



Uniwersytet
Gdański



Katedra Analizy Środowiska

**Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych
z Analizy Żywności**

Ćwiczenie 6

Oznaczanie zawartości kwasu benzoowego i kwasu sorbowego
w napoju bezalkoholowym



1. Wprowadzenie

Dodatki do żywności stosuje się w celu podniesienia jej walorów smakowych, zwiększenia trwałości, ułatwienia procesów wytwarzania, a niejednokrotnie zwiększenia atrakcyjności wyglądu zewnętrznego. Termin „dodatek do żywności” w języku polskim ma szersze znaczenie niż w języku angielskim, w którym odpowiadają mu pojęcia: *food additive*, *food ingredient* oraz *food constituent*. W systemie prawnym Unii Europejskiej uczyniono bardzo wiele w celu uporządkowania terminologii różnych gałęzi gospodarki, jednak w tym przypadku napotkano na poważne trudności; w uproszczony sposób można przyjąć:

- ***food constituent*** (składnik naturalny) jest to składnik produktu żywnościowego, który występuje w jego pierwotnym (naturalnym) składzie, np. skrobia jako składnik ziemniaka,
- ***food ingredient*** (dodatek uzupełniający) jest to substancja wprowadzana do żywności, która staje się częścią składową produktu – np. mączka (skrobia) ziemniaczana dodana do pieczywa,
- ***food additive*** (dodatek technologiczny – funkcjonalny) jest to substancja, którą wprowadza się do żywności w celach technologicznych, w tym organoleptycznych, zazwyczaj sama niespożywana jako żywność i niestosowana jako typowy jej składnik. Tę grupę dodatków objęto ścisłą kontrolą, a poszczególne dodatki aprobowane przez komisję FAO/WHO oznaczono symbolem E.

1.1. Kategorie dodatków do żywności

Większość produktów żywnościowych dostępnych w obrocie handlowym zawiera dodatki do żywności, które są stosowane w celu:

- przedłużenia trwałości produktów, a więc ograniczenia lub zapobiegania niekorzystnym zmianom powodowanym przez drobnoustroje, enzymy tkankowe oraz abiotyczne procesy degradacyjne, np. utlenianie;
- zapobiegania niekorzystnym zmianom jakościowym powodującym zmiany barwy, smaku, zapachu, konsystencji,
- zwiększenia atrakcyjności konsumenckiej oraz ułatwienia stosowania lub wykorzystania produktu,
- ochrony składników odżywczych produktu (np.: witamin zwykle ulegającym szybkiej degradacji),
- utrzymania stałej i powtarzalnej jakości produktu,



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

- ułatwienia prowadzenia procesów produkcyjnych oraz zwiększania ich efektywności przez np.: zmniejszenie ubytków, energochłonności lub zwiększenie wydajności,
- otrzymywania nowych produktów, w tym dietetycznych np.: żywność o zmniejszonej lub zwiększonej kaloryczności (energii), zawartości cukru, białka, glutenu itd.

Technologiczną klasyfikację dodatków do żywności można uszeregować w czterech zasadniczych grupach, a w nich poszczególne kategorie zgodnie z określeniem funkcji przyjętych przez Unię Europejską (Tabela 1).

Tabela 1. Kategorie dodatków do żywności (wg Dyrektywy 89/10/EEC)

Zapobiegające zepsuciu	Sensoryczne	Teksturotwórcze	Pomocnicze
<ul style="list-style-type: none">– Konserwanty– Kwasy– Bufory– Przeciwutleniacze– Sekwestranty (synergenty)– Stabilizatory– Gazy (atmosfera kontrolowana)	<ul style="list-style-type: none">– Barwniki– Substancje nabłyszczające– Regulatory kwasowości– Słodziki– Wzmacniacze smaku– Aromaty	<ul style="list-style-type: none">– Emulgatory– Substancje przeciwzbrylające– Skrobie modyfikowane– Stabilizatory– Zagęszczacze– Zwiększające masę– Zwilżające– Żelujące	<ul style="list-style-type: none">– Enzymy– Gazy wypierające– Polepszacze mąki– Substancje pianotwórcze– Substancje przeciwpięniące– Rozpuszczalniki

1.1.1. Dodatki zapobiegające psuciu żywności

Dodatki, które zapobiegają zepsuciu się żywności można podzielić na dwie zasadnicze grupy o zupełnie innym charakterze działania, a mianowicie na substancje, które zapobiegają zmianom powodowanym przez:

- *Drobnoustroje* – konserwanty i kwasy;
- *Tlen z powietrza* – przeciwutleniacze (antyoksydanty) i synergenty (Tabela 2.).

Tabela 2. Dodatki zapobiegające psuciu się żywności

Czynnik powodujący zmiany	Rodzaj dodatku	Funkcja dodatku
Drobnoustroje	Kwasy	Obniżenie pH, hamowanie rozwoju drobnoustrojów i aktywności enzymów
	Konserwanty	Inaktywacja enzymów drobnoustrojów
Tlen z powietrza	Przeciwutleniacze	Zapobieganie tworzeniu nadtlenków
	Synergenty	Wspomaganie przeciwutleniaczy przez kompleksowanie metali

Konserwanty mają na celu zmniejszenie, względnie całkowite zahamowanie procesów biologicznych powodowanych działaniem mikroflory lub enzymów tkankowych, które są odpowiedzialne za psucie się lub obniżanie jakości żywności. Konserwanty wpływają na procesy biochemiczne komórki przez:

- zmianę przepuszczalności ścian komórkowych lub błon cytoplazmatycznych,
- ingerencję w mechanizm genetyczny, np.: przez jego uszkodzenie,
- inaktywację niektórych enzymów np.: przez redukcyjne działanie siarczanów(IV) na wiązania disulfidowe lub inaktywowanie składników niezbędnych do rozwoju drobnoustrojów, np.: witamin, aminokwasów.

Wśród konserwantów stosowanych do utrwalania żywności, można wyróżnić dwie zasadnicze grupy:

- **antyseptyki** – związki syntetyczne o prostej budowie, mogące mieć swoje odpowiedniki w przyrodzie, zwykle stosuje się je w ilości poniżej 0,2%;
- **antybiotyki** – związki o skomplikowanej budowie, działające w bardzo małych dawkach (od kilku do kilkuset ppm).

Efektywność działania konserwantu zależy od jego aktywności w stosunku do rodzaju drobnoustrojów, warunków środowiska, stężenia jonów wodorowych, temperatury, składu chemicznego produktów, obecności substancji zmniejszających aktywność wody. Szczególne znaczenie ma oddziaływanie pH środowiska: im niższe jest pH tym dodatki konserwujące o charakterze słabych kwasów lub soli słabych kwasów wykazują silniejsze działanie (najsilniej



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

działają w stanie niezdysoncjowanym, ze wzrostem pH wzrasta stopień ich dysoncjacji). Kwasy propionowy, sorbowy, octowy, hydroksybenzoesy są trwałe przy pH = 4,5 i niższym, natomiast powyżej pH 6 szybko ulegają dysoncjacji i zanika ich działanie konserwujące.

