

ANALIZA ŻYWNOŚCI

ZBIÓR ĆWICZEŃ

POD REDAKCJĄ ANNY GRONOWSKIEJ-SENGER

WYDANIE IV UZUPEŁNIONE, POPRAWIONE

**WYDAWNICTWO SGGW
WARSZAWA 2018**

© Copyright by Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2018
Wydanie IV uzupełnione, poprawione

Autorzy:

Anna Gronowska-Senger – wstęp i ćwiczenie 1

Małgorzata Drywień – ćwiczenia: 3, 5, 13, 14

Jadwiga Hamułka – ćwiczenia: 1, 2, 6, 11, 12

Agata Wawrzyniak – ćwiczenia: 4, 7, 8, 9, 10

Fotografie na okładce – Agata Wawrzyniak i Jadwiga Hamułka
Projekt graficzny okładki i strony tytułowej – Krystyna Piotrowska

Redaktor wydania I – Ewa Janda
Redaktor techniczny – Krystyna Piotrowska

ISBN 978-83-7583-224-2

Wydawnictwo SGGW
ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa
tel. (22) 593 55 20 (-22; -25 – sprzedaż), fax (22) 593 55 21
e-mail: wydawnictwo@sggw.pl
www.wydawnictwosggw.pl

Druk: ZAPOL sp.j., al. Piastów 42, 71-062 Szczecin

Spis treści

Wstęp	5
Ćwiczenie 1. Pobieranie i przygotowywanie próbek do badań laboratoryjnych	7
Ćwiczenie 2. Oznaczanie zawartości wody i suchej masy w wybranych produktach spożywczych	13
Ćwiczenie 3. Oznaczanie zawartości białka ogółem w wybranych produktach spożywczych	21
Ćwiczenie 4. Metody oznaczania zawartości cukrów bezpośrednio redukujących i sacharozy w syropach owocowych oraz laktozy w mleku	29
Ćwiczenie 5. Oznaczanie zawartości włókna pokarmowego w wybranych produktach spożywczych	44
Ćwiczenie 6. Oznaczanie zawartości tłuszczu w wybranych produktach spożywczych	50
Ćwiczenie 7. Metody oznaczania zawartości popiołu w wybranych produktach spożywczych	61
Ćwiczenie 8. Oznaczenie zawartości wapnia i żelaza w wybranych produktach spożywczych	68
Ćwiczenie 9. Oznaczanie zawartości magnezu i miedzi w wybranych produktach spożywczych	75
Ćwiczenie 10. Oznaczanie zawartości chlorków w produktach pomidorowych oraz soku z kiszanej kapusty i kiszonych ogórków	83
Ćwiczenie 11. Oznaczanie zawartości witaminy A w wybranych produktach spożywczych	87
Ćwiczenie 12. Oznaczanie zawartości karotenoidów o aktywności witaminy A w wybranych produktach spożywczych	95
Ćwiczenie 13. Oznaczanie zawartości ryboflawiny w wybranych produktach spożywczych	101
Ćwiczenie 14. Oznaczanie zawartości witaminy C w wybranych produktach spożywczych	106

Wstęp

Żywność zanim dotrze od wytwórcy do konsumenta jest narażona na liczne zagrożenia w sferze wartości odżywczej. Występują one zarówno w czasie jej produkcji, jak i przetwarzania. Jednocześnie żywność, jak wiemy, jest nierozdzielnie związana z pojęciem życia, a jej ilość i jakość wpływa na organizm człowieka, który do prawidłowego funkcjonowania wymaga stałego „dowozu” energii i składników budulcowych. Składnikami dostarczającymi energii są głównie węglowodany i tłuszcze, a materiałem budulcowym – białko, witaminy, sole mineralne i woda. Składniki te zawarte są w pożywieniu, przy czym żaden produkt spożywczy nie zawiera ich wszystkich w ilościach niezbędnych dla ustroju człowieka. Stąd też istnieje potrzeba znajomości składu i wartości odżywczej żywności, aby w zależności od potrzeb uzupełniać tę wartość tak, żeby spełniała ona swoje zadania z punktu widzenia żywienia. Celowi temu służy analiza żywności, dysponująca coraz nowocześniejszymi metodami, zwłaszcza instrumentalnymi, z których większość wymaga jednak dosyć kosztownej, precyzyjnej i nie zawsze dostępnej aparatury. Z tych względów proste, tradycyjne metody i techniki laboratoryjne będą jeszcze długo stosowane w oznaczaniu podstawowego składu chemicznego pożywienia. Znajomość ich zasad i postępowania analitycznego jest niezbędna dla specjalisty z zakresu żywienia.

Głównym zadaniem niniejszej publikacji jest więc przybliżenie zagadnień analizy żywności studentom z kierunku „żywienie człowieka” oraz „dietetyka”, w którego programach nauczania istnieje ten przedmiot.

Mając na względzie potrzeby dydaktyki w tej dziedzinie, starano się w publikacji zebrać stosunkowo najprostsze, najczęściej stosowane w rutynowej analizie żywności metody, głównie chemiczne, możliwe do zrealizowania w przeciętnie wyposażonym laboratorium. Metody te nie obejmują wszystkich składników pokarmowych, a jedynie podstawowe, bez wnikania, na przykład, w skład aminokwasowy białka czy kwasów tłuszczowych w tłuszczu.

Publikacja zawiera czternaście ćwiczeń, których tematyka obejmuje białka, tłuszcze i węglowodany oraz wybrane witaminy i składniki mineralne. Przy wyborze tych ostatnich kierowano się głównie ich niedoborem w pożywieniu, natomiast w przypadku witamin – ich podatnością na straty w procesach technologicznych, transporcie i przechowywaniu produktów spożywczych.

Anna Gronowska-Senger

Ćwiczenie 1

POBIERANIE I PRZYGOTOWYWANIE PRÓBEK DO BADAŃ LABORATORYJNYCH

Anna Gronowska-Senger, Jadwiga Hamulka

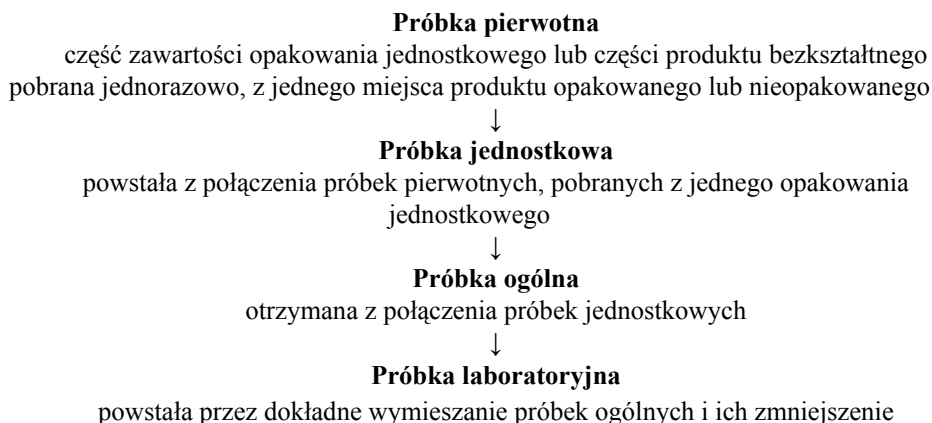
Wprowadzenie

Ocena żywieniowa produktów spożywczych pod kątem zawartości w nich poszczególnych składników pokarmowych stanowi podstawę określenia wartości odżywczej tych produktów. Ocena ta opiera się na oznaczeniu składu chemicznego żywności i wymaga przygotowania reprezentatywnej próbki, to znaczy charakteryzującej całą partię produktu, który chcemy analizować.

Prawidłowe pobranie i przygotowanie **reprezentatywnej** pod względem chemicznym i fizycznym oraz odpowiednio **jednorodnej** (rozdrobnionej, rozmieszanej bądź zhomogenizowanej) próbki produktu jest warunkiem dokładności analizy (jest nie mniej ważne od prawidłowości wykonania samej analizy).

Właściwe pobranie i przygotowanie takiej próbki nie jest łatwe ze względu na dużą różnorodność i zmienność produktów spożywczych. Ich występowanie w postaci stałej, półstałej czy ciekłej, jak również sposób opakowania, transportu i stan, w jakim materiał się znajduje w momencie pobierania próbek, rzutują na sposób postępowania związany z ich przygotowaniem.

Przygotowanie jednorodnej próbki laboratoryjnej wymaga wielu pośrednich etapów, co ilustruje następujący schemat:



Tak otrzymana próbka laboratoryjna stanowi podstawę do przeprowadzenia określonego typu analizy.

Czynnikiem warunkującym uzyskanie próbki reprezentatywnej dla całości analizowanego produktu jest prawidłowe pobranie próbek pierwotnych. Przed ich pobraniem wykonuje się oględziny badanej partii materiału i podejmuje decyzje w zakresie liczby próbek pierwotnych, jakie mają być pobrane, ich wielkości i miejsca pobrania. Liczbę próbek pierwotnych uzależnia się od wielkości badanej partii, przy czym im jest ona większa, tym więcej pobiera się próbek pierwotnych (patrz tab. 1), stopnia jednorodności produktu (o charakterze stałym, półstałym, ciekłym, gazowym) oraz złożonej precyzji badań. Należy również przestrzegać proporcjonalnego udziału w próbce wszystkich części danego produktu, a więc części jadalnych i niejadalnych.

Tabela 1. Ogólne zasady pobierania próbek

Liczba jednostek		
W partii towaru	z których należy pobrać próbki	w tym jednostek opakowanych nie mniej niż
1	1	–
2	2	–
3	3	–
4–10	co druga	3
11–100	co dziesiąta	5
> 100	co dwudziesta	10

Źródło: Drzazga B.: Analiza techniczna w przemyśle spożywczym. Część ogólna. WSiP, Warszawa 1992.

W przypadku partii produktu złożonej z pojedynczych jednostek opakowanych ilość jednostek, z których należy pobrać próbkę (x), można obliczyć, korzystając ze wzoru:

$$x = 0,7\sqrt{N}$$

gdzie:

N – liczba jednostek w partii towaru będącego przedmiotem badań,
 $0,7$ – współczynnik tabelaryczny, uzależniony od żądanej dokładności analizy.

Dla każdej grupy produktów spożywczych istnieją odrębne, ujęte zarządzeniami (Polskie Normy – PN), przepisy regulujące zasady pobierania i przygotowywania próbek przez zawodowo przygotowanych ekspertów, maklerów, dysponujących odpowiednimi przyrządami.

W zależności od formy występowania surowców, półproduktów lub wyrobów gotowych stosuje się nieco inne techniki i przyrządy pomocnicze pozwalają

jące na otrzymanie w efekcie końcowym próbki laboratoryjnej o cechach reprezentatywnych dla całości partii badanego towaru. Przykłady pobierania próbek:

- **z partii produktów w małych opakowaniach** (zawartych w opakowaniach zbiorowych):
 - nie wymaga na ogół przyrządów pomocniczych za wyjątkiem produktów będących w silosach, kontenerach lub zbiornikach, które pobiera się za pomocą sond zgłębnikowych,
 - dla produktów zawartych w opakowaniach jednostkowych do 100 g lub 100 cm³ próbkę pierwotną może stanowić jedno opakowanie,
 - losowe pobieranie próbek pierwotnych można przeprowadzić za pomocą liczb przypadkowych – losowych bądź za pomocą losowania „na ślepo”;
- **z produktów sypkich** przesyłanych luzem lub w jednostkowych opakowaniach przeladowywanych za pomocą urządzeń o działaniu ciągłym próbki pierwotne pobiera się z całego strumienia produktu w jednakowych odstępach czasu lub z jednostek ruchu;
- **z produktów ciekłych** próbki pobiera się za pomocą szklanych lub metalowych rurek zwężonych u dołu i zamykanych u góry podczas ciągłego przepływu cieczy w jednakowych objętościach w określonych odstępach czasu;
- **z produktów półstałych, gęstych, lepkich** (np. masło, miód) pobiera się próbki ze zbiornika po dokładnym wymieszaniu za pomocą świdra rynienkowego lub odpowiednich miarek.

Próbki powinny być pobierane szybko i w warunkach niewywołujących zmian właściwości produktu. Sprzęt i naczynia do pobierania próbek powinny być czyste, suche, wolne od obcych zapachów i odporne na chemiczne działanie produktu.

Wszystkie próbki jednostkowe miesza się bardzo dokładnie i z uzyskanej próbki ogólnej przygotowuje się średnie próbki laboratoryjne.

Przy pobieraniu i przygotowywaniu próbek do badań należy również przestrzegać warunków mających istotny wpływ na oznaczane składniki. Dlatego też podczas pobierania i przygotowywania próbek do oznaczania zawartości:

- **wody i składników odżywczych** należy maksymalnie skrócić czas mieszania i rozdrabniania produktów, unikać przegrzania homogenizatorów oraz przechowywać próbki w czystych, szczelnie zamkniętych naczyniach w odpowiedniej temperaturze;
- **witamin** należy zabezpieczyć próbki przed ogrzewaniem, światłem, tlenem, a w przypadku próbek przeznaczonych do oznaczania witaminy C natychmiast po pobraniu dodać na przykład kwasu szczawiowego;

- **składników mineralnych** należy zwrócić uwagę na stosowanie odpowiednich młynków, noży, homogenizatorów ze względu na możliwość zanieczyszczeń, na przykład związkami cynku czy żelaza.

Niektóre próbki (płynne, sypkie) nadają się do wykonania analiz na zawartość poszczególnych składników odżywczych jedynie po ich dokładnym wymieszaniu, większość jednak wymaga specjalnego przygotowania, na przykład przez rozdrobnienie lub homogenizację.

Przygotowane próbki laboratoryjne najczęściej przechowuje się w hermetycznie zamkniętych słoikach. W zależności od czasu wykonywania poszczególnych analiz niekiedy próbki wymagają utrwalenia, w celu uniknięcia zmian w zawartości niektórych składników, jak na przykład cukry, które mogą ulegać fermentacji. Jeżeli analizy wykonywane są w przeciągu najbliższych dni, próbki przechowuje się w zamkniętych słoikach, najlepiej w lodówce. W przypadku gdy analizy wykonywane są dopiero po kilku dniach lub później od daty pobrania, próbki utrwalą się na przykład przez zamrożenie.

Naczynie ze średnią próbką laboratoryjną należy dokładnie zamknąć i oznakować, podając na etykiecie:

- nazwę produktu i klasę jakości,
- nazwę producenta, datę produkcji i numer partii,
- wielkość partii,
- określenie przewidywanego badania laboratoryjnego,
- datę i miejsce pobrania próbki,
- numer próbki,
- numer opakowania, z którego próbka pochodzi,
- numer specyfikacji listu przewozowego lub innego dokumentu określającego dostawę,
- nazwiska i podpisy osób pobierających próbkę.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zdobycie przez studentów umiejętności pobierania i przygotowywania średnich próbek laboratoryjnych różnych produktów spożywczych do analizy chemicznej.

Produkty drobnoziarniste i sypkie

Zawartość opakowania jednostkowego, na przykład mąki lub kaszy, wysypać, formując jednocześnie stożek, który następnie należy rozplaszczyc i podzielić po przekątnych na cztery części. Dwie przeciwległe odrzucić, a pozostałe

dwie części wymieszać w suchym, czystym naczyniu szklanym, po czym utworzyć podobny do poprzedniego stożek i dzielić, jak wcześniej, aż do uzyskania próby w ilości 100 g. Otrzymaną próbkę laboratoryjną zemleć, przesypać do suchego, czystego naczynia, szczelnie zamknąć i zaopatrzyć w etykietę zawierającą nazwę produktu, datę sporządzenia próbki oraz nazwisko osoby przygotowującej. Masa uzyskanej próbki laboratoryjnej nie powinna być mniejsza od 30 g, aby analizę można było wykonać kilkakrotnie.

W przypadku mąki pomijamy etap związany ze sproszkowaniem próbki.

Produkty ciekłe

Zawartość opakowań jednostkowych (butelki, słoiki) przenieść do czystej, suchej zlewki o pojemności 1000 cm³, bardzo starannie wymieszać bagietką, a następnie pobrać pipetą 3 razy po 50 cm³. W przypadku produktów lepkich, na przykład olej, odważyć 150 g produktu na wadze technicznej.

Produkty maziste i ciastowate

Opakowanie jednostkowe, na przykład sera topionego, masła, należy rozetrzeć w moździerzu porcelanowym, a następnie pobrać z kilku miejsc próbki tak, aby łączna masa wynosiła co najmniej 125 g. Probki wymieszać i przenieść natychmiast do szczelnie zamkniętego naczynia szklanego, na przykład do słoika typu twist-off. próbka powinna wypełniać przynajmniej połowę naczynia.

Przy pobieraniu próbek z serów twardych należy z próbki jednostkowej sera usunąć skórkę, a następnie zetrzeć go na tarce, wymieszać i przenieść do szczelnie zamkniętego naczynia szklanego.

Mięso

Z kawałka mięsa, na przykład wołowego, wieprzowego, pobrać z kilku miejsc, za pomocą ostrego, nierdzewnego noża próbki pierwotne, reprezentujące zarówno tkankę mięsną, jak i tłuszczową. Masa jednej próbki powinna wynosić około 50 g. Probki pierwotne rozdrobnić za pomocą maszynki do mielenia mięsa, w celu przygotowania próbki laboratoryjnej. Uzyskaną próbkę przenieść do czystego, suchego naczynia szklanego, szczelnie zamknąć i przechowywać w temperaturze +4°C do dalszej analizy lub zamrozić.

Owoce i warzywa

Z opakowania jednostkowego przygotowanych owoców lub warzyw usypać stożek, rozpląszczyć i podzielić dwiema przekątnymi (za pomocą linijki) na cztery trójkąty, z których dwa przeciwległe odrzucić, a z pozostałych ponownie utworzyć stożek i dzielić, jak poprzednio. Warzywa lub owoce wybierać ręcznie

losowo, nie biorąc pod uwagę cech poszczególnych egzemplarzy. Usunąć części niejadalne, na przykład: ogonki, pestki, a następnie owoce twardsze (gruszki, jabłka itp.) zetrzeć na tarce, natomiast owoce miękkie rozetrzeć w porcelanowym moździerzu. Uzyskaną średnią próbkę laboratoryjną suszyć w temperaturze 50°C. Zemleć i dosuszać w temperaturze 100°C, po czym przenieść do suchego, czystego naczynia szklanego i zabezpieczyć do czasu przeprowadzenia analiz.

Naczynie z próbką powinno być szczelnie zamknięte i otwierane na krótko – w czasie wykonywania analiz. Nie wolno próbki zostawiać w pobliżu źródła ciepła czy też na oknie z powodu narażenia na działanie promieni słonecznych lub zimna.

Przed przystąpieniem do wykonywania naważki analitycznej próbkę należy doprowadzić do temperatury pokojowej i dokładnie wymieszać. Po odważeniu należy ją ponownie zabezpieczyć, aby można było, jeżeli zaistnieje taka potrzeba, powtórzyć oznaczenie.

Naczynie, w którym mamy wykonać naważkę, musi być suche i czyste.

UWAGA: nie wolno odważać substancji bezpośrednio na szalkach, bez jakiegokolwiek naczynia! Ze względu na higroskopijność papieru nie można na nim odważać próbek przeznaczonych do analiz chemicznych.

Wyposażenie laboratoryjne

Sprzęt i aparatura:

Maszynka do mielenia mięsa

Młynek

Moździerz porcelanowy

Tarka plastikowa

Waga analityczna

Waga techniczna

Piśmiennictwo

DRZAZGA B.: Analiza techniczna w przemyśle spożywczym. Część ogólna. WSiP, Warszawa 1992

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

NOGALA-KAŁUCKA M. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.

OBIEDZIŃSKI M. (red.): Wybrane zagadnienia z analizy żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2009.

Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 7 marca 2003 roku w sprawie szczegółowych warunków pobierania próbek artykułów rolno-spożywczych (DzU 2003 nr 59, poz. 526).

Ćwiczenie 2

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WODY I SUCHEJ MASY W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Jadwiga Hamułka

Wprowadzenie

Zawartość wody w produktach spożywczych jest jednym z podstawowych kryteriów określających ich jakość, wartość odżywczą i przydatność przechwalniczą. Im większa jest procentowa zawartość wody w danym produkcie, tym mniejsza ilość cennych składników odżywczych – białek, tłuszczów i węglowodanów. Ponadto wraz ze wzrostem zawartości wody zwiększa się możliwość rozwoju drobnoustrojów w produktach spożywczych, a co za tym idzie – maleje ich przydatność do długotrwałego przechowywania bez właściwej obróbki technologicznej.

Zawartość wody w produktach spożywczych waha się w szerokich granicach – od kilku procent do ponad 90% i podlega zmianom w wyniku obróbki technologicznej bądź w czasie ich przechowywania. Niektóre surowce zawierają prawie stałą ilość wody (np. mleko, niektóre owoce i warzywa, pewne partie tuszy zwierzęcej), ale w większości produktów jej zawartość ulega dużym wahanom.

Zawartości wody w produktach spożywczych, w %

[Kunachowicz i in. 2017]:

- soki, napoje, mleko, herbata, kawa – 85–100
- świeże: warzywa, owoce i grzyby – 75–95
- ryby – 50–80
- mięso i przetwory, sery, jaja – 40–75
- masło i margaryny – 15–55
- pieczywo – 25–40
- produkty zbożowe, mąki – 7–15
- rośliny strączkowe suche – 8–12

Z analitycznego punktu widzenia **zawartość wody** w produkcie spożywym jest to taka ilość wody, jaką można w nim oznaczyć każdą z dostępnych i dla danego produktu właściwych metod.

W produktach spożywczych woda występuje jako tak zwana woda wolna (stanowiąca rozpuszczalnik substancji organicznych i mineralnych, wypełniająca wolne przestrzenie i niepodlegająca zjawiskom kapilarnym) i woda związana niebiorąca udziału w regulacji ciśnienia osmotycznego (woda higroskopijna, kapilarna, krystalizacyjna i konstytucyjna).

W produktach spożywczych o bardzo dużej powierzchni (np. produkty sproszkowane) ilość wody zaadsorbowanej może być bardzo duża. Zależy to od higroskopijności substancji. Wydzielenie i oznaczenie tej wody z produktu jest stosunkowo łatwe. Trudniej jest wydzielić wodę kapilarną, a najtrudniej usunąć z produktu spożywczego wodę krystalizacyjną i chemicznie związaną (konstytucyjną).

Z pojęciem wody nieodłącznie związane jest pojęcie suchej masy (suchej substancji). **Suchą masę** danego produktu spożywczego rozumie się jako pozostałość po usunięciu z niego wody. Procesowi temu towarzyszy ulatnianie się niektórych substancji, na przykład: olejków eterycznych, lotnych kwasów i niektórych alkoholi.

W praktyce analitycznej często przyjmuje się, że zawartość wody i zawartość suchej masy wzajemnie się uzupełniają, co można przedstawić za pomocą następujących równań:

$$\text{zawartość suchej masy [\%]} = 100 - \text{zawartość wody [\%]}$$

$$\text{zawartość wody [\%]} = 100 - \text{zawartość suchej masy [\%]}$$

Są to więc pojęcia względne i umowne. Przyjmuje się, że część produktu, która w warunkach stosowanej metody zostaje z niego usunięta, stanowi zawartość wody, a ta, która pozostaje – suchą masę.

W analityce rozróżnia się następujące pojęcia dotyczące suchej masy, a mianowicie:

- **sucha masa całkowita** – otrzymana przez suszenie produktu w określonych warunkach;
- **sucha masa rozpuszczalna w wodzie** – czyli ekstrakt;
- **sucha masa skorygowana** – otrzymana z różnicy suchej masy całkowitej i zawartości związków dodawanych do produktów, na przykład soli.

Do oznaczania zawartości wody lub suchej masy w produktach spożywczych stosuje się następujące metody:

- suszenia termicznego w różnych warunkach temperatury i ciśnienia,
- destylacji azeotropowej,

- pomiaru stałej dielektrycznej,
- densymetryczne,
- refraktometryczne,
- pomiaru rezonansu jądrowo-magnetycznego,
- chemiczne.

Metody suszenia termicznego polegają na wydzieleniu wody z próbki za pomocą suszenia w podwyższonej temperaturze, pod normalnym lub zmniejszonym ciśnieniem. Suszenie termiczne zachodzi wówczas, gdy ciśnienie pary wodnej w materiale poddanym suszeniu jest wyższe od ciśnienia panującego w otoczeniu (komorze suszarki), przy czym przebiega ono tym szybciej, im większa jest różnica tych ciśnień.

Prawidłowość wyników otrzymanych metodą suszenia termicznego zależy nie tylko od składu chemicznego i właściwości badanego produktu, ale także od parametrów stosowanej metody, a więc temperatury procesu suszenia, czasu suszenia, ciśnienia oraz sposobu przygotowania próbki.

W zależności od produktu, a właściwie jego składu chemicznego, stosuje się różne warunki suszenia, a mianowicie:

- **w produktach niezawierających związków wrażliwych na wysoką temperaturę lub zawierających je w niewielkiej ilości, zwłaszcza cukrów prostych** (produkty zbożowe) – suszenie bezpośrednie próbek w temperaturze 130°C do uzyskania stałej masy;
- **w produktach zawierających duże ilości cukrów prostych lub innych termolabilnych związków** – suszenie próbek w warunkach obniżonego ciśnienia w temperaturze odpowiednio niższej lub nawet w temperaturze pokojowej przy jednoczesnym zastosowaniu związków pochłaniających wodę, jak na przykład: chlorek wapnia, stężony kwas siarkowy, bezwodnik kwasu fosforowego;
- **w produktach zawierających duże ilości białek, cukrów prostych i dekstryn** (tworzących w czasie suszenia błonkę na powierzchni – np. mleko, sery, mięso) – suszenie próbek ze wstępnym podsuszaniem w temperaturze 60°C po zmieszaniu produktów podlegających zlepianiu i zapiekaniu (np. mięso, sery), z odpowiednim sypkim materiałem (np. wyprażonym piaskiem morskim) lub zastosowaniu pasków bibuły filtracyjnej (np. w przypadku mleka), przez co zwiększa się powierzchnia parowania i dosuszenie próbek w temperaturze 100–105°C do uzyskania stałej masy;
- **w produktach na wpół ciekłych** – po wstępnym dwukrotnym potraktowaniu próbek alkoholem dodawanym w ilości kilka razy większej i odparowaniu na łaźni wodnej (co wiąże się z prawie całkowitym usunięciem wody) próbki dosusza się w suszarce zazwyczaj w temperaturze 100–105°C;
- **w sokach, przecierach owocowych i warzywnych** – wstępne podsuszenie na wrzącej łaźni wodnej, a następnie dosuszenie próbki w suszarce w temperaturze 100–105°C;

W czasie suszenia termicznego z produktów usuwana jest woda wolna i słabo związana, natomiast nie jest usuwana woda krystalizacyjna i chemicznie związana.

Próbki do czasu wystudzenia, przed każdym ważeniem, przechowywane są w ekzykatorze wraz z czynnikiem pochłaniającym wilgoć (np. krzemionką – SiO_2 , bezwodnym węglanem wapnia – CaCO_3). Czas przetrzymywania próbek w ekzykatorze uzależniony jest od temperatury początkowej, wielkości próbki, rodzaju naczynia i temperatury, jaka panuje na zewnątrz.

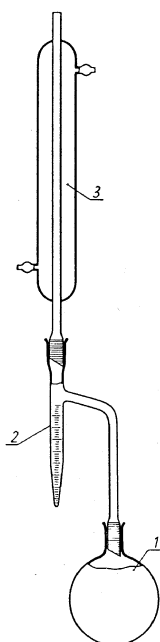
Metoda destylacji azeotropowej należy do bezpośrednich metod oznaczania zawartości wody w produktach spożywczych. Polega na wydzieleniu wody z badanego materiału w drodze destylacji z rozpuszczalnikami organicznymi o temperaturze wrzenia powyżej 100°C oraz mniejszej gęstości, niemieszającymi się z wodą, lecz tworzącymi z nią tak zwane mieszaniny azeotropowe. W metodzie tej stosowane są rozpuszczalniki o gęstości mniejszej od gęstości wody (po skropleniu tworzą warstwę znajdującą się nad warstwą wody), na przykład toluen – $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ (temp. wrzenia 111°C , $d = 0,867 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$) czy ksylen – $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$ (temp. wrzenia 140°C , $d = 0,862 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$).

Oznaczenie przeprowadza się w specjalnych aparatach (rys. 1), gdzie skroplony w chłodnicy destylat jest odbierany w kalibrowanej probówce i rozdzielany na dwie warstwy. Destylacja trwa zwykle od 30 do 60 minut.

Metoda destylacji azeotropowej polecana jest do oznaczania zawartości wody w produktach nieulegających rozkładowi w temperaturze wrzenia danego rozpuszczalnika oraz do produktów niezawierających składników lotnych rozpuszczalnych w wodzie po oddestylowaniu. Badany produkt powinien zawierać nie mniej niż 0,5% i nie więcej niż 40% wody.

Metoda ta nie powinna być stosowana do surowców i produktów zawierających większe ilości monosacharydów, ze względu na możliwość ich rozkładu w podwyższonej temperaturze z wydzieleniem wody, czy też hydrolizę oligosacharydów, na przykład sacharozy, do cukru inwertowego (glukozy, fruktozy) i związane z tym przyłączenie pewnej ilości wody.

Metoda dielektryczna oznaczania zawartości wody polega na wprowadzeniu badanej próbki między okładki kondensatora i zmierzeniu jego pojemności elektrycznej. Zawartość wody odczytuje się z empirycznie wycecho-



Rysunek 1. Aparat do oznaczania zawartości wody metodą destylacji:
1 – kolba destylacyjna,
2 – wyskalowana biuretka,
3 – chłodnica

wanej skali lub specjalnych tablic przeliczeniowych. Metoda ta stosowana jest głównie do oznaczania zawartości wody w zbożach i przetworach zbożowych.

Metody densymetryczne polegają na przygotowaniu roztworu podstawowego i zmierzeniu jego gęstości, którą na podstawie specjalnych tablic przelicza się na zawartość ekstraktu. Po oznaczeniu części nierozpuszczalnych oblicza się zawartość wody i suchej masy. Metody te stosowane są do produktów, w których jeden składnik (np. cukry) może występować w różnych ilościach (np. marmolady, dżemy, miody).

Metody refraktometryczne opierają się na pomiarze współczynnika załamania światła (refrakcji), który zależy od długości fali padającego światła, rodzaju substancji oraz jej stężenia w badanym środowisku. Odczytu ekstraktu dokonuje się na jednej z dwóch skal – na skali cukrowej refraktometru (jako procentową zawartość ekstraktu) lub na skali podającej wartość współczynnika załamania światła. Pomiar przeprowadza się w określonej temperaturze lub uwzględnia odpowiednią poprawkę. Metody te stosowane są przede wszystkim do oznaczania zawartości ekstraktu w przetworach owocowych (sokach, marmoladach, dżemach, konfiturach) i warzywnych (sokach, pastach pomidorowych) oraz w roztworach cukrów i miodów.

Metoda rezonansu jądrowo-magnetycznego (NMR) wykorzystuje zjawisko pochłaniania energii pola elektromagnetycznego wysokiej częstotliwości (w zakresie fal radiowych) przez jądra atomów wodoru wody znajdującej się w badanym materiale. Metoda ta charakteryzuje się dużą dokładnością i powtarzalnością wyników, jest szybka, nadaje się do seryjnych oznaczeń. Wyniki nie zależą od granulacji ani składu chemicznego produktu. Metoda ta nadaje się do oznaczeń w zakresie od 3 do 100% zawartości wody.

Metody chemiczne umożliwiają oznaczenie całkowitej zawartości wody, zarówno wody wolnej, jak i związanej. W metodach tych wykorzystuje się reakcje chemiczne zachodzące pomiędzy wodą zawartą w próbkach badanych produktów oraz niektórymi substancjami celowo do nich dodanymi, na przykład: węglík wapnia (karbid), wodorek wapnia lub odczynnik Fischera. Powstałe w wyniku tych reakcji produkty oznacza się ilościowo. Na tej podstawie i z wykorzystaniem równania reakcji chemicznych oblicza się procentową zawartość wody.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodą suszenia termicznego oraz destylacji azeotropowej oznaczania zawartości wody i suchej masy w wybranych produktach spożywczych.

