



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych
z Analizy Żywności**

Ćwiczenie 5

Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą
Bertranda

Gdańsk, 2024

1. Wprowadzenie

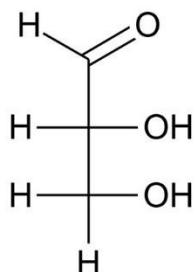
Sacharydy (inaczej cukry) są to polihydroksyaldehydy i polihydroksyketony oraz niektóre ich pochodne (aminosacharydy, deoksosacharydy, kwasy uronowe). Nazwa sacharydy wywodzi się od sacharozy, sacharydu powszechnie używanego w celach spożywczych i zwanego potocznie cukrem.

1.1. Struktura sacharydów

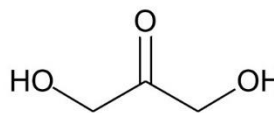
Tradycyjnym wzorem ogólnym cukrów jest $C_nH_{2n}O_n$, choć wiele sacharydów tego wzoru nie spełnia. W literaturze cukry znane są też pod nazwą węglowodanów, jednak ta nazwa nie jest zalecana, ponieważ wzór sumarycznych nie wszystkich cukrów odpowiada wielokrotności ugrupowania C(HOH).

Rozróżniane są dwie podstawowe grupy cukrów:

- *aldozy* – homologi aldehydu glicerynowego (Rysunek 1.)
- *ketozy* – homologi dihydroksyacetonu (Rysunek 1.)



Aldehyd D-glicerynowy

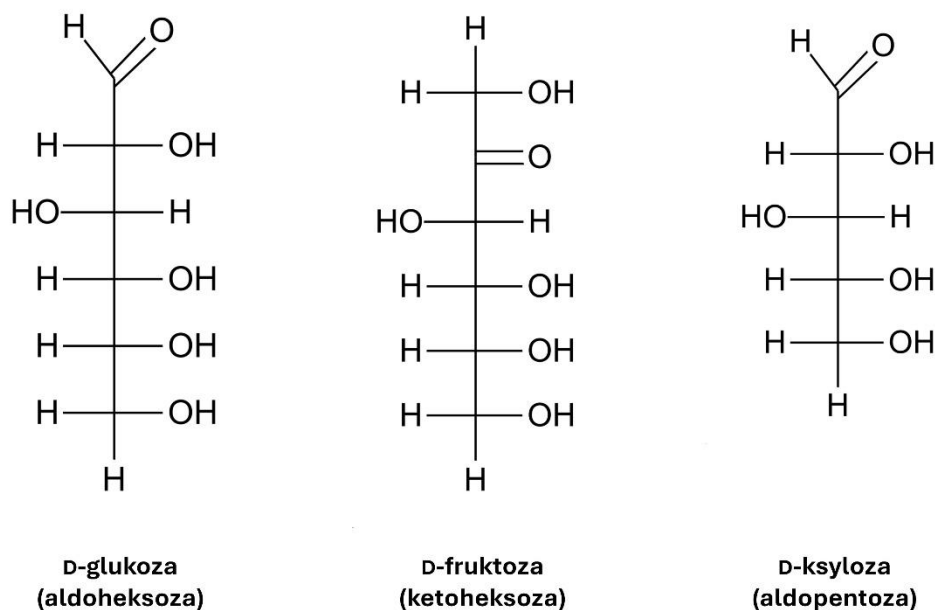


Dihydroksyaceton

Rysunek 1. Struktury aldehydu D-glicerynowego i dihydroksyacetonu.

W zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce, cukry dzielą się na triozy (3 atomy C), tetrozy (4 atomy C), pentozy (5 atomów C), heksozy (6 atomów C), heptozy (7 atomów C) i oktozy (8 atomów C). Przykładowe struktury zestawiono na Rysunku 2.

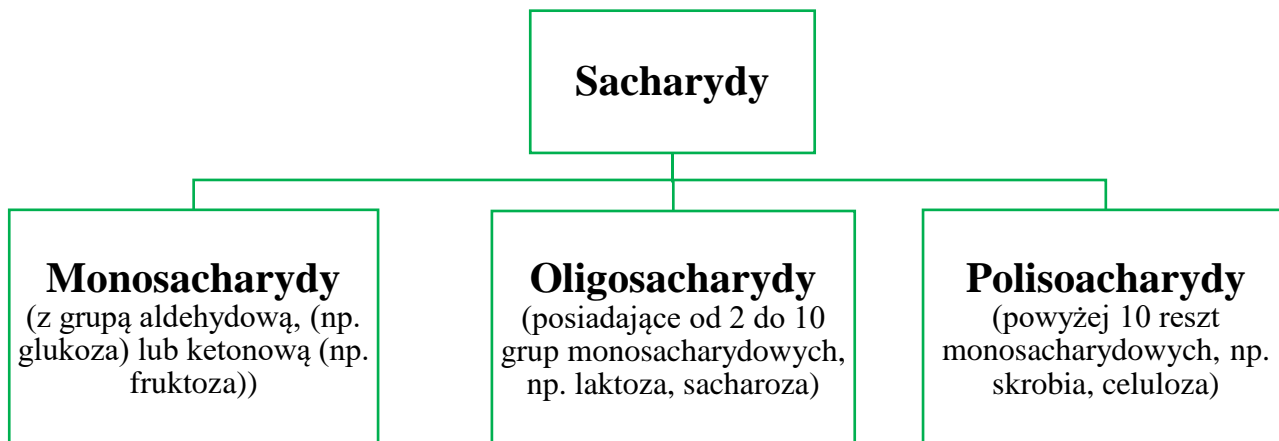
Łatwo zauważyć, że nazwa cukru składa się z liczebnika podającego liczbę atomów węgla i charakterystycznej dla cukrów końcówki – oza. Monosacharydy charakteryzują się obecnością w cząsteczce asymetrycznych atomów węgla (połączonych z 4 różnymi grupami chemicznymi), zwanych centrami stereogenicznymi. Obecność asymetrycznych atomów węgla stwarza możliwość występowania licznych izomerów optycznych i przestrzennych.