Efektywność działania poszczególnych środków konserwujących w stosunku do różnych grup drobnoustrojów jest różna. Najsilniejsze działanie bakteriobójcze i hamujące rozwój bakterii wykazują: azotany(III), siarczany(IV), kwas benzoesy i jego sole. Na grzyby pleśniowe i drożdże silnie działają; kwas sorbowy, kwas benzoesy oraz estry i sole sodowe i potasowe tych kwasów. Niektóre środki konserwujące wykazują wybiórcze działanie, np.: kwas propionowy i jego sole hamują rozwój *Bacillus subtilis*, który powoduje wady miękiszka chleba i pojawienie się obcego zapachu. Bardzo często do utrwalania produktu stosuje się dwa lub więcej dodatków, wykazujących efekt synergistyczny, dzięki czemu przy mniejszych dawkach poszczególnych konserwantów uzyskuje się podobny efekt. Konserwant przeznaczony do utrwalania żywności powinien:

- być nietoksyczny,
- łatwo ulegać metabolizmowi w organizmie człowieka i nie odkładać się w tkance tłuszczowej
- cechować się niezawodnością działania i szerokim spektrum hamowania bakterii, drożdży i pleśni,
- być rozpuszczalny w wodzie (drobnoustroje rozwijają się w fazie wodnej produktu),
- być obojętny chemicznie wobec innych składników żywności,
- nie wpływać na cechy organoleptyczne produktu,
- być trwały i odporny na procesy technologiczne, którym jest poddawany produkt,
- być tani.

W Tabeli 3 przedstawiono krótką charakterystykę wybranych konserwantów dopuszczonych do stosowania w Polsce.

Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

Tabela 3. Charakterystyka wybranych konserwantów dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa	Właściwości	Metabolizm w organizmie człowieka, działanie na organizm	ADI
Kwas benzooesowy (E 210)	<ul style="list-style-type: none"> • Białe kryształy, bez zapachu, słabo rozpuszczalny w wodzie, dobrze rozpuszczalny w etanolu i eterze; • w środowisku kwaśnym (pH 3-4,5) hamuje rozwój pleśni, mniej skuteczny wobec bakterii; • jego działanie wspomaga obecność dwutlenku siarki, soli, cukru oraz kwasu sorbowego i jego soli 	<ul style="list-style-type: none"> • W przewodzie pokarmowym wchłania się szybko i jest wydalany z moczem, głównie w postaci kwasu hipurowego lub benzoiloglukoronidu, a częściowo w postaci wolnej; • W większych dawkach może wywołać objawy zatrucia (wymioty, bóle głowy, alergię, uczucie drapania w gardle, podrażnienia nabłonka zakwaszenie organizmu 	0 – 5
Kwas sorbowy (E 200)	<ul style="list-style-type: none"> • Bezbarwne kryształy lub biały proszek o słabym zapachu i lekko kwaśnym smaku; dobrze rozpuszczalny w gorącej wodzie, etanolu i oleju; • hamuje rozwój pleśni i drożdży (pH 3-6); • obecność soli kuchennej, cukru, kwasu propionowego, nizyny i fosforanów zwiększa jego działanie konserwujące. 	<ul style="list-style-type: none"> • W organizmie człowieka ulega procesowi β oksydacji, typowej dla kwasów tłuszczowych; • Jeden z bezpieczniejszych środków konserwujących, uznany za nietoksyczny dla organizmu człowieka. 	0 – 25
Estry kwasu <i>p</i> -hydroksybenzooesowego: -etylowy (E214) -propylowy (E216) -metylowy (E218)	<ul style="list-style-type: none"> • Kryształy lub biały proszek, bez zapachu, trudno rozpuszczalne w wodzie, dobrze w etanolu; • hamują rozwój pleśni, bakterii i drożdży (pH 3-6); • odporne na działanie tlenu z powietrza oraz niskie i wysokie temperatury stosowane w przetwórstwie. 	<ul style="list-style-type: none"> • Wchłaniają się szybko, ulegają hydrolizie w jelicie cienkim i są wydalane z moczem w postaci niezmienionej lub w połączeniu z kwasem glukuronowym; • Mogą powodować miejscowe znieczulenie błony śluzowej jamy ustnej. 	0 – 10
Ditlenek siarki (E 220)	<ul style="list-style-type: none"> • Bezbarwny, drażniący gaz, rozpuszczalny w wodzie i etanolu; skutecznie działa na bakterie i pleśń, słabiej na drożdże (pH 1-6); • posiada właściwości odkażające, wybielające, hamuje aktywność enzymów oksydoredukcyjnych (stabilizacja witaminy C); • zapobiega enzymatycznemu i nieenzymatycznemu brunatnieniu oraz tworzeniu się nitrozoamin. 	<ul style="list-style-type: none"> • Może powodować podrażnienia przewodu pokarmowego oraz reakcje alergiczne; • długotrwałe przyjmowanie, nawet w małych dawkach, obniża odporność organizmu 	0 – 0,7
Nizyna (E 234)	<ul style="list-style-type: none"> • Antybiotyk o charakterze polipeptydu, wytwarzany przez szczepy bakterii kwasu mlekowego; • nie jest stosowana w lecznictwie, jest skuteczna tylko wobec bakterii Gram-dodatnich; • przeciwdziała fermentacji masłowej w serach 	<ul style="list-style-type: none"> • Jest całkowicie rozkładana przez trypsynę. • Jest bezpiecznym związkiem, w badaniach na zwierzętach nie stwierdzono wpływu na mikroflorę przewodu pokarmowego i działania alergicznego 	0 – 33 tys.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

<p>Azotany (III): -azotan potasu (E249) -azotan sodu (E250)</p> <p>Azotany (V): -azotan sodu (E251) -azotan potasu (E252)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Białe lub żółtawe kryształy, dobrze rozpuszczalne w wodzie; w połączeniu z solą i cukrem stanowią składnik mieszanek peklujących. • Azotany (III) zapobiegają rozwojowi bakterii beztlenowych, a w szczególności laseczek zgorzeli (<i>Clostridium perfringens</i>) oraz <i>Clostridium botulinum</i>, wytwarzającego silną toksynę – jad kielbasiany; • działanie antybakteryjne azotanów (V) jest słabe i występuje dopiero po ich redukcji do azotanów (III). 	<ul style="list-style-type: none"> • W przewodzie pokarmowym azotany (III) mogą powodować nitrozowanie, dając <i>N</i>-nitrozozwiązki o silnym działaniu rakotwórczym; • przenikają przez barierę krew-łożysko i wykazują działanie teratogenne; • u małych dzieci mogą powodować hemoglobinemię – zaburzenia w wymianie tlenowej krwi. 	<p>5</p> <p>0,2</p>
---	--	--	---------------------

*ADI [mg/kg masy ciała] – dopuszczalne dzienne pobranie substancji konserwujących przez człowieka, ang. *Acceptable Daily Intake*)

Zakres stosowania konserwantów jest stopniowo ograniczany przez rozwój fizycznych metod utrwalania, np.: niskie temperatury, naświetlanie nadfioletem, atmosfera kontrolowana, sterylizacja, stosowanie technologii aseptycznych oraz wprowadzenie procedur analizy zagrożeń i końcowej kontroli jakości **HACCP** (ang. *Hazard Analysis and Critical Control Point*), które mają na celu zapewnienie czystości higienicznej produktów spożywczych przeznaczonych dla konsumentów. HACCP jest systemowym postępowaniem mającym na celu identyfikację i oszacowanie skali zagrożeń bezpieczeństwa żywności, z punktu widzenia jej jakości zdrowotnej oraz ryzyka wystąpienia tych zagrożeń podczas przebiegu wszystkich etapów produkcji i dystrybucji.

