



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIWERSYTET GDAŃSKI

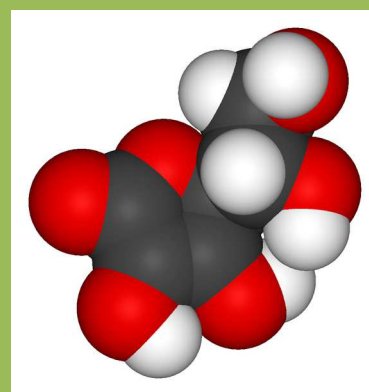
**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

# SKRYPT Z OCHRONY ŚRODOWISKA

## Analiza żywności



**Jolanta Kumirska**

**Marek Gołębiowski**

**Monika Paszkiewicz**

**Anna Bychowska**



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



UNIWERSYTET GDAŃSKI

**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

---

# **SKRYPT Z OCHRONY ŚRODOWISKA**

---

Jolanta Kumirska Marek Gołębiowski  
Monika Paszkiewicz Anna Bychowska

## **Analiza żywności**

**Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego**

**Gdańsk 2010**



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



**UNIA EUROPEJSKA**  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

---

© Copyright by Jolanta Kumirska Marek Gołębiowski Monika Paszkiewicz Anna  
Bychowska

Skład komputerowy: Jolanta Kumirska

ISBN 978-83-7326-711-4

Recenzent: prof. dr hab. inż. Maria Teresa Sadowska

Projekt okładki i strony tytułowej: Anna Białk – Bielińska

All rights reserved

Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, ul. Armii Krajowej 119/121.  
81-824 Sopot, tel./fax (058) 523-11-37

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii  
Katedra Analizy Środowiska  
80-952 Gdańsk, ul. Sobieskiego 18/19

## SPIS TREŚCI

WSTĘP .....	8
<b>2. ZAKRES, ROZWÓJ I ZNACZENIE ANALIZY ŻYWNOŚCI</b> .....	9
<b>3. SKŁAD CHEMICZNY ŻYWNOŚCI</b> .....	12
3.1. <i>PODSTAWOWE SKŁADNIKI ŻYWNOŚCI</i> .....	14
3.1.1. WODA.....	14
3.1.1.1. Struktura wody i jej właściwości fizykochemiczne .....	14
3.1.1.2. rodzaje wody występującej w żywności .....	16
3.1.1.3. Zawartość wody i zawartość suchej substancji.....	17
3.1.2. BIAŁKA.....	19
3.1.2.1. Budowa i właściwości białek .....	19
3.1.2.2. Podział białek .....	22
3.1.2.3. Białka w produktach spożywczych.....	23
3.1.2.4. Białka zawarte w mleku .....	24
3.1.3. SACHARYDY .....	25
3.1.3.1. Budowa i właściwości sacharydów .....	26
3.1.3.2. Sacharydy występujące w żywności .....	30
3.1.4. LIPIDY.....	31
3.1.4.1. Definicja i klasyfikacja lipidów .....	31
3.1.4.2. Lipidy proste - acyloglicerole.....	32
3.1.4.3. KWASY TŁUSZCZOWE .....	35
3.1.4.4. Tłuszcze jako składniki pożywienia.....	39
3.1.4.5. Właściwości pokarmowe tłuszczów .....	40
3.1.4.6. Pozostałe lipidy.....	41
3.1.5. WITAMINY .....	42
3.1.5.1. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach .....	43
3.1.5.2. Witaminy rozpuszczalne w wodzie.....	48
3.1.6. ZWIĄZKI MINERALNE .....	56
3.1.6.1. Występowanie i właściwości .....	56
3.1.6.2. Zawartość w produktach żywnościowych.....	57
3.1.7. NIEBIAŁKOWE ZWIĄZKI AZOTOWE.....	58
3.1.7.1. Wolne aminokwasy i peptydy.....	59
3.1.7.2. Aminy i ich pochodne.....	60
3.1.7.3. Histamina i alifatyczne poliaminy .....	60
3.1.7.4. Nitrozoaminy .....	61
3.1.7.5. Heterocykliczne aminy aromatyczne i kwasy nukleinowe oraz nukleotydy.....	62
3.2. <i>ZANIECZYSZCZENIA ŻYWNOŚCI</i> .....	62
3.2.1. Mikotoksyny.....	64
3.2.2. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (wwa).....	65
3.2.3. Heterocykliczne aminy aromatyczne (haa) .....	66
3.2.4. Azotany(v) i azotany(iii) .....	67
3.2.5. Metale ciężkie.....	68
3.2.5.1. Zanieczyszczenia wód metalami ciężkimi .....	69
3.2.5.2. Zanieczyszczenia roślin metalami ciężkimi .....	70
3.2.6. Dioksyny.....	71
3.2.7. Polichlorowane bifenyly (pcb) .....	72
3.2.8. Radionuklidy .....	72
3.2.9. Pestycydy.....	73
3.3. <i>RAKOTWORCZE I MUTAGENNE SKŁADNIKI ŻYWNOŚCI</i> .....	74
3.3.1. Mutageny i kancerogeny pochodzenia naturalnego.....	76
3.3.2. Mutageny tworzone podczas przechowywania i przetwórstwa żywności .....	76
3.3.3. Mutageny pochodzące z pestycydów, środków przeciwwgrzybiczych i dodatków do żywności .....	77

3.3.4. Pozostałe czynniki ryzyka rozwoju chorób nowotworowych.....	78
3.4. <i>PRZECIWRAKOTWÓRCZE SKŁADNIKI ŻYWNOŚCI</i> .....	79
3.5. <i>DODATKI DO ŻYWNOŚCI</i> .....	83
3.5.1. Kategorie dodatków do żywności.....	84
3.5.2. Dodatki zapobiegające psuciu się żywności .....	85
3.5.3. Dodatki kształtujące cechy sensoryczne.....	90
3.5.4. Dodatki smakowo-zapachowe .....	92
3.5.5. Dodatki kształtujące cechy fizyczne żywności .....	96
3.5.6. Dodatki skrobiowe i białkowe.....	97
3.5.7. Dodatki o wartościach odżywczych.....	98
3.5.8. Dodatki ułatwiające wyrób żywności.....	99
3.6. <i>ZAFALSZOWANIA ŻYWNOŚCI</i> .....	100
4. <b>CHARAKTERYSTYKA METOD STOSOWANYCH W ANALIZIE ŻYWNOŚCI</b> .....	102
4.1. <i>ZASADY POBIERANIA I PRZYGOTOWANIA PRÓBEK ŻYWNOŚCI DO ANALIZY</i> .....	102
4.1.1. Podstawowe pojęcia.....	102
4.1.2. Ogólne zasady pobierania próbek .....	103
4.1.3. Szczegółowe zasady pobierania próbek żywności.....	104
4.1.4. Błędy popełniane w trakcie pobierania próbek.....	107
4.1.5. Przygotowanie próbek do analizy .....	107
4.1.5.1. Rozpuszczanie próbek .....	108
4.1.5.2. Stapianie próbek.....	109
4.1.5.3. Mineralizacja próbek.....	109
4.1.5.4. Ekstrakcja próbek .....	110
4.2. <i>METODY CHEMICZNE</i> .....	114
4.2.1. Metoda wagowa .....	115
4.2.1.1. Mechanizm strącania osadów.....	115
4.2.1.2. Współstrącanie osadów .....	116
4.2.1.3. Oddzielanie osadu od roztworu .....	116
4.2.1.4. Suszenie i prażenie osadów .....	117
4.2.2. Analiza miareczkowa.....	118
4.2.2.1. Klasyfikacja metod miareczkowania .....	119
4.2.2.2. Miareczkowanie alkacymetryczne.....	121
4.2.2.3. Miareczkowanie redoksymetryczne .....	125
4.3. <i>METODY INSTRUMENTALNE</i> .....	128
4.3.1. Chromatografia gazowa.....	129
4.3.1.1. Budowa chromatografu gazowego.....	133
4.3.1.2. Połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS).....	136
4.3.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) .....	141
4.3.2.1. Budowa i zasada działania chromatografu cieczowego .....	142
4.3.2.2. Wypełnienia kolumn.....	145
4.3.2.3. Fazy ruchome.....	149
4.3.2.4. Połączenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS) .....	153
4.3.3. Spektrofotometria UV-VIS .....	154
4.3.3.1. Prawa absorpcji.....	157
4.3.3.2. Budowa aparatury .....	159
4.3.3.3. Wybór długości fali i stężeń roztworów wzorcowych .....	160
4.4. <i>METODY ANALIZY ILOŚCIOWEJ</i> .....	161
4.5. <i>ANALIZA SENSORYCZNA</i> .....	163
4.5.1. Analiza sensoryczna i badania konsumenckie (hedoniczne) .....	164
4.5.2. Laboratoryjna analiza sensoryczna.....	165
4.5.3. Badania konsumenckie (ocena hedoniczna).....	168
5. <b>METODY OZNACZANIA PODSTAWOWYCH SKŁADNIKÓW ŻYWNOŚCI</b> .....	171
5.1. <i>OZNACZANIE WODY</i> .....	171
5.2. <i>OZNACZANIE BIAŁEK</i> .....	175