Rysunek 2. Struktury D-glukozy, D-fruktozy i D-ksylozy

Kolejny podział sacharydów związany jest z ich przynależnością do szeregu konfiguracyjnego D lub L. Przynależność do odpowiedniego szeregu determinuje konfiguracja ostatniego centrum stereogenicznego cząsteczki cukru. Do szeregu D należą te homologi aldehydu D-glicerynowego lub dihydroksyacetonu, w których w projekcji Fischera grupa hydroksylowa -OH przy ostatnim centrum stereogenicznym znajduje się po prawej stronie, w szeregu L znajduje się ona po lewej stronie (homologi aldehydu L-glicerynowego). Cukry szeregu D są bardziej rozpowszechnione w przyrodzie niż cukry szeregu L. Do popularnych cukrów zaliczają się: D-glukoza, D-ryboza, D-galaktoza, D-mannoza i D-fruktoza. Do nielicznych naturalnych cukrów prostych szeregu L należy L-arabinoza i L-galaktoza.

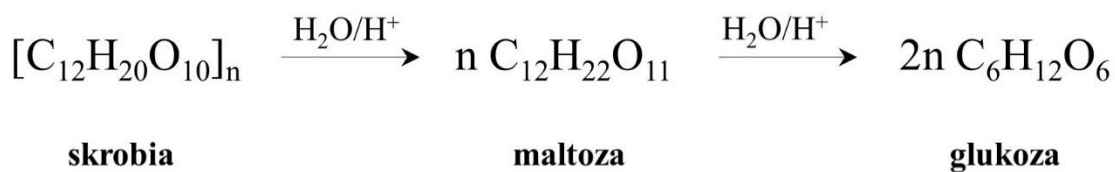
Inny podział sacharydów na tzw. cukry proste (monosacharydy) i cukry złożone (oligosacharydy i polisacharydy) związany jest ich zdolnością do kondensacji (polimeryzacji) (Rysunek 3).



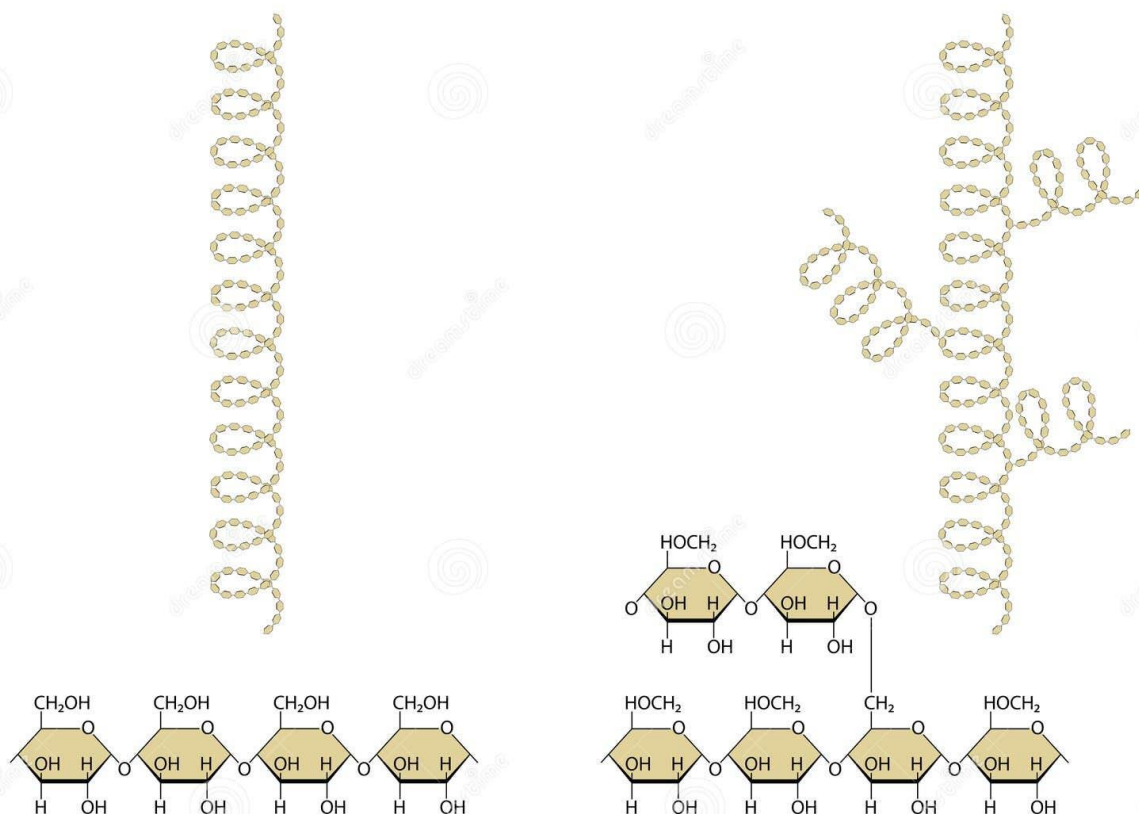
Rysunek 3. Podział sacharydów ze względu na ich budowę chemiczną.