Oznaczenie zawartości wody (suchej masy) w produktach zbożowych przez bezpośrednie suszenie

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na określeniu ubytku wody z próbki w czasie jej bezpośredniego suszenia w temperaturze 130°C.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do wysuszonego do stałej masy i zważonego z dokładnością do 0,0001 g naczynka wagowego odważyć na wadze analitycznej około 2 g zmielonej i dokładnie wymieszanej próbki. Naczynko z próbką wstawić do suszarki o temperaturze 130°C i suszyć do uzyskania stałej masy, to znaczy gdy różnica dwóch następujących po sobie ważeń nie przekracza 0,001 g. Czas suszenia powinien wynosić minimum 90 minut – w suszarce z samoczynną wymianą powietrza i minimum 60 minut – przy mechanicznej wymianie powietrza. Po tym czasie naczynko przenieść do eksykatora, ostudzić i zważyć na wadze analitycznej. Ponownie umieścić w suszarce w celu dosuszenia i po 15 minutach ostudzić naczynko z próbką i ponownie zważyć. Suszenie uważa się za zakończone, gdy próbka osiągnie stałą masę.

Obliczyć zawartość wody i suchej masy w gramach w przeliczeniu na 100 g badanego produktu.

Oznaczenie zawartości suchej masy (wody) w mleku przez suszenie ze wstępnym podsuszeniem

ZASADA METODY

Metoda ta polega na wstępnym podsuszeniu mleka na bibule filtracyjnej w temperaturze 60°C i dosuszeniu do stałej masy w temperaturze 100–105°C. Wstępne podsuszenie na bibule filtracyjnej zapobiega powstawaniu na powierzchni suszonego materiału „skorupki” utrudniającej odparowanie wody z głębszych warstw produktu.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do wysuszonego do stałej masy i zważonego z dokładnością do 0,0001 g naczynka wagowego ze spiralnie zwiniętymi paskami bibuły filtracyjnej odmierzyć 2 cm³ mleka i dokładnie rozprowadzić na bibule. Naczynko z mlekiem zważyć na wadze analitycznej i umieścić w suszarce o temperaturze 60°C na 2 godziny. Po tym czasie temperaturę suszarki podwyższyć do 105°C i próbkę suszyć dalej – przez następne 2 godziny. Po zakończeniu suszenia naczynko umieścić w eksykatorze, ostudzić i zważyć z dokładnością do 0,0001 g. Próbkę poddać jeszcze

jednemu suszeniu w ciągu 1 godziny, ostudzić w eksykatorze i zważyć. Jeżeli różnica dwóch kolejnych ważeń nie przekracza 0,001 g, to suszenie uważa się za zakończone, gdyż próbka uzyskała stałą masę. W przeciwnym razie próbkę należy dalej suszyć.

Obliczyć zawartość suchej masy i wody w gramach w przeliczeniu na 100 g mleka.

Oznaczenie zawartości suchej masy (wody) w przecierach owocowych i warzywnych metodą podwójnego suszenia

ZASADA METODY

Metoda polega na wagowym oznaczeniu suchej masy (wody) w badanym produkcie poprzez wstępne podsuszenie próbki na łaźni wodnej i dosuszenie do stałej masy w suszarce w temperaturze 95–98°C.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do wysuszonego do stałej masy i zważonego z dokładnością do 0,0001 g naczynka wagowego przenieść 3–5 g badanego przecieru. Naważkę przecieru równomiernie rozproszyc na powierzchni naczynka i ponownie zważyć. Naczynko z przecierem umieścić na wrzącej łaźni wodnej na 45 minut. Po tym czasie usunąć skropliny pary wodnej ze spodniej części naczynka i umieścić próbkę w suszarce o temperaturze 95–98°C na kolejne 45 minut. Po zakończeniu suszenia naczynko umieścić w eksykatorze, ostudzić i zważyć z dokładnością do 0,0001 g. Ponownie umieścić w suszarce w celu dosuszenia i po 15 minutach ostudzić naczynko z próbką i ponownie zważyć. Suszenie uważa się za zakończone, gdy różnica dwóch następujących po sobie ważeń nie przekracza 0,001 g.

Obliczyć zawartość suchej masy i wody w gramach w przeliczeniu na 100 g badanego produktu.

Oznaczenie zawartości wody (suchej masy) w produktach mięsnych metodą destylacji azeotropowej

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na wydzieleniu wody z badanego produktu w drodze destylacji z rozpuszczalnikami organicznymi niemieszającymi się z wodą, lecz tworzącymi z nią mieszaniny azeotropowe o punkcie wrzenia wyższym niż 100°C.

WYKONANIE OZNACZENIA

Na wysuszonej bibule zważyć 10 g dobrze rozdrobnionej średniej próbki laboratoryjnej z dokładnością do 0,0001 g. Przenieść próbkę do kolby destylacyjnej aparatu z kilkoma ziarnkami pumeksu lub tłuczonej porcelany i wlać

100 cm³ toluenu lub innego rozpuszczalnika organicznego świeżo przedestylowanego i wysyconego wodą. Podłączyć kolbę do zestawu destylacyjnego (rys. 1), włączyć ogrzewanie. Prowadzić destylację do czasu, gdy poziom wody w odbieralniku nie ulegnie zmianie w ciągu 5 minut (zwykle czas destylacji trwa około 30 min). Po zakończeniu destylacji odbieralnik ochłodzić. Odczytać zawartość wody na skali odbieralnika z dokładnością do 0,05 cm³.

Wynik podać jako zawartość wody i suchej masy w gramach w przeliczeniu na 100 g badanego produktu, przy założeniu, że gęstość wody wynosi 1 g·cm⁻³.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki

Toluen (wysycony wodą)

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Waga techniczna

Suszarka laboratoryjna

Eksykator

Łaźnia wodna

Aparat do destylacji azeotropowej

Piśmiennictwo

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., PRZYGODA B., IWANOW K.: Tabele składu i wartości odżywczej żywności. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2017.

NOGALA-KAŁUCKAM. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.

OBIEDZIŃSKI M. (red.): Wybrane zagadnienia z analizy żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2009.

Ćwiczenie 3

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA OGÓLEM W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Małgorzata Drywień

Wprowadzenie

Białka, obok tłuszczów i węglowodanów, to podstawowy składnik żywności, będący źródłem aminokwasów dla organizmów ludzi i zwierząt. Zawartość białka w produktach spożywczych jest jednym z głównych wyznaczników ich wartości odżywczej.

Zawartość białka ogółem w wybranych produktach spożywczych, w g·(100 g)⁻¹ części jadalnych

[Kunachowicz i in. 2018]:

■ proszek jajeczny	– 48,4
■ mleko w proszku pełne	– 27,0
■ sery twarde	– 25,0–29,0
■ mięso i przetwory mięsne	– 7,0–27,0
■ ryby	– 16,0–20,0
■ sery twarogowe	– 13,0–20,0
■ nasiona roślin strączkowych (suche)	– 21,0–34,0
■ jaja świeże	– 12,5
■ mąki i kasze	– 7,0–13,0
■ mleko krowie	– 3,3–3,5
■ owoce i warzywa świeże	– 0,4–7,0

Białka należą do związków azotowych i zawierają w swoim składzie, w zależności od rodzaju produktu, 15–18% azotu (przeciętnie 16%). Dzięki tej zależności możliwe jest ilościowe oznaczenie białek na podstawie zawartości azotu, jeśli produkty nie zawierają innych związków azotowych lub zawierają ich niewiele. Określoną eksperymentalnie ilość azotu należy pomnożyć przez odpowiedni współczynnik, aby uzyskać zawartość białka w analizowanej próbie. Dla białek, w których jest około 16% azotu, współczynnik ten wynosi 6,25

(100% białka/16% azotu = 6,25). Dla białek zawierających różną od 16% ilość azotu (szczególnie pochodzenia roślinnego) współczynnik należy wyznaczyć doświadczalnie lub posłużyć się istniejącymi tabelami współczynników indywidualnych.

Wartości współczynników indywidualnych dla przeliczania azotu na białko

■ mleko i produkty mleczne	– 6,38
■ jaja	– 6,25
■ mięso i przetwory, ryby, drób	– 6,25
■ kasza kukurydziana	– 6,25
■ kasza gryczana	– 6,31
■ kasza jęczmienna	– 5,83
■ kasza manna	– 5,70
■ makaron jajeczny	– 5,70
■ mąka pszenna wrocławska typ500	– 5,70
■ pieczywo mieszane żytnio-pszenne	– 5,73
■ płatki owsiane	– 5,83
■ ryż	– 5,95
■ groch, całe ziarno	– 6,25
■ soja	– 5,71
■ fasola	– 6,00
■ warzywa, owoce	– 6,25
■ produkty mieszane, racje pokarmowe	– 6,25

W analityce żywnościowej do oznaczeń zawartości białka mogą być stosowane następujące metody: Kjeldahla, Sorensena, kolorymetryczne i immunoenzymatyczna.

Metoda Kjeldahla jest najczęściej stosowaną metodą oznaczania azotu ogólnego i pośrednią oznaczania białka, stanowi metodę odwoławczą. Jej zasada polega na mineralizacji badanej substancji we wrzącym kwasie siarkowym, w wyniku czego białka ulegają utlenieniu do CO₂ i H₂O. Azot grup aminowych białek uwalnia się w postaci amoniaku i wiąże z kwasem siarkowym. Po zalkalizowaniu próbki amoniak oddestylowuje się do kwasu borowego, a następnie odmiareczkuje mianowanym roztworem kwasu solnego lub siarkowego. Analiza przebiega w trzech etapach:

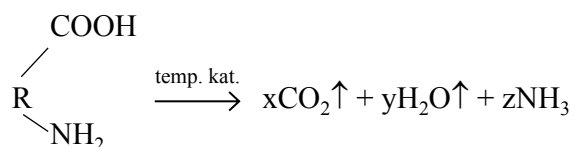
- mineralizacja próbki,
- destylacja amoniaku z parą wodną,
- miareczkowanie.

Mineralizacja, czyli spalanie związków organicznych polega na intensywnym ich utlenieniu i przekształceniu substancji organicznej w nieorganiczną. Zachodzą tu następujące procesy:

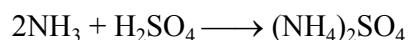
- rozkład kwasu siarkowego z uwolnieniem tlenu



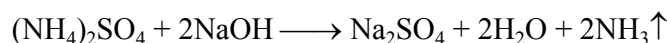
- utlenienie substancji organicznych z uwolnieniem dwutlenku węgla, wody i amoniaku



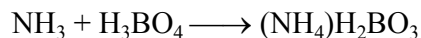
- przechodzenie amoniaku w siarczan amonowy



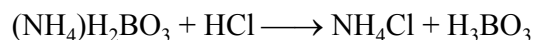
Destylacja amoniaku odbywa się w warunkach podwyższonej temperatury i nadmiaru zasady:



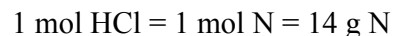
Wydzielony amoniak jest wiązany w nadmiarze kwasu borowego:



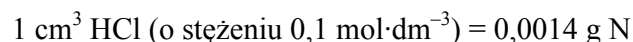
a następnie **miareczkowany** mianowanym roztworem kwasu solnego (lub siarkowego):



Z równania tego wynika, że:



stąd możemy określić miano używanego do oznaczeń roztworu kwasu solnego względem azotu:



Na tej podstawie z ilości 1 cm^3 roztworu HCl zużytej do miareczkowania wylicza się ilość azotu w oznaczanej próbce, następnie, stosując odpowiedni współczynnik przeliczeniowy, określa się zawartość białka. Opisaną metodą może być oznaczany azot pochodzący z jonów amonowych oraz związków

zawierających grupy amidowe, aminowe i iminowe, natomiast nie są oznaczane azotany, azotyny oraz azot aromatycznych pierścieni heterocyklicznych.

Metoda Sorensena (miareczkowania formolowego) oparta jest na zablokowaniu grup aminowych aminokwasów aldehydem mrówkowym, w wyniku czego tracą one swoje właściwości, grupa karboksylowa natomiast zostaje odblokowana i może być zmiareczkowana mianowanym roztworem wodorotlenku sodu. Liczba uwolnionych grup karboksylowych jest równoważna liczbie związanych z formaldehydem grup aminowych.

Metody kolorymetryczne:

- **oparte na wbudowywaniu barwników** – polegają na ilościowym wbudowywaniu do białek barwników organicznych dodanych w nadmiarze (oranż G, czerń amidowa 10B, Coomassie Blue G-250), w wyniku czego tworzą się nierozpuszczalne kompleksy, które mogą być odwirowane lub oddzielone przez sączenie od reszty roztworu; mierzy się natężenie barwy pozostałego roztworu, zależne od ilości barwnika niezwiązanego z białkiem, które jest odwrotnie proporcjonalne do ilości białka w badanej próbce;
- **biuretowa** – polega na oznaczaniu białek i peptydów zawierających co najmniej dwa wiązania peptydowe, które tworzą w środowisku alkalicznym barwne kompleksy z jonami miedzi; stężenie białka jest proporcjonalne do natężenia fioletowego zabarwienia roztworu, którego absorpcję mierzy się przy długości fali 540 nm;
- **Lowrego** – w pierwszej fazie polega na wywołaniu reakcji biuretowej, po czym na redukcji kwasów fosforowolframowego i fosfomolibdenowego (odczynnik Folina-Ciocalteu'a) do odpowiednich tlenków przez miedź związaną z białkiem oraz tyrozynę i tryptofan, zawarte w białku; absorbancję powstałego niebieskiego roztworu mierzy się przy 750 nm;

Metoda immunoenzymatyczna (ELISA) polega na tworzeniu połączeń specyficznych przeciwciał z oznaczanym białkiem oraz odpowiednim enzymem, który reagując z bezbarwnym substratem, przeprowadza go w barwny związek. Natężenie barwy oznacza się spektrofotometrycznie przez porównanie z roztworem wzorcowym. Metoda ta pozwala na oznaczenie zarówno zawartości białek, jak i stopnia ich denaturacji.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodą Kjeldahla oznaczania zawartości białka ogółem w wybranych produktach spożywczych.

Oznaczanie zawartości białka metodą Kjeldahla

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na mineralizacji badanej substancji we wrzącym kwasie siarkowym. Związki organiczne, w tym także białka, zostają utlenione do CO_2 i H_2O ; azot zawarty w grupach aminowych białek uwalnia się w postaci amoniaku i wiąże z kwasem siarkowym. Po zalkalizowaniu próbki amoniak oddestylowuje się do odbieralnika, gdzie jest on wiązany przez roztwór kwasów borowego i odmiareczkowany roztworem kwasów solnego lub siarkowego.

WYKONANIE OZNACZENIA

Mineralizacja na mokro. Do oznaczeń należy pobrać taką próbkę, by zawierała około 0,02 g azotu, co w przypadku większości produktów spożywczych odpowiada naważce rzędu 0,5–1,5 g.

Próbkę produktu odważyć na papierku bezazotowym z dokładnością do 0,001 g, a następnie wprowadzić do kolby Kjeldahla, dodając katalizator, 5 cm³ 30-procentowego roztworu perhydrolu oraz 15 cm³ stężonego kwasu siarkowego ($d = 1,84$):

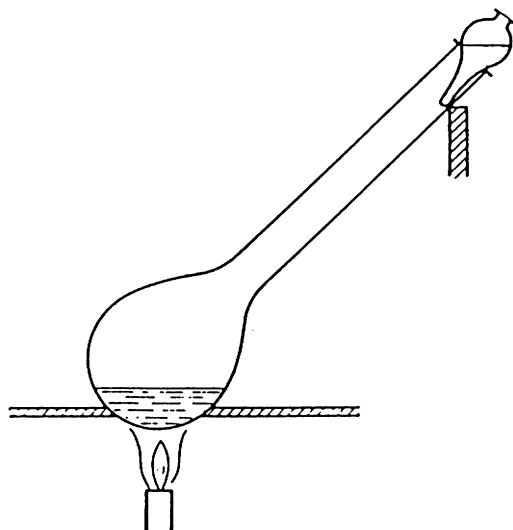
- perhydrol – jako czynnik utleniający dodawany jest w celu przyspieszenia procesu spalania, co zapobiega stratom azotu;
- katalizator (sole miedzi, selenu) – przenosi tlen z kwasu siarkowego na substancję organiczną;
- substancje podwyższające temperaturę wrzenia (K_2SO_4 , H_3PO_4) – skracają czas mineralizacji;
- kwas siarkowy – dodawany w ilości 15 cm³·(1 g)⁻¹ suchej masy, jest głównym czynnikiem utleniającym; powinien charakteryzować się określoną gęstością, co warunkuje uzyskanie odpowiedniej temperatury spalania (ok. 330°C).

Równoległe z próbką badaną należy przygotować próbkę ślepą dla stosowanego zestawu odczynników.

Kolbę Kjeldahla wraz z zawartością umieścić nad płomieniem palnika (rys. 2), początkowo ogrzewając łagodnie aż do momentu, gdy próba przestanie się pienić. Następnie wylot kolby zamknąć szklaną chłodniczką napelnioną wodą, która zapobiega nadmiernemu parowaniu kwasu. Zwiększyć ogrzewanie i prowadzić mineralizację do momentu, gdy zawartość kolby będzie klarowna.

UWAGA: Cały proces spalania prowadzić pod wyciągiem!

Po zakończeniu mineralizacji i ostudzeniu próbkę rozcieńczyć 5 cm³ wody destylowanej i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 cm³. Kolbę Kjeldahla popłukać trzy-cztero-krotnie małymi porcjami wody destylo-

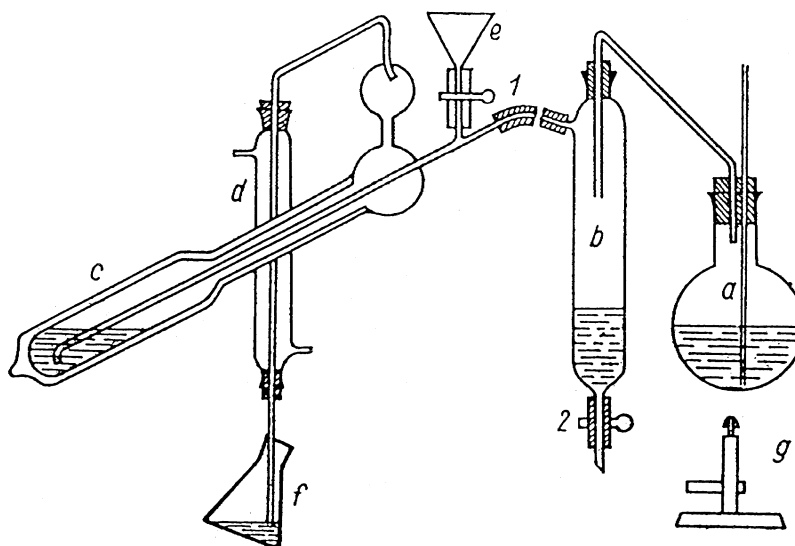


Rysunek 2. Ustawienie kolby Kjeldahla podczas mineralizacji próbki

wanej, za każdym razem dokładnie przenosząc roztwór do kolby miarowej. Kolbę uzupełnić do 100 cm^3 wodą destylowaną (roztwór podstawowy).

Destylacja amoniaku. Destylację prowadzi się w aparacie Parnasa-Wagnera (rys. 3).

Przed przystąpieniem do właściwego oznaczenia uruchomić aparat przy zamkniętych zaciskach (1, 2), doprowadzając do wrzenia wodę w wytwornicy pary wodnej (a). Następnie otworzyć zaciski dla wyrównania ciśnienia pomiędzy aparatem a otoczeniem i wyłączyć grzałkę. Do odbieralnika (f) wlać około 10 cm^3 4-procentowego roztworu kwasu borowego i dodać 8 kropli wskaźnika Tashiro. Odbieralnik postawić pod wylot chłodnicy (d) tak, aby był on zanurzony w roztworze kwasu. Do kolby destylacyjnej aparatu (c) wprowadzić przez lejek (e) kolejno: 10 cm^3 roztworu podstawowego, 3–4 krople fenoloftaleiny, 5– 10 cm^3 wody destylowanej w celu spłukania lejka, a następnie, bardzo ostrożnie, 10– 15 cm^3 30-procentowego roztworu NaOH (do uzyskania czerwonego zabarwienia w kolbie destylacyjnej). Włączyć ogrzewanie wytwornicy pary wodnej (g), zamknąć zaciski i prowadzić destylację, aż do uzyskania obojętnego odczynu kropeł spływających z chłodnicy (sprawdzić papierkiem wskaźnikowym). Usunąć odbieralnik i wyłączyć ogrzewanie. W wyniku przerwania ogrzewania i ochłodzenia aparatu powstaje w nim podciśnienie, które powoduje zassanie zawartości kolby destylacyjnej do zbiornika na zlewki (b), skąd należy ciecz usunąć przez otwarcie zacisków. Aparat należy przepłukać, wlewając do kolby destylacyjnej około 20 cm^3 wody destylowanej; po zamknięciu zacisków woda przepływa do zbiornika na zlewki.



Rysunek 3. Aparat Parnasa-Wagnera do destylacji amoniaku

- Wskaźnik Tashiro – podczas oddestylowania amoniaku zmienia barwę z fioletowej na zieloną, ponieważ powstała sól słabego kwasu i silniejszej zasady (jednoboran amonu) tworzy z kwasem borowym układ buforowy, co powoduje gwałtowny wzrost pH roztworu z 5,0 do ponad 6,0.

Miareczkowanie. Uzyskany ciepły destylat miareczkować roztworem HCl o stężeniu $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ wobec wprowadzonego wcześniej wskaźnika Tashiro. Zmiana zabarwienia z zielonej na fioletową wskazuje koniec miareczkowania.

Obliczyć zawartość białka (B) badanego produktu, w $\text{g} \cdot (100 \text{ g})^{-1}$, uwzględniając miano HCl względem azotu, stosowane rozcieńczenia oraz indywidualny współczynnik do przeliczania azotu na białko.

Przy obliczaniu wyniku należy:

- uwzględnić wartość próby ślepej,
- przyjąć za wynik ostateczny średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

H_2SO_4 , stężony ($d = 1,84 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

Perhydrol, 30-procentowy roztwór wodny H_2O_2

Katalizator, mieszanina K_2SO_4 i $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, Kjeltabs CK

Wskaźnik Tashiro (0,2 g czerwieni metylowej rozpuścić w 50 cm^3 96-procentowego etanolu; 0,1 g błękitu metylenowego rozpuścić w 150 cm^3 50-procentowego etanolu; roztwory zmieszać i przesączyć)

Fenoloftaleina, 1-procentowy roztwór alkoholowy

NaOH, 30-procentowy roztwór wodny

H₃BO₃, 4-procentowy roztwór wodny

HCl, roztwór wodny o stężeniu 0,1 mol·dm⁻³

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Kolby Kjeldahla

Aparat Parnasa-Wagnera

Piśmiennictwo

- KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.
- KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2007.
- NOGALA-KAŁUCKA M. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.
- OBIEDZIŃSKI M. (red): Wybrane zagadnienia z analizy żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2009.
- POMERANZ Y., MELOAN C.E.: Food Analysis, Theory and Practice. 3th edition. Springer, New York 2000.

Ćwiczenie 4

METODY OZNACZANIA ZAWARTOŚCI CUKRÓW BEZPOŚREDNIO REDUKUJĄCYCH I SACHAROZY W SYROPACH OWOCOWYCH ORAZ LAKTOZY W MLEKU

Agata Wawrzyniak

Wprowadzenie

Cukrowce określane mianem węglowodanów są związkami węgla, których ogólną budowę można wyrazić wzorem $C_x(H_2O)_y$. Są szeroko rozpowszechnionym składnikiem żywności, a ich dominującym źródłem w żywieniu człowieka są produkty pochodzenia roślinnego.

Zawartość cukrowców w wybranych produktach spożywczych, w $g \cdot (100 g)^{-1}$ części jednakowych

[Kunachowicz i in. 2018]:

▪ produkty zbożowe	– 50,0–80,0
▪ nasiona roślin strączkowych (suche)	– 33,0–62,0
▪ mleko w proszku pełne	– 40,0
▪ owoce i warzywa świeże	– 3,0–23,0
▪ mleko krowie	– 5,0
▪ sery twarogowe	– 4,0
▪ jaja kurze całe	– 0,6
▪ sery podpuszczkowe	– 0,1
▪ mięso, ryby	– 0,0

Ze względu na budowę chemiczną cukrowce zawarte w produktach spożywczych można podzielić na:

- **monosacharydy** – na przykład glukoza, fruktoza, galaktoza;
- **oligosacharydy** – złożone z 2 do 10 jednostek monosacharydów, na przykład sacharoza, maltoza, laktoza, rafinoza, stachioza;
- **polisacharydy** – złożone z więcej niż 10 jednostek monosacharydów, na przykład skrobia, celuloza, hemiceluloza.

Wyodrębnione związki różnią się w znacznym stopniu właściwościami fizykochemicznymi, co decyduje między innymi o ich rozpuszczalności i możli-

wości przygotowania próbki do ilościowego oznaczenia poszczególnych węglowodanów.

Z analitycznego punktu widzenia wśród cukrowców wyróżnia się:

- rozpuszczalne w wodzie (mono- i oligosacharydy);
- rozpuszczalne na gorąco w 2-procentowym roztworze kwasu mineralnego (skrobia);
- rozpuszczalne w stężonych roztworach kwasów mineralnych (celuloza i jej pochodne).

Ze względu na zróżnicowanie fizykochemiczne **cukrowce ogółem** są składnikiem pokarmowym żywności, którego **nie oznacza się analitycznie**, lecz oblicza z tak zwanej różnicy:

cukrowce ogółem = masa próbki – (woda + białko + tłuszcze + popiół)

Wśród metod oznaczania wybranych grup węglowodanów znalazły zastosowanie metody: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Podział ten nie jest jednak ścisły, gdyż istnieje wiele metod kombinowanych, to jest fizykochemicznych lub biochemicznych.

Metody fizyczne

Metody densymetryczne oparte są na pomiarze gęstości wodnych roztworów za pomocą areometru lub piknometru, którą to gęstość przelicza się za pomocą tabel na zawartość ekstraktu.

Metody refraktometryczne oparte są na pomiarze współczynnika załamania światła (refrakcji) przez cząsteczki cukru rozpuszczonego w wodzie. W produktach spożywczych, w których cukry stanowią główny składnik, stawia się często znak równości między oznaczoną zawartością cukru a zawartością suchej masy. W przypadku pomiaru w roztworach zawierających, oprócz cukrów, inne składniki rozpuszczalne otrzymane wyniki dotyczą ekstraktu ogólnego. W przypadku syropów owocowych udział cukrów w ekstrakcie stanowi 90%.

Metody polarymetryczne wykorzystują zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego przez cząsteczki cukrów w roztworze wodnym, w których obecne są asymetryczne atomy węgla.

Metody fizyczne należą do metod orientacyjnych lub półilościowych i mogą być stosowane tylko do oznaczania węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie.

Metody chemiczne

Metody miareczkowe (objętościowe) wykorzystują właściwości redukujące cukrów, w stosunku do jonów miedzi, wynikające z obecności w cząsteczkach cukrów wolnych grup karbonylowych (ketonowej lub aldehydowej). Właściwo-

ści te mają wszystkie monosacharydy oraz oligosacharydy, na przykład maltoza i laktoza, u których jedna z grup aldehydowych nie wchodzi w skład wiązania glikozydowego. Cukry te określa się pojęciem cukrów bezpośrednio redukujących.

Sacharydy pozbawione właściwości redukujących poprzez zablokowanie grupy karbonylowej poddaje się hydrolizie kwasowej do monosacharydów i oznacza wraz z cukrami bezpośrednio redukującymi jako cukry ogółem. Przykładem takiego cukru jest sacharoza, w której aldehydowa grupa glukozy oraz ketonowa fruktozy uczestniczą w tworzeniu wiązania glikozydowego.

Metody miareczkowe nie są metodami specyficznymi dla cukrów, ponieważ w produktach spożywczych właściwości redukujące w warunkach oznaczania cukrów wykazują: aminokwasy (cysteina, kwas asparginowy), białka, niektóre kwasy organiczne, niektóre aldehydy, zasady purynowe i inne.

Do najczęściej stosowanych metod miareczkowych (objętościowych) zalicza się metody Lane'a-Eynona i Bertranda.

Metody absorpcyjne (kolorymetryczne) oparte są na pomiarze absorpcji związków barwnych powstających w wyniku reakcji chemicznej cukrów (najczęściej monosacharydów) z różnymi odczynnikami chemicznymi. Do najczęściej stosowanych zalicza się metody: antronową, rezorcynową i żelazicyjankową.

Metody chromatograficzne wykorzystują chromatografię gazową (GLC) lub wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). Identyfikację prowadzi się po rozdzieleniu na odpowiedniej kolumnie chromatograficznej, a ilość poszczególnych węglowodanów w próbce oblicza się, biorąc pod uwagę czasy retencji i powierzchnie rozdzielonych pików.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodami chemicznymi, to jest metodą Lane'a-Eynona i metodą Bertranda, wykorzystywanymi do ilościowego oznaczania cukrów bezpośrednio redukujących i sacharozy w wybranych syropach owocowych oraz laktozy w mleku.

Refraktometryczne oznaczenie zawartości ekstraktu w wybranym syropie owocowym

Przed przystąpieniem do przygotowania rozcieńczeń i roztworu podstawowego badanego produktu należy wstępnie oznaczyć refraktometrycznie zawartość ekstraktu w syropie, to jest suchej substancji rozpuszczalnej w wodzie.

WYKONANIE POMIARU REFRAKTOMETRYCZNEGO

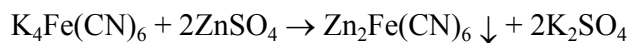
Na oczyszczoną powierzchnię pryzmatu refraktometru Abbego nanieść parę kropli syropu. Zamknąć refraktometr i odczytać zawartość ekstraktu oraz temperaturę pomiaru. Jeżeli temperatura pomiaru jest różna od 20°C, należy wprowadzić odpowiednią poprawkę do odczytu. Wynosi ona dla skali cukrowej $\pm 0,065$ jednostki na 1°C. Dla temperatury pomiaru powyżej 20°C poprawkę należy dodać, poniżej 20°C zaś odjąć.

Zawartość ekstraktu przeliczyć na zawartość cukru w syropie, mnożąc otrzymany wynik przez współczynnik 0,9.

Usuwanie substancji interferujących metodą Carreza

Przed właściwym oznaczeniem cukrów w produktach ciekłych należy uprzednio usunąć substancje interferujące, to jest białka, lub substancje niesacharydowe o właściwościach redukcyjnych w stosunku do miedzi lub żelaza oraz substancje, które ulegają przemianom do reduktonów.

Do odbiałczania i klarowania roztworów stosuje się płyny Carreza I (heksacyjanożelazian potasu) i Carreza II (siarczan cynku) dodane do próby w równych objętościach:



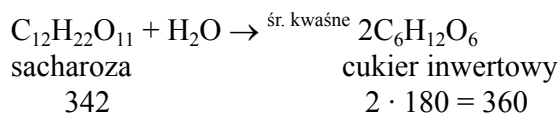
Powstający w reakcji koloidalny heksacyjanożelazian cynku, opadając w formie osadu, porywa za sobą związki wielkocząsteczkowe, klarując próbkę.

WYKONANIE KLAROWANIA PRÓBKI

Do roztworu cukru, w trakcie wykonywania rozcieńczeń, należy dodać po 5 cm³ płynów Carreza I i II, po czym całość dopełnić w kolbie miarowej wodą destylowaną do 200 cm³, wymieszać, odstawić na 10 minut i przesączyć przez sączek bibułowy.

Hydroliza (inwersja) oligosacharydów metodą Clergeta-Herzfelda

Po usunięciu związków interferujących, można jedną z przedstawionych poniżej metod oznaczyć bezpośrednio zawartość cukrów prostych redukujących, po czym wykonać analizę zawartości „cukrów ogółem”, to jest sumy cukrów bezpośrednio redukujących i sacharozy po jej uprzednim zhydrolizowaniu w środowisku kwaśnym do tak zwanego cukru inwertowego, to jest glukozy i fruktozy:



Różnicę pomiędzy zawartością cukrów ogółem i bezpośrednio redukujących przelicza się na sacharozę, mnożąc uzyskany wynik przez współczynnik przeliczeniowy 0,95 (gdyż stosunek mas molowych sacharozy : glukozy i fruktozy wynosi jak 342 : 360).