5.3. OZNACZANIE SACHARYDÓW.....	180
5.3.1. Wstępne przygotowanie próbek żywności do oznaczania sacharydów.....	181
5.3.2. Charakterystyka metod stosowanych w oznaczaniu sacharydów przyswajalnych .....	182
5.3.3. Oznaczanie skrobi i błonnika pokarmowego .....	189
5.4. OZNACZANIE LIPIDÓW .....	191
5.4.1. Metody oznaczania tłuszczu surowego w produktach żywnościowych .....	191
5.4.2. Metody oznaczania poszczególnych klas lipidów w produktach żywnościowych .....	193
5.4.3. Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych w produktach żywnościowych.....	195
5.4.4. Oznaczanie parametrów jakości tłuszczu .....	197
5.5. OZNACZANIE WITAMIN.....	198
5.5.1. Oznaczanie witamin rozpuszczalnych w wodzie .....	199
5.5.2. Oznaczanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach .....	203
5.6. Oznaczanie składników mineralnych .....	206
5.6.1. Popiół ogólny i jego charakterystyka.....	206
5.6.2. Metody oznaczania poszczególnych składników mineralnych .....	209
6. METODY OZNACZANIA ZANIECZYSZCZEŃ ŻYWNOCI.....	212
6.1. OZNACZANIE DIOKSYN .....	212
6.2. OZNACZANIE RTĘCI.....	214
6.3. OZNACZANIE WWA .....	215
6.4. OZNACZANIE MIKOTOKSYN.....	216
6.5. OCENA MUTAGENNOŚCI I RAKOTWÓRCZOŚCI SKŁADNIKÓW ŻYWNOCI .....	216
7. METODY OZNACZANIA DODATKÓW DO ŻYWNOCI .....	218
7.1. METODY OZNACZANIA KONSERWANTÓW.....	218
7.2. METODY OZNACZANIA PRZECIWUTLENIACZY.....	219
7.3. METODY STOSOWANE DO OZNACZANIA BARWNIKÓW .....	222
7.4. METODY OZNACZANIA DODATKÓW SMAKOWO-ZAPACHOWYCH.....	223
7.5. METODY OZNACZANIA DODATKÓW KSZTAŁTUJĄCYCH CECHY FIZYCZNE ŻYWNOCI.....	226
8. OZNACZANIE ZAFĄLSZOWAŃ ŻYWNOCI.....	228
8.1. PRZYKŁADY WYKRYWANIA ZAFĄLSZOWANIA WYBRANYCH PRODUKTÓW ŻYWNOCIOWYCH .....	228
9. OPRAWOWANIE, OCENA STATYSTYCZNA I INTERPRETACJA WYNIKÓW ANALIZ... 232	
9.1. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI ANALIZ W CHEMICZNYM LABORATORIUM ANALITYCZNYM .....	232
9.2. OCENA PRAWDZIWOŚCI WYNIKÓW (POPRAWNOŚĆ) .....	233
9.3. OCENA ROZRZUTU WYNIKÓW (PRECYZJA) – POWTARZALNOŚĆ, ODTWARZALNOŚĆ I NIEPEWNOŚĆ (WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI PRACY W LABORATORIUM).....	235
9.4. GRAFICZNA PREZENTACJA WYNIKÓW ANALIZ.....	237
10. OCENA JAKOŚCI SUROWCÓW I PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH.....	240
10.1 ZASADY GHP/GMP ORAZ SYSTEM HACCP JAKO NARZĘDZIA ZAPEWNIENIA BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOCI .....	247
11. PROCEDURY ĆWICZEŃ .....	254
11.1. OZNACZANIE WODY W MAŁCE.....	254
11.2. WYBRANE ELEMENTY ANALIZY SENSORYCZNEJ.....	254
11.2.1. Określenie zdolności rozpoznawania trzech z czterech podstawowych smaków .....	255
11.2.2. Ocena smaku słodkiego wodnych roztworów sacharozy i kwasu cytrynowego metodą parzystą .....	256
11.2.3. Ocena intensywności smaku słonego wodnych roztworów chlorku sodu metodą szeregowania .....	257
11.2.4. Ocena intensywności smaku słodkiego modyfikowanego roztworu pomarańczowego metodą skalowania.....	258
11.3. OZNACZANIE BIAŁKA W MLEKU METODĄ SPEKTROFOTOMETRYCZNĄ.....	260
11.4. OZNACZANIE KOFEINY.....	262

11.5. ANALIZA KWASÓW TŁUSZCZOWYCH W SMALCU METODĄ GC .....	266
11.6. OZNACZANIE "CUKRÓW OGÓŁEM" W KARMELKACH METODĄ BERTRANDA.....	270
11.7. OZNACZANIE KWASU BENZOESOWEGO W NAPOJU BEZALKOHOLOWYM METODĄ MIARECZKOWANIA .....	275
11.8. OZNACZANIE WITAMINY C W SOKU Z KISZONEJ KAPUSTY I SOKU Z CYTRYNY METODĄ MIARECZKOWĄ.....	277
<b>LITERATURA .....</b>	<b>280</b>

## Wstęp

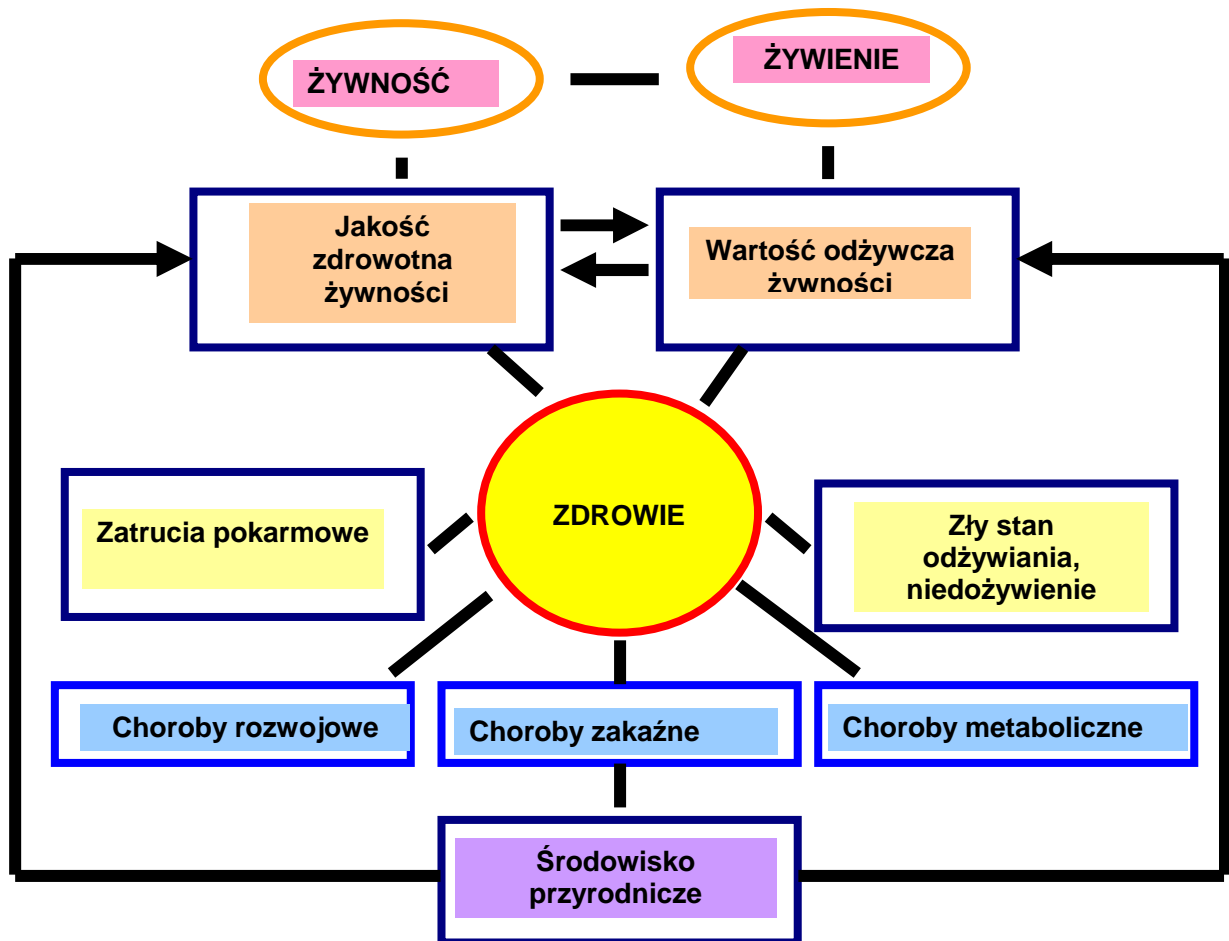
Analiza żywności wchodzi w zakres multidyscyplinarnej nauki o żywności i żywieniu człowieka, która korzysta ze zdobyczy takich dziedzin jak matematyka, chemia, fizyka, biologia, biochemia, mikrobiologia, fizjologia, inżynieria, informatyka, a także ekonomia, organizacja produkcji czy marketing. Podstawowym jej celem jest ocena jakości żywności, o której decyduje przede wszystkim skład chemiczny. W celu zapewnienia wysokiej jakości zdrowotnej żywności wszystkie elementy łańcucha żywnościowego tj. produkcji i pozyskiwania surowców, skupu surowców, ich przetwarzania i obrotu towarowego, wytwarzania i obrotu środkami spożywczymi, muszą być objęte ścisłym nadzorem mającym na celu wyszukiwanie czynników, które obniżają jakość zdrowotną żywności oraz zapewniają odpowiednie bezpieczeństwo żywności. Znajomość metod oznaczania podstawowych składników żywności, dodatków do żywności, zanieczyszczeń czy zmian zachodzących podczas przetwarzania i przechowywania żywności jest niezbędna dla specjalistów zajmujących się produkcją i kontrolą jakości żywności oraz przydatna wszystkim osobom zainteresowanym zrozumieniem zależności między spożywaną żywnością a zdrowiem człowieka.