Cukrami prostymi nazywane są sacharydy, które nie ulegają hydrolizie; należy do nich m.in. aldehyd glicerynowy, ryboza, glukoza, oraz wiele innych. Jeżeli cząsteczka cukru składa się z dwóch lub więcej reszt monosacharydów, to zaliczany jest on do **cukrów złożonych**, a ich hydroliza prowadzi do otrzymania cukrów prostych. Cukry złożone, zawierające od 2 do 10 reszt monosacharydowych, nazywane są oligosacharydami, natomiast cukry powyżej 10 reszt - polisacharydami. Składnikami cukrów złożonych może być około 50 obojętnych i kwaśnych monosacharydów oraz podobna ilość aminocukrów. Polisacharydy mogą być liniowe lub rozgałęzione, utworzone z jednego rodzaju monosacharydu (homopolisacharydy) lub z różnych jednostek cukrowych (heteropolisacharydy). Jednostki monosacharydowe mogą występować w formie pierścienia sześciocząłowego (piranozowego) lub pięciocząłowego (furanozowego), łączyć się wiązaniem α - lub β -glikozydowym. Dodatkowo do reszt cukrowych mogą być przyłączone podstawniki niecukrowe, np. grupy acylowe, alkilowe, siarczanowe, fosforanowe czy cykliczne acetale.

W przyrodzie sacharydy występują zarówno w postaci wolnej, jak i związanej z peptydami (proteoglikany), proteinami (glikoproteiny) oraz lipidami (glikolipidy). Z uwagi na znaczenie żywieniowe bardziej szczegółowo zostanie opisana budowa skrobi. Składa się ona z jednostek glukozyłowych połączonych wiązaniem 1,4- α -glikozydowymi z tym, że łańcuchy zawierają także pewną liczbę odgałęzień. W wyniku częściowej hydrolizy skrobi powstaje maltoza (disacharyd), hydroliza całkowita prowadzi wyłącznie do D-glukozy:



Skrobię można rozdzielić na dwie frakcje amylozę i amylopektynę. W amylozie, która stanowi ok. 20% skrobi, cząsteczki glukozy (50-300) budują łańcuch prosty (nierozgałęziony), łącząc się wiązaniami 1,4. Długie, proste łańcuchy amylozy są zwinięte spiralnie, przyjmując postać helisy. Amylopektyna, stanowiąca ok. 80% skrobi jest mocno rozgałęziona. Mimo, że każda cząsteczka może zawierać aż 300-5000 jednostek glukozowych, odcinki łańcucha, w którym wyłącznie występują wiązania 1,4 zawierają średnio tylko 25-30 takich jednostek. Łańcuchy te połączone są w punktach rozgałęzień wiązaniami 1,6. Różnice w strukturze przedstawiono na Rysunku 4.



Rysunek 4. Ilustracja różnic pomiędzy amylozą (po lewej) i amylopektyną (po prawej) [źródło: dreamstime.com]

Amyloza i amylopektyna wykazują nieco inne właściwości fizyczne; amyloza rozpuszcza się w wodzie, amylopektyna jest w niej nierozpuszczalna. Wspólnie tworzą ziarenka (granulki) skrobi, które można zobaczyć za pomocą mikroskopu i które są charakterystyczne dla roślin, z których pochodzą (Rysunek 5).



Rysunek 5. Granulki skrobi

Granulki skrobi składają się z dwóch warstw: zewnętrznej - amylopektyny oraz wewnętrznej – amylozy. Z powodu mocno rozgałęzionej budowy, ziarna skrobi w zimnej wodzie pęcznieją, po ogrzaniu tworzą roztwór koloidalny, tzw. kleik skrobiowy, który po ochłodzeniu ulega koagulacji.

1.2. Właściwości fizyczne i chemiczne sacharydów

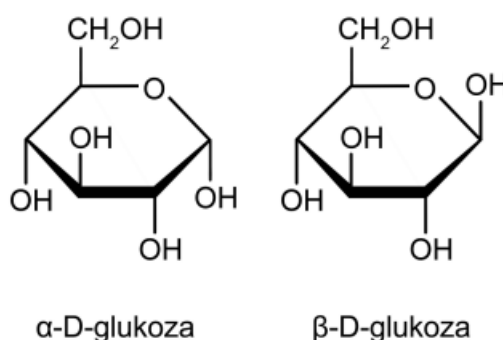
1.2.1. Właściwości fizyczne sacharydów

Monosacharydy i oligosacharydy są słodkie, rozpuszczalne w wodzie, łatwo krystalizują i mają określoną masę cząsteczkową. W przeciwieństwie do nich polisacharydy nie mają smaku słodkiego, są mniej lub wcale nierozpuszczalne w wodzie i są zróżnicowane pod względem masy cząsteczkowej. Wszystkie cukry są nietlne i rozpadają się przed osiągnięciem temperatury wrzenia. Krystalizują z roztworów opornie (wyjątkiem jest sacharoza) i mają tendencję do tworzenia gęstych, syropowatych cieczy, zwłaszcza jeśli nie są czyste. Monosacharydy zawierają asymetryczne atomy węgla i dlatego są związkami optycznie czynnymi; wodne roztwory sacharydów wykazują zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego.

1.2.2. Właściwości chemiczne sacharydów

Przy omawianiu właściwości chemicznych cukrów należy uwzględniać zarówno ich budowę pierścieniową jak i łańcuchową. Tworzenie pierścieni heterocyklicznych jest wynikiem

wewnątrzcząsteczkowej addycji grupy hydroksylowej do grupy aldehydowej lub ketonowej z utworzeniem wiązania półacetalowego (hemiacetalowego). Z powodu płaskiej budowy grupy aldehydowej i ketonowej tworzenie wiązania półacetalowego prowadzi do powstania dwóch izomerów, nazywanych anomerami α i β . Anomer α (monosacharydu z szeregu konfiguracyjnego D) posiada półacetalową grupę hydroksylową pod powierzchnią pierścienia we wzorze Hawortha, anomer β nad powierzchnią np. dla D-glukozy.