Zmiana stężenia kwasu w hydrolizowanym roztworze może powodować niepełny rozkład sacharozy lub rozkład innych oligo- i polisacharydów. Przedłużenie czasu i podwyższenie temperatury hydrolizy może doprowadzić do rozkładu produktów inwersji, to jest glukozy i fruktozy.

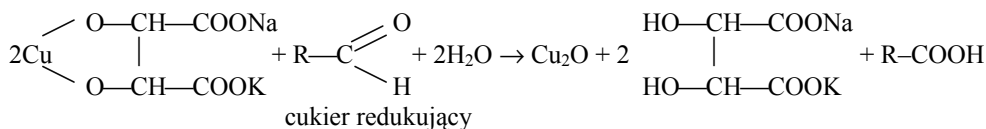
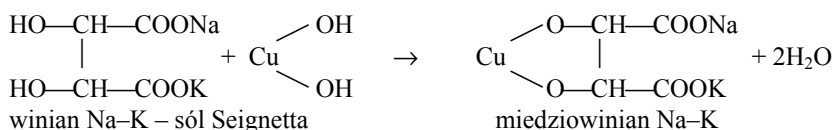
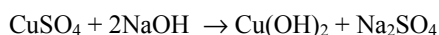
WYKONANIE HYDROLIZY

Do około 80 cm³ uprzednio przygotowanego, odbiałzonego i klarownego roztworu cukru dodać 5 cm³ stężonego kwasu solnego ($d = 1,19 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$), mieszaninę podgrzać na łaźni wodnej i utrzymać w temperaturze 68–70°C, przez 5 minut. Po schłodzeniu całość zobojętnić 30-procentowym wodorotlenkiem sodu wobec wskaźnika fenoloftaleiny i dopełnić wodą destylowaną do 100 cm³, tak aby otrzymać w kolbie roztwór cukru o stężeniu 0,1–0,4%.

Oznaczenie zawartości cukrów bezpośrednio redukujących i sacharozy metodą Lane'a-Eynona

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na bezpośrednim miareczkowaniu wrzącej mieszaniny jednakowych objętości płynów Fehlinga I i Fehlinga II odpowiednio rozcieńczonym roztworem badanych cukrów (o stężeniu 0,1–0,4%), po uprzednim odbiałczeniu i klarowaniu próbki oraz ewentualnie przeprowadzonej hydrolizie, w obecności błękitu metylenowego jako wskaźnika odbarwiającego się po całkowitym zredukowaniu miedzi przez cukier obecny w roztworze:



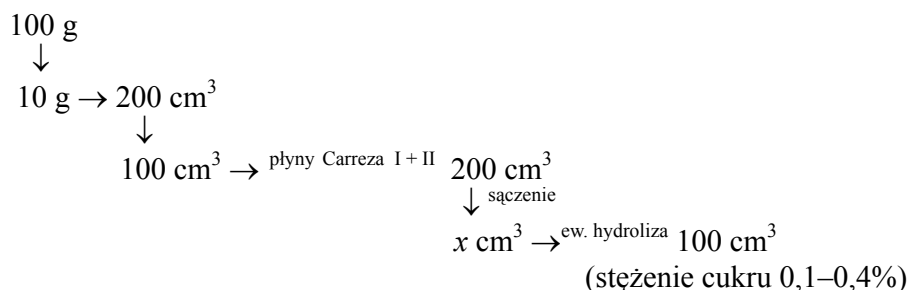
Pomiędzy stężeniem roztworu cukru i jego zużyciem nie ma zależności liniowej, gdyż zużyciu większej objętości roztworu odpowiada dłuższy czas miareczkowania oraz niższa alkaliczność środowiska, i odwrotnie. Czynniki te wywierają wpływ na powstawanie tak zwanych reduktionów, co ma miejsce w podwyższonej temperaturze i środowisku alkalicznym.

Obecność soli Seignetta, to jest winianu sodu i potasu, zapobiega wytrącaniu się wodorotlenku miedzi, co umożliwia prawidłowe przeprowadzenie redukcji miedzi.

Rozwinięciem metody Lane'a-Eynona jest polecana przez AOAC (Association of Official Analytical Chemists) metoda Munsona i Walkera, polegająca na ogrzewaniu roztworu cukrów, w standardowych warunkach, z odczynnikami Fehlinga, a następnie oznaczeniu wytrąconego osadu Cu_2O za pomocą miareczkowania manganometrycznego lub jodometrycznego.

WYKONANIE OZNACZENIA

Po wstępnym refraktometrycznym oznaczeniu zawartości ekstraktu w próbce, uwzględnieniu poprawki temperaturowej i przeliczeniu ekstraktu na cukier odważyć 10 g syropu owocowego z dokładnością 0,0001 g do krystalizatora, po czym wykonać rozcieńczenia według zaproponowanego schematu:



W trakcie wykonywania rozcieńczeń należy dodać po 5 cm^3 płynów Carreza I i II w celu odbiałczenia i klarowania próbki, po czym całość dopełnić wodą destylowaną do 200 cm^3 , wymieszać, odstawić na 10 minut i przesączyć przez sączek bibułowy.

Z klarownego wyciągu pobrać taki $x \text{ cm}^3$ roztworu (przeprowadzić ewentualną hydrolizę), aby uzyskać w kolbie miarowej o pojemności 100 cm^3 końcowe stężenie cukru w granicach 0,1–0,4% i tak przygotowanym roztworem napełnić biuretę.

Do kolby stożkowej na 250 cm^3 wlać po 5 cm^3 płynów Fehlinga I i II, a następnie dodać z biurety 15 cm^3 roztworu cukrów. Całość zamieszać i ogrzewać nad palnikiem do wrzenia. Po upływie 2 minut od chwili zagotowania się próby przystąpić do dalszego miareczkowania roztworem cukrów z biurety, nie prze-

rywając gotowania. W momencie gdy roztwór w kolbie prawie utraci barwę niebieską, należy dodać 2–3 krople wskaźnika błękitu metylenowego i zakończyć miareczkowanie w momencie odbarwienia się wskaźnika. Następnie powtórzyć miareczkowanie, dodając do płynów Fehlinga prawie całą, zmniejszoną o 1 cm³, ilość roztworu cukru zużytą w pierwszej analizie. Próbę zagotować i po 2 minutach gotowania dokończyć miareczkowanie wobec wskaźnika.

Tabela 2. Obliczanie zawartości cukrów [mg] oznaczanych metodą Lane'a-Eynona z użyciem 10 cm³ mieszaniny płynów Fehlinga

Zużycie badanego roztworu cukru [cm ³]	Cukier inwertowy [mg]				Glukoza [mg]	Fruktoza [mg]	Maltoza [mg]	Laktoza [mg]	
	sacharoza nieobecna	1 g sacharozy w 100 cm ³	5 g sacharozy w 100 cm ³	10 g sacharozy w 100 cm ³				bezwodna	wodzian
15	50,5	49,9	47,6	46,1	49,1	52,2	77,2	64,9	68,3
20	50,9	50,2	47,6	46,1	49,5	52,5	76,8	64,6	68,0
25	51,2	50,4	47,6	46,0	49,8	52,8	76,4	64,5	67,9
30	51,5	50,5	47,7	46,0	50,1	53,2	76,0	64,4	67,8
35	51,8	50,7	47,7	45,8	50,4	53,4	75,7	64,5	67,9
40	52,0	50,8	47,7	45,6	50,6	53,6	75,4	64,5	67,9
45	52,3	45,4	47,7	45,4	50,9	53,9	75,2	64,7	68,1
50	52,3	51,0	47,7	45,2	51,1	54,0	75,0	64,9	68,3

Źródło: Krełowska-Kułas M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

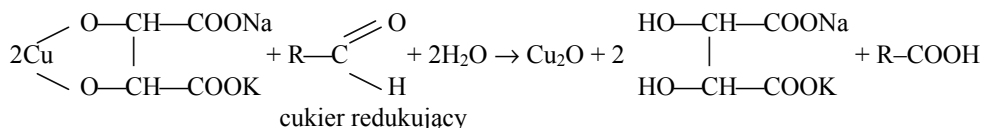
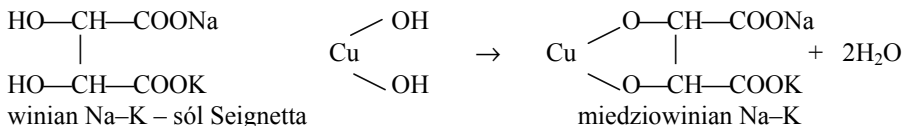
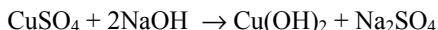
Jeżeli płyny Fehlinga odbarwiają się całkowicie już po wprowadzeniu do kolby roztworu cukrów w ilości 15 cm³, należy roztwór cukrów rozcieńczyć co najmniej trzy-krotnie. Jeżeli do miareczkowania używane jest ponad 50 cm³ roztworu cukrów, to konieczne jest zwiększenie stężenia cukrów 2–3 razy.

Na podstawie liczby zużytych do miareczkowania centymetrów sześciennych roztworu badanego cukru należy odczytać z tabeli 2 zawartość cukru w tym roztworze. Uwzględniając rozcieńczenia, obliczyć zawartość cukru w 100 g produktu.

Oznaczenie zawartości cukrów bezpośrednio redukujących i sacharozy oraz laktozy metodą Bertranda

ZASADA METODY

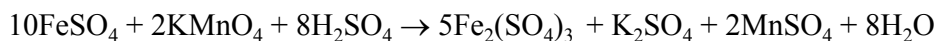
Oznaczenie polega na ilościowym redukowaniu przez cukry (o stężeniu 0,1–0,4%) jonów miedzi Cu²⁺ do miedzi Cu⁺ w środowisku zasadowym (pH = 12) i temperaturze wrzenia, po uprzednim usunięciu substancji interferujących i ewentualnie przeprowadzonej hydrolizie:



Wytworzony tlenek miedziawy rozpuszczany jest następnie w roztworze siarczanu żelazowego i kwasu siarkowego, gdzie zachodzi redukcja soli żelazowej do żelazawej:

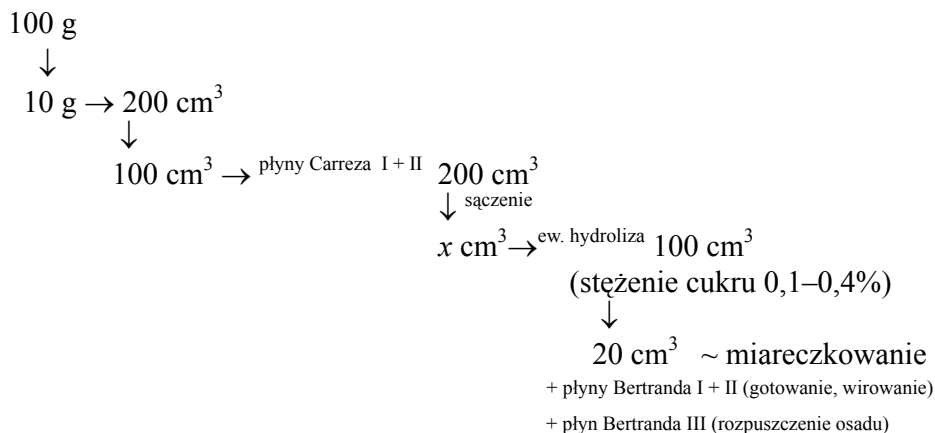


Ilość zredukowanej soli żelazawej oznacza się przez miareczkowanie mianowanym roztworem nadmanganianu potasu:



WYKONANIE OZNACZENIA CUKRÓW BEZPOŚREDNIO REDUKUJĄCYCH I SACHAROZY

Po wstępnym refraktometrycznym oznaczeniu zawartości ekstraktu w próbce, uwzględnieniu poprawki temperaturowej i przeliczeniu ekstraktu na cukier odważyć 10 g syropu owocowego z dokładnością 0,0001 g do krystalizatora, po czym wykonać rozcieńczenia według zaproponowanego schematu:



W trakcie wykonywania rozcieńczeń należy dodać po 5 cm³ płynów Carreza I i II w celu odbiałczenia i klarowania próby, wymieszać, po czym całość dopełnić wodą destylowaną do 200 cm³ i po 10 minutach przesączyć przez sączek bibułowy.

Następnie pobrać taki x cm³ roztworu (przeprowadzić ewentualną hydrolizę), aby uzyskać w kolbie miarowej na 100 cm³ stężenie cukru w granicach 0,1–0,4%.

Odmierzyć pipetą 20 cm³ wyżej wymienionego roztworu do kolby stożkowej o pojemności 200 cm³, dodając po 20 cm³ płynów Bertranda I i II. Całość zagotować i utrzymać we wrzeniu przez 3 minuty, schłodzić i przenieść ilościowo do próbek wirówkowych o pojemności 100 cm³, popłukując kolbę wodą destylowaną. Roztwór znad osadu powinien mieć zabarwienie niebieskie.

Próbki wyważyć parami i odwirować wytrącony Cu₂O przy 3000 obrotów na minutę, przez 10 minut. Roztwór znad osadu (supernatant) zlać, a tlenek miedziawy (osad) rozpuścić, natychmiast dodając do próbki wirówkowej 20 cm³ płynu Bertranda III. Całość przenieść ilościowo do kolby stożkowej o pojemności 200 cm³, popłukując próbkę wodą destylowaną i miareczkować 0,02 N KMnO₄ do uzyskania trwałego różowego zabarwienia.

Obliczyć masę zredukowanej miedzi, mnożąc objętość zużytego roztworu KMnO₄ przez jego miano miedziowe (1 cm³ KMnO₄ o stężeniu 0,02 mol·dm⁻³ odpowiada 6,357 mg jonów miedzi), a następnie z tabeli 3 odszukać odpowiadającą uzyskanemu wynikowi zawartość cukru w 20 cm³ roztworu pobranego do analizy. Uwzględniając rozcieńczenia, obliczyć zawartość cukru w 100 g produktu.

Tabela 3. Określenie ilości [mg] glukozy, cukru inwertowego, laktozy i maltozy na podstawie ilości oznaczanego tlenku miedzi metodą Bertranda (wg von Fellenberga) w 20 cm³ roztworu

Cu [mg]	Glukoza	Cukier inwertowy	Laktoza	Maltoza	Cu [mg]	Glukoza	Cukier inwertowy	Laktoza	Maltoza
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
8,9	5,6	4,6	5,1	7,5	35,5	18,7	18,4	24,6	30,0
9,8	6,0	5,1	5,8	8,2	36,4	19,2	18,8	25,2	30,8
10,7	6,4	5,6	6,4	9,0	37,3	19,6	19,3	25,9	31,5
11,5	6,8	6,0	7,1	9,7	38,2	20,0	19,8	26,5	32,3
12,4	7,2	6,4	7,7	10,5	39,1	20,4	20,2	27,2	33,3
13,3	7,7	6,9	8,4	11,2	40,0	20,9	20,7	27,8	33,8
14,2	8,1	7,3	9,0	12,0	40,8	21,3	21,1	28,5	34,6
15,1	8,6	7,8	9,7	12,7	41,7	21,7	21,6	29,1	35,3
16,0	9,0	8,3	10,3	13,5	42,6	22,2	22,1	29,8	36,1
16,9	9,5	8,7	11,0	14,2	43,5	22,6	22,5	30,4	36,9

cd. tabeli 3

Cu [mg]	Glukoza	Cukier inwertowy	Laktoza	Maltoza	Cu [mg]	Glukoza	Cukier inwertowy	Laktoza	Maltoza
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
17,8	9,9	9,2	11,6	15,0	44,4	23,1	23,0	31,1	37,7
18,6	10,4	9,6	12,3	15,7	45,3	23,5	23,5	31,7	38,4
19,5	10,8	10,0	12,9	16,4	46,2	24,0	23,9	32,4	39,2
20,4	11,2	10,5	13,6	17,2	47,1	24,4	24,4	33,0	40,0
21,3	11,7	11,0	14,2	17,9	48,0	24,8	24,9	33,7	40,8
22,2	12,1	11,4	14,8	18,7	48,8	25,3	25,3	34,3	41,6
23,1	12,5	11,9	15,5	19,5	49,7	25,7	25,8	34,9	42,1
24,0	13,0	12,4	16,2	20,2	50,6	26,2	26,2	35,6	42,4
24,9	13,4	12,8	16,8	21,0	51,4	26,6	26,7	36,2	43,8
25,8	13,9	13,3	17,5	21,7	52,4	27,1	27,2	36,9	44,6
26,6	14,3	13,7	18,1	22,4	53,3	27,5	27,6	37,5	45,4
27,5	14,8	14,2	18,7	23,2	54,2	27,9	28,1	38,2	46,2
28,4	15,2	14,7	19,4	23,9	55,1	28,4	28,6	38,8	47,0
29,3	15,6	15,1	20,0	24,7	55,9	28,8	29,0	39,4	47,7
30,2	16,1	15,6	20,7	25,4	56,8	29,2	29,5	40,1	48,5
31,1	16,5	16,1	21,3	26,2	57,7	29,7	30,0	40,8	49,3
32,0	16,9	16,5	22,0	27,0	58,6	30,1	30,4	41,4	50,1
32,9	17,4	17,0	22,6	27,7	59,5	30,6	30,9	42,0	50,8
33,7	17,8	17,4	23,3	28,5	60,4	31,0	31,4	42,7	51,4
34,6	18,3	17,9	23,9	29,2	61,3	31,4	31,8	43,3	52,3
62,2	31,9	32,3	44,0	53,2	93,2	47,5	48,5	66,6	80,6
63,0	32,3	32,7	44,6	53,9	94,1	47,9	49,0	67,2	81,4
63,9	32,8	33,1	45,3	54,7	95,0	48,4	49,5	67,9	82,2
64,8	33,2	33,6	45,9	55,5	95,9	48,9	49,9	68,6	83,0
65,7	33,7	34,1	46,6	56,3	96,8	49,3	50,4	69,2	83,8
66,6	34,1	34,5	47,2	57,0	97,7	49,7	50,9	69,9	84,6
67,5	34,5	35,0	47,9	57,8	98,6	50,2	51,4	70,5	85,3
68,4	35,0	35,5	48,5	58,6	99,4	50,6	51,8	71,2	86,1
69,3	35,4	35,9	49,2	59,4	100,3	51,1	52,3	71,9	86,9
70,2	35,9	36,4	49,8	60,2	101,2	51,5	52,8	72,5	87,7
71,0	36,3	36,8	50,4	61,0	102,1	52,0	53,2	73,2	88,5
71,9	36,8	37,3	51,1	61,8	103,0	52,4	53,7	73,8	89,3
72,8	37,2	37,8	51,8	62,6	103,9	52,9	54,2	74,5	90,1
73,7	37,6	38,2	52,4	63,3	104,8	53,3	54,7	75,1	90,8
74,6	38,1	38,7	53,1	64,1	105,7	53,8	55,2	75,8	91,7
75,5	38,5	39,2	53,7	64,9	106,6	54,2	55,7	6,5	92,5
76,4	39,0	39,7	54,4	65,7	107,4	54,7	56,1	77,1	93,2
77,3	39,4	40,2	55,0	66,5	108,3	55,1	56,5	77,7	94,0
78,1	39,8	40,6	55,7	67,2	109,2	55,6	57,0	78,4	94,8
79,0	40,3	41,1	56,3	68,0	110,1	56,0	57,5	79,1	95,6

cd. tabeli 3

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
79,9	40,7	41,6	57,0	68,8	111,0	56,5	58,0	79,8	96,4
80,8	41,2	42,0	57,6	69,7	111,9	56,9	58,5	80,4	97,2
81,7	41,6	42,5	58,2	70,4	112,8	57,4	59,0	81,0	97,9
82,6	42,1	43,0	58,9	71,2	113,7	57,8	59,4	81,7	98,8
83,5	42,6	43,5	59,5	72,0	114,5	58,3	59,9	82,3	99,5
84,4	43,0	43,9	60,2	72,8	115,4	58,7	60,3	83,0	100,3
85,2	43,4	44,4	60,8	73,5	116,3	59,2	60,8	83,7	101,1
86,1	43,9	44,8	61,4	74,3	117,2	59,6	61,3	84,4	101,9
87,0	44,3	45,3	62,1	75,1	118,1	60,1	61,8	85,0	102,7
87,9	44,8	45,8	62,8	75,8	119,0	60,5	62,2	85,6	103,5
88,8	45,2	46,3	63,4	76,6	119,9	61,0	62,7	86,3	104,3
89,7	45,7	46,7	64,0	77,4	120,8	61,5	63,2	87,0	105,1
90,6	46,1	47,2	64,6	78,3	121,6	61,9	63,7	87,7	105,9
91,5	46,6	47,6	65,3	79,0	122,5	62,4	64,1	88,3	106,7
92,3	47,0	48,0	66,0	79,8	123,4	62,8	64,6	89,0	107,5
124,3	63,3	65,1	89,1	108,2	155,4	79,3	81,9	113,0	136,2
125,2	63,7	65,6	90,3	109,1	156,3	79,7	82,4	113,6	137,0
126,1	64,2	66,0	91,0	109,9	157,2	80,2	82,8	114,3	137,8
127,0	64,6	66,5	91,6	110,7	158,1	80,7	83,3	115,0	138,6
127,9	65,0	67,0	92,2	111,5	159,0	81,1	83,8	115,6	139,4
128,8	65,5	67,5	92,9	112,3	159,8	81,6	84,3	116,3	140,2
129,6	66,0	67,9	93,6	113,0	160,7	82,1	84,7	117,0	141,0
130,5	66,4	68,4	94,3	113,8	161,6	82,5	85,2	117,6	141,8
131,4	66,9	68,9	94,9	114,6	162,5	82,9	85,7	118,3	142,6
132,3	67,4	69,3	95,6	115,4	163,4	83,4	86,2	119,0	143,3
133,2	67,8	69,8	96,2	116,2	164,3	83,9	86,6	119,7	144,2
134,1	68,2	70,3	96,9	117,0	165,2	84,4	87,1	120,3	145,0
135,0	68,7	70,8	97,6	117,8	166,1	84,8	87,6	121,0	145,8
135,9	69,2	71,2	98,2	118,6	166,9	85,3	88,1	121,7	146,6
136,8	69,6	71,7	98,8	119,4	167,8	85,7	88,5	122,4	147,4
137,6	70,0	72,2	99,5	120,2	168,7	86,2	89,0	123,0	148,2
138,5	70,5	72,7	100,2	121,0	169,6	86,6	89,5	123,7	149,0
139,4	71,0	73,2	100,8	121,8	170,5	87,1	90,0	124,3	149,8
140,3	71,4	73,6	101,5	122,6	171,4	87,6	90,4	125,0	150,6
141,2	71,9	74,1	102,2	123,4	172,3	88,0	90,9	125,6	151,4
142,1	72,3	74,6	102,8	124,2	173,2	88,5	91,4	126,3	152,2
143,0	72,8	75,1	103,6	125,0	174,0	88,9	91,9	127,0	153,0
143,9	73,2	75,5	104,2	125,8	174,9	89,4	92,3	127,7	153,8
144,7	73,7	76,0	104,9	126,6	175,8	89,9	92,8	128,4	154,6
145,6	74,2	76,5	105,6	127,4	176,7	90,3	93,3	129,1	155,4

cd. tabeli 3

Cu [mg]	Glukoza	Cukier inwertowy	Laktoza	Maltoza	Cu [mg]	Glukoza	Cukier inwertowy	Laktoza	Maltoza
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
146,5	74,6	76,9	106,2	128,2	177,6	90,8	93,8	129,7	156,2
147,4	75,1	77,4	106,9	129,0	178,5	91,3	94,2	130,4	157,0
148,3	75,6	77,9	107,6	129,8	179,4	91,7	94,7	131,1	157,8
149,2	76,0	78,4	108,2	130,6	180,3	92,2	95,2	131,8	158,6
150,0	76,5	78,9	108,9	131,4	181,2	92,7	95,7	132,4	159,4
151,1	77,0	79,4	109,6	132,2	182,0	93,2	96,2	133,1	160,2
151,8	77,4	79,9	110,6	133,0	182,9	93,6	96,6	133,8	161,0
152,7	77,9	80,4	110,9	133,8	183,8	94,1	97,1	134,5	161,7
153,6	78,3	80,9	111,6	134,6	184,7	94,5	97,6	135,2	162,5
154,5	78,8	81,4	112,3	135,4	185,6	95,0	98,1	135,8	163,3
186,5	95,5	98,6	136,5	164,1	217,6	111,9	116,2	160,1	191,8
187,4	95,9	99,1	137,2	164,9	218,4	112,4	116,7	160,7	192,6
188,3	96,4	99,6	137,9	165,7	219,3	112,8	117,2	161,4	193,4
189,1	96,9	100,1	138,6	166,5	220,2	113,3	117,7	162,0	194,2
190,0	97,4	100,6	139,3	167,3	221,1	113,8	118,2	162,7	195,0
190,9	97,8	101,1	140,0	168,0	222,0	114,2	118,7	163,4	195,7
191,8	98,3	101,6	140,6	168,8	222,9	114,7	119,2	164,0	196,5
192,7	98,7	102,1	141,3	169,6	223,8	115,2	119,7	164,7	197,3
193,6	99,2	102,6	142,0	170,4	224,7	115,6	120,2	165,1	198,1
194,5	99,7	103,1	142,6	171,2	225,6	116,1	120,7	166,0	198,9
195,4	100,1	103,6	143,3	172,0	226,4	116,6	121,2	166,7	199,7
196,2	100,6	104,1	144,0	172,8	227,3	117,0	121,7	167,3	200,5
197,1	101,1	104,6	144,7	173,6	228,2	117,5	122,2	168,0	201,3
198,0	101,5	105,1	145,4	174,3	229,1	118,0	122,7	168,7	202,1
199,0	102,0	105,6	146,1	175,1	230,0	118,5	123,2	169,4	202,9
199,8	102,5	106,1	146,8	175,9	230,9	119,0	123,7	170,0	203,7
200,7	103,0	106,6	147,5	176,7	231,8	119,4	124,2	170,7	204,5
201,6	103,5	107,1	148,1	177,5	232,7	119,9	124,7	171,3	205,3
202,5	103,9	107,6	148,8	178,3	233,5	120,4	125,2	172,0	206,1
203,4	104,4	108,1	149,4	179,0	234,4	120,9	125,7	172,6	206,9
204,2	104,8	108,6	150,1	179,8	235,3	121,4	126,2	173,3	207,7
205,1	105,3	109,1	150,8	180,6	236,2	121,8	126,7	174,0	208,4
206,0	105,8	109,6	151,4	181,4	237,1	122,3	127,2	174,7	209,2
206,9	106,3	110,1	152,1	182,2	238,0	122,8	127,8	175,4	210,0
207,8	106,8	110,6	152,8	183,0	238,9	123,3	128,3	176,1	210,8
208,7	107,2	111,1	153,4	183,3	239,8	123,7	128,8	176,8	211,6
209,6	107,7	111,6	154,1	184,6	240,6	124,2	129,3	177,5	212,4

cd. tabeli 3

1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
210,5	108,2	112,1	154,8	185,4	241,5	124,7	129,8	178,2	213,2
211,3	108,6	112,6	155,4	186,2	242,4	125,2	130,3	178,8	214,0
212,2	109,0	113,1	156,1	187,0	243,3	125,6	130,8	179,5	214,8
213,1	109,6	113,6	156,8	187,8	244,2	126,1	131,3	180,2	215,6
214,0	110,0	114,2	157,4	188,6	245,1	126,6	131,8	180,9	216,4
214,9	110,5	114,7	158,1	189,4	246,0	127,1	132,3	181,6	217,2
215,8	111,0	115,2	158,7	190,2	246,9	127,6	132,8	182,3	218,0
216,7	111,4	115,7	159,4	191,0	247,8	128,0	133,3	183,0	218,8
248,6	128,5	133,8	183,6	219,6	275,3	143,0	149,1	204,4	243,6
249,5	129,0	134,4	184,3	220,4	276,2	143,4	149,6	205,2	244,4
250,4	129,4	134,9	185,0	221,2	277,1	143,9	150,1	205,9	245,2
251,3	129,9	135,4	185,7	222,0	277,9	144,4	150,6	206,6	246,0
252,2	130,4	135,9	186,4	222,8	278,8	144,9	151,2	207,3	246,8
253,1	130,8	136,4	187,1	223,6	279,7	145,4	151,7	208,0	247,6
254,0	131,3	136,9	187,8	224,4	280,6	145,8	152,3	208,7	248,4
254,9	131,8	137,4	188,5	225,1	281,5	146,3	152,8	209,8	249,2
255,7	132,3	137,9	189,1	225,9	282,4	146,8	153,3	210,2	249,9
256,6	132,8	138,4	189,8	226,7	283,3	147,3	153,9	210,9	250,7
257,5	133,2	138,9	190,5	227,5	284,2	147,8	154,4	211,6	251,5
258,4	133,7	139,4	191,2	228,3	285,0	148,2	154,9	212,3	252,3
259,3	134,2	140,0	191,9	229,1	285,9	148,7	155,4	213,0	253,1
260,2	134,7	140,5	192,6	229,9	286,8	149,2	155,9	213,7	253,8
261,1	135,2	141,0	193,3	230,8	287,7	149,7	156,5	214,4	254,6
262,0	135,6	141,5	194,0	231,6	288,6	150,2	157,0	215,2	255,4
262,8	136,1	142,0	194,7	232,4	289,5	150,7	157,5	215,9	256,2
263,7	136,6	142,5	195,4	233,2	290,4	151,2	158,0	216,6	257,0
264,6	137,1	143,0	196,0	234,0	291,3	151,7	158,6	217,3	257,8
265,5	137,6	143,5	196,7	234,8	292,2	152,2	159,1	218,0	258,5
266,4	138,1	144,0	197,4	235,6	293,0	152,7	159,6	218,8	259,3
267,3	138,5	144,5	198,1	236,4	293,9	153,2	160,1	219,5	260,1
268,2	139,0	145,0	198,8	237,2	294,8	153,6	160,7	220,2	260,9
269,1	139,5	145,5	199,5	238,0	295,7	154,1	161,2	220,9	261,6
270,0	140,0	146,1	200,2	238,8	296,6	154,6	161,8	221,6	262,4
270,8	140,5	146,6	200,9	239,6	297,5	155,1	162,3	222,4	263,2
271,7	141,0	147,1	201,6	240,4	298,4	155,6	162,8	223,1	264,0
272,6	141,5	147,6	202,3	241,2	299,3	156,1	163,4	223,8	264,8
273,5	142,0	148,1	203,0	242,0	300,1	156,6	163,9	224,5	265,4
274,4	142,5	148,6	203,7	242,8	301,0	157,1	164,4	225,2	266,3

Źródło: Krelowska-Kułas M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

Należy pamiętać, że zależności między ilością cukru i zredukowanej miedzi zostały ustalone empirycznie (przedstawione w postaci tabel) ze względu na niekorzystne reakcje uboczne występujące w tym oznaczeniu (powstawanie reduktorów w środowisku alkalicznym i podwyższonej temperaturze). Z tego powodu należy ściśle przestrzegać warunków oznaczenia, zwracając szczególną uwagę na to, aby wytrącony w czasie oznaczenia Cu_2O był pokryty zawsze warstwą cieczy zapobiegającej jego utlenieniu tlenem atmosferycznym do CuO .

WYKONANIE OZNACZENIA ZAWARTOŚCI LAKTOZY

Z dokładnie wymieszanego mleka odważyć 10 g do zlewki z dokładnością 0,0001 g, po czym całość przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 200 cm^3 , popłukując zlewkę około 100 cm^3 wody destylowanej:

100 g

↓

10 g → płyny Carreza I + II 200 cm^3

↓ sączenie

20 cm^3 (do oznaczenia)

~ miareczkowanie

+ płyny Bertranda I + II (gotowanie, wirowanie)

+ płyn Bertranda III (rozpuszczenie osadu)

Następnie wprowadzić do roztworu mleka po 5 cm^3 płynów Carreza I i II w celu odbiałczenia i klarowania próby, wymieszać i dopełnić wodą destylowaną do 200 cm^3 . Po 10 minutach przesączyć przez sączone bibuły.