Celem skryptu „Analiza Żywności” jest przekazanie studentom zwięzłych i systematycznych wiadomości na temat podstawowych składników żywności oraz metod stosowanych w analizie żywności do oceny jakości surowców, półproduktów, oraz produktów gotowych przemysłu spożywczego. Skrypt ten obejmuje również spis wybranych ćwiczeń laboratoryjnych, mających na celu nabycie praktycznych umiejętności z tego zakresu.



## 2. Zakres, rozwój i znaczenie analizy żywności

Już w starożytności zdawano sobie sprawę z ogromnego wpływu spożywanego pożywienia na zdrowie człowieka. Obecnie wiadomo, że między żywnością, żywieniem a zdrowiem człowieka istnieją ściśle zależności (Rys. 1).



**Rys. 1.** Związki między żywnością, żywieniem a zdrowiem (wg Gawęcki J., Mossor-Pietraszewska T. *Kompendium wiedzy o żywności, żywieniu i zdrowiu* PWN, Warszawa, 2004, str. 6)

Centralną pozycję zajmują w nim dwie cechy: jakość żywności, na którą wpływ mają głównie sanitarno-higieniczne warunki produkcji, przetwórstwa i obrotu handlowego oraz wartość odżywcza żywności, informująca o zawartości niezbędnych dla organizmu składników, ich wzajemnych proporcjach i biodostępności. Obie cechy są ze sobą powiązane. O jakości żywności decyduje ponadto zawartość w niej naturalnych związków toksycznych, zanieczyszczeń środowiskowych, technologicznych i biologicznych.

## Zakres analizy żywności

Podstawowym zadaniem analizy żywności jest dokonanie analizy jakościowej i ilościowej produktów żywnościowych na każdym etapie ich wytwarzania, począwszy od etapu surowców, poprzez etap produkcji, obrotu handlowego, aż do etapu konsumpcji. Analizie, oprócz produktów spożywczych poddane są także materiały i wyroby przeznaczone do kontaktu z żywnością.

Analiza żywności dostarcza informacji o fizycznych, chemicznych i biologicznych właściwościach składników żywności, dodatków do żywności, o przemianach tych związków w trakcie przechowywania i przetwarzania surowców oraz produktów żywnościowych, a także o roli jaką odgrywają poszczególne składniki w tworzeniu cech sensorycznych artykułów spożywczych. Ważnym zadaniem analizy żywności jest analiza jakościowa i ilościowa podstawowych składników odżywczych, przede wszystkim białek, sacharydów, lipidów, witamin, składników mineralnych, oznaczanie dodatków funkcjonalnych, wykrywanie zafałszowań i zanieczyszczeń żywności oraz rodzaju i ilości substancji szkodliwych dla zdrowia. Do zakresu analizy żywności należy również dostarczenie danych umożliwiających badanie wpływu parametrów obróbki żywności na funkcjonalne właściwości składników żywności oraz poznawanie mechanizmów i skutków reakcji chemicznych i biochemicznych zachodzących w żywności na właściwości sensoryczne i jakość zdrowotną produktów żywnościowych.

Dzięki postępowi w zakresie analizy żywności stało się możliwe:

- poznanie szczegółowego składu większości surowców i produktów żywnościowych;
- ustalenie wartości kalorycznej artykułów spożywczych;
- opracowanie szybkich oznaczeń składników żywności, przy małym nakładzie pracy;
- prowadzenie badań na temat funkcjonalnych właściwości składników żywności;
- oznaczanie zanieczyszczeń żywności na bardzo niskim poziomie stężeń, rzędu kilku pg/g;
- oznaczanie biologicznych zanieczyszczeń żywności oraz badanie jego wpływu na jakość produktów spożywczych;
- poznanie mechanizmów przemian chemicznych i biochemicznych zachodzących w czasie przechowywania i przetwarzania surowców i produktów żywnościowych;
- zmniejszenie strat składników odżywczych i zapobieganie tworzenia się związków szkodliwych w trakcie obróbki technologicznej żywności;

- opracowanie nowych dodatków do żywności, spełniających szereg funkcji technologicznych i sensorycznych, które są zgodne z obowiązującymi normami;
- monitorowanie procesu produkcji i obrotu produktami żywnościowymi pod kątem zapewnienia właściwej jakości zdrowotnej żywności i przestrzegania zasad bezpieczeństwa żywności.

### 3. Skład chemiczny żywności

**Żywnością** nazywamy jadalne części tkanek roślinnych i zwierzęcych w stanie naturalnym lub przetworzonym, które po zjedzeniu i przyswojeniu przez organizm ludzki mogą być źródłem różnych składników odżywczych. Zgodnie z terminologią pojęcie żywności nie obejmuje:

- środków żywienia zwierząt, żywych zwierząt, jeżeli nie są wprowadzone do obrotu jako żywność przeznaczona bezpośrednio dla konsumenta,
- roślin przed zbiorem,
- produktów leczniczych,
- kosmetyków, tytoniu i wyrobów tytoniowych,
- środków odurzających i substancji psychotropowych,
- pasz,
- pozostałości i zanieczyszczeń.

**Składnikiem odżywczym** jest natomiast składnik pokarmowy niezbędny do odżywiania organizmu człowieka. Wyróżnia się obecnie ponad 400 różnych składników odżywczych, z tym że tylko 60 z nich to tzw. składniki niezbędne. Składniki niezbędne muszą być dostarczone w pożywieniu, ponieważ organizm nie jest w stanie sam ich wytworzyć, ani niczym zastąpić. Każdy ze składników odżywczych pełni odrębną rolę, a zapotrzebowanie na każdego z nich jest różne i zależne od wieku człowieka, płci, okresu wzrostu, wykonywanej pracy i stopnia aktywności fizycznej. Do składników odżywczych zaliczane są w szczególności białka, węglowodany, tłuszcze, minerały i witaminy. Ponieważ zasadniczą cechą żywności jest to, iż posiadają składniki odżywcze powstała klasyfikacja żywności uwzględniająca występowania w niej dominującego składnika odżywczego. Zgodnie z nią żywność podzielono na cztery zasadnicze grupy:

- produkty białkowe,
- żywność bogatą w sacharydy,
- tłuszcze jadalne,
- owoce i warzywa.

Do produktów spożywczych bogatych w białko zaliczamy mięso, mleko i jego przetwory oraz jaja. Najbardziej skoncentrowanym źródłem sacharydów jest cukier. Duże ilości węglowodanów zawierają też zboża i produkty zbożowe, ziemniaki, miód i nasiona niektórych roślin strączkowych (groch, fasola, bób, soja, łubin, soczewica).

Owoce i warzywa są z kolei bogatym źródłem witamin, składników mineralnych, mikroelementów oraz związków terpenowych, flawonowych, garbników, chinonów i fitoncydów. Skład chemiczny owoców i warzyw jest bardzo zróżnicowany; w największej ilości występuje w nich woda (nawet do 96%), natomiast inne składniki stanowią odpowiednio: sacharydy (2 – 30%), białka ( 3 - 4%), lipidy (< 1%), kwasy organiczne, sole mineralne, barwniki.

Przybliżony skład chemiczny mięsa, mleka i jego przetworów, przedstawiono odpowiednio w Tabeli 1 i Tabeli 2.

**Tabela 1.** Przybliżony skład chemiczny mięsa (wg Palka K. Budowa i skład chemiczny żywności. W: Sikorski Z.E. (red.), *Chemia Żywności* Wyd. 5, Tom 1, WNT, Warszawa, 2007, str. 22)

Rodzaj mięsa	Woda [%]	Białko [%]	Lipidy [%]	Sacharydy [%]
Bydłęce chude	71,5	21,0	6,5	1,0
Wieprzowe chude	72,0	20,0	7,0	1,0
Cielęce	75,0	20,0	3,5	1,0
Jagnięce	71,5	19,5	7,0	1,5
Drobiowe jasne	75,0	23,0	2,0	1,0
Drobiowe ciemne	76,0	20,0	4,5	1,0
Mięso z ryb:				
dorsza	81,0	18,0	0,5	0,5-1,5
halibuta	76,5	21,0	1,0	1,5
śledzia	60,0	18,0	15,5	0,5-1,5
Mięso bezkręgowców morskich:				
homara	76,0	19,5	1,5	0,5-1,5
kraba	81,0	16,0	1,0	0,5-1,5
ostrygi	85,0	7,5	1,5	0,5-1,5

**Tabela 2.** Skład chemiczny mleka i produktów mleczarskich (wg Palka K. Budowa i skład chemiczny żywności. W: Sikorski Z.E. (red.) *Chemia Żywności* Wyd. 5, Tom 1, WNT, Warszawa, 2007, str. 26)

Mleko i produkty mleczarskie	Woda [%]	Lipidy [%]	Białko [%]	Laktoza i kwas mlekowy [%]	Popiół [%]
Mleko krowie	88,0	3,5	3,0	4,5	1,0
Mleko kozie	87,0	4,0	3,5	4,5	1,0
Mleko owcze	82,0	6,5	6,0	4,5	1,0
Śmietana 25%	68,0	25,0	3,0	4,0	0,5
Ser twarogowy	64,0	18,0	14,0	2,5	1,5
Ser twardy pełnotłusty	35,0	32,0	26,0	2,0	5,0
Proszek mleczny tłusty	3,0	26,0	26,0	38,0	6,0

W dalszej części tego rozdziału omówione zostaną podstawowe składniki żywności: woda, białka, sacharydy, lipidy, witaminy, składniki mineralne, a także inne ważne grupy związków naturalnie występujących w żywności, w tym: składniki rakotwórcze, mutagenne i przeciwrakotwórcze, substancje celowo wprowadzane do żywności na etapie produkcji i przetwarzania oraz zanieczyszczenia żywności.