Przeciwutleniacze służą do zapobiegania procesom utleniania pod wpływem tlenu z powietrza w dwóch procesach oksydacyjnych:

- *utlenianiu tłuszczów* – proces zwany potocznie jełczeniem, jest główną przyczyną psucia się produktów tłuszczowych (smalec, olej) oraz żywności o silnie rozwiniętej powierzchni, pomimo niewielkiej zawartości tłuszczu, np.: mąka i proszek mleczny,
- *utlenianiu substancji nietłuszczowych* – mogą mieć charakter reakcji nieenzymatycznych lub przebiegać przy udziale enzymów (oksydazy o-fenolowej i askorbinooksydazy); temu zjawisku zapobiega się, stosując termiczną inaktywację enzymów (np.: blanszowanie owoców i warzyw) lub niektóre przeciwutleniacze – szczególnie kwas L-askorbinowy i jego sole oraz tokoferole.

W celu zahamowania procesu utleniania się składników żywności w praktyce stosuje się różne zabiegi, np.: pakowanie produktów pod próżnią, w atmosferze gazu obojętnego (azotu). Dla wielu produktów jest to niewystarczające i w tych przypadkach zapobiega się utlenieniu, stosując dodatki przeciwutleniaczy naturalnych lub syntetycznych bądź synergentów.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

Przeciwutleniacze syntetyczne to przede wszystkim estry: propylowy (E 310), oktylowy (E 311) i dodecylowy (E 312) kwasu galusowego oraz BHA czyli butylo-hydroksyanizol (E319) i BHT butylo-hydrokso-toluen (E 320). Używane są do utrwalania tłuszczów smażalniczych oraz utrwalenia smażonego produktu na zasadzie efektu „przeniesienia” (ang. *carry through*) działania przeciwutleniacza z oleju smażalniczego na smażony produkt (szczególnie znaczenie przy produkcji, np.: chipsów, frytek, pączków).

Przeciwutleniacze naturalne to występujące w olejach roślinnych tokoferole (E 306) – najaktywniejsze działanie przeciwutleniające wykazuje δ -tokoferol (E 308). W przyrodzie ich obecność zapobiega nie tylko jęlczeniu nienasyconych kwasów tłuszczowych, chroni również przed utlenieniem inne substancje np. związki aromatyczne. Do naturalnych przeciwutleniaczy zalicza się także flawonoidy i fenylokwas, które występują w owocach, liściach, nasionach, przyprawach (szałwia, rozmaryn, oregano, tymianek). Próby zastępowania przeciwutleniaczy syntetycznych naturalnymi nie znalazły dotychczas większego zastosowania. Zwiększenie aktywności wielu przeciwutleniaczy uzyskuje się przez współdziałanie synergiczne dwóch i więcej związków np.: kwas L-askorbinowy + tokoferole. Substancje o charakterze przeciwutleniającym mogą powstawać również w czasie procesów przetwórczych, np.: polifenole powstające w procesie wędzenia, S-nitrozocysteina powstająca podczas peklowania oraz produkty nieenzymatycznego brunatnienia, które tworzą się w wyniku reakcji Maillarda. Reakcja Maillarda nie jest reakcją pojedynczą, lecz ich złożoną serią pomiędzy aminokwasami i cukrami redukującymi, zwykle zachodzącą w podwyższonej temperaturze. Grupa karbonylowa węglowodanu reaguje z grupą aminową aminokwasu, tworząc wodę i związki typu N-podstawionej glukozyloaminy, która następnie, w warunkach reakcji, rozpada się do mniejszych cząsteczek, zawierających reaktywne ugrupowanie O=CC-N. Atomy azotu i węgla karbonylowego tych cząsteczek mogą się następnie wzajemnie sprzęgać, tworząc związki heterocykliczne, np. pirazyny z wbudowanym atomem azotem, najczęściej obdarzone intensywnym, zapachem, charakterystycznym dla krakersów, chleba, orzeszków lub sera.

Synergenty wspomagają i przedłużają działanie przeciwutleniaczy. Ich rola polega na aktywowaniu funkcji przeciwutleniacza i kompleksowaniu jonów metali ciężkich, które katalizują procesy utleniania. Synergenty tworzą trwałe kompleksy z jonami metali, tzw. chelaty. Najważniejsze z nich to wersenian wapniowo-sodowy EDTA (E 385), kwasy: cytrynowy, winowy, jabłkowy oraz difosforany (V), aminokwasy i peptydy.



6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

1.1.2. Dodatki kształtujące cechy sensoryczne

Opinię konsumenta o produkcie kształtują jego cechy wizualne, a więc forma i barwa, jednak na ostateczną ocenę wpływa przede wszystkim smak, zapach i tekstura użytkowa. Obecnie, bardzo popularne stało się stosowanie dodatków barwiących i smakowo-zapachowych, które wpływają na atrakcyjność różnorodnych produktów żywnościowych. Istotnym postępowaniem w tej grupie dodatków jest stosowanie, w coraz większym stopniu, do ich wyrobu surowców naturalnych oraz synteza dodatków, których właściwości są identyczne z naturalnymi.

Barwniki. Barwa zachęca lub zniechęca do spożycia, sugeruje odczucie pewnych smaków i zapachów, ostrzega przed spożyciem produktu zepsutego. żywność barwi się w celu:

- nadania barwy produktom bezbarwnym, np.: napoje orzeźwiające,
- nadania lub wzmocnienia barwy produktów, np.: cukierki, napoje, desery,
- odtworzenia pierwotnej barwy, gdy nastąpiła degradacja barwników podczas
- przerobu, np.: kompoty,
- wyrównania i zapewnienia takiej samej barwy wszystkim partiom produktu, np.: sosy,
- nadania intensywnej barwy produktom przeznaczonym do rozcieńczenia, np.: syropy,
- zaprawy owocowe do jogurtów

Do produktów, których nie wolno barwić należą: żywność nieprzetworzona, woda, chleb, soki owocowe, dżemy, mleko, śmietana, twaróg, sery, olej, mięso i ryby, przetwory z jaj, kakao,

- czekolada, kawa, herbata, miód. Do barwienia stosuje się:
- barwiące części roślin jadalnych,
- barwniki organiczne naturalne,
- barwniki organiczne syntetyczne identyczne z naturalnymi,
- barwniki organiczne syntetyczne,
- barwniki nieorganiczne (pigmenty).