Odmierzyć pipetą 20 cm^3 wyżej wymienionego roztworu do kolby stożkowej o pojemności 200 cm^3 i dalej postępować zgodnie z opisem podanym przy oznaczeniu zawartości cukrów bezpośrednio redukujących w syropach owocowych.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

Carreza I – 15-procentowy wodny roztwór $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

Carreza II – 30-procentowy wodny roztwór $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Fehlinga I – 69,28 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić wodą do 1000 cm^3

Fehlinga II – 346 g $\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (winian sodu i potasu) rozpuścić w wodzie destylowanej, dodać 100 g NaOH rozpuszczonego w wodzie, po wymieszaniu uzupełnić całość wodą destylowaną do 1000 cm^3

Bertranda I – 40 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w wodzie destylowanej i uzupełnić do 1000 cm^3

Bertranda II – 200 g $\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (winian sodu i potasu) rozpuścić w wodzie destylowanej, dodać 150 g NaOH rozpuszczonego w wodzie, po wymieszaniu całość uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm^3

Bertranda III – 50 g $\text{Fe}_2(\text{SO})_4$ rozpuścić w 500 cm^3 gorącej wody destylowanej, po ochłodzeniu ostrożnie dodać 200 g stężonego H_2SO_4 ($d = 1,84 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$), całość uzupełnić wodą destylowaną do 1000 cm^3

Kwas solny stężony ($d = 1,19 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

NaOH, roztwór wodny 30-procentowy

KMnO_4 , mianowany roztwór wodny $0,02 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Fenoloftaleina, roztwór alkoholowy 1-procentowy

Błękit metylenowy, roztwór wodny 1-procentowy

Sprzęt i aparatura:

Refraktometr Abbego

Waga analityczna

Łaźnia wodna z termostatem

Kuchenka elektryczna

Palnik Bunsena z trójnogiem

Wirówka laboratoryjna z gilzami o pojemności 100 cm^3

Piśmiennictwo

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.

NOGALA-KAŁUCKA M. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.

OBIEDZIŃSKI M. (red): Wybrane zagadnienia z analizy żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2009.

Official Methods of Analysis of the AOAC. Wyd. XX. Association of Official Analytical Chemists, Rockville MD 2016.

Ćwiczenie 5

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WŁÓKNA POKARMOWEGO W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Małgorzata Drywień

Wprowadzenie

Z fizjologicznego i żywieniowego punktu widzenia włókno pokarmowe definiuje się jako roślinne polisacharydy i ligniny, które nie są trawione przez enzymy przewodu pokarmowego człowieka. W jego skład wchodzi wiele związków, w większości o charakterze wielocukrów, których klasyfikację przedstawiono na rysunku 4.



Rysunek 4. Klasyfikacja włókna pokarmowego

Składniki włókna (frakcje) pokarmowego charakteryzują się różnorodnymi właściwościami chemicznymi, fizycznymi i fizjologicznymi, co przyczyniło się do kolejnego ich podziału na dwie podstawowe grupy:

- **włókno rozpuszczalne w wodzie** (pektyny, β-glukany, gumy, śluzy, polisacharydy glonów, fruktany);
- **włókno nierozpuszczalne w wodzie** (celuloza, hemicelulozy, ligniny, skrobia oporna).

Zawartość błonnika pokarmowego w wybranych produktach spożywczych, w g·(100 g)⁻¹ części jadalnych

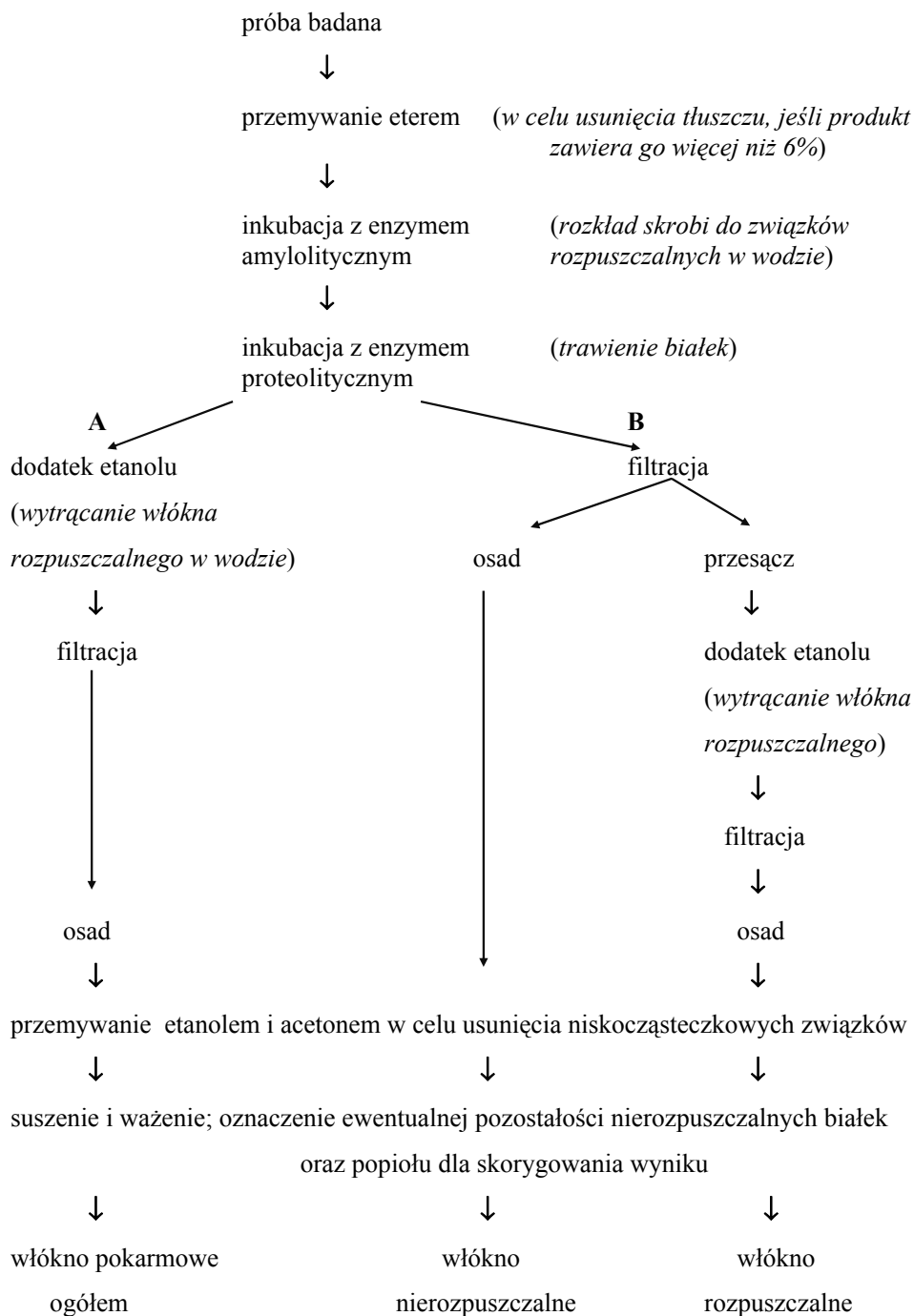
[Kunachowicz i Paczkowska 2007, Paczkowska i Kunachowicz 2007]:

	rozpuszczalny	nierozpuszczalny
■ kasza gryczana	0,8	5,1
■ kasza jęczmienna	1,8	4,4
■ chleb baltonowski	1,1	2,2
■ otręby pszenne	4,0	38,4
■ płatki owsiane	3,1	3,8
■ burak czerwony	0,4	1,8
■ fasola sucha	8,0	7,7
■ kapusta biała	1,0	1,5
■ marchew	1,7	1,9
■ ziemniaki	0,5	1,0
■ jabłko	0,5	1,5
■ kiwi	0,6	1,5
■ truskawki	0,6	1,2

Związki określane mianem włókna pokarmowego nie są wchłaniane ani metabolizowane przez organizm, nie dostarczają więc energii oraz związków odżywczych. Jednak ich znacząca rola w regulowaniu procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym człowieka, związana w dalszym etapie z ochroną organizmu przed wieloma groźnymi chorobami, przyczyniła się do rozwoju metod oznaczania zawartości błonnika pokarmowego w żywności.

Aktualnie do oznaczania włókna pokarmowego wykorzystywane są dwie grupy metod:

- **instrumentalne** (kolorymetryczne, chromatograficzne) – polegają na wstępnym usunięciu z próbki, na drodze trawienia enzymatycznego, skrobi i niskocząsteczkowych cukrów; następnie kolorymetrycznym i chromatograficznym oznaczeniu cukrów prostych i kwasów uronowych, wchodzących w skład poszczególnych frakcji włókna; metody te pozwalają na uzyskanie informacji dotyczących zarówno ilości włókna pokarmowego, jak i jego natury chemicznej;
- **enzymatyczno-wagowe** – ich zasada opiera się na oddzieleniu włókna od pozostałych składników żywności (tłuszczu, białek, skrobi i cukrów) przez zastosowanie przemywania i trawienia enzymatycznego, a następnie wagowym określeniu jego ilości; w zależności od zamierzonego efektu analiza może przebiegać według wybranego wariantu A lub B (rys. 5).



Rysunek 5. Schemat metod enzymatyczno-wagowych oznaczania włókna pokarmowego w żywności

Metody enzymatyczno-wagowe są powszechnie wykorzystywane w analizie żywnościowej i ulegają ciągłym modyfikacjom dotyczącym:

- skracania czasu poszczególnych zabiegów;
- wprowadzania bardziej efektywnych enzymów lub rezygnacji z nich, jeśli natura produktu na to pozwala;
- opracowywania szczegółowych metodologii dla określonych grup produktów, a nawet indywidualnych produktów.

Ogólny schemat analizy zostaje jednak zachowany.

Metody biologiczne wykorzystują korelację między strawnością suchej masy, obserwowaną u szczurów, lub wzrostem świnek morskich a ilością włókna pokarmowego w diecie hodowlanej; nie pozwalają na określenie w pełni udziału frakcji rozpuszczalnych w wodzie.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z enzymatyczno-wagową metodą AOAC oznaczania włókna pokarmowego rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego w wodzie, w wybranych produktach spożywczych pochodzenia roślinnego.

Oznaczanie zawartości włókna pokarmowego metodą AOAC

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na trawieniu (ewentualnie odtłuszczonej) próbki kolejno termooporną α -amylazą, proteazą i amyloglukozydazą, a następnie, po wytrąceniu włókna rozpuszczalnego, na wagowym oznaczeniu części niestrawionych z rozdziałem na rozpuszczalne i nierozpuszczalne w wodzie.

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie próbki do oznaczeń

Próbkę laboratoryjną badanego produktu suszyć 12 godzin w suszarce o temperaturze 70°C, po czym ostudzić i zmielić. Jeśli produkt zawiera więcej niż 10% tłuszczu, próbkę przenieść do kolby stożkowej, dodać heksan w ilości 25 cm³ na 1 g materiału i całość wytrząsnąć, a następnie przesączyć. Czynność powtórzyć trzykrotnie, po czym próbę wysuszyć i wagowo określić ubytek tłuszczu.

Trawienie enzymatyczne

Naważkę odtłuszczonego produktu w ilości 1 g, z dokładnością do 0,0001 g, przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 cm³, dodać 50 cm³ buforu fosforanowego o pH 6, sprawdzić pH, i jeśli to konieczne, doprowadzić je do wartości

6,0 ±0,2. Dodać 0,1 cm³ Termamylu, po czym kolbę przykryć folią aluminiową i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 15 minut, mieszając zawartość co 5 minut.

Jeśli do łaźni wstawia się jednocześnie kilka kolb, to spowoduje obniżenie temperatury wody, w związku z tym czas inkubacji należy wydłużyć do 30 minut.

Po ostudzeniu próbki do temperatury pokojowej dodać 0,275 N roztwór NaOH (ok. 16 cm³) tak, by pH roztworu osiągnęło wartość 7,5 ±0,2. Dodać 5 cm³ roztworu proteazy w buforze fosforanowym. Kolbę przykrytą folią aluminiową inkubować w termostacie (temp. 60°C) przez 30 minut. Do ochłodzonej do temperatury pokojowej próbki dodać 0,325 M roztwór HCl (ok. 10 cm³, aby pH wynosiło 4,0–4,6), a następnie 0,3 cm³ amyloglukozydazy i inkubować w termostacie (temp. 60°C) przez 30 minut. Próbkę przesączyć przez wysuszony, zważony sączonek. Kolbę stożkową wypłukać 10 cm³ gorącej wody, po czym popłuczyny przenieść na sączonek. Filtrat przenieść do wysokiej zlewki i zachować do dalszych oznaczeń.

Oznaczanie włókna pokarmowego nierozpuszczalnego w wodzie

Osad zebrany na sączoneku natychmiast przepłukać dwukrotnie 15 cm³ każdego z odczynników (zachowując kolejność): 78-procentowym etanolem, 95-procentowym etanolem, acetonem.

Zwłoka czasowa w przemyciu osadu może spowodować jego pęcznienie i wpłynąć na końcowy wynik oznaczenia.

Sączonek z osadem suszyć w temperaturze 105°C przez 12 godzin do stałej masy, ostudzić i zważyć. Masa osadu odpowiada zawartości błonnika nierozpuszczalnego w wodzie.

Oznaczanie włókna rozpuszczalnego w wodzie

Do zebranego filtratu dodać ogrzany do temperatury 60°C 95-procentowy etanol (4 objętości etanolu na 1 objętość filtratu) i pozostawić na 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie roztwór przesączyć przez wysuszony oraz zważony sączonek i postępować jak w punkcie opisanym wyżej. Masa wysuszonego osadu odpowiada wartości włókna rozpuszczalnego w wodzie (SDF).

Równoległe z próbką badaną należy przygotować próbkę ślepa dla stosowanego zestawu odczynników.

W obydwu zebranych osadach należy oznaczyć zawartość białka i popiołu.

Zawartość włókna pokarmowego ogółem odpowiada sumie włókna rozpuszczalnego i nierozpuszczalnego, po odjęciu pozostałości białek i popiołu, z ewentualnym uwzględnieniem zawartości tłuszczu, jeśli próbkę poddano wstępnemu odtłuszczeniu.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

Heksan

Bufor fosforanowy, 0,08 M, pH 6 – rozpuścić 1,400 g fosforanu dwusodowego, bezwodnego Na_2HPO_4 (lub 1,753 g dwuwodnego) oraz 9,68 g fosforanu jednosodowego jednowodnego NaH_2PO_4 (lub 10,94 g dwuwodnego) w około 700 cm^3 wody destylowanej, po czym dopełnić do 1000 cm^3 ; sprawdzić pH za pomocą phametru)

NaOH, 0,275 N roztwór wodny – rozpuścić 11 g NaOH w 700 cm^3 wody destylowanej, po czym dopełnić do 1000 cm^3)

HCl, 0,325 M roztwór wodny – rozcieńczyć 325 cm^3 1 M roztworu HCl do 1000 cm^3 wodą destylowaną

Termamyl (termooporna α -amylaza), roztwór 120L, Novo Nordisk Laboratories Proteaza, P-3910 for TDF, SIGMA – bezpośrednio przed oznaczeniem przygotować roztwór w buforze fosforanowym o stężeniu 5 mg na 5 cm^3

Amyloglukozydaza, A-9913, SIGMA, roztwór

Etanol, roztwór wodny 98-procentowy

Etanol, roztwór wodny 78-procentowy

Aceton

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Phametr

Łaźnia wodna

Suszarka owiewowa

Eksykator

Piśmiennictwo

KUNACHOWICZ H., PACZKOWSKA M.: Zawartość włókna pokarmowego frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wybranych warzywach i owocach. *Żyw. Człow. Metabol.* 2007, 34: 828–833.

McCLEARY B.V.: Dietary fibre analysis. *Proceed. Nutr. Soc.* 2003, 62: 3–9.

NOGALA-KAŁUCKA M. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.

Official Methods of Analysis of the AOAC. Wyd. XX. Association of Official Analytical Chemists, Rockville MD 2016.

PACZKOWSKA M., KUNACHOWICZ H.: Zawartość włókna pokarmowego frakcji rozpuszczalnej i nierozpuszczalnej w wybranych produktach zbożowych. *Żyw. Człow. Metabol.* 2007, 34: 824–827.

Ćwiczenie 6

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI TŁUSZCZU W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Jadwiga Hamułka

Wprowadzenie

Określenie **tłuszcz** obejmuje zarówno grupę produktów spożywczych, jak i składników pokarmowych. Produkty tłuszczowe – nazywane tłuszczami, jak na przykład: masło, smalec, margaryna czy też oleje roślinne, noszą nazwę tłuszczów widocznych (wydzielonych). Tłuszcze będące naturalnym składnikiem różnych produktów spożywczych, na przykład: mięsa i jego przetworów, mleka, produktów mlecznych, nazywane są tłuszczami niewidocznymi lub niewydzielonymi. W przeciętnym pożywieniu naszego społeczeństwa tłuszcze widoczne stanowią około 45% spożytego tłuszczu, a tłuszcze niewidoczne – około 55%.

Oznaczenie zawartości tłuszczu zaliczane jest do grupy analiz podstawowych, niezbędnych do ustalenia składu chemicznego produktów spożywczych. Ponadto określenie zawartości tłuszczu w produktach spożywczych pozwala wnioskować o ich wartości odżywczej, jak również prawidłowości przeprowadzonych procesów technologicznych, na przykład w przetwórstwie mięsnym, mleczarskim.

Zawartość tłuszczów w wybranych produktach spożywczych, w g·(100 g)⁻¹ części jadalnych [Kunachowicz i in. 2018]:

- tłuszcze jadalne – 70–100
(masło, margaryny, słonina, smalec, oleje roślinne, oliwa)
- tłuszcze stołowe o obniżonej kaloryczności – 45–60
(margaryny „niskokaloryczne”)
- produkty o bardzo dużej zawartości tłuszczu – 25–30
(śmietana kremowa, sery żółte, węgorz, metka, parówki, wafle nadziewane)
- produkty o dużej zawartości tłuszczu – 10–25

(wieprzowina, baranina, gęś, kaczka, kielbasy, śledź, makrela, jaja, sery tłuste, śmietana, twaróg tłusty, pieczywo cukiernicze)

- produkty o małej zawartości tłuszczu – 3–10
(polędwica, cielęcina, wołowina, kurczak, indyk, dorsz, ryby słodkowodne, produkty zbożowe, mleko pełne, lody, twarożki)
- produkty o bardzo małej zawartości tłuszczu – 0–3
(mleko chude, twaróg chudy, kefir, jogurt, pieczywo, warzywa, owoce, grzyby)

Tłuszcze jako składniki pokarmowe, nazywane inaczej **lipidami**, obejmują naturalną grupę związków organicznych (tłuszcze, oleje, fosfolipidy i sterole) o różnorodnej budowie chemicznej, nierozpuszczalnych w wodzie, a rozpuszczalnych w rozpuszczalnikach tłuszczowych, takich jak: heksan, eter naftowy, chloroform, benzen, alkohol, aceton i inne. Do grupy tej zalicza się także pochodne i pokrewne im związki. Tłuszcze naturalne są wieloskładnikową mieszaniną różnych lipidów, wśród których triacyloglicerole stanowią podstawowy ich składnik.

Lipidy dzieli się na trzy zasadnicze grupy:

- **lipidy proste** – estry kwasów tłuszczowych i glicerolu (lipidy właściwe – triacyloglicerole, woski);
- **lipidy złożone** – związki zawierające oprócz kwasów tłuszczowych i alkoholi również inne składniki (fosfolipidy, glikolipidy i inne);
- **lipidy pochodne** – pochodne lipidów prostych i złożonych, powstałe przede wszystkim w wyniku hydrolizy, zachowujące ogólne właściwości lipidów (kwasy tłuszczowe, alkohole, węglowodory).

Stąd też w analizie żywności termin **tłuszcz surowy** rozumie się jako sumę naturalnych związków organicznych, takich jak: glicerydy, wolne kwasy tłuszczowe, sterole, witaminy i barwniki rozpuszczalne w tłuszczach, fosfatydy, woski; nierozpuszczalnych w wodzie, które można wyekstrahować z produktu rozpuszczalnikami organicznymi (heksan, eter naftowy, chloroform, benzen, aceton i inne) i które nie są lotne w temperaturze 105°C.

Wśród metod oznaczania zawartości tłuszczu w produktach spożywczych najszersze zastosowanie znalazły:

- **metody ekstrakcyjne** (wagowe, np. Soxhleta, Weibulla-Stoldta, refraktometryczne, densymetryczne);
- **metody objętościowe** (kwasowe, np. Gerbera, bezkwasowe);
- **metody instrumentalne** wykorzystujące technikę odbiciową w bliskiej podczerwieni (NIR) lub magnetyczny rezonans jądrowy (NMR).

Metody ekstrakcyjne

Metody ekstrakcyjno-wagowe polegają na wydzieleniu z badanej próbki substancji tłuszczowej poprzez ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika (eteru, heksanu, chloroformu lub innego rozpuszczalnika tłuszczowego) i wagowym jej oznaczeniu.

Metody ekstrakcyjno-wagowe mogą polegać na:

- ekstrakcji rozpuszczalnikiem w nieokreślonej ściśle ilości;
- ekstrakcji określoną ilością rozpuszczalnika (np. metoda Grossfelda);
- stosowaniu wielokrotnej ekstrakcji ciągłej (np. metoda Soxhleta, metoda Weibulla-Stoldta, metoda Puzanova);

Warunkiem dokładności metod ekstrakcyjno-wagowych jest stosowanie odpowiednio przygotowanych odczynników. Wykorzystywany do ekstrakcji eter powinien być wolny od nadtlenu, pozbawiony śladów wody lub innych odczynników. Ponadto należy pamiętać o kolejności dodawanych odczynników zgodnie z opisem metody, w przeciwnym razie mogą powstać trudne do usunięcia emulsje. I tak na przykład w metodzie Rosego-Gottlieba dodanie eteru naftowego przed eterem etylowym prowadzi do powstania trwałej emulsji, nierozdzielającej się nawet po 24 godzinach. Z kolei niezachowanie kolejności dodawania alkoholu powoduje powstawanie „kłaczków”, które uniemożliwiają ilościowe wyekstrahowanie tłuszczu.

Metody ekstrakcyjno-wagowe należą do metod czasochłonnych, mimo to uznawane są za najdokładniejsze i stosowane jako metody odwoławcze w stosunku do innych, szybszych, orientacyjnych metod.

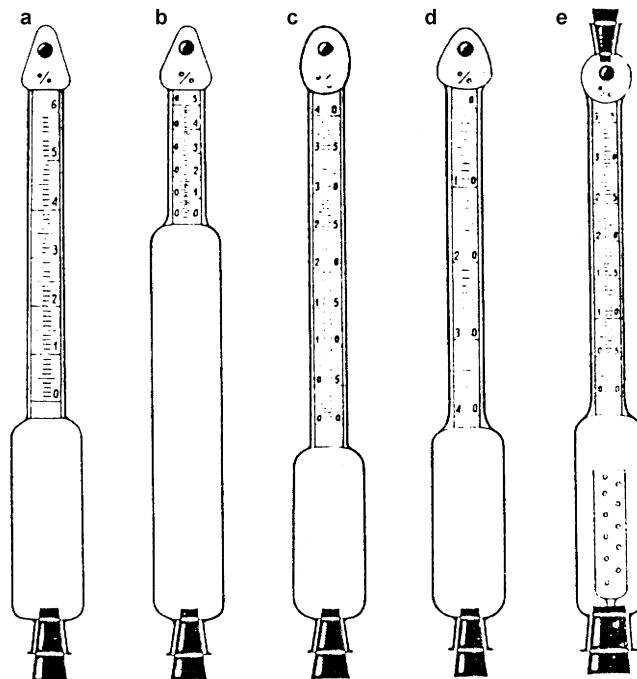
Metody ekstrakcyjno-refraktometryczne polegają na ekstrakcji tłuszczu z badanej próbki i oznaczeniu refrakcji otrzymanego wyciągu. Zasada metod oparta jest na zmianie współczynnika załamania światła rozpuszczalnika zależnie od ilości rozpuszczonego w nim tłuszczu. Tłuszcz obniża współczynnik refrakcji rozpuszczalnika, dlatego też stosuje się rozpuszczalniki o wysokim współczynniku załamania światła w stosunku do współczynnika refrakcji tłuszczu.

Metody ekstrakcyjno-refraktometryczne są szybkie, łatwe do wykonania, tanie, charakteryzują się dużą powtarzalnością wyników, nadają się jednak do oznaczania tłuszczu w produktach zawierających nieduże ilości tego składnika.

Metody ekstrakcyjno-densymetryczne polegają na wyekstrahowaniu tłuszczu z badanej próbki i oznaczeniu gęstości wyciągu tłuszczowego. Zasada metody polega na zmianie gęstości rozpuszczalnika w zależności od ilości rozpuszczonego w nim tłuszczu. Zawartość tłuszczu odczytuje się z krzywych. Jako rozpuszczalnik najczęściej stosuje się czterochlorek węgla. Ma on dużą gęstość, małą lotność i jest dobrym rozpuszczalnikiem tłuszczowym.

Metody objętościowe

Metody objętościowe (butyrometryczne) polegają na rozpuszczeniu znajdujących się w próbce białek i substancji towarzyszących, najczęściej stężonym kwasem siarkowym, rzadziej za pomocą odczynników zasadowych i wydzieleniu frakcji tłuszczowej (po uprzednim odwirowaniu) w specjalnym przyrządzie, zwanym tłuszczomierzem lub butyrometrem. Zawartość tłuszczu w badanej próbce odczytuje się bezpośrednio na wyskalowanej części butyrometru w stanie płynnym na gorąco. Znanych jest kilka typów butyrometrów przystosowanych do oznaczania zawartości tłuszczu w różnych produktach (rys. 6).



Rysunek 6. Różne typy butyrometrów (tłuszczomierzy): a – do mleka pełnego, b – do mleka odtłuszczonego, c – do mleka w proszku, d – do śmietany, e – do serów

Spośród metod objętościowych najbardziej popularna jest metoda Gerbera. Znalazła ona zastosowanie przede wszystkim przy określaniu poziomu tłuszczu w mleku, śmietanie, serach, a także mięsie i jego przetworach.

Metody objętościowe (butyrometryczne) należą do najszybszych metod oznaczania zawartości tłuszczu i charakteryzują się dużą prostotą wykonania oznaczenia.

Metody oznaczania zawartości tłuszczu w produktach spożywczych mają wiele wspólnych lub podobnych etapów, a mianowicie:

- wysuszenie do stałej masy (np. metoda Soxhleta) bądź hydroliza produktu (np. metoda Weibulla-Stoldta, metoda Gerbera), ułatwiające wyodrębnienie substancji tłuszczowych;
- wydzielenie substancji tłuszczowych w procesie ekstrakcji (np. metoda Soxhleta, metoda Weibulla-Stoldta) lub mechanicznie (metoda Gerbera);
- oznaczenie wolnej frakcji tłuszczowej, tak zwanego tłuszczu surowego, na przykład wagowo (np. metoda Soxhleta, metoda Weibulla-Stoldta).

Oprócz oznaczania zawartości tłuszczu w produktach spożywczych bardzo ważne jest określenie jego składu. Jednym z podstawowych wskaźników jakości tłuszczu w produktach spożywczych jest analiza składu kwasów tłuszczowych, których kompozycja zależy od wielu czynników (np. procesu technologicznego, cech genetycznych, warunków klimatycznych i glebowych).

Oznaczanie kwasów tłuszczowych w produktach spożywczych można przeprowadzić za pomocą chromatografii gazowej. Wyekstrahowany tłuszcz poddaje się hydrolizie zasadowej, a następnie uwolnione kwasy tłuszczowe przeprowadza się w ich pochodne – estry metylowe. Otrzymane estry rozdziela się metodą chromatografii gazowej. Na podstawie uzyskanego zapisu, zwanego chromatogramem, identyfikuje się poszczególne kwasy tłuszczowe, a następnie przeprowadza ilościową ocenę składu analizowanej mieszaniny.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z najczęściej stosowanymi metodami ekstrakcyjno-wagowymi oznaczania zawartości tłuszczu – metodą Soxhleta i metodą Weibulla-Stoldta oraz metodą objętościową Gerbera.

Oznaczenie zawartości tłuszczu metodą Soxhleta

ZASADA METODY

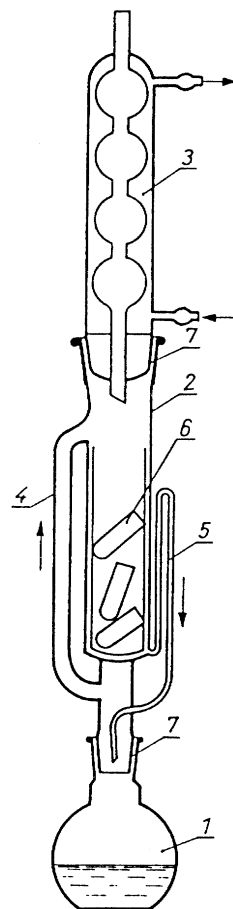
Oznaczenie polega na wielokrotnej ciągłej ekstrakcji substancji tłuszczowej z rozdrobnionego i uprzednio wysuszonego produktu za pomocą rozpuszczalnika organicznego, odparowaniu rozpuszczalnika i wagowym oznaczeniu substancji tłuszczowej.

Metoda Soxhleta należy do najbardziej rozpowszechnionych metod ekstrakcyjno-wagowych. Metoda ta polecana jest do oznaczania zawartości tłuszczu w produktach zawierających czyste triglicerydy, nie jest natomiast wskazana do produktów, w których tłuszcz występuje w postaci połączeń białkowych lub w postaci zemulgowanej, a także do preparatów farmaceutycznych.

Główne źródła błędów w metodzie Soxhleta to niedostateczne wysuszenie próbki oraz stosowanie rozpuszczalników niepozbawionych wody, a w przypadku eteru etylowego również nadtlenuków. Woda zawarta w próbce lub w rozpuszczalniku rozpuszcza sole mineralne i inne substancje rozpuszczalne w wodzie zawarte w produkcie, które po przejściu do wyciągu eterowego i odparowaniu rozpuszczalnika organicznego zwiększają masę suchej pozostałości traktowanej jako tłuszcz surowy. Ponadto obecność wody utrudnia przenikanie rozpuszczalnika organicznego w głąb cząsteczek produktu i tym samym uniemożliwia całkowite wyekstrahowanie tłuszczów. Nadtlenuki z kolei powodują wysycenie tlenem nienasyconych kwasów tłuszczowych, przyczyniając się do zawyżenia wyników, szczególnie podczas analizy produktów zawierających duże ilości tych kwasów.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do naczynka wagowego odważyć około 2–3 g produktu z dokładnością do 0,0001 g i wysuszyć w suszarce w temperaturze 105°C do stałej masy. Następnie całość przenieść do porcelanowego moździerza, dokładnie utrzeć z taką samą ilością suchego i odtłuszczonego piasku, w celu ułatwienia ekstrakcji, a następnie przenieść ilościowo do gilzy ekstrakcyjnej, wycierając 2–3-krotnie moździerz i naczynko, w którym próbka była suszona, zwitkami odtłuszczonej waty. Watę umieścić w gilzie, której dno powinno być również wyłożone zwitkiem waty. Gilzę po dokładnym zamknięciu zważyć z dokładnością do 0,0001 g, po czym umieścić ją w ekstraktorze aparatu Soxhleta (rys. 7). Połączyć odbieralnik zawierający kilka kawałków porcelany z ekstraktorem. Następnie wlać do ekstraktora rozpuszczalnik organiczny (heksan) w takiej ilości, aby nastąpiło samoczynne jego przelanie lewarem do odbieralnika, ponadto dodać rozpuszczalnika do około 1/2 pojemności ekstraktora. Połączyć ekstraktor z chłodnicą i otworzyć przepływ wody. Po sprawdzeniu szczelności całej aparatury włączyć łaźnię wodną i prowadzić ekstrakcję przez 3 godziny tak, aby w ciągu 1 godziny doszło do kilku przelewów. W celu sprawdzenia, czy proces ekstrakcji został zakończony, należy nanieść kroplę świeżo spływającego z ekstraktora heksanu na



Rysunek 7. Aparat Soxhleta do oznaczania zawartości tłuszczu: 1 – kolba destylacyjna, 2 – ekstraktor, 3 – chłodnica, 4 – rurka odprowadzająca opary rozpuszczalnika, 5 – rurka przelewowowa (syfon), 6 – gilza z badaną próbką, 7 – połączenia na szlifach

plytkę szklaną lub bibułę filtracyjną. Jeżeli po odparowaniu heksanu nie pozostaje tłusta plama, oznacza to, iż ekstrakcja tłuszczu z próby została zakończona, w przeciwnym wypadku powinna być kontynuowana w dalszym ciągu. Po zakończeniu ekstrakcji, ekstrakty heksanowe przenieść do butli na zlewki, a gilzę z próbką umieścić w porcelanowej kuwecie (szalce Petriego) i suszyć pod wyciągiem do całkowitego odparowania heksanu, **aż zapach heksanu nie będzie wyczuwalny!** Osuszone gilzy dosuszyć przez 20–30 minut w suszarce owiewowej w temperaturze 105°C do stałej masy, po czym przenieść do eksykatora w celu ostudzenia, a następnie zważyć gilzę z dokładnością do 0,0001 g.