Rysunek 6. Anomery glukozy

Drobna ilość form łańcuchowych w równowadze z pierścieniowymi wystarcza, aby cukry ulegały typowym reakcjom związków karbonylowych. Niekiedy reakcje te przebiegają inaczej niż w przypadku prostych aldehydów i ketonów, ponieważ obecność grup OH stwarza możliwości dalszych przemian. Wzory pierścieniowe są niezbędne przy opisie reakcji grup hydroksylowych w cukrach.

Reakcje, którym ulegają sacharydy można podzielić na:

a) Reakcje zachodzące na grupie karbonylowej i anomerycznym atomie węgla:

- *Mutarotacja* – równowagowe przemiany anomeru α w anomer β ;
- *Redukcja do alkoholi* – np. redukcja D-fruktozy prowadzi do uzyskania D-glukitolu i D-mannitolu)
- *Addycja do grupy karbonylowej* – m.in. tworzenie cyklicznych, wewnętrznych hemiacetali; praktyczne znaczenie w chemii żywności mają reakcje z α -hydroksykwasami, aminokwasami, nukleotydami, białkami i amoniakiem, które prowadzą do otrzymania brunatnych barwników żywności oraz wtórnych aromatów żywności;



Analiza Żywności

5. Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą Bertranda

- *Utlenianie* - znaczenie analityczne ma utlenianie jonami metali w środowisku alkalicznym, przede wszystkim jonami Ag^+ (reakcja Tollensa) i Cu^{2+} (reakcja Fehlinga);
- *Polimeryzacja* - w środowisku kwaśnym następuje atak grupy hydroksylowej (O-nukleofil) jednej cząsteczki cukru na anomeryczny atom węgla drugiej; w wyniku reakcji tworzą się struktury zawierające większą liczbę jednostek monosacharydowych.

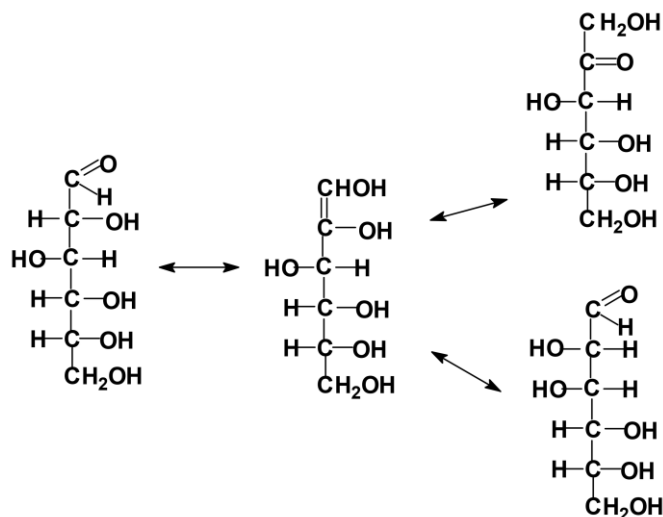
b) Reakcje grup hydroksylowych:

- *Estryfikacja* - estry otrzymuje się zwykle w reakcjach sacharydów (jako alkoholu estryfikującego) z chlorkami arylowymi lub bezwodnikami kwasów organicznych i mineralnych. Estryfikacja wyższych kwasów tłuszczowych mono-, di- i oligosacharydami lub alkoholami sacharydowymi prowadzi do otrzymania związków powierzchniowo czynnych, istotnych w produkcji żywności;
- *Eteryfikacja*;
- *Chlorowcowanie*;
- *Dehydratacja* – ogrzewanie monosacharydów powyżej temperatury topnienia prowadzi początkowo do odwracalnego wydzielenia cząsteczki wody, a następnie do powstania bardziej odwodnionych produktów: karamelanu ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_9$), karamelenu ($\text{C}_{36}\text{H}_{18}\text{O}_{24}$) i karamelinu ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{13}$). Reakcje te rozpoczynają karmelizację sacharydów;
- *Redukcja* – prowadząca do otrzymania deoksycukrów; utlenianie; tworzenie kompleksów - zdolność tworzenia kompleksów sacharydów z różnymi odczynnikami stanowi podstawę wielu metod wyodrębniania ich z mieszanin i oznaczania jakościowego i ilościowego (np. roztwór jodu w KI służy do wykrywania skrobi, gdyż tworzy ze skrobią charakterystyczny, ciemnogrnatowy kompleks).

- c) **Reakcje wiązania glikozydowego** – dotyczą di- i oligosacharydów; wiązanie glikozydowe ulega hydrolitycznemu rozszczepieniu w wobec katalizatorów kwasowych, np. z sacharozy produkuje się na skalę przemysłową cukier inwertowany, który jest mieszaniną D-glukozy i D-fruktozy

Przemiany sacharydów w środowisku zasadowym.

W środowisku zasadowym cukry redukujące ulegają enolizacji. Jako produkt przejściowy tworzy się bardzo nietrwały enol, i przekształca się w trzy epimery będące w stanie równowagi np. glukoza pozostaje w równowadze z mannozą i fruktozą i innymi produktami tych przemian.



Rysunek 7. Schemat enolizacji

Przemiany cukrów w środowisku stężonych kwasów.