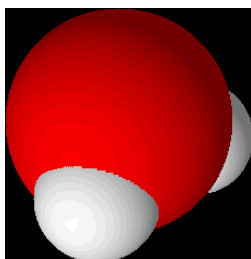
### 3.1. Podstawowe składniki żywności

#### 3.1.1. Woda

Woda jest najważniejszym związkiem chemicznym na naszej planecie; jest też jednym z głównych składników surowców i produktów żywnościowych. Jej ilość wywiera istotny wpływ na jakość, wartość odżywczą i trwałość przechowywania żywności.

##### 3.1.1.1. Struktura wody i jej właściwości fizykochemiczne

Cząsteczka wody,  $H_2O$ , składa się z jednego atomu tlenu i dwóch atomów wodoru połączonych polarnymi wiązaniami kowalencyjnymi (Rys. 2).



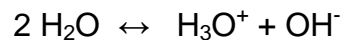
Rys. 2. Kształt cząsteczki wody

Cząsteczka wody jest polarna, ponieważ jądro atomu tlenu przyciąga elektrony silniej niż jądro atomu wodoru. Powstają dwa dipole elektryczne wzdłuż każdego z wiązań H-O, w których atom tlenu uzyskuje cząstkowy ładunek ujemny ( $\delta^-$ ), a każdy z atomów wodoru cząstkowy ładunek dodatni ( $\delta^+$ ). Dipolarna cząsteczka wody ma zdolność tworzenia wiązań wodorowych i może być w nich zarówno donorem, jak i akceptorem protonów. Wiązania wodorowe tworzą się zarówno między cząsteczkami wody, jak i z grupami funkcyjnymi wielu różnych związków chemicznych.

Większość parametrów fizykochemicznych wody charakteryzuje się znacznie wyższymi wartościami, niż to ma miejsce dla związków o podobnej strukturze (np. HF czy  $H_2S$ ) i tak np. temperatura topnienia wynosi  $0^\circ C$ , temperatura wrzenia  $100^\circ C$ , ciepło właściwe  $4 \text{ kJ/mol}$ , a stała dielektryczna  $\epsilon$  80. Wymienione powyżej właściwości wynikają z obecności wiązań wodorowych, co prowadzi do spójności ciekłej wody,

zwanej kohezją. Cząsteczki wody przylegają także do powierzchni tych substancji, na których występują grupy polarne lub zjonizowane (adhezja). Siły adhezji i kohezji wpływają m.in. na zjawiska kapilarne, które mają ogromne znaczenie w biologii, gdyż wykorzystywane są przez rośliny jako sposób transportu substancji odżywczych od korzeni do liści w procesie transpiracji.

Inną cechą charakterystyczną ciekłej wody jest jej mała lepkość oraz skłonność do nieznacznej jonizacji, która przebiega wg równania:



Woda może więc działać jako bardzo słaby kwas lub jako bardzo słaba zasada. Stopień dysocjacji wody w stanie równowagi jest mały i w temp. 25°C tylko jedna na  $10^7$  cząsteczek wody jest zjonizowana.

Gęstość wody rośnie wraz z obniżaniem temperatury, osiąga maksymalną wartość przy 4°C, a przy dalszym spadku temperatury maleje. Związane jest to z tym, że wiązania wodorowe łączące cząsteczki wody w siatce krystalicznej lodu są dłuższe niż w ciekłej wodzie. W stanie stałym woda tworzy sieć krystaliczną. W większości żywności mrożonej lód ma postać zwykłego lodu, jeżeli proces krystalizacji zachodził z umiarkowaną szybkością i w środowisku nie zawierającym substancji mających wpływ na tworzenie się wiązań wodorowych. Aktywne właściwości lodu mogą mieć istotne znaczenie dla trwałości żywności i innych materiałów biologicznych przechowywanych w stanie zamrożonym.

**Woda jako rozpuszczalnik.** Woda jest dobrym rozpuszczalnikiem dla związków polarnych i zjonizowanych, a złym dla związków hydrofobowych. Dodanie jakiegokolwiek substancji do wody powoduje zmianę właściwości, zarówno tej substancji, jak i środowiska wodnego. Właściwości roztworów wodnych są inne niż czystej wody i zależą od natury substancji rozpuszczonej oraz jej stężenia. Następuje obniżenie punktu zamarzania, wzrost temperatury wrzenia i wzrost ciśnienia osmotycznego roztworów.

W wyniku oddziaływania cząsteczek wody z różnymi substancjami tworzą się otoczki hydratacyjne, których rozmiar i trwałość zależy od struktury substancji rozpuszczonej, pH roztworu, temperatury, oraz od obecności innych związków w środowisku. W bezpośrednim sąsiedztwie jonów normalna struktura czystej wody zostaje zakłócona, a wielkość tego zakłócenia zależy od siły pola elektrycznego jonu. Woda związana jest mniej ruchliwa i ma większą gęstość niż woda wolna.

Woda jest dobrym rozpuszczalnikiem dla większości cząsteczek wchodzących w skład organizmów żywych, gdyż, są one zazwyczaj polarne lub mają zjonizowane grupy funkcyjne. Cząsteczki elektrycznie obojętne, ale zawierające grupy polarne, mogą zastąpić oddziaływanie między cząsteczkami wody korzystnym energetycznie oddziaływaniem elektrostatycznym jon-dipol, dipol-dipol lub dipol – dipol indukowany między cząsteczkami wody i substancją rozpuszczoną; mogą też tworzyć z wodą lub między sobą wiązania wodorowe. Wprowadzenie do wody związków hydrofobowych (węglowodorów, apolarnych łańcuchów kwasów tłuszczowych czy reszt niektórych aminokwasów) powoduje utworzenie wokół nich supramolekularnych struktur złożonych z cząsteczek wody, zwanych klatratami, które są podobnie uporządkowane jak cząsteczki wody w kryształach lodu. Wielkość klatratu jest proporcjonalna do powierzchni fragmentu hydrofobowego. Jednocześnie, w celu zminimalizowania kontaktu z wodą cząsteczki hydrofobowe wykazują tendencję do agregacji (pojawienie się oddziaływań van der Waalsa między cząsteczkami zwane oddziaływaniami hydrofobowymi).

#### 3.1.1.2. Rodzaje wody występującej w żywności

Właściwa ilość wody, charakterystyczna dla danego produktu, decyduje o konsystencji, wyglądzie i smaku żywności oraz jej podatności na zepsucie. Woda jest bowiem jednym z głównych czynników wpływających na intensywność procesów biochemicznych, chemicznych i fizycznych oraz tych, które decydują o rozwoju drobnoustrojów.

W produktach spożywczych woda występuje w dwóch podstawowych formach: jako tzw. woda wolna (5-96%) oraz jako woda związana.

**Woda wolna** jest słabo związana z podłożem. Pełni ona dwojaką rolę: bierze udział w procesach chemicznych, w których jest partnerem reakcji oraz stanowi środowisko, w którym te reakcje zachodzą. Intensywność przemian w produktach spożywczych zależy w znacznym stopniu od stosunku ilościowego wody wolnej do związanej – im więcej wody wolnej, tym przemiany zachodzą szybciej.

**Woda związana** (wg definicji Femenna) jest to ta część wody, która jest stosunkowo trwale połączona z produktem; zlokalizowana jest w bezpośrednim sąsiedztwie substancji rozpuszczonych lub zawieszonych, ma zmniejszoną aktywność, odmienne



właściwości od pozostałej masy wody zawartej w danym materiale i nie zamarza do temp.  $-40^{\circ}\text{C}$ . Woda związana może występować w produkcie jako:

- a) woda higroskopijna (zaadsorbowana), powlekająca cienką warstwą powierzchnię produktu,
- b) woda kapilarna, występująca w naczyniach włosowatych i podlegająca zjawiskom kapilarnym,
- c) woda krystalizacyjna,
- d) woda konstytucyjna (związana chemicznie np. koordynacyjnie poprzez grupy polarne koloidów).

Powyższa definicja wody związanej ma dwie zalety:

- umożliwia wyodrębnienie wody związanej jako frakcji całkowitej ilości wody w produkcie,
- umożliwia ilościową analizę, gdyż wodę nie zamarzającą w temperaturze  $-40^{\circ}\text{C}$  można mierzyć z zadowalającą dokładnością metodą TGA (Analiza Termogravimetryczna ang. *thermogravimetric analysis* – TGA), NMR (NMR, Magnetyczny Rezonans Jądrowy, ang. *Nuclear Magnetic Resonance* - NMR) lub kalorymetrycznie (poprzez pomiar wydzielonego ciepła).