Z różnicy masy gilzy przed ekstrakcją i po niej obliczyć zawartość tłuszczu w gramach na 100 g produktu świeżego. Można również obliczyć zawartość tłuszczu w próbce na podstawie różnicy masy kolby przed ekstrakcją i po niej, po dokładnym jej wysuszeniu.

Oznaczenie zawartości tłuszczu metodą Weibulla-Stoldta

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na hydrolizie połączeń frakcji tłuszczowej z innymi substancjami – przeważnie białkowym – za pomocą kwasu solnego, oddzieleniu frakcji tłuszczowej od hydrolizatu, wysuszeniu na sączku, wyekstrahowaniu rozpuszczalnikiem w aparacie Soxhleta i wagowym jej oznaczeniu.

Metoda Weibulla-Stoldta jest modyfikacją metody Soxhleta i jest zalecana do produktów, w których tłuszcz występuje w postaci połączeń białkowych lub w postaci zemulgowanej (mleko, sery, pieczywo, odżywki dla dzieci). Zniszczenie otoczek białkowych osłaniających kropelki tłuszczu umożliwia wydzielenie substancji tłuszczowej i ich oznaczenie.

Rozkład związków tłuszczowo-białkowych może następować pod wpływem hydrolizy próbki w roztworach mocnych kwasów lub słabej zasady amonowej. Zastosowanie silnych zasad jest niemożliwe z uwagi na hydrolityczny rozpad glicerydów i powstawanie soli kwasów tłuszczowych (mydeł) rozpuszczalnych w wodzie. Jeżeli w badanym produkcie występują wolne kwasy tłuszczowe, to zastosowanie nawet słabej zasady amonowej prowadzi do błędnych wyników na skutek powstania mydeł amonowych.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do zlewki o pojemności 600 cm³ odważyć z dokładnością do 0,0001 g wybrany produkt, dodać wody destylowanej i stężonego kwasu solnego w ilościach podanych w tabeli 4 oraz kilka kawałków pumeksu. Całość nakryć szkiełkiem zegarkowym i podgrzewać początkowo na łaźni wodnej, mieszając bagietką

Tabela 4. Warunki wykonania oznaczenia tłuszczu metodą Weibulla-Stoldta w wybranych produktach spożywczych

Produkt	Wielkość naważki [g]	Ilość i rozcieńczenie HCl		Czas	
		H ₂ O [cm ³]	HCl [cm ³]	gotowania [min]	ekstrakcji [h]
Masło	5	115	60 ($d = 1,19$)	20	1
Mleko zagęszczone i inne produkty mleczarskie słodzone	10	20	30 ($d = 1,125$)	20	1
Proszek mleczny, maślanka sproszkowana i inne produkty mleczne suche	20	100	60 ($d = 1,19$)	20	1
Lody i kremy	25	20	30 ($d = 1,125$)	20	2
Odżywki dla dzieci	3–10	33	17 ($d = 1,19$)	60	1
Mąki	20	100	60 ($d = 1,19$)	20	1
Pieczywo i makarony	20	100	60 ($d = 1,19$)	20	3
Wyroby cukiernicze	3–5	66	34 ($d = 1,19$)	15	6
Wyroby gastronomiczne	5	20	30 ($d = 1,125$)	15	4

Źródło: Krełowska-Kułas M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

w celu niedopuszczenia do zbrylania się produktu, następnie po kilkunastu minutach kontynuować ogrzewanie bezpośrednio na kuchence elektrycznej. Hydrolizę prowadzić pod wyciągiem zgodnie z czasem podanym w tabeli 4.

Po zakończeniu ogrzewania dodać do próby 160 cm³ gorącej wody destylowanej, wymieszać, a uwolniony tłuszcz oddzielić ilościowo na karbowanym sączku, przemywając trzykrotnie zlewkę i szkiełko zegarkowe gorącą wodą. Sączek przemywać gorącą wodą do momentu, aż woda z płukania przestanie dawać zabarwienie z papierkiem lakmusowym. Po odcieknięciu nadmiaru wody przenieść sączek łącznie z zatrzymanym tłuszczem na płytkę Petriego i suszyć w suszarce w temperaturze 105°C przez 2–4 godziny. Wysuszony sączek po ostudzeniu przenieść do gilzy ekstrakcyjnej i zakryć zwitkiem odtłuszczonej waty, którą uprzednio dokładnie należy zebrać resztki tłuszczu pozostałe na płytce Petriego. Całość umieścić w ekstraktorze aparatu Soxhleta i przeprowadzić ekstrakcję (patrz uwagi do metody Soxhleta). Czas trwania ekstrakcji podano w tabeli 4. Po zakończeniu ekstrakcji heksan odparować z kolby, a kolbę z pozostałością suszyć w suszarce w temperaturze 102–105°C przez 1 godzinę. Po ostudzeniu w ekcykatorze kolbę zważyć z dokładnością do 0,0001 g.

Z różnicy masy gilzy przed ekstrakcją i po niej obliczyć zawartość tłuszczu w gramach na 100 g badanego produktu.

Oznaczenie zawartości tłuszczu metodą Gerbera

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na wydzieleniu tłuszczu w specjalnym tłuszczomierzu (butyrometrze) po uprzednim rozpuszczeniu otoczek białkowych emulsji tłuszczowej za pomocą kwasu siarkowego, odwirowaniu warstwy tłuszczowej i odczytaniu procentowej zawartości tłuszczu na skali tłuszczomierza.

Do wydzielenia tłuszczu niezbędne jest jego uwolnienie z otoczek białkowych, czego dokonuje się przez potraktowanie badanej próbki stężonym kwasem siarkowym (stężenie uzależnione od rodzaju produktu – tab. 5) oraz alkoholem izoamylowym ($C_5H_{11}OH$), który zmniejsza przyczepność do szkła i ułatwia wydzielenie tłuszczu.

Tabela 5. Warunki wykonania oznaczenia tłuszczu metodą Gerbera w wybranych produktach spożywczych

Produkt	Rodzaj tłuszczomierza	Wielkość próbki	Kwas siarkowy (ilość i stężenie)
Mleko Mleko odtłuszczone	do mleka do mleka odtłuszczonego	11 cm ³ 22 cm ³	10 cm ³ ; $d = 1,815-1,825 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 20 cm ³ ; $d = 1,815-1,825 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (podwójna ilość alkoholu amyłowego – 2 cm ³)
Śmietana i śmietanka	Koehlera Hammerschmidta Roedera	5 cm ³ 5 cm ³ 5 g	10 cm ³ ; $d = 1,825 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 10 cm ³ ; $d = 1,815-1,825 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ 15 cm ³ ; $d = 1,60 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (po rozpuszczeniu białka i dodaniu alkoholu amyłowego uzupełnić do kreski)
Mleko w proszku	Teicherta	2,5 g	10 cm ³ ; $d = 1,815 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$
Masło	do masła	5 g	$d = 1,525-1,530 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (w takiej ilości, aby próbka pokryta była kwasem; po rozpuszczeniu białka i dodaniu alkoholu amyłowego uzupełnić kwasem do górnej kreski skali)
Sery i twarogi	van Gulika	3 g	15 cm ³ ; $d = 1,530 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ (po rozpuszczeniu białka i dodaniu alkoholu amyłowego uzupełnić kwasem do górnej kreski skali)
Mięso, konserwy mięsne, wędliny i wyroby wędliniarskie	do śmietany Roedera	5 g	15 cm ³ ; $d = 1,83 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}$
Wyroby gastronomiczne	do śmietany Roedera	5 g	15 cm ³ ; $d = 1,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-1}$

Źródło: Krełowska-Kułas M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do tłuszczomierza odmierzyć podaną w tabeli 5 ilość kwasu siarkowego i dodać badaną próbkę (próbki płynne wlać ostrożnie po ścianie tłuszczomierza, tak aby nie zmieszały się z kwasem). Dodać 1 cm^3 alkoholu izoamyłowego, aby nie zwilżyć szyjki tłuszczomierza. Dokładnie zamknąć tłuszczomierz, wkręcając gumowy korek (**konieczne zachowanie kolejności dodawanych odczynników**). Całość dokładnie wymieszać – do momentu rozpuszczenia się białek. W czasie mieszania gwałtownie wzrasta temperatura mieszaniny, dlatego też tłuszczomierz należy trzymać przez ściereczkę/rękawiczkę.

Tłuszczomierz umieścić w łaźni wodnej (korkiem w dół) o temperaturze $65\text{--}70^\circ\text{C}$ na 10–20 minut, podczas ogrzewania kilkakrotnie wstrząsnąć, aż do rozpuszczenia substancji białkowej. Następnie umieścić tłuszczomierz w wirówce Gerbera skalą do osi wirówki i wirować 5 minut przy 1000–1200 obrotach na minutę. Jeżeli wirówka nie jest ogrzewana, po zakończeniu wirowania tłuszczomierz wstawić na 5 minut do łaźni wodnej o temperaturze $65\text{--}70^\circ\text{C}$. **Należy uważać, aby skala tłuszczomierza była zawsze skierowana ku górze i aby nie mieszać rozdzielonych warstw.** Odczytać procentową zawartość tłuszczu w stanie płynnym (na gorąco w temperaturze 65°C) na skali tłuszczomierza, regulując poziom tłuszczu za pomocą korka. Manipulując korkiem, należy wprowadzić tłuszcz do skalowanej części tłuszczomierza, tak aby dolna część słupka tłuszczu sięgała zerowej kreski skali lub pokrywała się z inną całkowitą podziałką. Jeżeli cieczy w tłuszczomierzu jest zbyt mało, cały tłuszcz nie wchodzi do skalowanej części tłuszczomierza i regulowanie korkiem nie daje rezultatów, należy dodać roztworu kwasu siarkowego, wytrząsać i ponownie wirować.

Ze skali tłuszczomierza odczytuje się bezpośrednio procentową zawartość tłuszczu w produkcie. Przy oznaczaniu tłuszczu w mleku, produktach mlecznych i wyrobach garmażeryjnych odczytuje się wynik, biorąc pod uwagę menisk dolny warstwy tłuszczowej, a przy oznaczeniu tłuszczu w mleku odtłuszczonym odczytuje się procent tłuszczu według menisku górnego.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

Heksan

Kwas solny stężony ($d = 1,19\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ lub $d = 1,125\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ – tab. 4)

Kwas siarkowy stężony – roztwór o odpowiednim stężeniu w zależności od rodzaju produktu (tab. 5)

Alkohol izoamyłowy ($d = 0,815\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

Wata odtłuszczona

Piasek odtłuszczony

Sprzęt i aparatura:

Suszarka

Eksykator

Aparat Soxhleta

Łaźnia wodna (wrząca) w zestawie do ekstrakcji tłuszczu

Kuchenka elektryczna

Waga analityczna

Tuszczomierze Gerbera

Wirówka Gerbera

Łaźnia wodna z termostatem

Gilzy ekstrakcyjne lub twarda bibuła

Sączki średniej twardości

Moździerz porcelanowy

Piśmiennictwo

KOCJAN R.: Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów. Tom 2. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2000.

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.

NOGALA-KAŁUCKA M. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.

OBIEDZIŃSKI M. (red.). Wybrane zagadnienia z analizy żywności. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 2009.

Official Methods of Analysis of the AOAC. Wyd. XX. Association of Official Analytical Chemists, Rockville MD 2016.

Ćwiczenie 7

METODY OZNACZANIA ZAWARTOŚCI POPIOŁU W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Agata Wawrzyniak

Wprowadzenie

Proces mineralizacji jest jednym z podstawowych etapów poprzedzających oznaczanie zawartości składników mineralnych w produktach spożywczych. Podczas tego procesu związki organiczne, to jest białka, tłuszcze, węglowodany, zostają utlenione do dwutlenku węgla, tlenu wodoru i amoniaku, a składniki mineralne są przeprowadzone bezpośrednio do roztworu (mineralizacja „na mokro”) lub po rozpuszczeniu popiołu w stężonych kwasach mineralnych (mineralizacja „na sucho”).

Wśród metod mineralizacji substancji organicznych (utleniania) można wyróżnić trzy grupy:

- **mineralizację „na sucho”** – spopielanie w wysokiej temperaturze;
- **mineralizację „na mokro”** – utlenianie substancji organicznych za pomocą mocnych kwasów mineralnych, to jest kwasu azotowego, siarkowego lub nadchlorowego w kolbach Kjeldahla, w temperaturze wrzenia kwasów (120–330°C), aż do uzyskania klarownego roztworu;
- **mineralizację poprzez stapianie próbki produktu z substancjami utleniającymi.**

W analizie produktów spożywczych znalazły powszechne zastosowanie dwie pierwsze metody.

Spopielanie

Popiołem nazywamy pozostałość otrzymaną po całkowitym spaleniu (mineralizacji „na sucho”) próbki badanego produktu spożywczego.

Poziom popiołu w żywności jest miarą zawartości w niej składników mineralnych niezbędnych do normalnego funkcjonowania organizmu człowieka. Termin ten nie odpowiada dokładnie pojęciu składników mineralnych, ponieważ w czasie procesu spalania mogą ulegać stratom niektóre ze związków (np. chlor-

ki). Ponadto popiół może zawierać w swoim składzie substancje obce dodawane celowo (sól kuchenna) oraz zanieczyszczenia (piasek, środki chemiczne).

Głównymi składnikami popiołu są: potas, sód, wapń, magnez, żelazo, siarka, fosfor i chlor. Inne metale i metaloidy występują w popiele w mniejszych ilościach.

Zawartość popiołu w wybranych produktach spożywczych, w $\text{g}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ części jadalnych

[Kunachowicz i in. 2017]:

■ otręby pszenne	– 6,0
■ mleko w proszku pełne	– 6,0
■ nasiona roślin strączkowych (suche)	– 3,0–5,0
■ sery podpuszczkowe	– 3,0–5,0
■ wędliny	– 2,0–5,0
■ ryby i przetwory rybne	– 1,0–2,0
■ jajo kurze całe	– 1,0
■ mięso	– 0,4–1,0
■ mleko i przetwory mleczne	– 0,5–1,0
■ przetwory zbożowe	– 0,2–2,0
■ owoce i warzywa świeże	– 0,5–1,5
■ tłuszcze	– 0,2

Badania zawartości popiołu w produktach spożywczych przeprowadza się w celu:

- określenia wartości odżywczej produktów (oznaczenie popiołu jest punktem wyjścia do oznaczenia występujących w jego składzie wybranych składników mineralnych);
- oznaczenia zawartości metali ciężkich (np. kadmu, ołowiu);
- określenia poziomu zanieczyszczeń mineralnych żywności;
- oceny jakości badanych produktów spożywczych.

Na charakterystykę popiołu składa się oznaczenie:

- zawartości popiołu całkowitego (surowego);
- zawartości popiołu nierozpuszczalnego w 10-procentowym kwasie solnym;
- zawartości popiołu czystego;
- zawartości popiołu rozpuszczalnego w wodzie;
- odczynu popiołu;
- jego składu mineralnego.

Popiół całkowity (surowy) jest to masa popiołu oznaczonego bezpośrednio po mineralizacji (spopieleniu) próbki produktu. Popiół całkowity jest wyznacznikiem wartości żywieniowej, może zawierać też ślady zanieczyszczeń (np. piasku).

Popiół nierozpuszczalny w 10-procentowym HCl wskazuje głównie na zawartość piasku, który nie rozpuszcza się w 10-procentowym HCl, określa czystość produktu.

Popiół czysty nie zawiera piasku:

popiół surowy – piasek = popiół czysty

Popiół rozpuszczalny w wodzie jest to frakcja związków rozpuszczalnych, głównie soli sodu i potasu oraz chlorków i węglanów, wyługowanych z użyciem gorącej wody destylowanej z popiołu całkowitego, uzyskanego po spopieleniu próbki produktu.

Odczyn popiołu określa kwasowość (przewaga Cl, P, S – produkty zbożowe, jaja, mięso, ryby) lub alkaliczność popiołu (więcej K, Na, Ca, Mg – warzywa, owoce, mleko) w zależności od tego, które z pierwiastków występują w produkcie w przewadze. Odczyn ten określa się metodami alkacymetrycznymi, a wynik wyraża się w centymetrach sześciennych kwasu lub zasady potrzebnych do zobojętnienia popiołu zawartego w produkcie.

Najczęściej stosowany sposób spopielenia polega na ogrzewaniu próbki produktu w parowniczkach lub tyglach porcelanowych, kwarcowych bądź platynowych, w dostępie powietrza, zazwyczaj w piecach muflowych.

Podczas mineralizacji „na sucho”, w wyższej temperaturze, istnieje możliwość strat składników mineralnych (np. siarki, chlorków), dlatego też proces ten musi być prowadzony w znormalizowanych warunkach, a istotnymi czynnikami wymagającymi kontroli są: temperatura, czas spalania i stosowane naczynia.

Dla większości produktów zalecana jest temperatura spopielenia 550°C. W przypadku zbóż i produktów zbożowych spopielenie prowadzi się w temperaturze 900°C (nie zawierają chlorków). Czas spopielenia wynosi 16–18 godzin. Krótszy czas procesu stosowany jest zwykle do materiału roślinnego lub w przypadku małych naważek.

Szybkość mineralizacji zależy od składu badanego materiału. Trudniej spopiela się produkty zawierające duże ilości białka lub z przewagą pierwiastków kwasotwórczych (zawierające sole łatwo topliwe – chlorki i fosforany). Aby zapobiec stratom chloru i fosforu, należy dodać przed mineralizacją substancje alkalizujące, na przykład octan magnezu.

W przypadku oznaczania w popiele miedzi należy unikać tygli kwarcowych, gdyż tworzą one z miedzią kompleksy krzemowo-miedziowe.

Przed przystąpieniem do mineralizacji, w celu nadania większej porowatości spopielanemu materiałowi, stosuje się mieszanie próbki z czystym piaskiem lub pumeksem.

Produkty półpłynne lub płynne (np. soki) przed procesem spalania należy zagaścić na łaźni wodnej.

Jeżeli spopielenie zachodzi opornie, można stosować dodatek substancji przyspieszających utlenianie składników próbki. W tym celu tygiel z częściowo spalonymi substancjami organicznymi chłodzi się i dodaje kilka kropel kwasu azotowego lub nadtlenku wodoru, ciecz odparowuje, a pozostałość wypraża. Otrzymana próbka popiołu ma być wolna od śladów węgla.

Wstępne zwęglanie próbki produktu nad palnikiem gazowym należy prowadzić przy możliwie słabym płomieniu gazu, aby zapobiec stratom substancji porywanych w postaci pyłu przez gaz, ulotnieniu się części soli (np. chlorków), jak też nie utrudniać dostępu powietrza do próbki.

Wykonanie ćwiczenia

W ramach ćwiczenia studenci zapoznają się z podstawowymi metodami określania zawartości popiołu oraz jego odczynu, w zależności od rodzaju badanego produktu spożywczego.

Oznaczenie całkowitej zawartości popiołu

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na spopieleniu (mineralizacji „na sucho”) próbki produktu w temperaturze 900°C w przypadku produktów zbożowych niezawierających chlorków lub w temperaturze 550°C w przypadku innych produktów spożywczych, po uprzednim jej zwęgleniu.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do tygla porcelanowego lub kwarcowego, uprzednio doprowadzonego do stałej masy i zważonego, odważyć 4 g jednorodnej próbki badanego produktu spożywczego z dokładnością do 0,0001 g. Próbkę zwęglić na kuchence elektrycznej lub nad płomieniem palnika pod wyciągiem, po ostudzeniu dodać 5 cm³ stężonego kwasu azotowego i odparować pod wyciągiem do zakończenia wydzielania się dymów. Zwęgloną próbkę umieścić w piecu muflowym w temperaturze 550 lub 900°C, w zależności od produktu, na 16–18 godzin, aż do uzyskania jasnego, wolnego od śladów węgla popiołu. Po tym czasie próbkę przenieść do eksykatora i po ochłodzeniu do temperatury pokojowej zważyć na wadze analitycznej. W celu sprawdzenia skuteczności spopielenia próbkę prażyć dodatkowo przez 30 minut, po czym powtórnie zważyć. Różnica mas oznaczonych w obu wypadkach nie może przekraczać 0,0002 g.

Z różnicy mas tygla z popiołem i tygla pustego, po uwzględnieniu wielkości naważki, obliczyć zawartość popiołu całkowitego w 100 g produktu.

Oznaczenie zawartości popiołu rozpuszczalnego w wodzie

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na wylugowaniu gorącą wodą dejonizowaną frakcji związków rozpuszczalnych, głównie soli sodu i potasu oraz chlorków i węglanów, z popiołu całkowitego, uzyskanego po mineralizacji próbki produktu w temperaturze 550°C.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do tygla z popiołem całkowitym dodać 10–15 cm³ wody dejonizowanej i ogrzewać całość przez 5 minut pod przykryciem. Po dokładnym wymieszaniu zawartość tygla przenieść na twardy sączek bezpopiołowy, przemyty uprzednio wodą dejonizowaną. Przesącz zbierać do wyprażonej i zważonej parownicy. Proces wymywania związków mineralnych z użyciem gorącej wody dejonizowanej powtórzyć trzykrotnie, każdorazowo popłukując dokładnie tygiel i osad na sączku, do uzyskania 40–50 cm³ przesączu. Po zakończeniu ekstrakcji parownicę umieścić we wrzącej łaźni wodnej w celu odparowania wody. Próbki dosuszyć w suszarce w temperaturze 130°C. Suchą pozostałość prażyć w piecu w temperaturze 550°C przez 30 minut, po czym ostudzić parownicę w ekscykatorze i zważyć.

Z różnicy mas parownicy z popiołem i parownicy pustej, po uwzględnieniu wielkości naważki, obliczyć zawartość popiołu rozpuszczalnego w 100 g produktu.

Oznaczenie zawartości popiołu nierozpuszczalnego w 10-procentowym kwasie solnym

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na określeniu masy części popiołu całkowitego, która nie zostaje rozpuszczona w 10-procentowym kwasie solnym.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do tygla z popiołem całkowitym dodać 5 cm³ 10-procentowego kwasu solnego i ogrzewać całość przez 15 minut na wrzącej łaźni wodnej pod przykryciem. Po ochłodzeniu zawartość tygla przenieść ilościowo na sączek bezpopiołowy, z użyciem gorącej wody dejonizowanej, przemywając kilkakrotnie tygiel i osad na sączku gorącą wodą. Osad wraz z sączkiem umieścić w tyglu, całość suszyć przez 30 minut w temperaturze 130°C, zwęglić i spopielić w piecu muflowym w temperaturze 920°C do uzyskania jasnego popiołu.

Z różnicy mas tygla z popiołem i tygla pustego, po uwzględnieniu wielkości naważki, obliczyć zawartość popiołu nierozpuszczalnego w 10-procentowym kwasie solnym w 100 g produktu.

Oznaczenie odczynu popiołu

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na rozpuszczeniu popiołu całkowitego w kwasie siarkowym i odmiareczkowanie nadmiaru kwasu roztworem zasady.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do tygla z popiołem całkowitym dodać dokładnie odmierzoną ilość 20 cm^3 $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu siarkowego. Całość po dokładnym wymieszaniu przenieść z użyciem gorącej wody dejonizowanej do zlewki, po czym ogrzewać przez 15 minut, utrzymując roztwór w stanie łagodnego wrzenia. Po schłodzeniu próbkę miareczkować roztworem wodorotlenku sodowego o stężeniu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ wobec fenoloftaleiny. Wykonać próbę ślepą, miareczkując 20 cm^3 H_2SO_4 roztworem NaOH.

Uzyskany wynik, przekraczający 20 cm^3 użytej zasady, świadczy o przewodzie pierwiastków kwasotwórczych w badanym materiale, a wynik mniejszy od 20 cm^3 – o przewodzie pierwiastków alkalicznych. W pierwszym przypadku wynik należy przedstawić jako ilość cm^3 zasady sodowej o stężeniu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, a w drugim jako ilość cm^3 kwasu siarkowego o stężeniu $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, potrzebnych do zobojętnienia popiołu uzyskanego ze 100 g produktu.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

Kwas azotowy stężony ($d = 1,14 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

HCl, roztwór wodny 10-procentowy

H_2SO_4 , roztwór wodny $0,05 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

NaOH, roztwór wodny $0,1 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Fenoloftaleina, roztwór alkoholowy 1-procentowy

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Łaźnia wodna z termostatem

Kuchenka elektryczna

Palnik Bunsena

Piec mufłowy

Eksykator

Piśmiennictwo

- KRELOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.
- KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., PRZYGODA B., IWANOW K.: Tabele składu i wartości odżywczej żywności. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2017.
- NOGALA-KAŁUCKAM. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.
- PN-ISO 2171:2010. Ziarno zbóż i przetwory zbożowe. Oznaczanie popiołu całkowitego.

Ćwiczenie 8

OZNACZENIE ZAWARTOŚCI WAPNIA I ŻELAZA W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Agata Wawrzyniak

Wprowadzenie

Według obecnych poglądów do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka niezbędnych jest co najmniej 17 składników mineralnych, do szczególnie zaś istotnych należą wapń i żelazo.

Wapń

Wapń jest pierwiastkiem należącym do grupy makroelementów, dostarczany do diety głównie z mlekiem i jego przetworami i z tych też produktów jest najlepiej absorbowany.

Wykorzystanie wapnia z diety zależy od formy chemicznej i obecności w pożywieniu substancji wpływających na jego rozpuszczalność. Niskie pH, obecność aminokwasów zasadowych, laktozy, kwasów organicznych, a także obecność witaminy D i odpowiedni stosunek wapnia do fosforu zwiększają jego wykorzystanie.

Zawartość wapnia w wybranych produktach spożywczych, w $\text{mg}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ części jadalnych

[Kunachowicz i in. 2018]:

- | | |
|--|------------|
| ▪ sery podpuszczkowe | – 400–1300 |
| ▪ mleko, przetwory mleczne, sery twarogowe | – 50–200 |
| ▪ jajo kurze całe | – 50 |
| ▪ mąki, pieczywo, kasze do | – 50 |
| ▪ nasiona roślin strączkowych (suche) | – 50–250 |
| ▪ mięso i przetwory mięsne, ryby | – 5–50 |
| ▪ owoce i warzywa świeże | – do 100 |

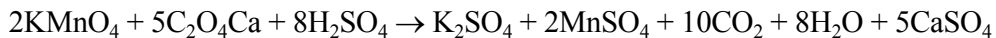
Należy zaznaczyć, że produkty roślinne, mimo dużej niekiedy zawartości w nich wapnia, nie są dobrym źródłem tego składnika ze względu na obecność takich substancji, jak: fityniany, szczawiany i błonnik, utrudniających wyko-

rzystanie składników mineralnych. Na gorsze wykorzystanie wapnia wpływają także: wyższe pH, obecność tłuszczu, jak też duża zawartość fosforu w racji pokarmowej.

Wapń z dziennej racji pokarmowej jest absorbowany na poziomie 30–40%.

Wśród metod oznaczania wapnia najszerze zastosowanie znalazły cztery niżej opisane metody.

Metoda manganometryczna (objętościowa) – wapń znajdujący się w roztworze zmineralizowanej próbki produktu, pod postacią chlorku wapniowego, wytrąca się w środowisku kwaśnym pod wpływem dodanego szczawianu amonowego, tworząc szczawian wapniowy. Po rozpuszczeniu szczawianu wapniowego w kwasie siarkowym miareczkuje się wolny kwas szczawowy roztworem nadmanganianu potasowego i oblicza ilość związanego z nim wapnia:



Metoda ta należy do metod klasycznych, jest dość pracochłonna, nie wymaga skomplikowanej aparatury i oznacza się stosunkowo dużą precyzją.

Metoda kompleksometryczna z wersenianem dwusodowym (objętościowa) polega na miareczkowaniu wapnia w zmineralizowanej próbce produktu roztworem wersenianu dwusodowego w obecności wskaźnika mieszaniny mureksydowej, którego barwa zmienia się od szaroróżowej do niebieskofioletowej.

Oznaczenie wapnia metodą kompleksometryczną utrudnia ewentualna obecność w roztworze metali ciężkich, mogących tworzyć z mureksydem kompleksy barwne oraz duża czułość metody na obecność szczawianów, fosforanów, które tworzą ze wskaźnikiem silniejsze kompleksy niż kompleks oznaczanych kationów, a roztwór nie zmienia zabarwienia nawet po dodaniu nadmiaru wersenianu; jak też stosunkowo trudno do uchwycenia końcowy punkt miareczkowania.

Metoda fotometrii płomieniowej polega na pomiarze w roztworach zmineralizowanej próbki natężenia promieniowania emitowanego przez wzbudzone atomy wapnia w płomieniu palnika. Określenie zawartości wapnia w próbce odbywa się na podstawie odczytu z krzywej wzorcowej. Metoda ta wymaga usunięcia jonów interferujących, a szczególnie fosforanów poprzez dodatek roztworu kompleksującego, na przykład azotanu cyrkonu, lub usunięcia wyżej wspomnianych związków na jonitach.

Metoda atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej (ASA) polega na pomiarze absorpcji promieniowania lampy katodowej przy długości fali rezonansowej 422,7 nm przez wolne atomy wapnia znajdujące się w roztworze próbki wprowadzonej do płomienia palnika acetyleno-powietrznego w formie rozpylonej. Mierzona absorpcja jest proporcjonalna do stężenia danego pierwiastka. Zawartość wapnia w próbce odczytuje się na podstawie krzywej standardowej.

Interferencja jonów fosforanowych usuwana jest przez stosowanie dodatku soli strontu lub lantanu do badanych roztworów. Metoda ta zalecana jest ze względu na selektywność oznaczeń, dużą czułość oraz szybkość przeprowadzanych analiz.

Żelazo

Żelazo jest dość szeroko rozpowszechnionym w naturze mikroelementem, jednak jego wykorzystanie z dziennej racji pokarmowej jest stosunkowo małe i wynosi średnio 10%, w produktach pochodzenia roślinnego od 1 do 5%, natomiast w przypadku mięsa, w którym występuje głównie w postaci hemowej (mioglobina, hemoglobina), do 30%.

Absorpcja żelaza niehemowego zależy w dużej mierze od składu diety. Na obniżenie jej wpływa obecność fitynianów, szczawianów, tanin, fosforanów, zasadowe pH, niektóre białka roślinne, wysoki poziom tłuszczu, obecność wapnia, cynku, kadmu i manganu. O zwiększeniu wykorzystania zaś decyduje obecność kwasu askorbinowego, kwasu foliowego, tak zwany meat factor – czynnik występujący w białkach mięśniowych, oraz niektóre aminokwasy (histrydina, L-cysteina) i obecność miedzi.

Zawartość żelaza w wybranych produktach spożywczych, w $\text{mg}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ części jadalnych

[Kunachowicz i in. 2018]:

■ wątroba wieprzowa	– 19,0
■ otręby pszenne	– 15,0
■ żółtko jaja kurzego	– 7,0
■ nasiona roślin strączkowych (suche)	– 5,0–8,0
■ mąki, pieczywo, kasze	– 1,0–4,0
■ jaja kurze całe	– 2,0
■ mięso i wędliny	– 1,0–3,0
■ owoce i warzywa świeże	– 0,5–2,0
■ ryby i przetwory rybne	– 0,2–1,5
■ mleko i przetwory mleczne	– 0,1–1,0

Do oznaczania żelaza zaleca się metodę atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej i metody kolorymetryczne.