Cukry o liczbie atomów węgla większej od 4 w cząsteczce, ogrzewane z mocnymi kwasami, ulegają odwodnieniu i cyklizacji. Z pentoz powstaje furfural, natomiast z heksoz powstaje 5-hydroksymetylofurfural, który dalej ogrzewany przekształca się w kwas mrówkowy i lewulinowy, którego pochodne dają barwne związki z pochodnymi fenolowymi. Reakcja ta pozwala odróżnić pentozy od heksoz i aldozy od ketoz.

Właściwości redukujące cukrów.

Zarówno aldozy jak i ketozy w środowisku zasadowym wykazują właściwości redukujące, tzn. reagują np. z płynem Tollensa, dając lustro srebrne. Warunkiem występowania właściwości redukujących jest obecność w cząsteczce cukru wolnej grupy aldehydowej lub ketonowej, a to możliwe jest w środowisku zasadowym.

Próba Benedicta jest najbardziej czułą próbą na cukry redukujące, w której używa się 1% wodny roztwór siarczanu(VI) miedzi(II), 10% roztwór cytrynianu sodu, 1% roztwór amoniaku

i 10% roztwór węgla sodu. Po dodaniu cukru redukującego i ogrzaniu pojawia się żółty, pomarańczowy lub czerwony osad tlenku Cu_2O . Za pomocą tej próby można wykryć cukier redukujący już przy stężeniu 0,1%.

Węglowodany redukujące odczynnik Fehlinga, odczynnik Benedicta lub odczynnik Tollensa noszą nazwę cukrów redukujących (np. glukoza). Sacharoza, powszechnie używana w gospodarstwach domowych, jest cukrem nieredukującym.

1.2.3. Właściwości funkcjonalne sacharydów

Sacharydy charakteryzują się w większości przypadków słodkim smakiem. Za wzorec smaku przyjmuje się 10% wodny roztwór sacharozy; jednostka słodkości, tzw. względna słodkość – RS (ang. *relative sweetness*) takiego roztworu wynosi 1. W Tabeli 1 zamieszczono wartości RS dla innych sacharydów.

Tabela 1. Względna słodkość (RS) 10% wodnych roztworów różnych związków (sacharoza = 1,0) [Zdzisław E. Sikorski, *Chemia żywności*, WNT, Warszawa, 2002]

Związek	RS	Związek	RS
Sacharoza	1,00	Rafinoza	0,01
β -D-fruktopiranoza	1,80	Stachinoza	0,10
Cukier inwertowany	1,30	Ksylitol	0,85 – 1,2
α -D-glukopiranoza	0,70	Mannitol	0,40
β -D-glukopiranoza	0,80	Sorbitol	0,60
α -D-mannopiranoza	0,30	Miód	0,97
β -D-mannopiranoza	Gorzka	Melasa	0,74
β -D-galaktopiranoza	0,32	Sacharyna	200 – 700
Maltoza	0,32	Cyklaminiany	30 – 140
α -D-Laktoza	0,20	Aspartam	200
β -D-Laktoza	0,30	Neohesperydyno dihydrochalon	2000
D-Galaktosacharoza	Bez smaku		

Jak widać w Tabeli 1, ze wzrostem liczby jednostek monosacharydowych słodkość w sacharydzie zanika. Wyjątkiem jest sacharoza, która ma dwie reszty cukrowe, ale tylko reszta glukozy oddziałuje z receptorem na języku. Słodkość sacharydów można wywołać przez modyfikacje chemiczne, np. chlorowanie, ale metody te mają ograniczone znaczenie praktyczne.

W Polsce w użyciu są następujące naturalne, sacharydowe środki słodzące: D-glukoza, D-fruktoza, laktoza, sacharoza, maltoza, syropy skrobiowe, ekstrakty słodowe, alkohole cukrowe, miód i syrop klonowy. Dostępne są także inne, niesacharydowe środki słodzące, takie jak np. kwas *N*-cykloheksyloaminosulfonowy (30 razy słodszy od sacharozy), aspartam (200 razy słodszy od sacharozy), sacharyna (300 razy słodszy od sacharozy), acesulfam (200 razy słodszy od sacharozy).

1.3. Sacharydy występujące w żywności

W produktach spożywczych zidentyfikowano ponad 100 rodzajów cukrów. D-Glukoza i D-fruktoza znajduje się głównie w miodzie, owocach i warzywach, laktoza (dimer D-glukozy i D-galaktozy) w mleku ssaków, sacharoza w burakach cukrowych i trzcinie cukrowej, a skrobia w ziarnie zbóż, w przetworach zbożowych oraz w ziemniakach.

Sacharydy zaliczane są do grupy składników energetycznych i występują głównie w produktach pochodzenia roślinnego (Tabela 2).

Tabela 2. Zawartość sacharydów w wybranych produktach spożywczych (Małecka M. Wybrane metody analizy żywności, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003)

Rodzaj produktu	Łączna zawartość sacharydów [%]
Wieprzowina, wołowina	0,0
Ser Gouda, tłusty	0,1
Ogórek	2,9
Ser twarogowy tłusty	3,5
Pomidor	3,6
Mleko spożywcze (2% tłuszczu)	4,9
Marchew	8,7
Pomarańcza	11,3
Brzoskwinia	11,9
Jabłko	12,1
Banan	23,5
Chleb	56,2
Ziarno pszenicy	70,5
Ziarno żyta	74,2
Kasza jęczmienna, pęczak	74,9



Analiza Żywności

5. Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą Bertranda

Ich najbogatszym źródłem są: mąka, kasze, pieczywo, suche nasiona roślin strączkowych, czyli groch i fasola oraz ziemniaki. Zawierają one 20-70% sacharydów w postaci skrobi. Najbardziej skoncentrowanym źródłem węglowodanów jest cukier. Do grupy produktów węglowodanowych zalicza się ponadto błonnik. Rozpowszechniony w przyrodzie jako materiał budulcowy i podporowy roślin jest ważnym składnikiem pożywienia, chociaż ustrój człowieka nie trawi go i nie przyswaja. Zawartość węglowodanów w pożywieniu jest konieczna do prawidłowego przetwarzania tłuszczów, lecz ich nadmiar prowadzi do otyłości.

