu tikvicu, dodaje se 5—6 ml Se-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 10—15 kapi 15<sup>0/0</sup>-nog H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Zagrijavamo tako dugo, da je tekućina sasvim bistra.

Neutralizacija: Nakon ohlađenja vrlo brižljivo dodaje se 2—4 ml vode i ponovo hladi. Pod tekućom vodom vrlo oprezno dodaje se zasićena otopina

NaOH, dok se tekućina još zagrijava. Nakon toga dodaje se 5 kapi fenolftaleina i toliko NaOH, da se postigne crvena boja. Prema potrebi proba se ponovo hladi i dodaje joj se kap po kap  $\text{HNO}_3$  (1:1) do obezbojavanja.

Fotometriiranje: Ohlađenu, neznatno dušično kiselu otopinu kvantitativno se filtrira iz Kjeldahlove tikvice u 100 ml odmjernu tikvicu. Dodaje se 10 ml molibdat-vanadat- $\text{HNO}_3$  reagenta u omjeru 1:1:1 (molibdat reagent: 25 g amon molibdata otopi se u vodi na 500 ml; vanadat reagent: 1.25 g amon vanadata otopi se u 10 ml  $\text{HNO}_3$  konc. i dopuni do 500 ml s vodom;  $\text{HNO}_3$  pripremiti u omjeru 1:2). Nakon toga dopuni se tikvica vodom do marke. Otopina za uspo-ređivanje: 10 ml reagenta za bojadisanje i vode do 100 ml.

Fotometriiranje se vrši nakon nekoliko minuta kod plavog filtra, odnosno kod 480 m $\mu$ . Baždarnu krivulju odredi se sa standardnim otopinama od 2 do 24 gama P/ml, koju u datim granicama predstavlja premisa, što omogućava izra-čunavanje rezultata s pomoću Lambert-Beerove formule.

Iz alikvotnog dijela vlažnog rastvora, pripremljenog za fotometriiranje P, može se određivati i N prema poznatoj makro ili mikro Kjeldahl metodi.

### Literatura

1. Bird, E. W., Weber, J. (1961): Determination of Ca and Mg in milk by EDTA titration, *J. Dairy Sci.*, 44 (6), 1036—46;
2. Brown, I. R., Jarvis i drugi (1961): Elimination of asching in the determination of Sr and Ca in liquid milk, *Canad. J. Biochem. and Physiol.*, 39 (8) 1309—12.
3. Cencelj, J., (1957): Metode kemičnih analiz zemelj, gnojil in krmil KIS 3, Ljubljana.
4. Dušek, P., Sedlaček, B. A. J. (1965): Complexometric method for rapid estimation of Ca in milk *Z. Lebensmittel. u Forsch.*, 129, 5.
5. Elliott, W. E. (1952): Complexometric determination of Ca *J. Biol. Chem.*, 197, 641.
6. Gerbenko, F. P., Vashun, Z. M. (1967): Extraction-Complexometric Determination of Ca in milk with azo-azoxy BN reagent. *Vop. Pitan.*, 26, 4 73—77.
7. Gehrke, C. W. (1961): Determination of Ca and Mg by EDTA titration *J. Assoc. Offic. Agric. Ch.*, 44, 2.
8. Görner, F., Töhöreva, J. (1964): Study of complexometric method for direct estimation of Ca in milk, *Prümysl Potravin*, 15 (8), 424—26.
9. Have, A. J. van der (1954): The Determination of Ca and Mg in milk by complexon III *Neth., Milk Dairy J.*, 8, 157.
10. Jenness, R. (1953): Titration of Ca and Mg in milk by EDTA *Anal. Chem.*, 25, 966.
11. Kamal, T. H. (1960): Complexometric titration of Ca and Mg in the presence of phosphate in milk and blood plasma, *J. Agric. FD. Chem.* 8, (2), 156—58.
12. Konrad (1962): Complexometric estimation of Ca in foods with special reference to milk and dairy products, *Z. Lebensm. Unters.*, 118, (1), 35—40.
13. Mašek, J. (1966): Complexometric estimation of Ca and Mg content of milk *Docum. vet., Brno*, 5, 69—73.
14. Mazzo, A. A. (1960): Opredelenie soderžnja kalcijsa i magnijsa v moloke *Vop. Pitan.*, 19, (5), 74—76.
15. Ntailianas, H. A., Whitney, R. M. (1964): Calcein as an Indicator for the Determination of total Ca and Mg and Ca alone in the same Aliquot of milk *J. of Dairy Sci.*, 47, 19—27.
16. Ntailianas, H. A., Whitney, R. M. (1963): The direct Complexometric Determination of Ca and Mg in milk *J. of Dairy Sci.*, 46, 1335—41.
17. Sarudi, I. Jr., (1966): Complexometric Estimation of Ca in milk *Elelmiscery. Közl.*, 12, (2) 99—102.
18. Sirník, V. (1971): Poenostavljena metoda določanja Ca v svežem mleku *Zbornik BTF, Ljubljana*.
19. Vajić, B. (1963): Analitika živežnih namirnica, I. mlijeko 64, Zagreb.