Metoda atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej (ASA) polega na pomiarze absorpcji promieniowania lampy katodowej przy długości fali 248,3 nm przez wolne atomy żelaza znajdujące się w roztworze zmineralizowanej próbki wprowadzonej do płomienia w formie rozpylonej. Zawartość żelaza w próbce odczytuje się na podstawie krzywej standardowej.

Metody kolorymetryczne oparte są na oznaczeniach jonów żelazowych (Fe^{3+}), to jest metoda rodankowa i metoda z kwasem sulfosalicylowym, oraz na oznaczeniach jonów żelazawych (Fe^{2+}), to jest metoda z orto-fenantroliną i metoda z 2,2-dwupirydylem.

Częściej do oznaczeń żelaza stosowane są metody oparte na oznaczeniu jonów żelazawych (Fe^{2+}) ze względu na:

- większą trwałość utworzonych barwnych kompleksów w czasie;
- odporność żelaza związanego w barwnych kompleksach na utlenianie;
- mały wpływ substancji obecnych w roztworze na oznaczenie;
- pH roztworu oznaczanego powyżej 4 zapobiega interferencji fosforanów, szczawianów czy fluorków.

Wykonanie ćwiczenia

W ramach ćwiczenia studenci zapoznają się z kolorymetryczną (orto-fenantrolinową) metodą oznaczania żelaza oraz kompleksometryczną metodą oznaczania wapnia.

Składniki mineralne, czyli te pierwiastki, które pozostają po mineralizacji próbki produktu, oznacza się w produktach spożywczych po uprzednim spopieleniu próbki (mineralizacja „na sucho”) i rozpuszczeniu otrzymanego popiołu w kwasach lub po bezpośrednim utlenieniu substancji organicznych mocnymi kwasami mineralnymi (mineralizacja „na mokro”).

Przygotowanie próbki popiołu do oznaczeń wapnia i żelaza

W celu przygotowania zmineralizowanej próbki produktu do oznaczenia w niej zawartości składników mineralnych należy otrzymany popiół całkowity (ćwiczenie 7) rozpuścić w 5 cm^3 stężonego kwasu solnego, całość odparować nad płomieniem palnika pod wyciągiem do sucha, a następnie ponownie rozpuścić w 5 cm^3 stężonego kwasu solnego i odparować do połowy objętości. Zawartość tygla przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 cm^3 i uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną, uzyskując roztwór podstawowy.

Oznaczanie zawartości żelaza metodą orto-fenantrolinową

ZASADA METODY

Wykonanie pomiaru absorbancji utworzonego barwnego połączenia orto-fenantroliny z jonami żelazawymi (Fe^{2+}), po uprzedniej redukcji jonów żelazowych (Fe^{3+}) chlorowodorkiem hydroksyloaminy, w środowisku słabo kwaśnym (pH 4). Intensywność powstałego zabarwienia mierzy się przy długości fali świetlnej 510 nm.

WYKONANIE OZNACZENIA**Przygotowanie krzywej standardowej (wzorcowej)**

Do pięciu kolb miarowych o pojemności 50 cm³ pobrać: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 i 1,0 cm³ przygotowanego roztworu standardowego żelaza (co odpowiada ilości 20–100 µg żelaza w poszczególnych kolbach). Następnie do wszystkich kolb dodać po 2 cm³ 10-procentowego roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy; a po kilku minutach 10 cm³ buforowego roztworu octanu sodowego i 2 cm³ 0,1-procentowego roztworu orto-fenantroliny, po czym całość dopełnić wodą dejonizowaną do kreski.

Wykonać próbę odczynnikową, tak zwaną ślepa.

Pomiar absorbancji przeprowadzić po upływie około 1 godziny (trwałość zabarwienia około 24 godzin) przy długości fali świetlnej 510 nm. Wykreślić krzywą standardową.

Oznaczenie zawartości żelaza w badanej próbce

Z roztworu podstawowego zmineralizowanej próbki produktu pobrać taką ilość roztworu do kolby miarowej o pojemności 50 cm³, która zawierałaby około 40 µg żelaza (zakres odczytu z krzywej standardowej 0–100 µg Fe na 50 cm³). Dalej postępować jak przy sporządzaniu krzywej standardowej, dodając odpowiednio chlorowoderek hydroksyloaminy, bufor octanowy i orto-fenantrolinę w odpowiednich ilościach.

Pomiar absorbancji wykonać po 1 godzinie wobec próby ślepej odczynnikowej.

W razie zmętnienia badanego roztworu po dodaniu buforu octanowego należy zamiast niego dodać 10 cm³ 10-procentowego roztworu cytrynianu sodowego i dalej postępować jak wyżej. Pomiar absorbancji wykonać nie wcześniej niż po 3 godzinach.

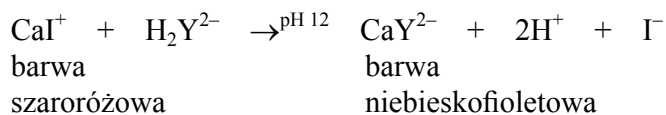
Zawartość żelaza odczytać z krzywej standardowej, a następnie, uwzględniając odpowiednie rozcieńczenia, podać w miligramach na 100 g badanego produktu.

Oznaczenie zawartości wapnia metodą kompleksometryczną**ZASADA METODY**

Oznaczenie polega na miareczkowaniu wapnia w zmineralizowanej próbce produktu roztworem wersenianu dwusodowego (solą sodową kwasu etylenodwuaminoczeroctowego) w obecności wskaźnika mieszaniny – mureksydu i zieleni naftolowej, którego barwa zmienia się od szaroróżowej do niebieskofioletowej.

Działanie wskaźnika polega na tworzeniu w obecności NaOH barwnego kompleksu mureksydu z wapniem (Ca⁺). Miareczkowanie tego kompleksu wer-

senianem (H_2Y^{2-}) daje w punkcie równoważnikowym zmianę barwy związaną z „wyparciem” mureksydu (Γ) z kompleksu z wapniem i z utworzeniem kompleksu wersenianu z wapniem (CaY^{2-}):



Zieleń naftolowa dodana do wskaźnika ułatwia uchwycenie zmian barwy.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do kolby stożkowej o pojemności 100 cm^3 pobrać taką ilość roztworu podstawowego zmineralizowanej próbki produktu, aby zawierała $40\text{--}200 \mu\text{g}$ wapnia, po czym dodać do 10 cm^3 wody dejonizowanej. Całość alkalizować $1,6 \text{ cm}^3$ roztworu NaOH o stężeniu $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Próbkę miareczkować wobec 50 mg dodanego wskaźnika mianowanym roztworem wersenianu sodowego o stężeniu $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jeden cm^3 wersenianu sodowego o stężeniu $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ odpowiada $0,04008 \text{ mg}$ jonów wapnia.

Zawartość wapnia w badanych produktach wyrazić w gramach na 100 g produktu, uwzględniając rozcieńczenia.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

Kwas solny stężony ($d = 1,19 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

Standardowy roztwór żelaza – odważyć $0,7023 \text{ g}$ soli Mohra $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ i utlenić żelazo, dodając 5 cm^3 3-procentowego roztworu nadtlenu wodoru; nadmiar nadtlenu wodoru rozłożyć przez ogrzewanie na łaźni wodnej; po ochłodzeniu całość dopełnić wodą dejonizowaną do 1000 cm^3 (1 cm^3 roztworu zawiera $100 \mu\text{g}$ Fe)

H_2O_2 , roztwór wodny 3-procentowy

Chlorowodorek hydroksyloaminy, roztwór wodny 10-procentowy (przechowywać w butelce z ciemnego szkła w temp. 5°C)

Octanowy roztwór buforowy – $41,5 \text{ g}$ bezwodnego octanu sodowego cz.d.a. wysuszonego w temperaturze 100°C rozpuścić w 500 cm^3 wody dejonizowanej

Orto-fenantrolina, roztwór wodny 0,1-procentowy (przechowywać w butelce z ciemnego szkła w temp. 5°C)

NaOH, roztwór wodny $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Wersenian sodowy, roztwór wodny $0,001 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$

Wskaźnik – $0,20 \text{ g}$ mureksydu i $0,50 \text{ g}$ zieleni naftolowej utrzeć z 50 g NaCl

Sprzęt i aparatura:

Palnik Bunsena

Eksykator

Spektrokolorometr lub spektrofotometr, długość fali 510 nm

Piśmiennictwo

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.

NOGALA-KAŁUCKAM. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.

Official Methods of Analysis of the AOAC Wyd. XX. Association of Official Analytical Chemists, Rockville MD 1990.

SZCZEPANIAK W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.

Ćwiczenie 9

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI MAGNEZU I MIEDZI W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Agata Wawrzyniak

Wprowadzenie

Magnez

Magnez jest najważniejszym, obok potasu, kationem wewnątrzkomórkowym, aktywującym około 300 enzymów, jest pierwiastkiem należącym do grupy makroelementów.

Przeciętna absorpcja magnezu z diety wynosi 30–40%. Głównym źródłem tego składnika są produkty roślinne (zbożowe oraz ziemniaki).

Zawartość magnezu w wybranych produktach spożywczych, w $\text{mg}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ części jadalnych

[Kunachowicz i in. 2017]:

■ otręby pszenne	– 490
■ kakao 16%, proszek	– 420
■ migdały	– 270
■ kasza gryczana	– 218
■ nasiona roślin strączkowych (groch, fasola)	– 125–170
■ orzechy	– 90–180
■ czekolady	– 54–165
■ produkty zbożowe (zależnie od wymiału)	– 10–100
■ mięso i przetwory mięsne	– 10–36
■ ryby i przetwory rybne	– 12–45
■ jajo kurze całe	– 12
■ mleko i przetwory mleczne	– 8–30
■ warzywa świeże	– 10–50
■ owoce świeże	– 2–40

Przyswajalność magnezu ogranicza duża zawartość tłuszczu w diecie (tworzenie się mydeł magnezowych) oraz obecność celulozy, hemicelulozy, fitynianów, tanin, szczawianów, jak też zwiększone ilości wapnia i fosforu. Obecność

białka i laktozy przyczynia się do wzrostu wykorzystania tego pierwiastka ze spożywanej diety. Witamina D odgrywa natomiast znacznie mniejszą rolę we wchłanianiu magnezu niż w przypadku wapnia.

Wśród metod oznaczania magnezu zastosowanie znalazły metody: wagowa, kompleksometryczna, kolorymetryczna, fotometrii płomieniowej i atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej (ASA).

Metoda wagowa, jako wyjątkowo pracochłonna, jest obecnie rzadko stosowana.

Wadą **metody kompleksometrycznej** jest konieczność usuwania substancji interferujących (głównie anionów fosforanowych i kationów wapnia) oraz zachowanie odpowiedniego stężenia jonów wodorowych, a także słabo widoczna i powolna zmiana barwy w punkcie równoważnikowym pomimo stosowania różnych wskaźników, takich jak mureksyd czy czerń eriochromowa.

Metody kolorymetryczne oznaczania magnezu należą do metod mało specyficznych i wymagają wybiórczego oddzielenia magnezu od innych pierwiastków. W tym celu stosuje się usuwanie fosforanów na jonitach, związki chelatujące magnez czy roztwory kompensacyjne zawierające interferujące jony. Metody te stosowane są z uwagi na różne wyposażenie aparaturowe laboratoriów i brak konieczności posiadania kosztownej aparatury badawczej.

Zastosowanie **metody fotometrii płomieniowej** do oznaczeń omawianego pierwiastka wymaga pozbawienia badanego roztworu jonów interferujących, a szczególnie fosforanów poprzez dodanie roztworu kompleksującego lub usunięcie wyżej wymienionych związków na jonitach.

Metoda atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej znajduje współcześnie coraz szersze zastosowanie z uwagi na dużą czułość, szybkość i prostotę oznaczenia oraz powtarzalność wyników. Czynnikiem ograniczającym zasięg stosowania tej metody jest konieczność posiadania specjalnej aparatury. Interferencja anionów fosforanowych, kationów wapniowych czy szczawianów usuwana jest poprzez zastosowanie soli strontu czy lantanu.

Miedź

Miedź zaliczana jest do pierwiastków z grupy mikroelementów. Podobnie jak w przypadku magnezu, głównym źródłem miedzi w naszej diecie są produkty roślinne (zbożowe i ziemniaki).

Zawartość miedzi w wybranych produktach spożywczych, w $\text{mg}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ części jadalnych

[Kunachowicz i in. 2017]:

- orzechy laskowe – 1,29
- nasiona roślin strączkowych (suche) – 0,48–1,20

■ podroby	– 0,35–1,00
■ otręby pszenne, zarodki pszenne	– 0,95
■ czekolady	– 0,50–0,60
■ produkty zbożowe	– 0,06–0,40
■ jajo kurze całe	– 0,06
■ mięso i przetwory mięsne, ryby	– 0,02–0,25
■ mleko, przetwory mleczne	– 0,01–0,07
■ warzywa i owoce świeże	– 0,01–0,19

Wykorzystanie miedzi z przeciętnej diety kształtuje się u ludzi zdrowych na poziomie 50% i zależy między innymi od składu diety oraz postaci chemicznej, w jakiej miedź występuje.

Wchłanianie miedzi z dietą obniża zwiększona podaż żelaza lub cynku, gdyż pierwiastki te współzawodniczą o miejsca absorpcji. Fruktaza i kwas askorbiny, z uwagi na właściwości redukujące, mogą powodować przekształcenie miedzi w postać trudniej absorbowanego jonu miedziawego. Przystawianie miedzi obniża się także w obecności zwiększonej ilości siarczków, molibdenu, kadmu oraz fitynianów. Z kolei miedź w połączeniu z niskocząsteczkowymi związkami organicznymi, na przykład z niektórymi aminokwasami, jest lepiej absorbowana niż w formie siarczynu miedzi.

Do oznaczania miedzi zaleca się metody: kolorymetryczne, polarograficzną i atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej (ASA).

Do najczęściej stosowanych **metod kolorymetrycznych** należą metody dwutiokarbaminianowa i ditizonowa, charakteryzujące się dużą czułością i selektywnością oznaczenia. Metody te wymagają jednakże wykonania czynności wstępnych związanych z oddzieleniem miedzi od pozostałych pierwiastków obecnych w badanym roztworze.

Metoda polarograficzna, rejestrująca falę polarograficzną miedzi w roztworze zmineralizowanej próbki, wymaga zastosowania odpowiedniego elektrolitu podstawowego. Najczęściej stosowane są rodanek potasowy, chlorek amonowy, bufor octanowy oraz kwaśny ftalan potasowy. Zastosowanie roztworu ftalanu potasowego pozwala na równoczesne oznaczenie w badanej próbce oprócz miedzi również cynku, po usunięciu żelaza z roztworu poprzez użycie ditizonu jako środka kompleksotwórczego.

Do metod znacznie szybszych i nowocześniejszych należy **metoda atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej**, która umożliwia bezpośredni pomiar miedzi w roztworze zmineralizowanej próbki ze względu na nieistotny wpływ takich pierwiastków, jak: sód, potas, wapń czy magnez.

Wybór metody oznaczenia miedzi w produktach spożywczych uzależniony jest od wyposażenia danego laboratorium.

Wykonanie ćwiczenia

W ramach ćwiczenia studenci zapoznają się z metodami kolorymetrycznymi, to jest z metodą z żółcieniem tiazolową wykorzystywaną do oznaczenia magnezu oraz metodą ditiokarbaminianową stosowaną do oznaczenia miedzi.

Analizę przeprowadza się w roztworze popiołu uzyskanego ze spopielenia próbek produktów spożywczych w temperaturze nieprzekraczającej 500°C (mineralizacji „na sucho”) lub w roztworze uzyskanym z bezpośredniego utlenienia substancji organicznych mocnymi kwasami mineralnymi w kolbach Kjeldahla (mineralizacji „na mokro”).

Przygotowanie próbki popiołu do oznaczeń magnezu i miedzi

W celu przygotowania zmineralizowanej próbki produktu do oznaczenia w niej zawartości składników mineralnych należy otrzymany popiół całkowity (ćwiczenie 7) rozpuścić w 5 cm³ mieszaniny stężonego kwasu solnego i kwasu azotowego, całość odparować nad płomieniem palnika pod wyciągiem do sucha, a następnie ponownie rozpuścić w 5 cm³ mieszaniny stężonych kwasów i odparować do połowy objętości. Zawartość tygla przenieść ilościowo do kolby miarowej na 100 cm³ i uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną, uzyskując roztwór podstawowy.

Oznaczenie zawartości magnezu metodą kolorymetryczną z żółcieniem tiazolową

ZASADA METODY

Wykonanie pomiaru absorbancji barwnego związku powstałego na skutek reakcji wodorotlenku magnezu z żółcieniem tiazolową. Intensywność powstałego zabarwienia mierzy się przy długości fali świetlnej 540 nm.

Trwałość i intensywność połączenia zależne są od sposobu alkalizowania próby, obecności innych jonów w roztworze, temperatury roztworu i czasu pomiaru. W celu zwiększenia trwałości zabarwienia dodaje się hydroksyloaminę, a stosowana skrobia jako koloid ochronny zapobiega zmętnieniu roztworu wskutek koagulacji wodorotlenku magnezowego. W celu wyeliminowania interferencji jonów obecnych w badanej próbce używa się roztworu kompensacyjnego składającego się z roztworu soli: chlorku wapnia, siarczanu glinu, siarczanu magnezu, fosforanu potasu.

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie krzywej standardowej (wzorcowej)

Do kolb miarowych o pojemności 50 cm³ odmierzyć kolejno: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 cm³ roztworu roboczego magnezu, zawierającego w 1 cm³ 25 µg pierwiastka (co odpowiada ilości 25–125 µg Mg w poszczególnych kolbach). Do każdej z kolb dodać kolejno: 1 cm³ 5-procentowego roztworu hydroksyloaminy, 5 cm³ mieszaniny 2-procentowego roztworu skrobi i roztworu kompensacyjnego przygotowanej w stosunku objętościowym (v/v) 1 : 1, 1 cm³ 0,1-procentowego roztworu żółcieni tiazolowej, 5 cm³ roztworu wodorotlenku sodowego o stężeniu 2,5 mol·dm⁻³. Całość uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski, wymieszać. Po 20 minutach zmierzyć absorbancję przy długości fali 540 nm wobec próby ślepej odczynnikowej, zawierającej wodę dejonizowaną zamiast standardu. Wykreślić krzywą standardową.

Oznaczenie zawartości magnezu w badanej próbce

Z roztworu podstawowego zmineralizowanej próbki produktu odmierzyć do kolby miarowej o pojemności 50 cm³ objętość roztworu zawierającą około 75 µg magnezu (zakres odczytu z krzywej standardowej 0–125 µg Mg na 50 cm³). Dalej postępować jak przy sporządzaniu krzywej standardowej, dodając kolejno wymienione ilości odczynników. Po upływie 20 minut wykonać pomiar absorbancji w odniesieniu do równolegle przygotowanej próby ślepej odczynnikowej.

Zawartość magnezu odczytać z krzywej standardowej, a następnie, uwzględniając odpowiednie rozcieńczenia, podać w miligramach na 100 g badanego produktu.

Oznaczenie zawartości miedzi metodą kolorymetryczną ditiokarbaminianową

ZASADA METODY

Wykonanie pomiaru absorbancji barwnego połączenia miedzi z dietyloditiokarbaminianem sodu (Na-DDTK) przy pH 8,5 w obecności soli dwusodowej kwasu wersenianowego (EDTA-Na) jako substancji chelatującej, po uprzedniej ekstrakcji kompleksu karbaminianowego czterochlorkiem węgla. Intensywność powstałego zabarwienia zmierzyć przy długości fali świetlnej 435 nm.

W celu usunięcia wpływu pierwiastków przeszkadzających w oznaczeniu, tworzących barwne kompleksy karbaminianowe (żelazo, mangan, cynk), stosuje się jako środek maskujący wersenian sodowy, który w środowisku winianowym lub cytrynianowym przy pH 8–9 tworzy z tymi pierwiastkami bezbarwne połączenia.

WYKONANIE OZNACZENIA**Przygotowanie krzywej standardowej (wzorcowej)**

Do rozdzielaczy o pojemności 100 cm³ odmierzyć: 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 5,0 cm³ roztworu roboczego standardu miedzi (co odpowiada ilości 0,20–50 µg Cu w poszczególnych kolbach) i dopełnić do 25 cm³ roztworem kwasu siarkowego o stężeniu 1 mol·dm⁻³. Do każdego rozdzielacza dodać: 10 cm³ roztworu cytrynianowo-wersenianowego i 2 krople 0,1-procentowego roztworu błękitu tymolowego, a następnie kroplami dodawać roztwór wodorotlenku amonowego o stężeniu 6 mol·dm⁻³ do zmiany zabarwienia na zielone lub niebieskozielone. Całość ochłodzić i dodać 1 cm³ 1-procentowego roztworu dietyloditiokarbaminianu sodowego i 15 cm³ czterochlorku węgla, po czym wytrząsać energicznie przez 2 minuty, pozostawiając do rozdzielenia się warstw. Przesączyć warstwę czterochlorkową przez zwitek waty do próbówki i zmierzyć absorbancję przy długości fali 435 nm w odniesieniu do próby ślepej odczynnikowej, zawierającej wodę dejonizowaną zamiast standardu. Wykreślić krzywą standardową.

Oznaczenie zawartości miedzi w badanej próbce

Z roztworu podstawowego zmineralizowanej próbki produktu odmierzyć do rozdzielacza o pojemności 100 cm³ objętość roztworu zawierającą około 25 µg miedzi (zakres odczytu z krzywej standardowej 0–50 µg Cu) i uzupełnić do 25 cm³ roztworem kwasu siarkowego o stężeniu 1 mol·dm⁻³. Następnie dodać 10 cm³ roztworu cytrynianowo-wersenianowego i postępować dalej jak przy sporządzaniu krzywej standardowej, dodając kolejno wymienione ilości odczynników. Pomiar absorbancji wykonać w odniesieniu do przygotowanej równolegle próby ślepej odczynnikowej.

Zawartość miedzi odczytać z krzywej standardowej, a następnie, uwzględniając odpowiednie rozcieńczenia, podać w miligramach na 100 g badanego produktu.

Wyposażenie laboratoryjne**Odczynniki:**

Kwas solny stężony ($d = 1,19 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

Kwas azotowy stężony ($d = 1,14 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)

Standardowe roztwory magnezu:

A – roztwór podstawowy – 0,250 g metalicznego magnezu rozpuścić w 10 cm³ kwasu solnego o gęstości $d = 1,19 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$; całość dopełnić wodą dejonizowaną do objętości 250 cm³ (1 cm³ roztworu zawiera 1 mg Mg)

B – roztwór roboczy – 25 cm³ roztworu podstawowego rozcieńczyć wodą dejonizowaną w kolbie miarowej do objętości 1000 cm³ (1 cm³ roztworu zawiera 25 µg Mg)

Hydroksyloamina, roztwór wodny 5-procentowy

Skrobia, roztwór wodny skleikowany 2-procentowy

Roztwór kompensacyjny – rozpuścić 5,51 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,74 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$; 0,418 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0,97 g K_3PO_4 w 1000 cm^3 wody dejonizowanej z dodatkiem 10 cm^3 stężonego kwasu solnego ($d = 1,19 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

Mieszanina roztworu skrobi i roztworu kompensacyjnego – zmieszać po 250 cm^3 obydwu odczynników

Żółcień tiazolowa (tytanowa), roztwór wodny 0,1-procentowy (trwałość roztworu około 1 tygodnia)

NaOH, roztwór wodny 2,5 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Standardowe roztwory miedzi:

A – roztwór podstawowy – 0,3928 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 cm^3 , dodać 4 cm^3 10-procentowego kwasu siarkowego i dopełnić wodą dejonizowaną do kreski (1 cm^3 roztworu zawiera 1 mg Cu)

B – roztwór roboczy – 5 cm^3 roztworu podstawowego rozcieńczyć wodą dejonizowaną w kolbie miarowej do objętości 50 cm^3 (roztwór pośredni); następnie 5 cm^3 roztworu pośredniego rozcieńczyć roztworem kwasu siarkowego o stężeniu 1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ w kolbie miarowej do objętości 50 cm^3 (1 cm^3 roztworu zawiera 10 μg Cu)

H_2SO_4 , roztwór wodny 1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$

Cytrynianowo-wersenianowy roztwór – rozpuścić 20 g dwuzasadowego cytrynianu amonowego i 5 g soli dwusodowej kwasu wersenianowego w wodzie dejonizowanej i uzupełnić wodą do objętości 100 cm^3 ; usunąć ślady miedzi, wytrąsając z 1 cm^3 roztworu Na-DDTK i 10 cm^3 czterochlorku węgla; ekstrakcję powtarzać do uzyskania po wytrząsaniu bezbarwnej fazy czterochlorku węgla

Błękit tymolowy, roztwór 0,1-procentowy – rozpuścić 0,1 g błękitu tymolowego w wodzie, dodać roztwór wodorotlenku sodowego o stężeniu 0,1 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, aż do zmiany zabarwienia na niebieskie, uzupełnić całość wodą dejonizowaną do 100 cm^3

Amonu wodorotlenek, roztwór wodny 6 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, oczyszczony od śladów miedzi (patrz cytrynianowo-wersenianowy roztwór)

Dietyloditiokarbaminian sodu (Na-DDTK), roztwór 1-procentowy przesączony przez zwitek oczyszczonej waty bawełnianej, przygotować każdorazowo do analiz roztwór świeży; watę bawełnianą oczyścić ze śladów metali przez trawienie jej w ciągu kilku godzin ciepłym kwasem solnym o stężeniu 0,2 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$; następnie odsączyć na leku Büchnera, przemywać wodą dejonizowaną do zaniku kwaśnej reakcji przesącza

Czterochlorek węgla, wolny od metali

Sprzęt i aparatura:

Spektrokolorymetr lub spektrofotometr, długość fali 435 oraz 540 nm

Palnik Bunsena

Eksykator

Piśmiennictwo

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2017.

Official Methods of Analysis of the AOAC. Wyd. XX. Association of Official Analytical Chemists, Rockville MD 1990.

SZCZEPANIAK W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.

Ćwiczenie 10

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CHLORKÓW W PRODUKTACH POMIDOROWYCH ORAZ SOKU Z KISZONEJ KAPUSTY I KISZONYCH OGÓRKÓW

Agata Wawrzyniak

Wprowadzenie

Chlor, główny anion przestrzeni pozakomórkowych jest pierwiastkiem należącym do grupy makroelementów, którego źródłem w naszej diecie jest przede wszystkim sól kuchenna, wędliny oraz sery podpuszczkowe.

Zawartość chlorków (w przeliczeniu na NaCl) w wybranych produktach spożywczych, w $\text{mg}\cdot(100 \text{ g})^{-1}$ części jadalnych [Kunachowicz i in. 2016]:

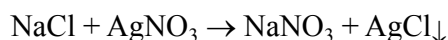
▪ ryby wędzone	– 3000
▪ sery podpuszczkowe	– 1650–3000
▪ ogórki kiszone	– 1500–3500
▪ wędliny, przetwory mięsne	– 1150–3100
▪ mleko w proszku	– 1250–1650
▪ kapusta kiszona	– 1200–2500
▪ pieczywo	– 1000–1200
▪ sok pomidorowy	– 600
▪ koncentraty pomidorowe	– 250–500
▪ mleko, napoje mleczne	– 115–250
▪ jajo kurze całe	– 250
▪ mięso, podroby, ryby świeże	– 30–300
▪ nasiona roślin strączkowych (suche)	– do 100
▪ warzywa świeże	– do 170
▪ owoce świeże	– do 35

Chlor spożywany z całodzienną racją pokarmową uczestniczy w regulacji gospodarki wodnej i równowagi kwasowo-zasadowej. Gospodarka chlorem w organizmie jest ściśle powiązana z jonem sodowym, którego spadkowi lub wzrostowi stężenia w osoczu towarzyszą takie same zmiany stężenia jonu chlorowego.

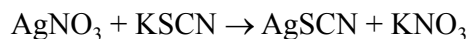
W produktach spożywczych sól występuje jako naturalny składnik lub jako dodatek do żywności dozowany podczas przemysłowego jej przetwarzania ze względu na poprawę cech organoleptycznych produktu, jak również na udowodnione właściwości konserwujące i funkcjonalne.

Chlor i chlorki w produktach spożywczych oznacza się metodami objętościowymi, do których należą metody Volharda i Mohra.

Metoda Volharda polega na dodaniu w nadmiarze azotanu srebra do zakwaszonego kwasem azotowym roztworu chlorków:



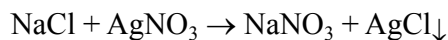
Nadmiar azotanu srebra odmiareczkowuje się rodankiem sodu lub potasu w obecności siarczanu żelazowo-amonowego jako wskaźnika:



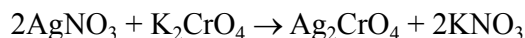
Nadmiar rodanku potasu reaguje z Fe(III), powodując w punkcie równoważnikowym powstawanie jasnoceglastego kompleksu.

Zaletą metody Volharda jest możliwość miareczkowania chlorków w środowisku kwaśnym.

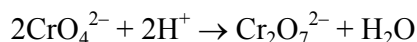
Metoda Mohra oparta jest na argentometrycznym miareczkowaniu chlorków w środowisku obojętnym azotanem srebra w obecności chromianu potasowego jako wskaźnika:



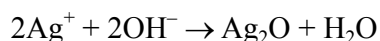
Po wytrąceniu się chlorku srebra nadmiar azotanu srebra reaguje z chromianem srebra, dając brunatnoczerwone zabarwienie:



Ważne jest, aby odczyn roztworu podczas przebiegu reakcji był odczynem obojętnym. W roztworze kwaśnym jony wodorowe reagują z jonami CrO_4^{2-} , w wyniku czego powstają jony HCrO_4^- i $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Powoduje to zmniejszenie stężenia jonów CrO_4^{2-} , a przy niższych pH może w ogóle nie powstawać osad dobrze rozpuszczalnego w środowisku kwaśnym Ag_2CrO_4 , co wpływa na błędny wynik analizy:



W roztworach silnie alkalicznych ($\text{pH} > 10,5$) następuje wytrącanie osadu Ag_2O wcześniej niż Ag_2CrO_4 :



Wykonanie ćwiczenia

W ramach ćwiczeń studenci zapoznają się z metodą Mohra oznaczania chlorków. Zawartość soli kuchennej w ocenianym produkcie spożywczym jest to zawartość chlorków, oznaczonych jako jon chlorkowy, które następnie zostają przeliczone i wyrażone jako chlorek sodu – NaCl.

Oznaczanie zawartości chlorków metodą Mohra

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na miareczkowaniu chlorków azotanem srebra w środowisku obojętnym w obecności chromianu potasu jako wskaźnika.

WYKONANIE OZNACZENIA

Do czystej, suchej zlewki o pojemności 150 cm³ odważyć 10 g badanego produktu z dokładnością 0,0001 g, po czym dodać około 40 cm³ wody dejonizowanej. Całość dokładnie wymieszać bagietką i pozostawić w spokoju na 5 minut. Następnie zawartość zlewki miareczkować NaOH o stężeniu 0,1 mol·dm⁻³, w obecności papierka lakmusowego jako wskaźnika, do zubożnienia. Zubożniony roztwór przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ i uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski. Po wymieszaniu roztwór przesączyć przez sączek bibułowy. Pierwszą frakcję przesącza odrzucić. Z uzyskanego przesącza odmierzyć pipetą 10 cm³ do kolby stożkowej, dodać 1 cm³ 5-procentowego roztworu chromianu potasu jako wskaźnika i miareczkować mianowanym roztworem azotanu srebra o stężeniu 0,1 mol·dm⁻³, do chwili osiągnięcia czerwono-pomarańczowego zabarwienia miareczkowanego płynu.