Barwniki naturalne. Największą akceptacją konsumentów cieszą się barwniki naturalne roślinne: karotenoidy otrzymywane z nasion drzewa tropikalnego, suszonej marchwi, niektórych glonów morskich lub skórki owoców cytrusowych; flawonoidy otrzymywane z wyciągu czerwonych winogron, czarnych porzeczek, żurawin, aronii lub czarnego bzu; betalainy otrzymywane z soku buraka ćwikłowego; porfiryny (chlorofile) otrzymywane z zielonych części roślin. Ze względu na budowę chemiczną barwniki występujące w naturze łatwo ulegają degradacji



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

(głównie reakcji utleniania) w czasie przetwarzania i przechowywania (działanie tlenu, światła, temperatury, pH), co ogranicza możliwość ich zastosowania w produktach trwałych. Większe zastosowanie znajdują preparaty barwników naturalnych oraz barwniki syntetyczne identyczne z naturalnymi z grupy karotenoidów i ksantofili. Preparaty barwników naturalnych występują jako roztwory wodne lub olejowe, emulsje, zawiesiny, preparaty suche lub na nośnikach (np. na maltodekstrynie) oraz mikrokapsułkowane. Do najważniejszych należą: kurkuma, koszenila, kompleksy miedziowe chlorofilu i chlorofiliny, anatto, betanina, kapsorubina, astaksantyna, luteinna i karmele. Barwniki otrzymane w procesie syntezy, identyczne z naturalnymi to: ryboflawina, β -karoten, kantaksantyna.

Syntetyczne barwniki organiczne. Do barwienia żywności stosuje się głównie związki mono i diazowe. Ich zaletą jest niska cena, trwałość i odporność na warunki środowiska oraz jednorodność chemiczna. Występują w postaci: proszku i granulatu (88 - 93 % czystego barwnika), past (4 - 10 % czystego barwnika), roztworów wodnych (1 - 6 % czystego barwnika). W zależności od budowy chemicznej sklasyfikowano je wg tzw. indeksu barwy. Do najczęściej stosowanych należą barwniki żółte i czerwone (tetrazyna, żółcień chinolinowa, azorubina, czerwień koszenilowa, czerwień Allura), rzadziej niebieskozielone (błękit patentowy, indygotyna, zieleń trwała) oraz brązowe i czarne. Wykorzystuje się je głównie w przemyśle cukierniczym, napojów orzeźwiających i alkoholowych, koncentratów spożywczych.

Barwniki nieorganiczne. Stosuje się je bardzo rzadko w barwieniu żywności, zwykle do powierzchniowego barwienia polew cukierniczych (węglan wapnia, ditlenek tytanu, tlenki żelaza, sadza) oraz nadawania efektów metalicznych (pył aluminium i srebra lub płatki złota).

1.1.3. Dodatki smakowo-zapachowe

Dodatki służące do wzmacniania lub nadawania określonego smaku i zapachu produktom żywnościowym mają różny charakter. Są to:

- przyprawy naturalne,
- aromaty naturalne i syntetyczne identyczne z naturalnymi,
- esencje spożywcze,
- aromaty syntetyczne,
- substancje wzmacniające smak,
- syntetyczne substancje słodzące.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

Przyprawy naturalne otrzymuje się z suszonych, jadalnych surowców roślinnych, głównie ziół (korzenie imbiru i selera, cebula i czosnek, liście majeranku i estragonu, kwiaty kaparów i szafranu, owoce papryki i kardamonu, nasiona kminku i kopru, kora cynamonu i wiele innych pochodzących głównie ze strefy krajów tropikalnych. Stosuje się je głównie w wyrobie drobno rozdrobnionych przetworów mięsnych, żywności orientalnej i barowej, koncentratów obiadowych, żywności niskotłuszczowej i wegetariańskiej.

Aromaty naturalne i syntetyczne identyczne z naturalnymi. Specyficznym dodatkiem smakowo-zapachowym jest koncentrat dymu wędzarniczego stosowany do aromatyzacji przetworów mięsnych i rybnych, serów, whisky i specjalnych gatunków piwa. Otrzymuje się go metodą suchej destylacji drewna (700 °C) i pirolizy drewna przegrzaną parą wodną. Kondensat dymu po usunięciu składników szkodliwych dla zdrowia jest ciekłą mieszaniną aromatycznych substancji smakowych głównie polifenoli (jest stosowany jako 2% emulsja lub 1% roztwór żelatyny przez rozpylenie w komorach wędzarniczych, zanurzenie lub natryskiwanie). Aromaty syntetyczne identyczne z naturalnymi otrzymuje się na drodze syntezy chemicznej, zwykle produktami takiej syntezy jest mieszanina izomerów (mieszanina racemiczna). Walory smakowe aromatów identycznych z naturalnymi są zbliżone do aromatów naturalnych, a ich dodatkową zaletą jest niska cena. Do tej grupy zalicza się również aromaty otrzymane metodami biotechnologicznymi, np.: z hodowli tkankowych, przez działanie enzymów na prekursorów aromatów lub otrzymywane przez wybrane szczepy drobnoustrojów z odpowiednio dobranych składników płynów hodowlanych, tzw. biosynteza *de novo*.

Esencje spożywcze są to aromaty naturalne lub ich mieszaniny z aromatami syntetycznymi w roztworze alkoholu etylowego lub oleju, stąd też wyróżniamy:

- esencje etanolowodne, np.: anyżowa, cytrynowa, ananasowa, wiśniowa czy pomarańczowa,
- oleoesencje, czyli esencje spożywcze w oleju roślinnym, np.: cytrynowa, arakowa lubrumowa.