1.4. Funkcje sacharydów

Sacharydy spełniają w organizmie wiele ważnych funkcji:

- są głównym, najtańszym i najłatwiej dostępnym źródłem energii, służącej przede wszystkim do utrzymywania stałej ciepłoty ciała, pracy narządów wewnętrznych oraz do wykonywania pracy fizycznej (z 1 g węglowodanów wyzwala się 4 kcal energii); glukoza jest prawie wyłącznym źródłem energii dla mózgu;
- są materiałem budulcowym elementów strukturalnych komórek lub substancji biologicznie czynnych, np. rybozy; biorą udział w budowie błon komórkowych;
- pozwalają na oszczędną gospodarkę białkami i lipidami;
- odgrywają znaczną rolę w gospodarce wodnej i mineralnej, zmniejszając wydalanie tych składników;
- niektóre sacharydy (zawarte w błonniku pokarmowym), choć nie są przez organizm człowieka trawione i przyswajane, odgrywają istotną rolę w regulowaniu procesów zachodzących w przewodzie pokarmowym, m.in. wpływają na perystaltykę przewodu pokarmowego, stymulują wzrost i rozwój „dobrych” bakterii (bakterii kwasu mlekowego). Błonnik pokarmowy obniża także poziom cholesterolu we krwi, reguluje metabolizm cukrów oraz pozwala na dłużej zachować uczucie sytości po posiłku.

1.5. Metody oznaczania zawartości sacharydów

Jak już wspomniano, sacharydy tworzą zróżnicowaną grupę związków, dlatego też istnieje wiele metod ich oznaczania w produktach spożywczych. Najczęściej wykorzystują one następujące właściwości cukrów: zachowanie wobec silnych kwasów mineralnych, zdolność skręcania



Analiza Żywności

5. Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą Bertranda

płaszczyzny światła spolaryzowanego, zdolność tworzenia przez większość sacharydów jednorodnych roztworów wodnych, właściwości redukcyjne oraz zdolność do ulegania fermentacji. Czasami zawartość sacharydów ogółem oblicza się w sposób uproszczony i podaje jako:

$$\text{sacharydy ogółem} = 100 - (\text{woda} + \text{popiół} + \text{białko} + \text{tłuszcz})$$

Wartości poszczególnych składników żywności (wody, popiołu, białka tłuszczu) oznacza się analitycznie i wyraża w procentach. Metoda ta jest stosowana przede wszystkim do ustalania wartości energetycznej produktu, daje jednak wyniki przybliżone, gdyż nie uwzględnia faktu, iż obliczona w ten sposób frakcja polisacharydowa zawiera inne składniki, np. kwasy organiczne. Ponieważ sacharydy obecne w żywności składają się z przyswajalnych i nieprzyswajalnych, zaleca się, aby w przypadku obliczania wartości energetycznej produktu, zamiast sacharydów ogółem stosować sacharydy przyswajalne, będące różnicą zawartości sacharydów ogółem i błonnika pokarmowego.

Wyznaczenie udziału frakcji błonnika pokarmowego (w tym tzw. skrobi odpornej) wymaga zastosowania odmiennych metod oznaczania, gdyż charakteryzuje się on innymi właściwościami fizykochemicznymi w porównaniu z sacharydami przyswajalnymi.

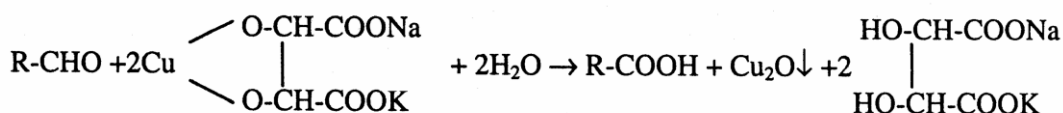
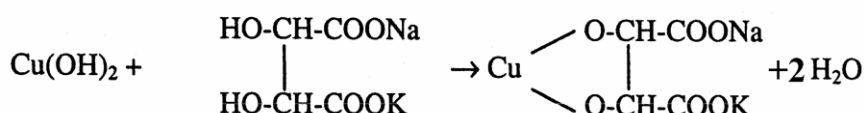
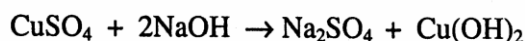
1.6. Metody oznaczania sacharydów przyswajalnych

Metody oznaczania sacharydów przyswajalnych można podzielić na:

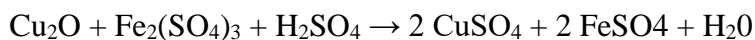
- **Fizyczne:** densymetryczne, refraktometryczne, polarymetryczne;
- **Chemiczne:** metoda Fehlinga, metoda Lane-Eynona, metoda Bertranda, metoda Luffa-Schoorla;
- **Fizykochemiczne:** metoda antronowa, metoda rezorcynowa, metoda heksazelazianowa
- **Chromatograficzne:** chromatografia cienkowarstwowa lub bibułowa, chromatografia kolumnowa, chromatografia gazowa, wysokosprawna chromatografia cieczowa;
- **Enzymatyczne.**