Na podstawie wyniku miareczkowania, uwzględniając stężenie zużytego do miareczkowania azotanu srebra i rozcieńczenie badanego soku w roztworze miareczkowanym, obliczyć procentową zawartość chlorku sodu w badanym produkcie.

Jeden cm³ 0,1-molowego roztworu AgNO₃ odpowiada 5,85 mg NaCl lub 3,55 mg Cl.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

NaOH, roztwór wodny 0,1 mol·dm⁻³

AgNO₃, mianowany roztwór wodny 0,1 mol·dm⁻³

K₂CrO₄, roztwór wodny 5-procentowy

Sprzęt i aparatura

Waga analityczna

Piśmiennictwo

KOCJAN R. (red.): Chemia analityczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2002.
KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2016.

Ćwiczenie 11

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WITAMINY A W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Jadwiga Hamulka

Wprowadzenie

Pojęcie witamina A rozumie się jako wszystkie związki wykazujące aktywność biologiczną retinolu (forma alkoholowa witaminy A), do których, oprócz retinolu, zalicza się: retinal, estry retinyłu (octowy i palmitynowy), kwas retinowy. Występują one wyłącznie w produktach pochodzenia zwierzęcego.

Zawartość witaminy A (retinolu) w wybranych produktach spożywczych, w $\mu\text{g}\cdot(100\text{ g})^{-1}$ części jadalnych [Kunachowicz i in. 2018]:

■ wątroba wołowa	– 14400
■ wątroba wieprzowa	– 13000
■ wątróbki drobiowe	– 9300
■ masło, margaryny	– 600–900
■ sery podpuszczkowe	– 210–500
■ sery twarogowe	– 5–80
■ jaja kurze całe	– 270
■ mleko w proszku pełne	– 200
■ śmietana	– 75–250
■ ryby i przetwory rybne	– 0–200
■ mleko krowie	– 15–40
■ jogurty, kefir	– 14–25

Zawartość witaminy A w produktach podaje się w następujących jednostkach: μg , mg lub ekwiwalentach retinolu, przy czym: 1 ekwiwalent retinolu = 1 μg retinolu. Dawniej wyrażano ją w jednostkach międzynarodowych (j.m.), przy czym:

1 j.m. = 0,3 μg retinolu

1 j.m. = 0,344 μg octanu retinyłu

1 j.m. = 0,535 μg palmitynianu retinyłu

Witamina A należy do związków labilnych, ulegających zniszczeniu pod wpływem tlenu, promieni słonecznych, obecności katalizatorów (np. śladów miedzi) w wysokiej temperaturze, ponadto jest łatwo utleniana przez nadtlarki kwasów tłuszczowych.

Do oznaczania witaminy A w żywności stosowane są metody chemiczne, wśród których najczęściej stosowane bywają metody:

- spektrofotometrii w zakresie nadfioletu,
- fluorymetryczne,
- kolorymetryczne (z trichlorkiem antymonu, kwasem trifluorooctowym lub trichlorooctowym),
- wysokosprawnej (wysokociśnieniowej) chromatografii cieczerwaj (HPLC).

Postępowanie analityczne podczas oznaczania witaminy A obejmuje następujące etapy:

- **Zmydlenie próbki** jest pierwszym procesem oznaczania. Proces ten ma na celu rozłożenie glicerydów do związków rozpuszczalnych w wodzie, to jest glicerolu i soli potasowych kwasów tłuszczowych (mydeł) oraz rozkład połączeń białkowo-witaminowych. Witamina A, karotenoidy i sterole zachowują swoje pierwotne właściwości fizykochemiczne, tworząc tak zwaną frakcję związków niezmydlających się, którą można następnie wyekstrahować rozpuszczalnikami organicznymi. Mimo że najkorzystniejsze jest zmydlenie próbki bezpośrednio wodorotlenkiem potasowym, to często zaleca się uprzednie wyekstrahowanie tłuszczu z suchego materiału (np. w aparacie Soxhleta), a następnie przeprowadzenie hydrolizy (zmydlenia). Do zmydlenia stosuje się przeważnie 50-procentowy roztwór wodorotlenku potasowego w ilości 0,5 cm³ KOH na 1 g próbki, a przy tłuszczach 1 cm³ na 1 g; do produktów mieszanych (np. racji pokarmowych) roztwór ługu powinien być bardziej stężony. Ilość dodawanego do zmydlenia alkoholu absolutnego powinna wynosić dwukrotnie więcej niż masa próbki, a przy tłuszczach kilkakrotnie więcej. Stosunek roztworu KOH do alkoholu w wielu analizach wynosi 1 : 10. Czas zmydlenia wynosi od 10 do 60 minut zależnie od charakteru badanego produktu.

Ze względu na właściwości witaminy A zmydlenie należy prowadzić w atmosferze azotu, często z zastosowaniem przeciwutleniaczy (hydrochinon, pirogallol itp.).

- **Ekstrakcję** witaminy A z frakcji niezmydlającej się można przeprowadzić za pomocą eteru naftowego lub heksanu.

Dalszy tok postępowania uzależniony jest od rodzaju wybranej metody.

Metody spektrofotometryczne polegają na pomiarze absorbancji *all-trans* alkoholowej postaci witaminy A w roztworze alkoholu izopropylenowego przy długości fali 325 nm. Absorbancja przy tej długości fali jest wprost proporcjonalna do stężenia witaminy A. Metody te odnoszą się jedynie do wolnej, alkoholowej postaci witaminy A w roztworze alkoholu izopropylenowego i nie mogą być stosowane do bezpośredniego oznaczania jej estrów (gdyż widmo absorpcji estrów witaminy A w nadfiolecie nie jest identyczne z widmem dla wolnej postaci alkoholowej witaminy A), chyba że po zastosowaniu procesu zmydlania. Maksimum absorpcji estrów witaminy A w alkoholu izopropylenowym znajduje się między 326 i 328 nm.

Metody spektrofotometryczne nie nadają się do oznaczania witaminy A w produktach spożywczych, lecz są bardzo przydatne między innymi do sprawdzenia czystości i zawartości witaminy A w roztworach standardowych oraz do preparatów farmaceutycznych i koncentratów.

Metody fluorymetryczne wykorzystują zjawisko emisji żółto-zielonej fluorescencji przez witaminę A pod wpływem wzbudzenia promieniowaniem UV (330–340 nm). Światło emitowane jest przy długości fali 480 nm. Metody te wymagają przygotowania krzywych standardowych dla retinolu w heksanie przy długości fali 480 nm i ustaleniu poprawki na fluorescencję fitofluenu. Przygotowanie próby wymaga uprzedniego zmydlenia i ekstrakcji. Metody te znajdują szczególne zastosowanie do oznaczeń witaminy A w mleku i produktach mlecznych, ponieważ nie zawierają one przeszkadzającego w oznaczeniu fitofluenu.

Metody kolorymetryczne wykorzystują reakcje barwne, jakie daje witamina A z takimi związkami, jak: trichlorek antymonu (reakcja Carra-Price'a) lub kwasy trichloro- i trifluorooctowy (kwasy Lewisa) w roztworach chloroformu, chlorku metylenu lub chlorku etylenu. Metodami kolorymetrycznymi oznacza się zarówno izomery *trans*, jak i *cis*.

Wśród metod kolorymetrycznych najbardziej rozpowszechniona jest reakcja Carra-Price'a z trichlorkiem antymonu.

Metoda wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) polega na zmydleniu próbki, ekstrahowaniu witaminy A eterem naftowym, a następnie oznaczeniu jej zawartości za pomocą HPLC w układzie faz odwróconych z detektorem UV/VIS. Możliwe jest również przeprowadzenie analizy z użyciem detektora fluorymetrycznego.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodą kolorymetryczną (reakcja Carra-Price'a) oraz metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) oznaczania witaminy A w produktach spożywczych.

Oznaczanie zawartości witaminy A metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem reakcji Carra-Price'a

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na pomiarze absorbancji powstałego barwnego zabarwienia, jaki daje witamina A z trichlorkiem antymonu (SbCl_3) przy długości fali 620 nm.

W metodzie tej występują pewne niedogodności, takie jak:

- krótkotrwałe zabarwienie, które zmusza do wykonania pomiaru w ciągu 5–10 sekund po dodaniu odczynnika;
- obecność substancji interferujących, które występują zwykle razem z witaminą A i powodują nietypowe zabarwienie z SbCl_3 lub hamowanie rozwoju barwy (głównie karotenoidy, sterole);
- obecność śladów wody i alkoholu, powodujących zmętnienie próby;
- właściwości korozyjne trichlorku antymonu.

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie krzywej standardowej (wzorcowej)

Odważyć 34,4 mg standardu octanu retinylu (z dokładnością 0,0001 g) i rozpuścić w 100 cm^3 chloroformu. Z tego pobrać 10 cm^3 i rozcieńczyć chloroformem do 100 cm^3 . Następnie pobrać kolejno: 2; 4; 6; 8 i 10 cm^3 do próbek miarowych o pojemności 10 cm^3 i uzupełnić do 10 cm^3 chloroformem. Z tych roztworów pobrać do kuwet po 0,1 cm^3 roztworu, co odpowiada: 0,6; 1,2; 1,8; 2,4; 3,0 μg retinolu. Następnie dodać 2–3 krople bezwodnika kwasu octowego oraz pipetą z szybkim wypływem 1 cm^3 25-procentowego chloroformowego roztworu trichlorku antymonu. Natychmiast (w ciągu 5–8 sekund) wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 620 nm w kolorymetrze wobec próby ślepej (chloroform z 2–3 kroplami bezwodnika kwasu octowego).

Wykreślić krzywą standardową.

Jako standard można stosować również inne stężone preparaty olejowe zawierające syntetyczny palmitynian retinylu lub retinol.

Oznaczenie zawartości witaminy A w badanej próbce

■ Zmydlanie próbki

Do kolbki stożkowej z korkiem na szlif o pojemności 100 cm³ naważyć około 1 g masła lub margaryny z dokładnością do 0,0001 g. Następnie dodać do próby 10 cm³ alkoholu absolutnego i 2 cm³ 50-procentowego roztworu wodorotlenku potasowego. Całość wymieszać i umieścić na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą powietrzną długości około 1 m. Doprowadzić azot przez otwór chłodnicy. Ogrzewać do wrzenia, aż do **całkowitego sklarowania** próby (ok. 30 min). Po zakończeniu procesu zmydlania próbkę schłodzić do temperatury otoczenia.

■ Ekstrakcja

Po zakończeniu zmydlania schłodzony hydrolizat badanej próby przenieść do rozdzielacza, popłukując kolbę wodą destylowaną w ilości 20 cm³ i dodać około 20 cm³ heksanu. Hydrolizat ekstrahować przez 2 minuty, **łagodnie wytrząsając próbę**, aby zapobiec powstaniu emulsji uniemożliwiającej rozdzielenie się warstw; należy przy tym, co pewien czas, otwierać korek rozdzielacza w celu wypuszczenia par heksanu. Po zaprzestaniu wytrząsania pozostawić próbkę w spokoju do chwili rozdzielenia się warstw – górnej heksanowej i dolnej wodnej. Następnie zlać warstwę wodną do drugiego rozdzielacza, a heksanową pozostawić w pierwszym. Ekstrakcję witaminy A z warstwy wodnej powtórzyć jeszcze dwukrotnie heksanem każdorazowo w ilości około 20 cm³, zbierając frakcje heksanowe w pierwszym rozdzielaczu. Połączone ekstrakty heksanowe przemywać w rozdzielaczu kilkakrotnie wodą destylowaną, aż do zaniku alkalicznego odczynu popłuczyn, co można sprawdzić, dodając do popłuczyn kilka kropli 1-procentowego roztworu fenoloftaleiny. Po całkowitym wypłukaniu wodorotlenku potasowego przesączyć ekstrakt heksanowy przez sączonek średniej twardości z nałożoną warstwą bezwodnego siarczanu sodu (około 0,5 cm grubości), do cylindra miarowego z korkiem na szlif o pojemności 100 cm³ (w celu osuszenia ekstraktu heksanowego ze śladów wody), popłukać sączonek heksanem i odczytać w cylindrze objętość otrzymanej frakcji heksanowej.

■ Określenie zawartości β-karotenu w próbce

Jeżeli uzyskany ekstrakt heksanowy ma barwę żółtą, należy przed oznaczeniem witaminy A określić w nim stężenie β-karotenu. W tym celu przenieść 10 cm³ ekstraktu do próbówki kolorymetrycznej i zmierzyć absorbancję roztworu przy długości fali 450 nm wobec heksanu. Otrzymaną wartość przeliczyć na zawartość β-karotenu w 100 g produktu, posługując się krzywą standardową i uwzględniając schemat rozcieńczeń.

- Pomiar zawartości witaminy A

Do kolbki stożkowej na szlif o pojemności 50 cm³ pobrać 1/4 uzyskanego ekstraktu heksanowego i odparować do sucha w atmosferze azotu na łaźni wodnej lub w wyparce próżniowej rotacyjnej. Suchą pozostałość rozpuścić **natychmiast** w 1 cm³ chloroformu (tak aby roztwór zawierał 1,5–4,5 µg retinolu w 1 cm³). Następnie pobrać 0,1 cm³ chloroformowego roztworu witaminy A do kuwety kolorymetrycznej, dodać 2–3 krople bezwodnika kwasu octowego oraz 1 cm³ 25-procentowego chloroformowego roztworu trichlorku antymonu i **natychmiast** zmierzyć absorbancję przy długości fali 620 nm wobec próby ślepej (chloroform i bezwodnik kwasu octowego).

Zawartość witaminy A odczytać z krzywej wzorcowej, a następnie po uwzględnieniu współczynnika rozcieńczeń podać w mikrogramach na 100 g produktu.

Oznaczanie zawartości witaminy A metodą wysokosprawnej chromatografii cieczonej (HPLC)

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na zmydleniu, a następnie wyekstrahowaniu mieszaniny heksanu witaminy A oraz oznaczeniu zawartości retinolu z użyciem HPLC w układzie faz odwróconych z detektorem UV/VIS.

Przygotowanie roztworu standardu

Odważyć 25 mg standardu *all-trans* retinolu i rozpuścić w 50 cm³ metanolu absolutnego. Roztwór podstawowy rozcieńczyć metanolem, tak aby zawartość retinolu w 1 cm³ wynosiła: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 µg. Z roztworów wzorcowych pobrać po 20 µl i nanieść na kolumnę chromatograficzną, a następnie dokonać pomiaru zawartości retinolu w temperaturze pokojowej przy długości fali 326 nm, stosując jako mieszaninę rozwijającą metanol zmieszany z wodą w stosunku objętościowym 95 : 5.

Wykreślić krzywą wzorcową w układzie pole powierzchni pików standardów a zawartość witaminy A.

WYKONANIE OZNACZENIA

- Zmydlenie

Do kolbki stożkowej na szlif o pojemności 100 cm³ odważyć 4 g margaryny z dokładnością do 0,0001 g, dodać 30 cm³ etanolu i 100 mg hydrochinonu. Wymieszać, a następnie ustawić na wrzącej łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Ogrzewać przez 10 minut pod azotem, po czym przez chłodnicę włąć

3 cm³ 50-procentowego roztworu KOH. Prowadzić zmydlenie przez 30 minut. Po zmydleniu próbkę schłodzić pod strumieniem wody i przenieść do rozdzielacza o pojemności 250 cm³, popłukując kolbę wodą destylowaną.

■ **Ekstrakcja**

Zmydlony hydrolizat ekstrahować trzykrotnie 20–30 cm³ heksanu. Połączone ekstrakty heksanowe przemywać wodą destylowaną do zaniku reakcji alkalicznej z fenoloftaleiną. Ekstrakt heksanowy przesączyć przez sączonej twardości z nałożoną warstwą bezwodnego siarczanu sodu około 0,5 cm grubości. Heksan odparować do sucha w atmosferze azotu na łaźni wodnej lub w wyparce próżniowej, a suchą pozostałość rozpuścić w takiej ilości metanolu, aby roztwór zawierał 5–10 µg retinolu w 1 cm³.

■ **Wykonanie oznaczenia**

Po odpowietrzeniu mieszaniny rozwijającej i ustabilizowaniu się jej przepływu na kolumnę nanieść 20 µl roztworu badanej próbki. Jako mieszaninę rozwijającą stosować roztwór metanolu i wody zmieszanych w stosunku objętościowym 95 : 5.

Pomiaru zawartości retinolu dokonać przy długości fali 326 nm.

Analizę ilościową przeprowadzić na podstawie porównania otrzymanego pola powierzchni pików do krzywej wzorcowej, uwzględniając współczynnik rozcieńczeń.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

Alkohol etylowy 99,8%

KOH, roztwór 50-procentowy

Heksan

Metanol spektralnie czysty

Hydrochinon

Eluent – 95% metanolu i 5% wody

Azot sprężony

Chloroform

Fenoloftaleina, roztwór 1-procentowy w alkoholu etylowym

Siarczan sodu bezwodny (Na₂SO₄)

Bezwodnik kwasu octowego cz.d.a.

Trichlorek antymonu – 25-procentowy roztwór w chloroformie osuszonym nad bezwodnym siarczanem sodu

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Łaźnia wodna

Spektrokolorymetr lub spektrofotometr, długość fali 620 nm.

Aparat HPLC

Piśmiennictwo

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.

SZCZEPANIAK W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.

WITKIEWICZ Z.: Podstawy chromatografii. Wydawnictwo Naukowe WNT, Warszawa 2005.

Ćwiczenie 12

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KAROTENOIDÓW O AKTYWNOŚCI WITAMINY A W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Jadwiga Hamulka

Wprowadzenie

Karotenoidy o właściwościach witaminy A są nazwą opisową dla wszystkich karotenoidów wykazujących aktywność biologiczną β -karotenu.

Obecnie znanych jest ponad 500 naturalnych barwników karotenoidowych, przy czym tylko kilkadziesiąt z nich (około 50) ma aktywność biologiczną. Są to karotenoidy, które w swej cząsteczce zawierają przynajmniej jeden pierścień β -jononu. Przy czym najaktywniejszy spośród nich jest β -karoten.

Karotenoidy są związkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślin. Źródłem karotenoidów dla naszego organizmu są żółte, pomarańczowe i czerwone warzywa oraz owoce, jak też zielone liście warzyw. Zwierzęta nie mają zdolności syntetyzowania karotenoidów, ale mogą wchłaniać i gromadzić barwniki dostarczane z paszą. Stąd też niektóre produkty pochodzenia zwierzęcego, na przykład: mleko, masło, jaja, zawierają niewielkie ilości karotenoidów.

β -karoten składa się z dwu pierścieni β -jononu połączonych łańcuchem polienowym, a pozostałe karotenoidy – tylko z jednego, stąd też wykazują one połowę aktywności biologicznej β -karotenu.

W organizmie człowieka β -karoten zostaje przekształcony w witaminę A. Teoretycznie z jednej cząsteczki β -karotenu mogą powstać dwie cząsteczki retinolu. Praktycznie proces ten przebiega ze znacznie mniejszą wydajnością. Ponadto mała przyswajalność karotenoidów z produktów roślinnych powoduje, że przyjmuje się, iż β -karoten wykorzystywany jest jako witamina A w 1/12 ilości spożytej, a pozostałe karotenoidy – w 1/24.

Zawartość β -karotenu w wybranych produktach spożywczych, w $\mu\text{g}\cdot(100\text{ g})^{-1}$ części jadalnych [Kunachowicz i in. 2018]:

- marchew – 9900
- warzywa o dużej zawartości β -karotenu – 2000–5500
(koperek, dynia, papryka czerwona, szczypiorek, szczaw, szpinak, boćwina, jarmuż, natka pietruszki)

- warzywa o średniej zawartości β -karotenu – 600–1500
(szparagi, pomidor, kapusta pekińska, por, brokuły, sałata, cykoria)
- owoce o średniej zawartości β -karotenu – 600–2300
(brzoskwinia, papaja, morela, mango)
- sery podpuszczkowe – 100–400
- jaja kurze całe – 270
- mleko w proszku pełne – 200
- śmietana – 50–190
- sery twarogowe – 3–60
- mleko krowie, jogurty, kefiry – 10–25

Barwniki karotenoidowe można podzielić na dwie główne grupy:

- **karoteny** – węglowodory karotenoidowe o ogólnym wzorze $C_{40}H_{56}$, do których zalicza się między innymi α -, β - i γ -karoteny oraz likopen;
- **ksantofile** – hydroksylowe pochodne karotenów, między innymi β -kryptokszantyna, luteina i zeaksantyna.

Wspólną cechą budowy wszystkich karotenoidów jest łańcuch alifatyczny z grupami metylowymi i układem sprzężonych wiązań podwójnych. Końcowe grupy łańcucha alifatycznego są zróżnicowane. Układ sprzężonych wiązań podwójnych jest odpowiedzialny za intensywność zabarwienia tych związków (od żółtego do czerwonego), a grupy końcowe – za ich aktywność biologiczną, właściwości adsorpcyjne oraz rozpuszczalność. Dwie ostatnie właściwości stanowią podstawę rozdziału tych związków.

Karotenoidy występujące w produktach spożywczych wykazują następujące właściwości fizykochemiczne, które należy uwzględnić podczas ich oznaczania:

- są rozpuszczalne w tłuszczach;
- są łatwo rozpuszczalne w eterze naftowym, eterze etylowym, chloroformie, benzenie, heksanie, a trudno rozpuszczalne w alkoholu (zwłaszcza karoteny);
- są wrażliwe na utlenianie, autooksydację i światło;
- są odporne na działanie podwyższonej temperatury w atmosferze beztlenowej z wyjątkiem zmian stereoizomerycznych;
- mają charakterystyczne widmo absorpcji z różnym maksimum, zależnie od stosowanego rozpuszczalnika organicznego.

Zawartość β -karotenu w produktach spożywczych podaje się w następujących jednostkach: μg , mg , oraz ekwiwalentach retinolu, przy czym:

1 równoważnik retinolu = 12 μg β -karotenu (pochodzących z produktów naturalnych diety)

1 równoważnik retinolu = 24 μg α -karotenu i (lub) β -kryptoksantyny (pochodzących z produktów naturalnych diety)

Oznaczanie zawartości karotenoidów w surowcach i produktach spożywczych, jako związków barwnych, przeprowadza się metodami spektrofotometrycznymi po rozdziale metodą adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej. Postępowanie analityczne obejmuje następujące etapy:

- **ekstrakcję oznaczanych karotenoidów (ewentualne zmydlenie próby)** – podstawową czynnością w analizie karotenoidów jest ich ekstrakcja z badanego materiału. Do ekstrakcji stosuje się zwykle eter naftowy, heksan, chloroform. Na ogół należy unikać stosowania podwyższonej temperatury w oznaczaniu karotenoidów. Jednakże istnieją produkty, na przykład o dużej zawartości tłuszczu, produkty mleczne, mieszane (roślinno-zwierzęce), dla których konieczne jest zmydlenie na gorąco. Ekstrakcja na gorąco wpływa na rozpad tkanki i na zmydlenie tłuszczów, ułatwiając w ten sposób całkowite pozyskanie barwnika.
- **rozdział na kolumnie chromatograficznej** – najczęściej stosowaną metodą rozdzielania różnych karotenoidów jest chromatografia kolumnowa. Różnice w budowie poszczególnych barwników pozwalają na rozwinięcie na kolumnie wyraźnych sfer adsorpcji z zastosowaniem odpowiedniego adsorbentu i mieszanin eluujących. Z różnych stosowanych adsorbentów do rozdziału karotenoidów najlepszy jest tlenek magnezu i celit, zmieszane w stosunku 1 : 3, z zastosowaniem do wymywania eteru naftowego z 2–5-procentowym dodatkiem acetonu. Pozwala to na dobre oddzielenie karotenów od ksantofili i chlorofilu. Do produktów pochodzenia zwierzęcego oraz mieszanych, zawierających oprócz karotenoidów także witaminę A, zaleca się stosowanie tlenku glinu, a do eluowania, oprócz eteru naftowego z 2–5-procentowym dodatkiem acetonu, także heksan.
- **kolorymetryczne oznaczenie karotenoidów w eluentach heksanowych**, a następnie ich przeliczenie na zawartość w badanej próbce.

Inną metodą, pozwalającą na rozdział karotenoidów jest metoda wysoko-sprawnej (wysokociśnieniowej) chromatografii cieczowej (HPLC).

Wykonanie ćwiczenia

W ramach ćwiczenia studenci zapoznają się z kolorymetryczną metodą oznaczania karotenoidów w produktach spożywczych po rozdziale na kolumnie chromatograficznej.

Oznaczenie zawartości β -karotenu i sumy karotenoidów z zastosowaniem chromatografii kolumnowej

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na pomiarze, przy długości fali świetlnej 450 nm, absorbancji heksanowych roztworów β -karotenu i pozostałych karotenoidów wyizolowanych za pomocą adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej.

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie krzywej standardowej (wzorcowej)

Odważyć 50,0 mg krystalicznego standardu β -karotenu z dokładnością 0,0001 g i rozpuścić w 500 cm³ heksanu. Z tego pobrać 10 cm³ i rozcieńczyć heksanem do 250 cm³. Następnie pobrać kolejno: 1; 2; 4; 6; 8 cm³ roztworu do próbek miarowych o pojemności 10 cm³ i uzupełnić do 10 cm³ heksanem. Z tych roztworów pobrać do kuwet po 1 cm³ roztworu heksanowego (co odpowiada: 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 i 3,2 μ g β -karotenu) i dokonać pomiaru absorbancji przy długości fali 450 nm wobec próby ślepej – heksanu.

Wykreślić krzywą standardową.

Oznaczenie zawartości β -karotenu i sumy karotenoidów w badanej próbce

■ Ekstrakcja

Na szkiełku zegarkowym odważyć 1–2 g (z dokładnością do 0,0001 g) dokładnie wymieszanej próbki i przenieść do moździerza. Dodać około 10 g bezwodnego siarczanu sodu. Zawartość moździerza ucierać do uzyskania jednorodnej, **suchej** masy, po czym całość przenieść ilościowo do kolbki stożkowej na szlif o pojemności 100 cm³. Do kolbki dodać 30 cm³ heksanu, kolbę zamknąć doszlifowanym korkiem i jej zawartość wytrząsać przez mniej więcej 5 minut w celu wyekstrahowania karotenoidów. Kontynuować ekstrakcję próby przez wymywanie kolejnymi porcjami heksanu (średnio po 20 cm³), aż do uzyskania bezbarwnego ekstraktu eterowego (4–5 razy). Zebrane ekstrakty heksanowe przesączyć przez sączek średniej twardości z nałożoną warstwą bezwodnego siarczanu sodu (około 0,5 cm grubości w celu osuszenia ekstraktu heksanowego ze śladów wody) do cylindra miarowego z korkiem na szlif o pojemności 100 cm³. Odczytać całkowitą objętość uzyskanego ekstraktu, połowę przenieść do kolbki stożkowej na szlif o pojemności 100 cm³ i odparować w atmosferze azotu

na łaźni wodnej lub w wyparce próżniowej rotacyjnej. Suchą pozostałość **natychmiast** rozpuścić w 2 cm³ heksanu i kolbkę zamknąć korkiem.

■ Przygotowanie kolumny chromatograficznej (rys. 8)

Kolumnę (lejek Allihna) umocować do statywu. Na dno wprowadzić zwitek waty, następnie bezwodny siarczan sodu (warstwa około 0,5 cm) oraz wsypać porcjami do wysokości 8–10 cm adsorbent – tlenek glinu zawierający 5% wody (nie ubijając mocno bagietką). Równomierne ułożenie adsorbentu w kolumnie warunkuje równe położenie i wymywanie pasm karotenoidów. Na wierzch adsorbentu nanieść 0,5-centymetrową warstwę bezwodnego siarczanu sodu. Kolumnę przemyć porcją dokładnie osuszonego z wody heksanu (20–30 cm³), uważając, aby **nie dopuścić do zapowietrzania kolumny**, co uniemożliwiłoby prawidłowy rozdział.

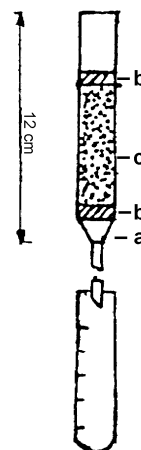
■ Rozdział na kolumnie chromatograficznej

Na wierzch kolumny, gdy część heksanu znajduje się jeszcze nad adsorbentem, nanieść ostrożnie po ściankach przygotowany uprzednio ekstrakt heksanowy (2 cm³) i poczekać do momentu jego wchłonięcia. Kolbę stożkową przepłukać małą porcją heksanu i również nanieść na kolumnę. Rozwijać chromatogram eluentem – heksanem z 3-procentowym dodatkiem acetonu. Obserwować przesuwanie się barwnych pasm ku dołowi. W chwili gdy silnie pomarańczowe pasmo β -karotenu osiągnie poziom waty, pod kolumnę postawić cylinder miarowy na szlif o pojemności 25 cm³ i kontynuować wymywanie do chwili zebrania całego pasma. Całość uzupełnić heksanem, tak aby stężenie β -karotenu w próbce wynosiło 0,5–3,0 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Zawartość cylindra wymieszać i przystąpić do pomiaru kolorymetrycznego.

■ Pomiar zawartości β -karotenu oraz sumy karotenoidów

Zmierzyć absorbancję roztworu heksanowego β -karotenu przy długości fali 450 nm wobec heksanu jako próby ślepej. Zawartość β -karotenu odczytać z krzywej wzorcowej. Uwzględniając współczynnik rozcieńczeń, podać zawartość β -karotenu w mikrogramach na 100 g badanego produktu.

Równocześnie zmierzyć absorbancję sumy karotenoidów (w drugiej połowie ekstraktu heksanowego) przy długości fali 450 nm wobec heksanu jako próby ślepej. Zawartość sumy karotenoidów odczytać z krzywej wzorcowej, a następnie, po uwzględnieniu współczynników rozcieńczeń, podać w mikrogramach na 100 g badanego produktu.



Rysunek 8. Kolumna chromatograficzna: a – wata, b – Na₂SO₄ bezwodny, c – adsorbent

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

Heksan

Azot sprężony

Siarczan sodu bezwodny (Na_2SO_4)

Adsorbent – tlenek glinu z 5-procentowym dodatkiem wody

Roztwór acetonu w eterze naftowym, 3-procentowy

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Łaźnia wodna

Butla z azotem z zaworem redukcyjnym

Spektrokolorymetr lub spektrofotometr, długość fali 451 nm

Lejek Allihna

Moździerz porcelanowy

Piśmiennictwo

- KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.
- KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.
- NOGALA-KAŁUCKAM. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.
- SZCZEPANIAK W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2008.
- WITKIEWICZ Z.: Podstawy chromatografii. Wydawnictwo Naukowe WNT, Warszawa 2005.

Ćwiczenie 13

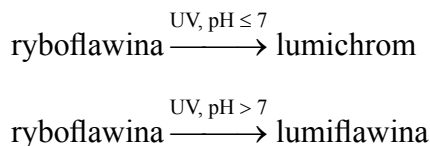
OZNACZANIE ZAWARTOŚCI RYBOFLAWINY W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Małgorzata Drywień

Wprowadzenie

Ryboflawina (witamina B₂, laktoflawina, owoflawina) należy do związków zwanych flawinami, jest rozpuszczalna w wodzie. W organizmie tworzy dwie formy koenzymatyczne – mononukleotyd flawinowy (FMN) i dwunukleotyd flawinoadeninowy (FAD).

Roztwory wodne ryboflawiny wykazują intensywną żółtozieloną fluorescencję, co zostało wykorzystane w metodach jej oznaczania. Najbardziej charakterystyczną cechą tej witaminy jest jej wrażliwość na światło:



Ryboflawina jest związkiem termostabilnym i wykazuje dużą odporność na działanie ciepła w procesie obróbki kulinarnej, jednak obserwuje się duże jej straty, spowodowane fotolabilnością. Działanie światła słonecznego powoduje znaczne zmniejszenie wartości witaminowej produktów spożywczych.

W produktach spożywczych ryboflawina występuje w formie wolnej lub związanej z kwasem fosforowym lub z kwasami fosforowym i adenyłowym, a z kolei obie te formy mogą być połączone ze specyficznymi białkami. Jej przyswajalność jest większa z produktów pochodzenia zwierzęcego, co najprawdopodobniej jest spowodowane trwałością kompleksów flawinowych w roślinach.