Większość sposobów konserwowania żywności polega na zmniejszeniu ilości wody lub zmianie jej właściwości. Wiązanie wody stało się szczególnie ważne w produkcji żywności o obniżonej zawartości tłuszczu i o średniej zawartości wilgoci (IMF, *Intermediate Moisture Foods*). Usunięcie tłuszczu, spełniającego rolę emulgatora, zakłóca równowagę między składnikami typowej żywności i powoduje destabilizację fazy wodnej. W celu zapewnienia odpowiedniej równowagi wodnej, na miejsce tłuszczu wprowadza się różne substancje wypełniające, które gwarantują optymalne wiązanie wody. Są to np. sole mineralne zawierające wapń, sód, potas, fosfor w żelach białkowych, celuloza preparowana (Avicel) w żywności pieczonej (ciastka, suche przekąski) czy skrobia w produkcji serów.

### 3.1.1.3. Zawartość wody i zawartość suchej substancji

Zawartość wody w środkach spożywczych waha się od kilku procent do ponad 90% i podlega zmianom w wyniku obróbki technologicznej produktu bądź w czasie jego przechowywania (Tabela 3).

**Tabela 3.** Zawartość wody w różnych produktach spożywczych (wg Worobiej E. Oznaczanie zawartości wody (suchej substancji). W: Klepacka M. (red.) *Analiza żywności* Wyd. 6, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 2005, str. 36)

Rodzaj produktu	Zawartość wody [%]
Oleje	Śladowe ilości
Masło	16
Produkty zbożowe, mąki	10-20
Pieczywo	30-50
Mięso i produkty mięsne	60-75
Ryby (świeże)	70-80
Owoce i warzywa	80-96
Mleko	85-90
Grzyby (świeże)	90-95

**Zawartość wody** w produkcie żywnościowym definiowana jest taką ilością wody, którą można w nim oznaczyć przy pomocy dostępnych i właściwych dla danego produktu metod analitycznych. Z pojęciem zawartości wody wiąże się nieodłącznie pojęcie **suchej substancji (suchej masy)**, przez które rozumie się pozostałość po usunięciu z niego wody.

W praktyce analitycznej często przyjmuje się, że zawartość wody i zawartość suchej substancji wzajemnie się uzupełniają. Można to przedstawić w następujący sposób:

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

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

Zachowanie powyższej zależności jest jednak w praktyce niemożliwe, a wynika to przede wszystkim z niedostatków i zróżnicowania metod oznaczania oraz właściwości produktów spożywczych. I tak w przypadku metod suszenia, które są najszerszej stosowane w kontroli jakości, podczas suszenia termicznego usunięte zostają wraz z wodą inne substancje lotne (alkohole, niektóre aminokwasy, estry, itp.), związki termolabilne ulegające rozkładowi (sacharydy), a woda nie jest usuwana w całości. W związku z powyższym pojęcia zawartość wody i zawartość suchej substancji są pojęciami umownymi i względnymi.

W analityce rozróżnia się dwa pojęcia dotyczące suchej substancji,

- 1) **suchą substancję całkowitą**, otrzymywaną przez suszenie produktów w określonych warunkach oraz
- 2) **suchą substancję rozpuszczalną** w wodzie czyli ekstrakt.

W skład suchej substancji oprócz ekstraktu wchodzi również **substancje nierozpuszczalne w wodzie**, m.in. celuloza, błonnik, część pektyn, białek i skrobi, stąd po oznaczeniu ekstraktu i części nierozpuszczalnych oblicza się dopiero zawartość suchej substancji w produkcie.

### 3.1.2. Białka

Białka są niezbędnymi składnikami pokarmowymi. Związki te są podstawowym elementem budowy tkanek, a ponadto wchodzi w skład enzymów i hormonów, regulując wiele ważnych procesów organizmu. Zawartość białka w produktach spożywczych jest jednym z czynników pozwalających określić ich wartość odżywczą. Ilość tych związków żywności decyduje często o prawidłowym przebiegu procesu produkcyjnego oraz o jakości gotowego wyrobu.

#### 3.1.2.1. Budowa i właściwości białek

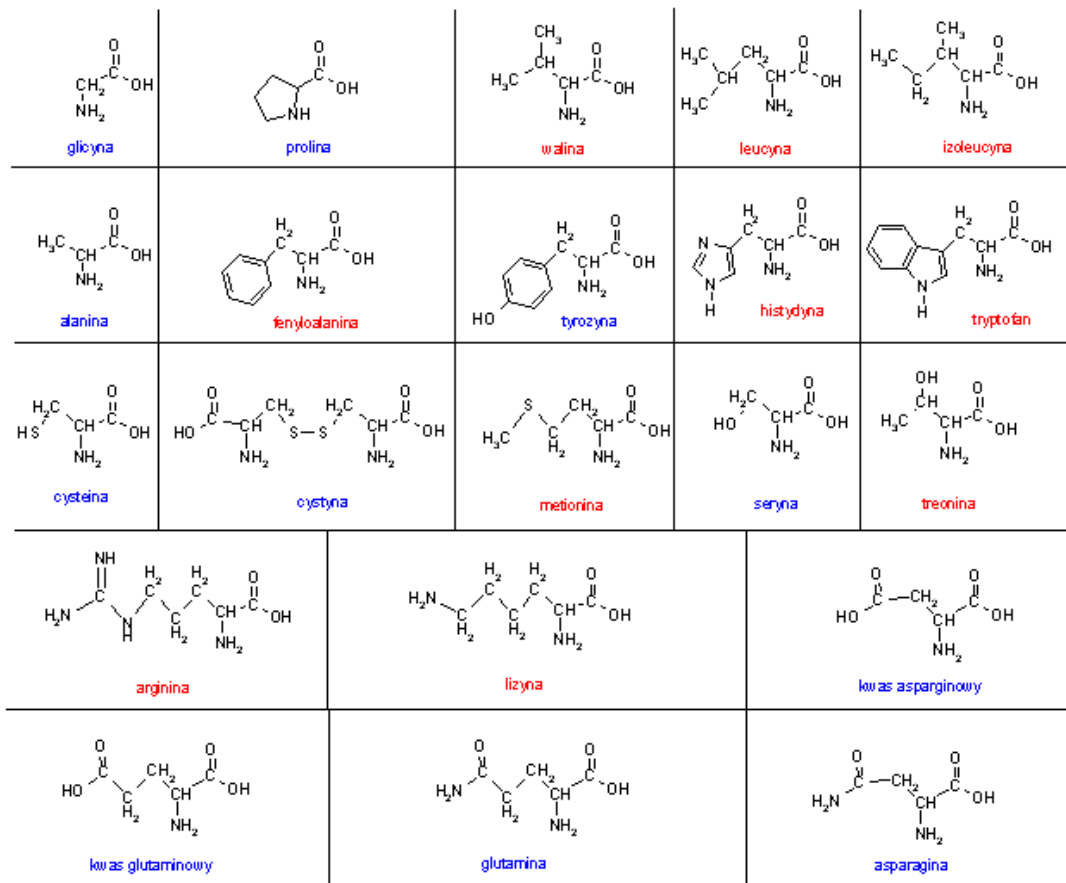
Białka są naturalnymi produktami zbudowanymi z reszt  $\alpha$ -L-aminokwasowych (Rys. 3), połączonych w łańcuchy polipeptydowe wiązaniami *trans*-peptydowymi (jedynie przed każdą resztą proliny występuje konfiguracja *cis*). Zawartość procentową podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białek przedstawia Tabela 4.

**Tabela 4.** Skład procentowy podstawowych pierwiastków wchodzących w skład białka

Pierwiastek	Procentowa zawartość w białku
węgiel	50-55%
tlen	20-23%
wodór	6-7%
azot	12-19%
siarka	0,2-3%
fosfor	0-6%

W białkach można znaleźć ponadto jony innych metali, na przykład selenu, manganu, cynku, magnezu, żelaza, miedzi czy kobaltu.

Organizm ludzki nie potrafi syntezować niektórych aminokwasów w związku z czym muszą być one dostarczane do organizmu w pożywieniu. Są to tzw. aminokwasy egzogenne, na Rys. 3 oznaczone kolorem czerwonym.



**Rys. 3.** Wzory aminokwasów wchodzących w skład białek. Kolorem czerwonym zaznaczono aminokwasy egzogenne

Różnorodność białek wynika ze składu i sposobu uszeregowania reszt różnych aminokwasów w cząsteczce (struktury pierwszorzędowej). Chemiczne właściwości i wymiary reszt aminokwasów powiązanych w określonej sekwencji decydują o konformacji białek (kształcie łańcuchów polipeptydowych - strukturze drugorzędowej), o ich przestrzennym ułożeniu w cząsteczce (strukturze trzeciorzędowej), a także o wzajemnym oddziaływaniu podjednostek przy tworzeniu struktur czwartorzędowych. Białka o określonej konformacji mają charakterystyczne właściwości biologiczne oraz cechy funkcjonalne w żywności.

W wyniku działania wielu czynników fizycznych (m.in. ogrzewania, silnego mieszania, wstrząsania) a także chemicznych (związków zdolnych do rozerwania wiązań wodorowych, np. roztworu mocznika, kwasów lub zasad) następuje nieodwracalne zniszczenie struktury białka zwane procesem **denaturacji**. Denaturacja białka dotyczy zmian w II, III- i IV-rzędowej strukturze białka natywnego, które to prowadzą do utraty aktywności biologicznej lub innej indywidualnej cechy

charakterystycznej przy zachowaniu jego struktury pierwszorzędowej. Denaturacja może być procesem odwracalnym (tzw. renaturacja) lub nieodwracalnym. W efekcie tego procesu bardzo często zachodzą procesy agregacji i strącania, co z kolei związane jest ze zmianą stopnia hydratacji i rozpuszczalności białek.