Metoda Bertranda

Stosuje się ją do oznaczania sacharydów w roztworach silnie zabarwionych. Oznaczanie sacharydów przeprowadza się metodą pośrednią na podstawie ilości roztworu manganianu(VII) potasu zużytego na miareczkowanie jonów Fe^{2+} odpowiadających stechiometrycznie ilości sacharydów redukujących zawartych w badanym roztworze. W metodzie tej stosuje się trzy płyny Bertranda (I – siarczan(VI) miedzi(II); II – winian potasu i sodu oraz wodorotlenek sodu; III – siarczan(VI) żelaza(III) w stężonym kwasie siarkowym(VI)). Oznaczenie polega na ilościowej redukcji jonów Cu^{2+} do Cu^{1+} przez sacharydy zawierające w cząsteczce wolne grupy redukujące, które zachodzi w środowisku silnie alkalicznym (pH ok. 12) i w temp. wrzenia roztworu. Schemat reakcji podany jest poniżej:



Wytworzone jony miedzi(I) ulegają utlenieniu w reakcji z trzecim płynem Bertranda do jonów Cu^{2+} , a jony Fe^{3+} redukcji do jonów Fe^{2+} . Ilość jonów Fe^{2+} oznacza się przez miareczkowanie mianowanym roztworem manganianu(VII) potasu:



Na podstawie zużycia ilości manganianu(VII) potasu oblicza się ilość miedzi zredukowanej przez sacharyd obecny w badanej próbce, a zawartość poszczególnych sacharydów odczytuje się z odpowiednich tablic.

W metodzie Bertranda, nie ma potrzeby dokładnego oznaczania miana odczynnika miedziowego (mieszaniny roztworów Bertranda I i II); musi być on jedynie dodany w nadmiarze do redukujących sacharydów.



2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Ćwiczenie polega na oznaczaniu zawartości cukrów ogółem w cukierkach twardych metodą Bertranda.

2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

a) Odczynniki:

- roztwór Bertranda I (4 g siarczanu (VI) miedzi (II) ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) rozpuszczone w 100 ml wody dejonizowanej) – 100 ml
- roztwór Bertranda II (20 g winianu sodu i potasu ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$) rozpuszczone w 50 ml wody dejonizowanej i wymieszane z NaOH (15 g) rozpuszczonym w 25 ml wody dejonizowanej, uzupełnione do 100 ml wodą dejonizowaną) – 100 ml
- roztwór Bertranda III (5 g bezwodnego siarczanu (VI) żelaza (III) ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) rozpuszczone w 50 ml gorącej wody dejonizowanej i po ochłodzeniu dodane 20 ml stężonego kwasu siarkowego (VI), uzupełnione do 100 ml wodą dejonizowaną) – 100 ml
- fenoloftaleina, 1% roztwór w EtOH – 50 ml
- oranż metylowy – 50 ml
- 0,1 M wodny roztwór NaOH – 500 ml
- 10% wodny roztwór NaOH – 500 ml
- Kwas siarkowy (VI), stężony – 25 ml
- 0,005 M wodny roztwór manganianu (VII) potasu – 500 ml

b) Akcesoria laboratoryjne:

- moździerz – 1 szt.
- łopatką – 1 szt.
- kolba stożkowa 250 ml – 5 szt.
- kolba stożkowa 100 ml – 3 szt.
- zlewka 250 ml – 1 szt.
- cylinder miarowy 100 ml – 1 szt.
- cylinder miarowy 50 ml – 1 szt.
- cylinder miarowy 25 ml – 4 szt.



Analiza Żywności

5. Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą Bertranda

- kolba miarowa 250 ml – 2 szt.
- biureta 25 ml – 3 szt.
- pipeta szklana 5 ml. – 2 szt.
- pipeta Pasteura – 10 szt.
- lejek filtrujący ze spiekany dyskiem – 3 szt.
- termometr – 1 szt.
- łaźnia wodna – 1 szt.
- płaszcz grzejny – 3 szt.

2.3. Wykonanie ćwiczenia

ETAP I - Przygotowanie roztworu podstawowego cukierków twardych

Cukierki (2-4 sztuki) rozetrzeć w suchym moździerzu. Na wadze technicznej odważyć 4 g roztartych cukierków z dokładnością $\pm 0,01$ g, przenieść do kolby stożkowej o pojemności 250 ml i rozpuścić w około 100 ml wody dejonizowanej. Całość zobojętnić 0,1 M wodnym roztworem NaOH wobec fenoloftaleiny (do uzyskania słabo różowego zabarwienia) i przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski.

ETAP II - Hydroliza (inwersja) cukrów w badanym produkcie

Przygotować łaźnię wodną o temperaturze wody 80 °C. Do kolby stożkowej o pojemności 250 ml wprowadzić 50 ml roztworu podstawowego cukierków (uzyskanego w ETAPIE I), a następnie za pomocą pipety szklanej, dodać 5 ml kwasu siarkowego (VI) (OSTROŻNIE!!! POD DYGESTORIUM) i starannie wymieszać. Kolbę wstawić do łaźni wodnej (o temp. 80 °C), w ciągu 2-3 minut doprowadzić temperaturę roztworu w kolbie do temperatury 68-71 °C i utrzymywać w tej temperaturze przez kolejne 5 min. Kolbę schłodzić, po czym roztwór zobojętnić za pomocą 10% wodnego roztworu NaOH, wobec oranżu metylowego (do uzyskania barwy żółtej). Zawartość kolby stożkowej przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 250 ml i uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski.