Aromaty syntetyczne otrzymuje się na drodze syntezy organicznej lub biosyntezy. Wśród aromatów syntetycznych największą grupę stanowią alkohole, estry, aldehydy oraz izomery związków naturalnych (Tabela 4). Wiele z nich ma struktury terpenowe. Metodami biosyntezy uzyskano m.in. wanilinę, antranilan metylu, kwas 2-metylomasłowy. Zastosowanie aromatów syntetycznych w produkcji żywności wymaga zezwolenia służby zdrowia, wyjątkiem jest wanilina i etylowanilina.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

Tabela 4. Przykłady syntetycznych aromatów stosowanych do żywności

Związek chemiczny	Typ aromatu	Związek chemiczny	Typ aromatu
Aldehyd benzooesowy	Gorzkich migdałów	Maślan amylu	Bananowy
Benzoosan etylu	Anyzowy	Mrówczan izomyłu	Śliwkowy
Cykloheksanopropionian allilu	Poziomkowy	Mrówczan etylu	Rumowy
Furfural	Świeżego chleba	Octan izobutyłu	Ananasowy
Geraniol	Morelowy	Octan geranylu	Agrestowy
Kwas masłowy	Maślano-serowy	Izowalerian izoamylu	Jabłkowy

Syntetyczne substancje smakowe są to głównie zamienniki cukru, czyli tzw. słodziki i ich mieszanki o bardzo dużej intensywności słodzenia, które mają profil słodkości zbliżony do cukru. Są one pomocne przy tworzeniu żywności niskoenergetycznej (napoje orzeźwiające, jogurty, desery, lody, soki, przetwory owocowe, płatki śniadaniowe). Wrażenie słodkości produktów niskoenergetycznych (niskokalorycznych) uzyskuje się, stosując polihydroksylowe alkohole cukrowe zwane alditolami, których słodkość jest mniejsza od sacharozy np. często używany mannitol (E 965i) – ma słodkość 0,6-0,9 w stosunku do sacharozy (jest zwykle dodawany do napojów bezalkoholowych, ciast, wyrobów cukierniczych). Syntetyczne, gorzkie dodatki smakowe to pochodne chininy, stosowane w napojach typu „tonic”.

Substancje wzmacniające smak lub przedłużające czas trwania wrażeń smakowych nazywa się również wzmacniaczami smaku. Wiele z nich nie ma smaku, lub jest on słabo wyczuwalny. Przypisuje się im właściwości otwierania kubków (receptorów) smakowych języka. Są to głównie pochodne kwasu glutaminowego (E 620), nukleotydy kwasu guanylowego (E 626) i inozynowego (E 630) oraz rybonukleotydy (E 634), które dodane do potraw o pH 5-8, szczególnie mięsnych, rybnych, warzywnych oraz zup wzmacniają naturalną smakowitość, nadając jej specyficzny charakter tzw. umami. Wbrew powszechnemu przekonaniu odczuwamy nie cztery, a pięć smaków. Ten ostatni to umami - co z japońskiego tłumaczy się jako "dobry, pełny, mięsny". Bezpośrednio wykrywaną substancją jest jeden z aminokwasów - kwas glutaminowy, który obficie występuje w pokarmach bogatych w białko takich jak: mięso, potrawy sfermentowane i zleżale (sery parmezan, roquefort), wodorosty, sosy rybne i sojowe, a także pomidory, orzechy, winogrona, brokuły i grzyby. W kuchni azjatyckiej jako przyprawa odpowiadająca temu smakowi. jest wykorzystywany glutaminian sodu. Umami odkrył w 1908 r. Kikunae Ikeda z Cesarskiego Uniwersytetu w Tokio, a jego istnienie zostało potwierdzone w 2000 roku.



6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

1.1.4. Dodatki kształtujące cechy fizyczne żywności

Dodatki kształtujące cechy fizyczne żywności pełnią różne funkcje w technologii. Podstawowym celem ich stosowania jest uzyskanie optymalnej i trwałej tekstury produktu, co często wiąże się z uzyskaniem większej jego wydajności.

Substancje żelujące i zagęszczacze. Do tej grupy zaliczamy przede wszystkim hydrokoloidy (biopolimery) – związki o dużej masie cząsteczkowej, rozpuszczalne w wodzie lub tworzące w niej zawiesiny. Zwiększają lepkość roztworów lub tworzą żele, często wykazują również właściwości emulgujące i stabilizujące. W zależności od pochodzenia można je podzielić na:

→ naturalne:

- wydzieliny roślin, np.: guma arabska (E 414), tragakant (E 413), karaya (E 416), guar (E 412), tara (E 417),
- składniki roślin wyższych w postaci ekstraktu np.: pektyna (E 440) lub wyizolowanego składnika, np.: skrobia, mączka chleba świętojańskiego (E 410),
- składniki wodorostów, np.: agar (E 406), alginiany (E 401-405), karagen (E 407),
- produkty pochodzenia zwierzęcego, np. żelatyna,
- substancje wytwarzane przez drobnoustroje, np.: dekstran, ksantan, kurdlan.

→ surowce roślinne modyfikowane metodami chemicznymi i fizycznymi, jak np.: pochodne celulozy, pektyna amidowana, skrobie modyfikowane.

→ syntetyczne np.: poli-*N*-winylopirolidon (PVP).

Hydrokoloidy mają największe znaczenie w grupie dodatków strukturotwórczych. Dzięki dużej cząsteczce tworzą w układach wodnych trójwymiarową sieć, co powoduje zwiększenie lepkości roztworu, lepsze wiązanie wody, a w odpowiednim stężeniu tworzą żele lub gąbczastą masę. Hydrokoloidy (z wyjątkiem żelatyny) są pochodzenia roślinnego lub mikrobiologicznego i należą do polisacharydów. W zależności od budowy chemicznej i warunków tworzą żele o różnych właściwościach, np.: wysokometylowana pektyna w celu utworzenia prawidłowego żelu wymaga dużej zawartości substancji wiążącej wodę (sacharozy) i kwaśnego środowiska, natomiast niskometylowana pektyna i alginiany, tworzą żel w obecności jonów metali wielowartościowych, a karageny wymagają jonów potasowych. Zmieszanie dwóch lub więcej koloidów umożliwia uzyskanie układów o nowych właściwościach lub dzięki synergizmowi zwiększenie ich efektywności. Na przykład ksantyn oraz mączka chleba świętojańskiego same nie tworzą żeli, natomiast ich mieszanina tworzy żel, elastyczny i sprężysty, odporny na zrywanie. Na efekt



6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

działania hydrokoloidów duży wpływ mają również warunki procesu technologicznego: temperatura, sposób wprowadzania i kolejność rozpuszczania składników, obecność jonów metali. Dla uzyskania powtarzalności cech produktu konieczne jest przeprowadzanie poszczególnych czynności zawsze w ten sam sposób. Hydrokoloidy stosuje się niemal we wszystkich działach produkcji żywności, a szczególnie do wytwarzania deserów, budyniu, kisielu (żelowanie), zup i sosów w proszku (wiązanie wody), lepszego wiązania wody przez ciasto i nadawania lepszej struktury i trwałości pieczywa, wyrobu cukierków, galaretek, marmoladek, kremów, zapobiegania krystalizacji cukru w syropach i lodach, lepszego związania wody, nadania struktury przetworom i napojom owocowym oraz warzywnym, zapobieganie rozwarstwianiu się sosów, majonezów itp..