Struktura białek znacząco warunkuje ich właściwości fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. Podstawowe struktury aminokwasów tworzących białko zawierają różne grupy funkcyjne - kwasowe, zasadowe, pierścienie aromatyczne, grupy alkoholowe, atomy siarki itp., stąd w zależności od pH roztworu, w jakim się znajdują przybierają - jako całość - ładunek ujemny lub dodatni. Wartość pH, przy którym sumaryczny ładunek cząsteczki wynosi 0, nosi nazwę **punktu izoelektrycznego**. W punkcie izoelektrycznym białko nie wykazuje ruchliwości elektroforetycznej oraz charakteryzuje się najniższą rozpuszczalnością w wodzie.

Białka nie posiadają charakterystycznej dla siebie temperatury topnienia. Na ogół są rozpuszczalne w wodzie. Niektóre z nich mogą rozpuszczać się w rozcieńczonych kwasach lub zasadach, jeszcze inne w rozpuszczalnikach organicznych. Posiadają zdolność wiązania cząsteczek wody (**hydratacja**). Na rozpuszczalność polipeptydów istotnie wpływa stężenie soli nieorganicznych. Małe stężenie wpływa dodatnio na rozpuszczalność, jednak przy pewnym stężeniu następuje uszkodzenie otoczki solwatacyjnej, co powoduje wypadanie białek. Proces ten nie narusza struktury białka, jest odwracalny i nosi nazwę **wysalania białek**.

Białka zaliczane są do najważniejszych składników pokarmowych. Spełniają one szereg istotnych funkcji w organizmie, takich jak:

- są niezbędne do utrzymania życia,
- stanowią zasadniczy element budowy wszystkich tkanek ustroju człowieka oraz wielu czynnych biologicznie związków (enzymy i hormony),
- regulują procesy przemiany materii i wiele funkcji ustroju, zapewniając jego prawidłowy stan oraz przystosowanie się do zmian środowiska zewnętrznego,
- są przeciwciałami oraz innymi elementami układu odpornościowego ustroju, odpowiedzialnymi za jego obronę przed działaniem drobnoustrojów i wirusów oraz innych zewnętrznych czynników patogennych,
- biorą udział w utrzymaniu bilansu wodnego, regulując zawartość płynów w układzie krążenia oraz w przestrzeniach wewnątrz- i pozakomórkowych,

- dzięki swoim właściwościom buforującym współuczestniczą w utrzymywaniu równowagi kwasowo-zasadowej ustroju,
- pełnią rolę transportową; są to białka związane z błonami komórkowymi, gdzie działają na zasadzie "pompy", lub znajdują się we wnętrzu komórek i przenoszą różne substancje przez błony komórkowe z jednego do drugiego krańca komórki. Obecne w płynach ustrojowych transportują substancje odżywcze oraz leki (np. hemoglobina transportuje tlen),

Odpowiednia ilość białek decyduje o prawidłowym wzroście i rozwoju człowieka, regeneracji wydalanych lub uszkodzonych tkanek (np. złączającej się ciągle skóry lub gojeniu ran), a tym samym o zdrowiu człowieka.

*Właściwości funkcjonalne* białek związane są z ich zdolnością do oddziaływania z wodą, innymi białkami, sacharydami, lipidami i jonami i umożliwiają osiągnięcie pożądanych cech sensorycznych żywności. Takie cechy funkcjonalne jak: lepkość, żelowanie, pęcznienie, zwilżanie się, rehydratacja, utrzymywanie wody, rozpuszczalność, pienienie się, tworzenie błon, ciast, włókien i emulsji, stabilizowanie emulsji powodują, że białka mogą wpływać na barwę, soczystość oraz teksturę produktów spożywczych. Odgrywają również istotną rolę przy rozdrabnianiu, mieszaniu i formowaniu artykułów żywnościowych.

### 3.1.2.2. Podział białek

Ze względu na budowę i skład białka dzielimy na proste i złożone:

- **białka proste** zbudowane są wyłącznie z aminokwasów,
- **białka złożone** posiadają obok aminokwasów, także części niebiałkowe zwane grupami prostetycznymi, są to np. nukleotydy i kwasy nukleinowe, reszty kwasu fosforowego, barwniki, jeden lub kilka kationów metali np. Fe, Cu, cukry, bądź też tłuszcze.

Inny podział białek związany jest z ich powinowactwem do rozpuszczania się w wodzie.

W oparciu o to kryterium białka dzielą się na:

- **białka rozpuszczalne w wodzie** zwane inaczej hydrofilowymi, ze względu na kształt nazywane są także globularnymi;
- **białka nierozpuszczalne w wodzie**, zwane też hydrofobowymi lub fibrylarnymi, przyjmują kształt włókien.

Białka można podzielić również w zależności od funkcji biologicznych. Wyróżniamy:

- **białka transportujące** - jest to m.in. hemoglobina, albumina osocza, lipoproteina,
- **białka magazynujące** - występujące np. w nasionach roślin,
- **białka strukturalne** - m.in. glikoproteiny, elastyna, kolagen i keratyna,
- **białka regulatorowe** - niektóre hormony jak insulina, glukagon czy hormon wzrostu,
- **toksyny** – występujące np. w jadzie węża,
- **przeciwciała**,
- **enzymy** - m.in. transferazy, hydrolazy, liazy,
- **białka aparatu kurczliwego** - aktyna i miozyna.

### 3.1.2.3. Białka w produktach spożywczych

Spośród wszystkich produktów spożywczych bogatym źródłem białka są jaja, mleko i produkty mleczne, mięso zwierząt hodowlanych oraz ryby. Wymienione produkty zawierają białka o wysokiej wartości odżywczej, tzw. białka pełnowartościowe, w skład których wchodzi wszystkie egzogenne aminokwasy w proporcjach zapewniających ich maksymalne wykorzystanie przez organizm ludzki. Większość artykułów pochodzenia roślinnego zaliczana jest do produktów niskobiałkowych. Wprawdzie nasiona roślin strączkowych (szczególnie soi) zawierają znaczne ilości białka, ale jest ono niepełnowartościowe z powodu niewystarczającej zawartości metioniny. Także wartość odżywcza zbóż jest ograniczona z powodu niedostatecznej zawartości lizyny.

W Tabeli 5 przedstawiono zawartość białka w wybranych produktach żywnościowych oraz jego wartość odżywczą wyznaczoną za pomocą **wskaźnika aminokwasu ograniczającego (CS)** (*chemical score*). Wskaźnik CS określa stopień wykorzystania aminokwasów danego białka do budowy białek ustrojowych, a wyznacza się go po porównaniu składu białka ze wzorcem FAO (zgodnie z Kodeksem Żywnościowym Światowej Organizacji Zdrowia FAO/WHO) i oblicza zgodnie ze wzorem:

$$CS = \frac{A}{A_w} \times 100$$

gdzie: A- oznacza zawartość niezbędnego aminokwasu w badanym białku, a  $A_w$  – zawartość tego aminokwasu w białku wzorcowym.

Białka pełnowartościowe charakteryzują się wysoką wartością wskaźnika aminokwasu ograniczającego.

**Tabela 5.** Zawartość białka i jego wartość odżywcza w wybranych produktach spożywczych (wg Samotyja U. Oznaczanie zawartości białka. W: Małecka M. (red) *Wybrane metody analizy żywności* Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003, str. 36)

Rodzaj produktu	Średnia zawartość białka w g/100 g produktu	Wskaźnik aminokwasu organiczającego wg wzorca FAO
Jaja całe	12,0	100,0
Wołowina	21,0	100,0
Dorsz	16,0	99,0
Mleko krowie	3,0	98,0
Soja	35,0	78,0
Kasza jęczmienna	8,8	67,0
Fasola	22,0	55,0
Ziemniaki	1,7	54,0
Pieczywo pszenne	5,8	46,8
Pomidory	0,9	34,8
Pomarańcze	0,9	28,9
Orzechy włoskie	16,0	22,0

#### 3.1.2.4. Białka zawarte w mleku

Skład mleka różnych gatunków zwierząt różni się dość znacznie (Tabela 6). Mniejsze różnice występują między poszczególnymi rasami i osobnikami. Mleko niektórych ssaków nie nadaje się do bezpośredniej konsumpcji przez człowieka, np. mleko fok zawiera 12 razy więcej tłuszczu, a także więcej białka niż mleko krowie. Istotnym składnikiem mleka jest laktoza - disacharyd nadający mleku charakterystyczny słodkawy posmak.

**Tabela 6.** Średni skład mleka różnych zwierząt (g/100 cm<sup>3</sup>)

Gatunek	Tłuszcz	Białko	Laktoza
Słoń	22,1	3,2	7,4
Szympan	3,7	1,2	7,0



Człowiek	4,0	1,3	6,5
Koń	1,6	2,7	6,2
Szara foka	<b>53,2</b>	11,2	2,6
Królik	10,5	<b>15,5</b>	2,0
Delfin	34,9	10,6	0,9

Białka mleka dzieli się ze względu na ich budowę, rolę biologiczną i właściwości funkcjonalne na kazeiny, białka serwatki oraz otoczki kuleczek tłuszczowych.

**Kazeiny** są heterogeniczną grupą fosfoprotein, których zawartość w mleku krowim wynosi 2,4-2,6%. Występują w postaci miceli tworząc roztwór koloidalny. Strącają się z surowego, odtłuszczonego mleka w temp. 20°C przy pH 4,6. Kazeiny mleka krowiego składają się w 40% z frakcji  $\alpha$ , w 30% z frakcji  $\beta$  oraz w 10% z frakcji  $\kappa$ .