Oznaczenie należy wykonać bardzo starannie, gdyż zmiana ilości kwasu siarkowego może spowodować niecałkowity rozkład polisacharydów i oligosacharydów (głównie sacharozy) do glukozy i fruktozy, z kolei wydłużenie czasu reakcji lub podniesienie temperatury może spowodować rozkład produktów hydrolizy!



Analiza Żywności

5. Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą Bertranda

ETAP III – oznaczanie zawartości cukrów metodą Bertranda

Do kolby stożkowej o pojemności 250 ml wprowadź 5 ml roztworu po inwersji (uzyskanego w ETAPIE II) oraz 15 ml wody dejonizowanej, a następnie dodać 20 ml roztworu Bertranda I i 20 ml roztworu Bertranda II. Zawartość kolby starannie wymieszać, po czym kolbę umieścić w płaszczu grzejnym. Doprowadzić roztwór do wrzenia i utrzymać w tej temperaturze przez 3 minuty, a następnie odstawić do ostygnięcia. **WYRĄCONY OSAD TLENKU MIEDZI I (Cu_2O) MUSI BYĆ CAŁY CZAS PRZYKRYTY ROZTWOREM!!!**

Ciecz nad osadem powinna mieć wyraźnie niebieskie zabarwienie, świadczące o nadmiarze zredukowanej soli miedziowej. Gdyby, np. w czasie ogrzewania roztwór zmienił barwę na brudnozieloną, świadczyłoby to, że ilość sacharydu w próbce przekracza możliwości redukcyjne odczynników Bertranda I i II; wówczas badany roztwór (po inwersji) należy rozcieńczyć i powtórzyć oznaczenie.

Następnie, ostrożnie przenieść ciecz wraz z osadem (ilościowo) na lejek filtrujący tak, aby nie dopuścić do odsłonięcia osadu Cu_2O , zarówno w kolbie, jak i na lejku. Do tego celu należy wykorzystać gorącą wodę dejonizowaną. Osad na lejku przemywać gorącą wodą dejonizowaną tak długo, aż zniknie niebieskie zabarwienie przesączu (**UWAŻAĆ ABY NIE NASTĄPIŁO UTLENIE NIE OSADU!**). Gdy przesącz będzie bezbarwny, a ciecz w lejku będzie odrobinę nad osadem, lejek należy przenieść nad czystą kolbę, **SZYBKO!** rozpuścić osad w 20 ml roztworu Bertranda III i przesączyć do kolby. Należy przy tym uważać, aby cały osad będący na lejku został całkowicie rozpuszczony. Najlepiej roztwór Bertranda III dodawać porcjami. Jeśli osad nie ulegnie całkowitemu rozpuszczeniu, należy dodać niewielką porcję roztworu Bertranda III. Uzyskany przesącz miareczkować 0,005 M roztworem manganianu (VII) potasu do uzyskania jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się przez 30 sekund. Zmiana barwy z zielonkawej na różową następuje bardzo wyraźnie od jednej kropli roztworu manganianu (VII) potasu dodanego w nadmiarze.



Analiza Żywności

5. Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą Bertranda

2.4. Opracowanie wyników

— Obliczyć miano miedziowe roztworu KMnO_4 ($T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}}$) zgodnie ze wzorem:

$$T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}} = 5 \cdot c_m \cdot M_{\text{Cu}} \quad [\text{mg Cu/ml KMnO}_4]$$

Gdzie:

c_m – stężenie KMnO_4 [mol/L]

M_{Cu} – masa molowa miedzi [g/mol]

- wykorzystując obliczone miano miedziowe, obliczyć liczbę miligramów miedzi odpowiadającą zużytej do miareczkowania objętości KMnO_4 ;
- korzystając z zamieszczonej poniżej Tabeli 3 przeliczyć obliczoną liczbę miligramów miedzi na równoważną jej ilość miligramów sacharydu inwertowanego (zawartego w próbce pobranej do oznaczenia)'
- uwzględniając zastosowane rozcieńczenia, obliczyć zawartość „cukrów ogółem”, a wynik wyrazić w g/100 ml.

Tabela 3. Ilość miedzi zredukowanej i odpowiadające jej ilości sacharydu inwertowanego w metodzie Bertranda (Małecka Maria, Wybrane metody analizy żywności, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003)

Ilość zredukowanej miedzi przez sacharydy [mg]	Ilość sacharydu inwertowanego [mg]
20	9,70
21	10,20
22	10,70
23	11,20
24	11,70
25	12,20
26	12,71
27	13,22
28	13,72
29	14,23
30	14,73



Analiza Żywności

5. Oznaczanie zawartości „cukrów ogółem” w cukierkach twardych metodą Bertranda

3. Literatura:

- Sikorski Zdzisław E.(red.), Chemia żywności, wyd. 4, WNT, Warszawa, 2002.
- Klepacka Mirosława (red.), Analiza Żywności, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005.
- Małecka Maria (red.), Wybrane metody analizy żywności, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003.
- Krełowska-Kułas Maria, Badanie jakości produktów spożywczych, PWE, Warszawa 1993.
- Harold Hart, Leslie E. Racine, David J. Hart, Chemia Organiczna Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1999.
- Kłyszajko-Stefanowicz Leokadia (red.), Ćwiczenia z Biochemii, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.

4. Informacje dodatkowe

Zakres informacji, które student powinien umieć, aby móc uczestniczyć w zajęciach:

- struktura i podział sacharydów
- właściwości fizykochemiczne sacharydów i reakcje oraz przemiany jakim ulegają
- funkcje sacharydów
- występowanie sacharydów w żywności
- metody oznaczania sacharydów
- zasada metody Bertranda

Przydatna literatura:

- Literatura spisana w Rozdziale 3.