Zawartość ryboflawiny w wybranych produktach spożywczych, w mg·(100 g)⁻¹ części jadalnych [Kunachowicz i in. 2018]:

- mleko krowie 3,5% – 0,17
- mleko w proszku pełne – 1,35
- sery twarde – 0,35–0,42

■ jaja	– 0,542
■ mięso i przetwory mięsne	– 0,08–3,33
■ ryby i przetwory	– 0,04–0,33
■ przetwory zbożowe	– 0,02–0,18
■ warzywa świeże	– 0,03–0,29
■ rośliny strączkowe suche	– 0,19–2,4
■ owoce świeże	– 0,02–0,10

Do oznaczania ryboflawiny w żywności mogą być wykorzystywane następujące metody: lumiflawinowa, fluorymetryczna, HPLC i polarograficzna.

Metoda lumiflawinowa polega na przekształceniu ryboflawiny w lumiflawinę (7,8,10-trimetyloizaloksazynę) w środowisku alkalicznym pod działaniem światła (fotoliza), a następnie pomiarze jej niebieskiej fluorescencji.

Metoda fluorymetryczna oparta jest na pomiarze żółtozielonej fluorescencji ryboflawiny, uprzednio uwolnionej z połączeń białkowo-fosforanowych. Fluorescencja zależy zarówno od pH roztworu, jak i koncentracji witaminy. Maksymalna intensywność fluorescencji występuje w zakresie pH 6–7, ale mierzona jest w zakresie pH 3–5, kiedy jest stała i stosunkowo niezależna od wpływu substancji interferujących. Natężenie fluorescencji jest wprost proporcjonalne do stężenia witaminy w badanym roztworze. Oznaczenie przebiega w trzech etapach:

- ekstrakcja witaminy – ma na celu uwolnienie ryboflawiny z połączeń białkowych i fosforanowych poprzez zastosowanie hydrolizy kwasowej i enzymatycznej;
- utlenianie substancji interferujących – stosowane w celu usunięcia substancji wykazujących fluorescencję w zakresie zbliżonym do fluorescencji ryboflawiny, zakłócających pomiar;
- pomiar fluorymetryczny – dokonywany jest przed chemiczną redukcją ryboflawiny i po niej tak, aby z różnicy tych wartości określić faktyczne stężenie witaminy w roztworze.

W zależności od dostępnej aparatury odczytu fluorescencji można dokonywać z krzywej wzorcowej lub przy użyciu standardu wewnętrznego, to znaczy stosując dodatek czystej ryboflawiny, dodawanej w ściśle określonej ilości do próbki równoległej do badanej.

Metoda HPLC stanowi połączenie techniki fluorymetrycznej z chromatograficzną. Polega na wstępnym uwolnieniu ryboflawiny z połączeń białkowych i fosforanowych, a następnie ilościowym jej oznaczeniu z użyciem wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z detektorem fluorymetrycznym;

Metody polarograficzne są szczególnie przydatne do oznaczania ryboflawiny w obecności innych witamin, bez konieczności jej wyodrębniania i oczyszczania.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z fluorymetryczną metodą oznaczania zawartości ryboflawiny (witaminy B₂) w mleku i jaj w proszku, produktach zbożowych oraz strączkowych suchych.

Oznaczanie ryboflawiny metodą fluorymetryczną

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na uwolnieniu witaminy z połączeń białkowych oraz fosforanowych, utlenieniu substancji interferujących oraz na pomiarze żółtozielonej fluorescencji przy długości fali światła wzbudzającego 450 nm oraz długości fali pomiaru światła emitowanego 524 nm.

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie krzywej wzorcowej

- Przygotowanie próby standardowej do kalibracji fluorymetru
Do próbki pobrać 5 cm³ roboczego roztworu standardowego ryboflawiny (5 µg witaminy), dodać 5 cm³ 0,1 M HCl i 1 cm³ lodowatego kwasu octowego, wymieszać. Około 5 cm³ przygotowanego roztworu przenieść ilościowo do kufewki fluorymetrycznej i wykalibrować aparat na 100% fluorescencji, uwzględniając wartość fluorescencji dla próby ślepej, przygotowanej jak wcześniej bez roztworu ryboflawiny.
- Przygotowanie roztworów wzorcowych
Przygotować równolegle dwie serie prób.
Z roztworu roboczego ryboflawiny pobrać do probówek kolejno: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0 cm³, co odpowiada: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0 µg witaminy. Wartości wzorcowe wprowadzić do pamięci komputera. Każdą próbę dopełnić 0,1 M roztworem HCl do 10 cm³, następnie dodać po 1 cm³ lodowatego kwasu octowego, wymieszać. Mierzyć fluorescencję prób przy $\lambda_{\text{Ex}} = 450$ nm i $\lambda_{\text{Em}} = 524$ nm w aparacie wykalibrowanym wobec próby standardowej.

Oznaczanie zawartości ryboflawiny

- Ekstrakcja witaminy
Do kolby stożkowej o pojemności 250 cm³ naważyć z dokładnością do 0,01 g próbkę produktu zawierającą 15–50 µg ryboflawiny i dodać 75 cm³ 0,1 M roztworu HCl (uwolnienie ryboflawiny z połączeń białkowych). Całość zhomogenizować i umieścić we wrzącej łaźni wodnej na 30–60 minut. Po tym czasie próbkę schłodzić do temperatury 50°C i dodać 5 cm³ roztworu enzymu Taka-diastaza (uwolnienie ryboflawiny z połączeń fosforanowych). Zawartość

kolby dokładnie wymieszać i pozostawić próbkę w termostacie w temperaturze 45°C na 2 godziny. Po zakończeniu hydrolizy enzymatycznej schłodzić próbkę do temperatury otoczenia, po czym przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ i dopełnić wodą dejonizowaną do kreski. Dokładnie wymieszaną zawiesinę przesączyć przez karbowany sącdek o średniej szybkości sączenia do kolby stożkowej o pojemności 250 cm³, przy czym pierwszą frakcję przesączu odrzucić. Uzyskany ekstrakt jest materiałem do dalszych badań.

Utlanie substancji interferujących

Oznaczenie prowadzić dla dwóch próbek równolegle.

Do dwóch probówek oznaczonych odpowiednio B (próbka badana) i W (próbka wygaszona) odmierzyć pipetą po 10 cm³ uzyskanego wcześniej ekstraktu oraz dodać po 1 cm³ lodowatego kwasu octowego i dokładnie wymieszać. Następnie dodać po 0,5 cm³ 3-procentowego roztworu KMnO₄, całość wymieszać i **dokładnie po 2 minutach** wprowadzić po 0,5 cm³ 3-procentowego roztworu H₂O₂ w celu odbarwienia próbek. Wydzielający się tlen należy usunąć, wstrząsając energicznie zawartość probówek, aż do chwili, gdy przestanie się pienić.

Obecność pęcherzyków tlenu może w dużym stopniu zakłócić pomiar; może dochodzić do wytrącania się osadu MnO₂, powodującego zmętnienie, wówczas należy próbki odwirować lub przesączyć.

Do próbki W dodać około 0,02 g ditionianu sodu w celu wygaszenia fluorescencji ryboflawiny, wymieszać.

■ Pomiar fluorymetryczny

Do kuwet fluorymetrycznych, oznaczonych odpowiednio B i W przenieść po 5 cm³ badanych roztworów i mierzyć fluorescencję w aparacie wykalibrowanym na 100% wobec próby standardowej, przy długości fali wzbudzającej $\lambda_{\text{Ex}} = 450 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{Em}} = 524 \text{ nm}$.

Korzystając z wcześniej wbudowanej do pamięci komputera krzywej wzorcowej, odczytać uzyskane wartości fluorescencji w postaci mikrogramów ryboflawiny, uwzględniając współczynnik rozcieńczeń. Z różnicy wartości dla próbek B i W obliczyć rzeczywistą zawartość ryboflawiny w próbce badanej. Ostateczny wynik wyrazić w miligramach ryboflawiny na 100 g produktu.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki:

UWAGA: do przygotowania odczynników stosować wyłącznie wodę dejonizowaną!

HCl, 0,1 M roztwór wodny – odważkę analityczną zawierającą 0,1 mola HCl dodać powoli do H₂O i dopełnić do 1000 cm³

Podstawowy roztwór standardowy ryboflawiny ($100 \mu\text{g}$ na 1 cm^3) – z wysuszonej w suszarce przez 24 godziny ryboflawiny odważyć $0,01 \text{ g}$ witaminy, rozpuścić w $0,1 \text{ M HCl}$ i dopełnić do 100 cm^3 ; przechowywać w lodówce (trwałość 1 rok)

Roboczy roztwór ryboflawiny ($1 \mu\text{g}$ na 1 cm^3) – z podstawowego roztworu standardowego ryboflawiny pobrać 1 cm^3 do kolby miarowej na 100 cm^3 i dopełnić do kreski $0,1 \text{ M HCl}$;

$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, $2,5 \text{ M}$ roztwór wodny – 205 g bezwodnego octanu sodu rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1000 cm^3

Roztwór enzymu Takadiastaza (SIGMA A-6211) – bezpośrednio przed oznaczeniem przygotować roztwór w $2,5 \text{ M}$ octanie sodu, o stężeniu $0,3 \text{ g}$ na 5 cm^3 CH_3COOH , lodowaty, cz.d.a.

KMnO_4 , 3-procentowy roztwór wodny – 3 g nadmanganianu potasu rozpuścić w wodzie i dopełnić do 100 cm^3 , przesączyć, przygotowywać w dniu oznaczenia

H_2O_2 , 3-procentowy roztwór wodny – rozcieńczyć 1 cm^3 perhydrolu do 100 cm^3 wodą

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionian sodu), cz.d.a.

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Łaźnia wodna

Termostat

Wirówka

Fotofluorymetr Kontron Instruments z oprogramowaniem komputerowym SFM25

Piśmiennictwo

BALL G.F.M.: Vitamins in foods. Analysis, bioavailability and stability. CRC Press 2005.

KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K., PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.

KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.

NOGALA-KAŁUCKA M. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.

NOLLET L.M.L.: Handbook of food analysis: Physical characterization and nutrient analysis. Marcel Dekker, New York 2004.

Official Methods of Analysis of the AOAC. Wyd. XX. Association of Official Analytical Chemists, Rockville MD 2016.

Ćwiczenie 14

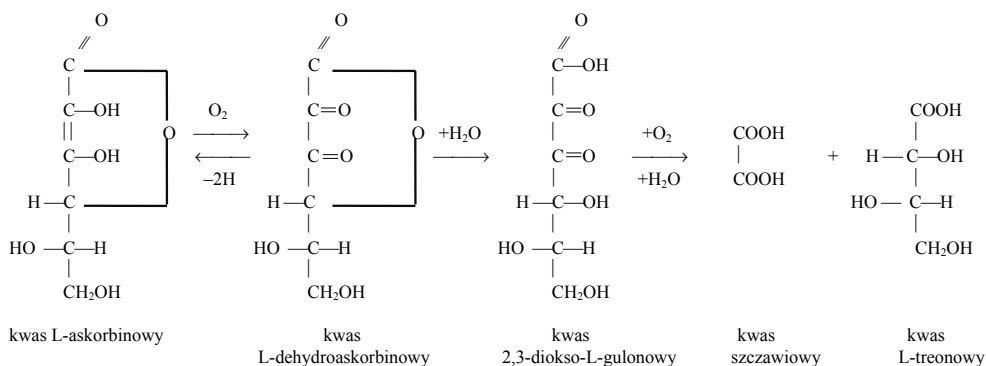
OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WITAMINY C W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Małgorzata Drywień

Wprowadzenie

Określenie witamina C obejmuje dwa związki – kwas L-askorbinowy oraz kwas L-dehydroaskorbinowy, będący utlenioną formą pierwszego. Kwas askorbinowy jest szeroko rozpowszechniony w świecie roślin i zwierząt, jedynie człowiek, małpa, świnka morska, nietoperze owocożerne oraz ptaki wróblowate mają genetycznie upośledzoną zdolność jego syntezy z D-glukozy lub D-galaktozy.

Kwas L-askorbinowy zawiera grupy dienolowe, które są odpowiedzialne za jego właściwości redukujące oraz kwasowe. W obecności tlenu bardzo łatwo ulega utlenieniu do formy dehydro-, a proces ten przyspieszają takie czynniki, jak: zasadowe środowisko, jony Cu^{2+} i Fe^{3+} , a dodatkowo nasila wzrost temperatury. Tlen wzmacnia działanie oksydazy kwasu askorbinowego, która jest naturalnie zawarta w niektórych produktach spożywczych, na przykład w ogórku.



Witamina C jest stabilna, zarówno w produktach spożywczych, jak i w przetworach. Stopniowe jej straty następują dopiero w momencie zetknięcia się z tlenem z powietrza (rozdrabnianie produktów, otwarcie opakowania). Przy oznaczaniu jej zawartości w produktach spożywczych stosuje się więc ekstrak-

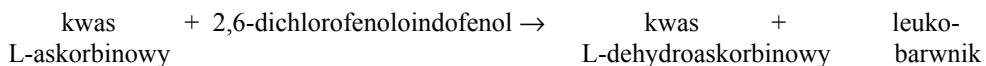
cję lub rozcieńczanie próbek z użyciem roztworów kwasów (metafosforowego, szczawiowego, solnego), które hamują procesy oksydacyjne.

Zawartość witaminy C w wybranych produktach spożywczych, w mg·(100 g)⁻¹ części jadalnych [Kunachowicz i in. 2018]:

■ mleko, jogurty	– 1,0–2,8
■ ryby świeże	– 0,0–2,0
■ boćwina	– 34,0
■ brokuły	– 83,0
■ brukselka	– 94,0
■ papryka czerwona	– 144,0
■ ziemniaki	– 14,0
■ grejpfrut	– 40,0
■ jabłko	– 9,2
■ kiwi	– 59,0
■ porzeczki czarne	– 182,6
■ truskawki	– 66,0
■ śliwki	– 5,2

W analityce żywności do oznaczeń zawartości witaminy C stosuje się dwie, poniższe podstawowe metody.

Metoda miareczkowa Tillmansa z modyfikacją Pijanowskiego oparta jest na redukujących właściwościach kwasu L-askorbinowego w stosunku do 2,6-dichlorofenoloindofenolu (odczynnik Tillmansa) – barwnika, który spełnia też funkcję indykatora, odbarwiając się po zredukowaniu:



Niedogodnością oryginalnej metody Tillmansa był to, że kwas dehydroaskorbinowy nie był oznaczany, gdyż nie reaguje z odczynnikiem Tillmansa. Opracowano więc procedurę polegającą na wcześniejszym zredukowaniu za pomocą H₂S, kwasu L-dehydroaskorbinowego (modyfikacja Pijanowskiego) i tym samym oznaczeniu całkowitej zawartości witaminy.

Metoda ta nastęrcza jednak dodatkowe trudności – w produktach roślinnych obecne są związki, które wykazują również właściwości redukujące (barwniki antocyjanowe, reduktony białkowe i cukrowe, SO₂, Fe²⁺). Powoduje to konieczność szybkiego zmiareczkowania badanych roztworów, powinowactwo bowiem tych reduktonów do odczynnika Tillmansa jest mniejsze i wymagają one dłuższego czasu reakcji niż kwas askorbinowy. Inną możliwością unikania tych trudności jest przeprowadzenie kilku miareczkowań, z których każde pozwala na

wyeliminowanie innych reduktonów i określenie zawartości kwasu askorbinowego z różnicy ich wyników. Ponadto w przypadku roztworów silnie zabarwionych stosuje się miareczkowanie 2,6-dichlorofenoloindofenolem w obecności rozpuszczalnika organicznego (benzen, chloroform, nitrobenzen, ksylen). Barwniki antocyjanowe nie rozpuszczają się w rozpuszczalniku organicznym, odczynnik Tillmansa zaś się rozpuszcza; nadmiarowa kropla odczynnika przechodzi do warstwy rozpuszczalnika, zabarwiając go na różowo.

Metoda fluorymetryczna polega na utlenieniu kwasu L-askorbinowego do L-dehydroaskorbinowego, który tworzy fluoryzujący kompleks z o-fenylendiaminą. Natężenie fluorescencji jest wprost proporcjonalne do stężenia witaminy w badanym roztworze. Metoda ta pozwala na określenie sumy kwasów askorbinowego i dehydroaskorbinowego, nawet jeśli występują w niewielkiej ilości. Na wynik oznaczenia nie mają wpływu barwniki antocyjanowe ani reduktony.

Metody tej nie można stosować do żywności przetworzonej – smażonej w głębokim tłuszczu (frytki, chipsy), zawiera ona bowiem dehydroreduktony lub dehydroredukcyjne kwasy, które powodują zawyżenie wyników analizy.

Oznaczenie przebiega w trzech etapach:

- ekstrakcja witaminy – „wyplukanie” witaminy z próbki produktu (jeśli ma on postać stałą) lub rozcieńczenie (jeśli ma postać płynną), z użyciem mieszaniny roztworów kwasów metafosforowego i octowego, która jednocześnie zapobiega utlenianiu przez jony miedzi i żelaza, denaturuje i wytrąca białka, dzięki czemu inaktywuje enzymy;
- utlenienie kwasu L-askorbinowego do formy dehydro- przez zastosowanie wytrząsania z węglem aktywowanym;
- pomiar natężenia fluorescencji chinoksaliny – kompleksu kwasu dehydroaskorbinowego z o-fenylendiaminą dokonywany na dwóch równoległych próbkach, z których w jednej kwas dehydroaskorbinowy został skompleksowany z użyciem kwasu borowego (próba o wygaszonej fluorescencji witaminy) tak, by z różnicy wartości dla obu prób określić faktyczne stężenie witaminy w roztworze.

Wykonanie ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie studentów z metodami oznaczania witaminy C – miareczkową Tillmansa w modyfikacji Pijanowskiego oraz fluorymetryczną, w owocach, warzywach oraz ich przetworach.

Oznaczanie całkowitej zawartości witaminy C metodą miareczkową Tillmansa w modyfikacji Pijanowskiego

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na wstępnym zredukowaniu siarkowodorem kwasu L-dehydroaskorbinowego do kwasu askorbinowego, a następnie odmiareczkowaniu go 2,6-dichlorofenoloindofenolem o barwie niebieskiej w środowisku kwaśnym. W wyniku redukcji 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez kwas askorbinowy w punkcie równoważnikowym nadmiar wprowadzonego 2,6-dichlorofenoloindofenolu wywołuje pojawienie się różowego zabarwienia.

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie próbki

Naważkę produktu wynoszącą około 100 g zhomogenizować lub rozetrzeć w moździerzu z 200–300 cm³ 3-procentowego roztworu kwasu szczawiowego. Z otrzymanej jednorodnej zawiesiny odważyć do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ około 10–40 g tej próbki, zawierającej 2–3 mg witaminy C, po czym dopełnić do kreski 3-procentowym roztworem kwasu szczawiowego. Jeśli badany produkt ma konsystencję płynną, odważyć 10 g do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ i dopełnić do kreski 3-procentowym roztworem kwasu szczawiowego. Po dokładnym wymieszaniu przesączyć próbę, odrzucając pierwszą frakcję (3–5 cm³). Zebrany przesącz chronić przed dostępem powietrza i światła.

Redukcja kwasu L-dehydroaskorbinowego (modyfikacja Pijanowskiego)

Do kolby miarowej o pojemności 25 cm³ pobrać 10 cm³ przesączu i dodać kolejno 3,5 cm³ 0,5 M roztworu kwasu siarkowego oraz 1,75 cm³ 1 M roztworu siarczku sodu. Zawartość kolby wymieszać i pozostawić na 10–15 minut bez dostępu światła. Następnie, bardzo ostrożnie, wprowadzić do kolby 2,5 cm³ 1 M alkoholowego roztworu chlorku rtęci (**odczynniki toksyczny**). Kolbę dopełnić do kreski wodą destylowaną i całość wytrząsać kilkadziesiąt sekund, po czym przesączyć przez karbowany sączek, odrzucając pierwszą frakcję (2–3 cm³).

Miareczkowanie

- Określenie miana roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu

Zmiareczkować 5 cm³ zakwaszonego roztworu standardowego kwasu L-askorbinowego o stężeniu 0,15 mg na 1 cm³ odczynnikiem Tillmansa. Za wynik przyjąć średnią z trzech oznaczeń i wyrazić go w miligramach kwasu askorbinowego na 1 cm³ 2,6-dichlorofenoloindofenolu.

Do kolby stożkowej o pojemności 100 cm³ pobrać 5–10 cm³ klarownego roztworu i miareczkować mianowanym 0,001 M roztworem 2,6-dichlorofenoloindofenolu do momentu pojawienia się różowego zabarwienia próbki, które utrzyma się przez mniej więcej 10 sekund. Oznaczenie szybko powtórzyć,

dodając do próbki prawie całą potrzebną ilość odczynnika Tillmansa i powoli miareczkować do pojawienia się trwałego zabarwienia.

Znając objętość zużytego do miareczkowania odczynnika Tillmansa i jego miano względem kwasu askorbinowego, obliczyć zawartość witaminy C w miligramach na 100 g analizowanego produktu.

Oznaczanie witaminy C metodą fluorymetryczną

ZASADA METODY

Oznaczenie polega na utlenieniu kwasu L-askorbinowego do L-dehydroaskorbinowego i przeprowadzeniu reakcji z o-fenylendiaminą, w której wyniku powstaje fluoryzujący kompleks. Jego natężenie mierzy się przy długości fali światła wzbudzającego 365 nm oraz długości fali pomiaru światła emitowanego 430 nm.

WYKONANIE OZNACZENIA

Przygotowanie krzywej wzorcowej

- Przygotowanie próby standardowej do kalibracji fluorymetru

Do kolby stożkowej o pojemności 250 cm³ pobrać 100 cm³ roboczego roztworu standardowego kwasu askorbinowego i wytrząsać z 2 g węgla aktywowanego, przesączyć. Do kolby miarowej o pojemności 100 cm³, zawierającej 5 cm³ roztworu octanu sodu, pobrać 5 cm³ przesączu, dopełnić do kreski wodą dejonizowaną, wymieszać. Pobrać 2 cm³ (10 µg witaminy C) roztworu do próbówki, dodać 5 cm³ roztworu o-fenylendiaminy, wymieszać i pozostawić w ciemnym miejscu na 35 minut. Następnie około 5 cm³ przygotowanego roztworu przenieść do kuwety fluorymetrycznej i wykalibrować aparat na 100% fluorescencji, uwzględniając wartość dla próby ślepej, przygotowanej jak wcześniej bez roztworu kwasu askorbinowego.

- Przygotowanie roztworów wzorcowych

Przygotować równolegle dwie serie prób.

Z roztworu roboczego kwasu askorbinowego (100 µg na 1 cm³) pobrać do kolb miarowych o pojemności 100 cm³ kolejno: 10; 20; 40; 60; 100 cm³, po czym dopełnić do kreski mieszaniną ekstrahującą. Każdą z prób przenieść do oddzielnej kolby stożkowej o pojemności 250 cm³, dodać po 2 g węgla aktywowanego, następnie wytrząsnąć i przesączyć. Do kolb miarowych o pojemności 100 cm³, zawierających po 5 cm³ roztworu octanu sodu i po 75 cm³ wody dejonizowanej, pobrać po 5 cm³ przygotowanych przesączów i dopełnić do kreski wodą dejonizowaną. Z poszczególnych roztworów wzorcowych pobierać kolejno do próbek po 2 cm³, po czym dodać po 5 cm³ o-fenylendiaminy i pozostawić w ciemnym miejscu. Próby zawierają odpowiednio: 1; 2; 4; 6; 10 µg witaminy C,

które to wprowadzić do pamięci komputera. Po 35 minutach zmierzyć fluorescencję prób przy $\lambda_{\text{Ex}} = 365 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{Em}} = 430 \text{ nm}$ w aparacie wykalibrowanym wobec próby standardowej.

Oznaczanie zawartości witaminy C

■ Ekstrakcja witaminy

Owoce i warzywa. Naważkę produktu, zawierającą około 5 mg witaminy C, zhomogenizować z 50 cm³ mieszaniny ekstrahującej i przenieść ilościowo, popłukując mieszaniną ekstrahującą, do kolby miarowej o pojemności 100 cm³. Zawartość kolby doprowadzić do pH 1,2 wobec błękitu tymolowego, posługując się mieszaniną zakwaszającą, po czym kolbę uzupełnić do kreski mieszaniną ekstrahującą i wymieszać.

Zakres zmiany barwy błękitu tymolowego: pH = 2,8 – barwa żółta; pH = 1,2 – barwa czerwona.

Soki. Naważkę produktu, zawierającą około 5 mg witaminy C, przenieść do kolby miarowej o pojemności 100 cm³, popłukując mieszaniną ekstrahującą. Doprowadzić pH roztworu do 1,2, stosując wcześniej opisaną procedurę, po czym całość uzupełnić do kreski mieszaniną ekstrahującą i wymieszać.

W przypadku produktów silnie zabarwionych przy ustalaniu pH należy posłużyć się papierkami wskaźnikowymi.

■ Utlenianie kwasu L-askorbinowego

Zawartość kolby miarowej przenieść do kolby stożkowej z korkiem na szlif, o pojemności 250 cm³, dodać około 2 g węgla aktywowanego, wytrząsać około 5 minut, po czym przesączyć przez twardy saczek, odrzucając pierwszą frakcję (3–5 cm³).

■ Pomiar fluorymetryczny

Próbka wygaszona (W). Do kolby miarowej o pojemności 100 cm³, zawierającej 5 cm³ roztworu kwasu borowego w octanie sodu, pobrać 5 cm³ wcześniej uzyskanego przesącza i pozostawić na 15 minut, mieszając co pewien czas. Następnie uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną i wymieszać.

Próbka badana (B). Do kolby miarowej o pojemności 100 cm³, zawierającej 5 cm³ roztworu octanu sodu i około 75 cm³ wody dejonizowanej, pobrać 5 cm³ uzyskanego wcześniej przesącza, uzupełnić do kreski wodą dejonizowaną i wymieszać.

Do próbek, oznaczonych odpowiednio W i B (po dwie na każdą próbkę), pobrać po 2 cm³ analogicznych roztworów, dodać po 5 cm³ roztworu o-fenylendiaminy, dokładnie wymieszać i pozostawić w ciemnym miejscu na 35 minut.

Do kuwet fluorymetrycznych (W i B) pobrać po 5 cm³ odpowiednich roztworów i mierzyć fluorescencję w aparacie wykalibrowanym na 100% wobec próby standardowej, przy $\lambda_{\text{Ex}} = 365 \text{ nm}$ i $\lambda_{\text{Em}} = 430 \text{ nm}$.

Korzystając z wcześniej wbudowanej do pamięci komputera krzywej wzorcowej, odczytać uzyskane wartości fluorescencji witaminy C w mikrogramach, uwzględniając współczynnik rozcieńczeń. Z różnicy wartości dla prób B i W obliczyć rzeczywistą zawartość witaminy C w badanej próbce. Ostateczny wynik wyrazić w miligramach witaminy C na 100 g produktu.

Wyposażenie laboratoryjne

Odczynniki

- Metoda Tillmansa w modyfikacji Pijanowskiego

Kwas szczawiowy, 3-procentowy roztwór wodny – 30 g kwasu szczawiowego rozpuścić w wodzie i dopełnić do 1000 cm³

2,6-dichlorofenolindofenol, 0,001 M roztwór wodny – 250 mg indofenolu rozpuścić w 700 cm³ gorącej wody destylowanej, zawierającej 200 mg NaHCO₃; po rozpuszczeniu barwnika schłodzić roztwór i dopełnić do 1000 cm³; przesączyć do butelki z ciemnego szkła

H₂SO₄, 0,5 M roztwór wodny – odmierzyć 28 cm³ 96-procentowego kwasu siarkowego o gęstości 1,84 g·cm⁻³ do 500 cm³ wody destylowanej, ostudzić i uzupełnić wodą do 1000 cm³

Na₂S, 1 M roztwór wodny – 75 g Na₂S rozpuścić na gorąco w 200 cm³ wody destylowanej, schłodzić i po przeniesieniu do kolby miarowej o pojemności 250 cm³ dopełnić do kreski

HgCl₂, 1 M roztwór alkoholowy – 27,15 g chlorku rtęciowego rozpuścić w 96% alkoholu etylowym, przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 cm³ i uzupełnić do kreski alkoholem etylowym

Roztwór standardowy kwasu L-askorbinowego o stężeniu 0,15 mg·cm⁻³

Błękit tymolowy – rozpuścić 0,1 g wskaźnika, rozartego w moździerzu porcelanowym, w 10,75 cm³ 0,02 M roztworu NaOH i rozcieńczyć do 250 cm³ wodą destylowaną

- Metoda fluorymetryczna

UWAGA: Do przygotowania odczynników stosować wyłącznie wodę dejonizowaną!

Mieszanina ekstrahująca – odważyć 30 g kwasu metafosforowego, zawierającego 34% HPO₃ i 59% NaPO₃; rozpuścić w 80 cm³ lodowatego kwasu octowego i 500 cm³ H₂O, dopełnić do 1000 cm³ wodą; przesączyć i przechowywać w lodówce (trwałość 2 tygodnie)

- Mieszanina zakwaszająca – przygotować roztwór 15 g HPO_3 w 40 cm^3 lodowatego kwasu octowego i rozcieńczyć do 500 cm^3 0,5 M roztworem H_2SO_4 , całość przesączyć
- Podstawowy roztwór standardowy kwasu askorbinowego (1 mg na 1 cm^3) – odważyć 0,1 g kwasu L-askorbinowego, uprzednio wysuszonego w eksykatorku nad kwasem siarkowym w ciemności przez 24 godziny; rozpuścić w mieszaninie ekstrahującej i dopełnić do 100 cm^3 ; przygotowywać w dniu analizy
- Roboczy roztwór standardowy kwasu askorbinowego (100 μg na 1 cm^3) – z podstawowego roztworu standardowego kwasu askorbinowego pobrać 25 cm^3 do kolby miarowej o pojemności 250 cm^3 i dopełnić do kreski mieszaniną ekstrahującą
- $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – rozpuścić 500 g uwodnionego octanu sodu w 1000 cm^3 wody dejonizowanej; w przypadku stosowania bezwodnego octanu – naważać 302 g soli
- H_3BO_3 , 3-procentowy roztwór w octanie sodu – rozpuścić 3 g kwasu borowego w roztworze octanu sodu, uzupełnić do 100 cm^3 ; przygotowywać bezpośrednio przed analizą
- Chlorowodorek o-fenylendiaminy, 0,02-procentowy roztwór wodny – odważyć 20 mg o-fenylendiaminy do kolby miarowej o pojemności 100 cm^3 , bezpośrednio przed użyciem uzupełnić do 100 cm^3 wodą dejonizowaną; odczynnik nietrwały – chronić przed światłem
- Węgiel aktywowany przemity kwasem solnym – do 200 g węgla aktywowanego wprowadzić 1000 cm^3 roztworu kwasu solnego, rozcieńczonego w stosunku: 1 część HCl i 9 części wody dejonizowanej; całość ogrzać do wrzenia i sączyć pod ciśnieniem na lejku Büchnera; następnie płukać dwukrotnie po 1000 cm^3 wody dejonizowanej, osączyć i wysuszyć w temperaturze 110–120°C

Sprzęt i aparatura:

Waga analityczna

Homogenizator laboratoryjny

Wytrząsarka do probówek

Fotofluorymetr Kontron Instruments z oprogramowaniem komputerowym SFM25

Piśmiennictwo

- BALL G.F.M.: Vitamins in foods. Analysis, bioavailability and stability. CRC Press 2005.
- KREŁOWSKA-KUŁAS M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, WARSZAWA 1993.
- KUNACHOWICZ H., NADOLNA I., IWANOW K. PRZYGODA B.: Wartość odżywcza produktów spożywczych i typowych potraw. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2018.
- NOGALA-KAŁUCKA M. (red.): Analiza żywności. Wybrane metody oznaczeń jakościowych i ilościowych składników żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań 2016.
- NOLLET L.M.L: Handbook of food analysis. Physical characterization and nutrient analysis. Marcel Dekker, New York 2004.
- Official Methods of Analysis of the AOAC. Wyd. XX. Association of Official Analytical Chemists, Rockville MD 2016.