Emulgatory i stabilizatory. Emulgatory są to substancje powierzchniowo czynne, których cząsteczki mają grupy hydro- i lipofilowe. Są one absorbowane na granicy faz emulsji oleju i wody. Najbardziej typową emulsją, gdzie olej jest rozproszony w wodzie (o/w) jest majonez, a odwrotnie w margarynie czy maśle – woda jest rozproszona w fazie tłuszczowej (w/o). efektywność emulgatorów wspomagają stabilizatory, najczęściej są nimi hydrokoloidy, które, tworząc usieciowania w fazie wodnej, zapobiegają migracji fazy olejowej, jej zlewaniu i wydzielaniu się. Emulgatory są stosowane do wyrobu wielu produktów żywnościowych, jak np.: przetworów tłuszczowych, jogurtów, deserów, lodów, pieczywa, a nawet rozdrobnionych przetworów mięsnych. Najczęściej używanymi emulgatorami są mono- i diacyloglicerole (E471), estry mono- i diacylogliceroli z kwasami organicznymi, a z emulgatorów naturalnych – lecytyna.

1.1.5. Dodatki skrobiowe i białkowe

Oprócz typowych dodatków kształtujących cechy sensoryczne i fizyczne żywności duże znaczenie ma grupa dodatków o wszechstronnej użyteczności. Są to:

- skrobie modyfikowane chemicznie (E 1410 do 1451),
- preparaty z białek roślinnych i mlecznych,
- dodatki balastowe, zwane również wypełniaczami, związane z rozwojem produkcji żywności o obniżonej wartości energetycznej, pochodne skrobi i celulozy.

Ich wartość użytkowa zależy od charakteru surowca oraz rodzaju i stopnia modyfikacji. Stosuje się je w celu tworzenia odpowiedniej tekstury produktu i trwałego związania wody. Mają one również pośredni lub bezpośredni wpływ na podniesienie wartości odżywczej albo obniżenie wartości energetycznej żywności.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

Skrobie modyfikowane. W wyniku modyfikacji chemicznej skrobi ziemniaczanej lub kukurydzianej (depolimeryzacja kwasowa, utlenianie, sieciowanie, stabilizowanie przez estryfikację lub eteryfikację) otrzymuje się produkty o właściwościach podobnych do naturalnych hydrokoloidów. Powszechnie wykorzystuje się je w produkcji żywności ze względu na ich dużą odporność na degradację w środowisku kwaśnym (np. ketchup) oraz w czasie ogrzewania. Korzystne cechy fizyczne żeli i roztworów z dodatkiem skrobi modyfikowanych to odporność na zjawiska retrodegradacji i synerozy mrożonek. Do najczęściej stosowanych należą fosforany diskrobiowe, skrobie acetylowane, hydroksypropylowane i acetylowany adypinian diskrobiowy.

Preparaty białkowe o różnym stopniu oczyszczenia otrzymuje się z surowców roślinnych (soja) i zwierzęcych (mleko, ryby). Stosowanie preparatów białkowych w określonych produktach żywnościowych ma na celu:

- wzbogacanie produktów w białko, np.: chleba i żywności specjalnej,
- zapewnienie stałej i powtarzalnej jakości np.: smarowalność pasztetów,
- zmniejszenie strat technologicznych, np.: zmniejszenie ubytków termicznych wędlin oraz zwiększenie wydajności produktu,
- modelowanie składu i jakości produktów, np. obniżenie wartości energetycznej, zawartości tłuszczów (żywność dietetyczna),
- obniżenie kosztu wsadu surowcowego, np.: częściowe zastąpienie mięsa,
- wytwarzanie żywności przeznaczenia specjalnego, np.: odżywki dla niemowląt,
- żywność bezmleczna, preparaty odchudzające.

1.1.6. Dodatki o wartościach odżywczych

Dodatek witamin i soli mineralnych ma na celu przywrócenie poziomu składników istotnych dla racjonalnego żywienia utraconych podczas procesów przetwórczych. Natomiast zamierzone wzbogacanie żywności ma na celu zwiększenie zawartości składników istotnych w żywieniu człowieka lub nadanie substytutowi (np. margaryna), wartości odżywczej zbliżonej do substytutenta (np. masło).

Osobną grupę stanowią dodatki, których celem jest uzupełnienie lub wzbogacenie żywności w tzw. składniki deficytowe, bądź zwiększenie jej wartości odżywczej. Do tej grupy należy zaliczyć sole wapnia, potasu, magnezu, żelaza oraz witaminy, głównie A, B, C i D.

Zgodnie z regulacjami WHO ani witaminy, ani aminokwasy nie są traktowane jako dodatki sensu stricto. Wzbogacanie żywności tymi 'dodatkami' jest regulowane odrębnymi

Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

rozporządzeniami Ministra Zdrowia, a jej wytwarzanie odbywa się pod nadzorem władz sanitarnych. Dotyczy to szczególnie żywności tzw. prozdrowotnej, odżywek i żywności dietetycznej, w której dodatki wzbogacające stosuje się w celu pokrycia ich wzmożonego zapotrzebowania przez określone grupy konsumentów (dzieci, sportowcy, ludzie starsi).

Oprócz typowych ‘dodatków wzbogacających’ powstaje nowa grupa dodatków modyfikujących skład produktu w celu kształtowania jego zdrowotnych cech użytkowych. Są to dodatki obniżające wartość energetyczną produktu tzw. substancje balastowe, które wykorzystuje się w celu produkcji wyrobów dających odczucie sytości. Do tej grupy dodatków można zaliczyć dodatki modyfikujące skład żywności: preparaty białka mleka lub białka roślinnego w celu wzbogacenia produktu w białko czy zastąpienia glutenu w odżywkach; preparaty sojowe w żywności wegetarian, czy osób nietolerujących białka mleka.

1.1.7. Dodatki ułatwiające wyrób żywności

Dodatki ułatwiające wyrób żywności (zwane pomocniczymi dodatkami przetwórstwa) to niektóre substancje używane w celu ułatwienia przebiegu procesów przetwórczych lub wspomagające procesy technologiczne. W końcowych etapach przetwórstwa usuwa się je i nie występują jako składnik w gotowym produkcie (Tabela 5).