**Białka serwatki.** Serwatka, tzw. odciek pozostający po strąceniu kazein z chudego mleka, jest mieszaniną czterech głównych składników stanowiących około 80% frakcji ( $\beta$ -laktoglobuliny,  $\alpha$ -laktoalbuminy, immunoglobuliny oraz albuminy osocza) oraz wielu innych występujących w małych ilościach, w tym dużej liczby enzymów. W mleku występują w rozproszeniu i są bardzo trudne do wydzielenia w postaci skrzepu.

**Białka budujące otoczki kuleczek tłuszczowych.** Głównym składnikiem tej frakcji białek jest butyrofilina, glikoproteina posiadająca grupy karboksylowe będąca białkiem transbłonowym. Zadaniem tych białek jest stabilizacja kropli lipidowych w mleku.

W mleku zidentyfikowano około 60 rodzimych enzymów we frakcji kazein, wśród białek serwatki i w białkowej otoczce kuleczek tłuszczowych. Niektóre z nich mają istotne znaczenie w technologii mleczarstwa (m.in. peroksydaza, fosfataza alkaliczna, plazmina, lipazy).

### 3.1.3. Sacharydy

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

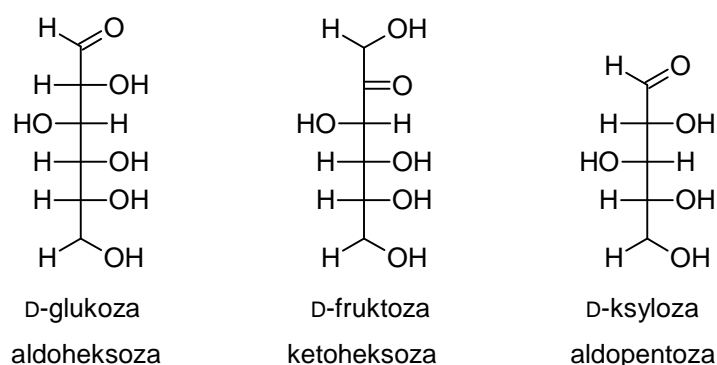
### 3.1.3.1. Budowa i właściwości sacharydów

Rozróżniane są dwie podstawowe grupy cukrów: **aldozy**, będące homologami aldehydu glicerynowego oraz **ketozy**, które są homologami dihydroksyacetonu (Rys. 4).



**Rys. 4.** Wzory chemiczne aldehydu glicerynowego oraz dihydroksyacetonu

W zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce, cukry dzielą się na triozy (3 atomy C), tetrazy (4 atomy C), pentozy (5 atomów C), heksozy (6 atomów C), heptozy (7 atomów C) i oktozy (8 atomów C), np:



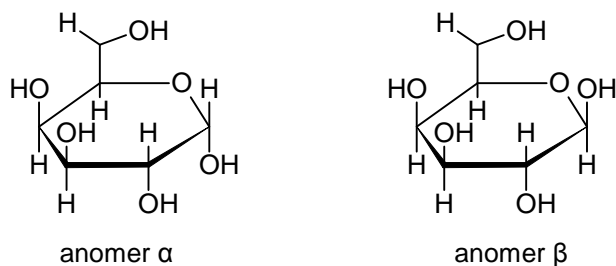
**Rys. 5.** Wzory i nazwy przykładowych cukrów

Nazwa cukru składa się z liczebnika podającego liczbę atomów węgla i charakterystycznej dla cukrów końcówki – oza (Rys. 5). 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.

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 homologii aldehydu D-glicerynowego lub dihydroksyacetonu, w których

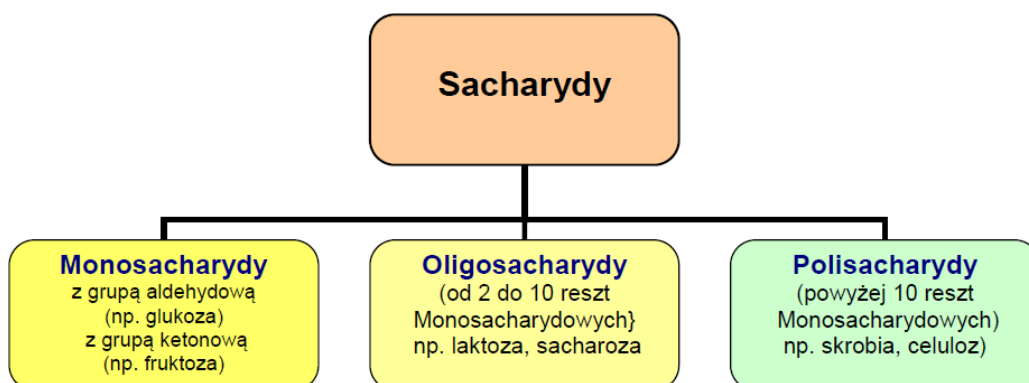
grupa hydroksylowa -OH przy ostatnim centrum stereogenicznym znajduje się po prawej stronie, w szeregu L znajduje się ona po lewej stronie. Cukry szeregu D są bardziej rozpowszechnione w przyrodzie niż cukry szeregu L. Do cukrów najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie zaliczają się: D-glukoza, D-ryboza, D-galaktoza, D-mannoza i D-fruktoza. Do nielicznych naturalnych cukrów prostych szeregu L należy L-arabinoza i L-galaktoza.

Należy także wspomnieć, iż wewnątrzcząsteczkowa addycja grupy hydroksylowej do grupy aldehydowej lub ketonowej prowadzi do utworzenia wiązania półacetalowego i powstania dwóch izomerów, nazywanych anomerami  $\alpha$  i  $\beta$ . Anomer  $\alpha$  (monosacharydu z szeregu konfiguracyjnego D) posiada półacetalową grupę hydroksylową pod powierzchnią pierścienia we wzorze Hawortha, anomer  $\beta$  nad powierzchnią np. dla D-glukozy (Rys. 6).



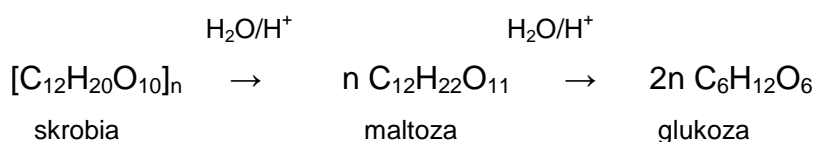
Rys. 6. Wzory Hawortha  $\alpha$  i  $\beta$  anomeru D-glukozy

Inny podział sacharydów na tzw. cukry proste (monosacharydy) i cukry złożone (oligosacharydy i polisacharydy) związany jest ich zdolnością do kondensacji (polimeryzacji) (Rys. 7).



Rys. 7. Podział sacharydów ze względu na ich budowę chemiczną

**Cukrami prostymi** nazywane są sacharydy, które nie ulegają hydrolizie; należy do nich m.in. ryboza, glukoza. 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. I tak na przykład, w wyniku częściowej hydrolizy skrobi powstaje maltoza (disacharyd), hydroliza całkowita prowadzi wyłącznie do D-glukozy:



W przyrodzie sacharydy występują zarówno w postaci wolnej, jak i związanej z peptydami (proteoglikany), proteinami (glikoproteiny) oraz lipidami (glikolipidy).

*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 nietlotne 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 synegriczne atomy węgla i dlatego są związkami optycznie czynnymi; wodne roztwory sacharydów wykazują zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego.

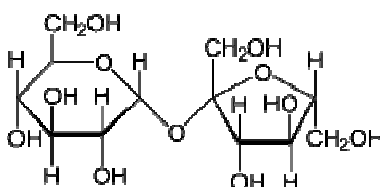
*Właściwości chemiczne sacharydów.* Przy omawianiu właściwości chemicznych cukrów należy uwzględniać zarówno ich budowę pierścieniową, jak i łańcuchową. Niewielka ilość form łańcuchowych w równowadze z pierścieniowymi wystarcza, aby cukry ulegały typowym reakcjom związków karbonylowych. Reakcje, którym ulegają sacharydy można podzielić na:

- reakcje zachodzące na grupie karbonylowej i anomerycznym atomie węgla,
- reakcje grup hydroksylowych,
- reakcje wiązania glikozydowego.

Z punktu widzenia metod oznaczania sacharydów duże znaczenie mają reakcje jakim podlegają sacharydy w obecności stężonych kwasów oraz ich właściwości redukujące.

*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 reagując z odczynnikami Fehlinga, płynem Tollensa, czy odczynnikiem Benedicta. Warunkiem występowania właściwości redukujących jest obecność w cząsteczce cukru wolnej grupy aldehydowej lub ketonowej, co możliwe jest w środowisku zasadowym. Sacharoza (Rys. 8),



**Rys. 8.** Wzór sacharozy

powszechnie używana w gospodarstwach domowych, jest cukrem nieredukującym.

*Właściwości odżywcze 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 (16,7 kJ) 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.

*Zapotrzebowanie.* Sacharydy powinny dostarczać 55-60% wartości energetycznej dziennej racji pokarmowej dorosłego człowieka.