Tabela 5. Dodatki pomocnicze i ułatwiające wyrób

Rodzaj dodatku	Funkcja dodatku
Preparaty enzymatyczne	Przyspieszają określone substancje biochemiczne
Polepszacze mąki	dodane do mąki lub ciasta polepszają ich jakość wypiekową
Spulchniacze	mieszaniny uwalniając CO ₂ , powodują zwiększenie objętości ciasta
Nośniki	rozpuszczają, rozcieńczają, dyspergują dodatki w celu ułatwienia ich stosowania
Rozpuszczalniki	ciekle lub gazowe służą do rozpuszczania
Gazy obojętne	tworzą atmosferę kontrolowaną w opakowaniach jednostkowych lub pomieszczeniach składowania żywności
Gazy wypierające	ułatwiają wypchnięcie ciekłego artykułu spożywczego z pojemnika i powodują uzyskanie odpowiedniej konsystencji (np. piana)
Substancje klarujące i filtrujące	oddzielają lub ułatwiają sedymentację bądź oddzielanie zawiesin występujących w cieczach (soki, wina, oleje)



6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

1.2. Ocena toksykologiczna dodatków

W pierwszej połowie XX wieku, a szczególnie w latach międzywojennych podjęto pierwsze próby uregulowań prawnych dotyczących stosowania dodatków do żywności, korzystając z ówczesnego stanu badań toksykologicznych. Decydujące znaczenie w kształtowaniu bezpiecznej żywności miało ustanowienie wspólnej komisji FAO/WHO, która w latach pięćdziesiątych XX wieku ustaliła metody toksykologicznej oceny składników żywności i metody określania wartości dopuszczalnego dziennego pobrania substancji konserwujących przez człowieka ADI (ang. *Acceptable Daily Intake*). ADI jest to taka ilość substancji, która zgodnie z aktualnym stanem wiedzy może być pobierana przez całe życie, prawdopodobnie bez szkody dla zdrowia. Dawka ta wyrażana jest w mg na kg masy ciała człowieka na dobę (mg/kg m.c./dobę). Przy hipotetycznym ustalaniu wartości ADI jako wartość wyjściową, przyjmuje się maksymalną dawkę, która nie spowodowała jakichkolwiek zmian w czasie toksycznej ekspozycji przewlekłej (chronicznej) (badania najczęściej prowadzone na szczurach). Dzieli się ją przez 10, jako współczynnik bezpieczeństwa ekstrapolowania wyników ze zwierzęcia na człowieka i ponownie przez 10, aby uwzględnić wrażliwość poszczególnych osób (chorzy, kobiety ciężarne, dzieci). Określone wartości ADI mają duży margines bezpieczeństwa.

Badania toksykologiczne dodatków do żywności są kosztowne i długotrwałe. Proste badania toksykologiczne (toksyczność ostra), są prowadzone na hodowlach linii komórkowych oraz specjalnie do tego celu selekcjonowanych zwierzętach doświadczalnych, głównie szczurach. W kolejnym etapie badań eksperyment jest prowadzony porównawczo na kilku gatunkach zwierząt. Już badając toksyczność przewlekłą w teście 90-dniowym, wykorzystuje się szczury i psy. Szczególnie długotrwałe są badania toksyczności przewlekłej, mutagenności, teratogenności i rakotwórczości, które wymagają prowadzenia eksperymentu ponad 18 miesięcy na myszach, 30 miesięcy na szczurach i 12 miesięcy na psach. Toksyczność reprodukcyjną bada się na płodach królików i prowadzi testy na wielu generacjach szczurów. Jednocześnie z obserwacjami zachowania się zwierząt są wykonywane badania przemiany materii (np. odkładanie badanej substancji w organizmie, charakter powstających produktów rozpadu).

W Polsce wykaz dopuszczonych środków konserwujących jest zawarty w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 17 marca 2003 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych, substancji pomagających w przetwarzaniu i warunków ich stosowania (Dz. U. nr 87/2003, poz. 805). W rozporządzeniu tym konserwanty są wymienione w grupie: Warunkowo dozwolone konserwanty i przeciwutleniacze. Grupa ta obejmuje 35 substancji, dla których określono środki



6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

spożywcze, w których mogą być stosowane i dopuszczalne dawki. Została ona podzielona na 4 podgrupy:

- Sorbiniany, benzoesany i para-hydroksybenzoesany.
- Ditlenek siarki i siarczany(IV).
- Inne konserwanty, dla których określono maksymalną dawkę w środku spożywczym, np.: bifenyl, difenyl, nizyna, natamycyna, dimetylodiwęglan, kwas borowy i jego sól, kwas propionowy i jego sole, lizozym.
- Inne konserwanty, dla których określa się ilości wprowadzone w procesie produkcji oraz ich pozostałości w środku spożywczym: azotan(III) sodu i potasu oraz azotan(V) sodu i potasu.

1.3. Metody oznaczania zawartości substancji konserwujących

1.3.1. Metody spektrofotometryczne

Zasada oznaczenia polega na ekstrakcji kwasu benzooesowego z próbki przy użyciu eteru etylowego, reekstrakcji alkalicznej, oczyszczeniu przez utlenianie zakwaszonym roztworem dichromianu potasu i oznaczeniu spektrofotometrycznym oczyszczonego kwasu przy długościach fali: 267 nm, 272 nm, 276 nm. Kwas sorbowy oddestylowuje się z parą wodną i oznacza jego zawartość w destylacie spektrofotometrycznie, przy długości fali 256 nm.

1.3.2. Metody kolorymetryczne

Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego metodą miareczkową polega na ekstrakcji kwasu zawartego w próbce chloroformem, odparowaniu rozpuszczalnika, rozpuszczeniu pozostałości w alkoholu etylowym i miareczkowaniu alkoholowego roztworu kwasu benzooesowego roztworem NaOH w obecności fenoloftaleiny.

1.3.3. Metody chromatograficzne

Obecnie w analizie substancji konserwujących coraz bardziej popularne stają się metody chromatograficzne. Do rozdzielenia i identyfikacji mieszaniny konserwantów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosuje się kolumny z odwróconymi fazami (RP C18), a jako eluentów można użyć np.: mieszaniny metanol/ bufor octanu amonu o pH 4,6; mieszaniny woda/metanol/kwas octowy itp.

Do oznaczania metodą chromatografii gazowej kwasy: sorbowy, benzoesowy i salicylowy metyluje się, gdyż estry metylowe tych kwasów są bardziej lotne niż wolne kwasy.



2. Część eksperymentalna

2.1. Cel ćwiczenia

Ćwiczenie polega na wykrywaniu i oznaczaniu zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

2.2. Odczynniki, akcesoria laboratoryjne i aparatura

a) Odczynniki:

- roztwór wzorcowy kwasu benzooesowego w chloroformie ($c = 200 \mu\text{g/ml}$) – 10 ml
- roztwór wzorcowy kwasu sorbowego w chloroformie ($c = 200 \mu\text{g/ml}$) – 10 ml
- roztwór wzorcowy kwasu dekanowego w chloroformie ($c = 200 \mu\text{g/ml}$) – 10 ml
- BSTFA (*N,O*-Bis(trimetylosililo)trifluoroacetamidu) – 1 ml
- chloroform, cz.d.a. – 100 ml
- NaCl, krystaliczny – 200 g
- nasycony roztwór NaCl – 500 ml
- 10 % wodny roztwór HCl – 500 ml
- bezwodny siarczan sodu – 100 g
- fenoloftaleina, roztwór 1% – 50 ml
- papierek wskaźnikowy
- chloroform do mycia strzykawek – 25 ml

b) Akcesoria laboratoryjne:

- cylinder miarowy 25 ml – 2 szt.
- cylinder miarowy 50 ml – 1 szt.
- cylinder miarowy 250 ml – 2 szt.
- kolba miarowa 250 ml – 2 szt.
- łyżka – 1 szt.
- kolba stożkowa 250 ml – 4 szt.
- kolba miarowa 250 ml – 2 szt.
- kolba „sercówka”, 150 ml – 2 szt.
- pipeta szklana 1 ml – 4 szt.
- pipeta szklana 10 ml – 2 szt.
- pipeta Pasteura – 10 szt.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

- lejek duży – 4 szt.
- sącdek, 12 cm – 4 szt.
- rozdzielacz, 250 ml – 2 szt.
- strzykawka do GC, 10 μ l – 1 szt.
- strzykawka do GC, 100 μ l – 1 szt.

c) Aparatura analityczna

Chromatograf gazowy Shimadzu GC-2025 (Shimadzu, Kyoto, Japonia) z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym wyposażony w kolumnę kapilarną RTX 5, 30 m, 0,25 mm średnica wewnętrzna, 0,25 μ m grubość filmu fazy ciekłej (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

2.3. Wykonanie ćwiczenia

2.3.1. Ekstrakcja kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego z napoju bezalkoholowego

Pobrać 2 ml próbki napoju, przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 ml. Dodać 30 g krystalicznego chlorku sodu, po wymieszaniu lekko zalkalizować roztwór 10 % roztworem NaOH (wobec fenoloftaleiny), uzupełnić do kreski nasyconym roztworem chlorku sodu i wymieszać. Następnie zawartość kolby przesączyć przez sącdek do kolby stożkowej o pojemności 250 ml. 150 ml przesącza przenieść do rozdzielacza, zobojętnić 10 % roztworem kwasu solnego wobec papierka lakmusowego i dodać jeszcze 5 ml 10 % roztworu kwasu solnego. Do zakwaszonego roztworu w rozdzielaczu dodać 0,5 ml roztworu kwasu dekanowego (wzorzec wewnętrzny) o stężeniu 200 μ g/ml, a następnie dodać 30 ml chloroformu i wytrząsać. Klarowną, dokładnie oddzieloną warstwę chloroformową przenieść do kolby stożkowej o objętości 250 ml. Procedurę ekstrakcji wykonać jeszcze dwukrotnie, używając każdorazowo po 30 ml chloroformu. Połączone ekstrakty chloroformowe osuszyć za pomocą bezwodnego siarczanu sodu (dodawać, aż przestanie się zbrylać). Osuszony ekstrakt przesączyć przez sącdek do kolby „sercówki”, a następnie odparować chloroform na wyparce rotacyjnej w temperaturze łaźni wodnej 35 °C. Suchą pozostałość przenieść do buteleczki zakręcannej o objętości 4 ml (używając do tego celu maksymalnie 4 ml chloroformu (porcjami)), a następnie odparować rozpuszczalnik do sucha pod strumieniem azotu. Uzyskaną w ten sposób próbkę zawierającą kwas benzooesowy i kwas sorbowy poddać reakcji derywatywacji zgodnie z procedurą opisaną w Rozdziale 2.3.3.



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

2.3.2. Przygotowanie próbek wzorcowych

Przygotuj próbki zawierające pojedyncze substancje oraz mieszaninę wzorcowego kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego (anality) oraz kwasu dekanowego (wzorzec wewnętrzny). W przypadku pojedynczych substancji przenieś po 0,5 ml analitu i wzorca wewnętrznego (każdy o stężeniu 200 µg/ml) do osobnych butelek zakręcanych o objętości 4 ml. Z kolei, aby przygotować mieszaniny obu substancji, umieść po 0,5 ml każdej z nich (o stężeniu 200 µg/ml) w jednej buteleczce. Następnie próbki odparuj do sucha pod strumieniem azotu, a suchą pozostałość poddaj reakcji derywatywacji opisanej w Rozdziale 2.3.3.

2.3.3. Derywatywacja kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego

Do próbek uzyskanych zgodnie z procedurami w Rozdziale 2.3.1 oraz 2.3.2 dodać 100 µl BSTFA, zamknąć naczynie, uszczelnić taśmą teflonową, po czym umieścić na 10 minut w bloczku grzejnym, w temperaturze 80 °C. Po tym czasie przeprowadzić analizę za pomocą techniki GC-FID (Rozdział 2.3.4).

2.3.4. Analiza pochodnych siliłowych techniką GC-FID

Próbki zawierające pochodną siliłową kwasu benzooesowego otrzymaną zgodnie z procedurą w Rozdziale 2.3.3 poddać analizie za pomocą techniki GC-FID zgodnie z warunkami:

- Chromatograf gazowy z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (Rozdział 2.2, podpunkt c)
- Kolumna kapilarna RTX-5 (Rozdział 2.2, podpunkt c)
- Temperatura dozownika: 220 °C
- Temperatura detektora: 220 °C
- Program temperaturowy: od 100 °C do 180 °C, z narostem 5 °C/min
- Gaz nośny: argon
- Przepływ gazu nośnego: 1 ml/min
- Objętość nastrzyku: 1 µl

2.4. Opracowanie wyników

- Wykorzystując czasy retencji uzyskane w wyniku analizy pojedynczych substancji wzorcowych zidentyfikować kwas benzooesowy, kwas sorbowy oraz wzorzec wewnętrzny na chromatogramach uzyskanych w wyniku analizy ekstraktu z napoju oraz mieszaniny substancji wzorcowych;

Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

- wykorzystując wyniki uzyskane dla mieszaniny substancji wzorcowych wyznaczyć współczynnik odpowiedzi (f) dla kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego, zgodnie ze wzorem:

$$\frac{Y_a}{Y_w} = f \frac{m_a}{m_w}$$

gdzie: Y_a – powierzchnia sygnału analitu
 Y_w – powierzchnia sygnału wzorca wewnętrznego
 m_a – masa analitu w próbce
 m_w – masa wzorca wewnętrznego w próbce
 f – współczynnik odpowiedzi

- wykorzystując współczynnik odpowiedzi obliczyć zawartość kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w próbce końcowej;
- obliczyć zawartość kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym (wynik wyrazić w mg/L), a uzyskany wynik odnieść do norm.

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.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 marca 2003 roku w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych, substancji pomagających w przetwarzaniu i warunków ich stosowania (Dz. U. nr 87/2003, poz. 805).

4. Informacje dodatkowe

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

- charakterystyka dodatków do żywności
- metody analizy konserwantów
- metoda wzorca wewnętrznego (zasada metody, warunki jakie musi spełniać substancja, aby mogła być wykorzystywana jako wzorzec wewnętrzny, współczynnik odpowiedzi)
- technika GC-FID – budowa, zasada działania, podstawowe pojęcia i prawa



Analiza Żywności

6. Oznaczanie zawartości kwasu benzooesowego i kwasu sorbowego w napoju bezalkoholowym

Przydatna literatura:

- Literatura spisana w Rozdziale 3.
- Stepnowski P., Synak E., Szafranek B., Kaczyński Z., „Techniki Separacyjne”, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, 2010