*Właściwości funkcjonalne sacharydów.* Sacharydy charakteryzują się w większości przypadków słodkim smakiem. Formują one swoją własną makrostrukturę, co widać pod postacią żelowania, gęstnienia, delikatnienia masy, zwiększonej odporności na ogrzewanie i wstrząsy oraz starzenie. Mogą kompleksować z wieloma związkami, a teksturująca rola sacharydów zależy od ich stężenia, warunków reakcji (temperatury, pH czy składu mieszaniny reakcyjnej), zawartości lipidów i białek oraz ich budowy. Błonnik pokarmowy jest mieszaniną substancji o charakterze polisacharydowym (celuloza, hemicelulozy, pektyny, gumy, śluzu) i niepolisacharydowym (ligniny). Sacharydy występujące w błonniku pokarmowym pełnią rolę substancji balastowych.

### 3.1.3.2. Sacharydy występujące w żywności

W produktach spożywczych zidentyfikowano ponad 100 rodzajów cukrów. Spotyka się je nie tylko w postaci czystej, ale też jako pochodne posiadające grupy aminowe, estrowe, eterowe, występujące w postaci utlenionej, bądź zredukowanej, związane z proteinami, białkami czy lipidami. Monosacharydami obecnymi w żywności są zarówno pentozy (np. D-ryboza, D-ksyloza czy L-arabinoza), jak i heksozy (m.in. D-glukoza, D-fruktoza, D-mannoza) oraz ich pochodne (np. kwas  $\beta$ -D-glukuronowy czy D-glukozamina). Znajdują się w niej ponadto oligosacharydy (m.in. lakoza, celobioza, sacharoza, rafinoza) oraz polisacharydy (np. skrobia, dekstran, glikogen, guma arabska czy galaktany). D-Glukoza i D-fruktoza występuje 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; obecnych głównie w produktach pochodzenia roślinnego (Tabela 7).

**Tabela 7.** Zawartość sacharydów w wybranych produktach spożywczych (wg Pachotek B. Oznaczenie zawartości sacharydów. W: Małecka M. (red.) *Wybrane metody analizy żywności* Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003, str. 48)

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

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. Jak już wspomniano, 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.

### 3.1.4. Lipidy

Lipidy wraz z białkami i sacharydami należą do podstawowych składników żywności. Z uwagi na funkcje jakie pełnią w ustroju stanowią absolutnie niezbędny element diety każdego człowieka. Zaleca się aby lipidy dostarczały w przybliżeniu 35-40% całkowitej energii dziennej racji pokarmowej. Wykazują ponadto najbardziej wydajną przemianę energii spośród wszystkich składników pożywienia. Wieloskładnikową mieszaninę różnych lipidów przyjęto z kolei określać mianem **tłuszczy**.

#### 3.1.4.1. Definicja i klasyfikacja lipidów

Lipidy to obszerna grupa związków naturalnych występujących we wszystkich organizmach żywych. Są to substancje o bardzo złożonej i różnorodnej budowie,

nierozpuszczalne w wodzie, natomiast rozpuszczalne w tzw. rozpuszczalnikach tłuszczowych, jak np.: eter etylowy, eter naftowy, chloroform, benzen, tetrachlorek węgla, czy aceton.

Z uwagi na duży stopień zróżnicowania lipidów, a przede wszystkim biorąc pod uwagę różnice w ich strukturze chemicznej, powstała klasyfikacja, która wyodrębnia 3 zasadnicze grupy lipidów (Rys. 9).

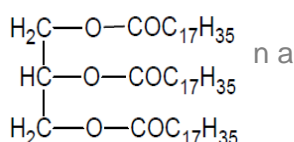


**Rys. 9.** Schemat ilustrujący klasyfikację lipidów (wg Drozdowski B. Lipidy. W: Sikorski Z.E. (red) *Chemia żywności* Wyd. 5, Tom 2, WNT, Warszawa, 2007, str. 74)

### 3.1.4.2. Lipidy proste - acyloglicerole

Powszechnie znane z życia codziennego oleje roślinne i tłuszcze zwierzęce pod względem chemicznym są obojętnymi estrami glicerolu i wyższych, alifatycznych kwasów karboksylowych, zwanych ogólnie kwasami tłuszczowymi. Zgodnie z klasyfikacją lipidów (Rys. 9) cząsteczki takie określamy mianem acylogliceroli i zaliczamy do grupy lipidów prostych, podgrupy lipidów właściwych. Jako że spośród wszystkich klas lipidów są to substancje najbardziej rozpowszechnione w naturze i w dodatku stanowią podstawowy składnik tłuszczy spożywczych zostaną omówione szczegółowo.

Glicerol, jako alkohol trihydroksylowy, może formować estry zarówno z jednym, dwoma, jak też z trzema cząsteczkami kwasów, tworząc odpowiednio monoacylo-, diacylo- i triacyloglicerole. Poniżej przedstawiono przykładową cząsteczkę triacyloglicerolu (Rys. 10).

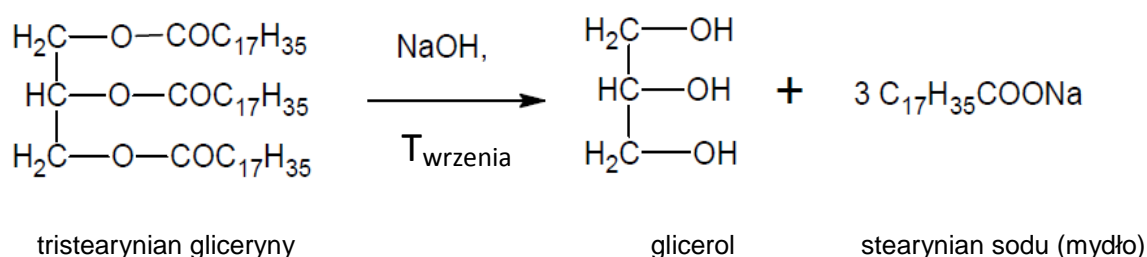




**Rys. 10.** Cząsteczka triacyloglicerolu – tristearynian glicerolu

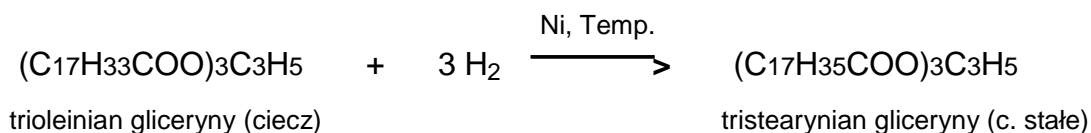
Kwasy wchodzące w skład acylogliceroli mogą być zarówno nasycone (np. stearynowy  $C_{17}H_{35}COOH$ , palmitynowy  $C_{15}H_{31}COOH$ ), jak i nienasycone (np. oleinowy  $C_{17}H_{33}COOH$ , linolowy  $C_{17}H_{31}COOH$ ). Ponadto w przypadku triacylogliceroli w jednej cząsteczce mogą występować albo trzy różne kwasy tłuszczowe (triacyloglicerole trój kwasowe), albo dwa lub jeden, tworząc w ten sposób odpowiednio triacyloglicerole dwu- lub jednokwasowe. Analogicznie jest w przypadku diacylogliceroli, z tym że tu wyodrębnić można diacyloglicerole dwu- bądź jednokwasowe. Spośród wszystkich acylogliceroli największe znaczenie pod względem spożywczym odgrywiają triacyloglicerole. To właśnie one i występujące w nich kwasy tłuszczowe determinują właściwości fizyczne i chemiczne tłuszczów, a tym samym decydują o ich przydatności technologicznej i wartości żywieniowej. Diacyloglicerole nie mają większego znaczenia zarówno w technologii tłuszczów, jak też nie odgrywają większej roli jako składnik pożywienia. Z kolei monoacyloglicerole są aktywnymi emulgatorami stabilizującymi emulsje typu woda/olej i wykorzystywane są głównie w technologii produkcji żywności. Właściwości chemiczne lipidów prostych zostaną przedstawione na przykładzie triacylogliceroli.

**Triacyloglicerole** wykazują właściwości typowe dla estrów. W warunkach kwaśnych mogą być zhydrolizowane do gliceryny i wolnych kwasów tłuszczowych, bądź też do mono- czy diacylogliceroli i kwasów tłuszczowych. Hydroliza tłuszczu przebiega także w warunkach zasadowych - powstają wówczas gliceryna oraz sole (sodowa, potasowa) kwasów tłuszczowych, potocznie zwane mydłami. Z uwagi na produkty reakcję tę przyjęto nazywać reakcją zmydlenia lub saponifikacji. Przykład reakcji hydrolizy zasadowej triacyloglicerolu przedstawiono poniżej (Rys. 11).



**Rys. 11.** Reakcja hydrolizy cząsteczki tristéarynianu glicerolu w środowisku zasadowym

Z uwagi na możliwość występowania nienasyconych kwasów tłuszczowych w cząsteczce triacylogliceroli związki te mogą ulegać także reakcji addycji (przyłączenia). Najbardziej znaną jest reakcja uwodornienia, podczas której następuje przyłączenie cząsteczki wodoru w miejsce wiązań podwójnych występujących w resztach kwasowych tłuszczu nienasyconego. W efekcie cząsteczka tłuszczu przyjmuje charakter nasycony, a także zmienia konsystencję z ciekłej na stałą. Metoda ta jest bardzo powszechnie wykorzystywana w przemyśle spożywczym do produkcji margaryny i nosi nazwę reakcji utwardzania tłuszczu (Rys. 12).



**Rys. 12.** Reakcja uwodornienia cząsteczki trioleinianu gliceryny

Triacyloglicerole w stanie stałym wykazują zjawisko polimorfizmu, co oznacza, iż mogą występować w kilku formach krystalicznych różniących się między sobą temperaturą topnienia. Przemiany polimorficzne zachodzą najczęściej na skutek ogrzewania, chłodzenia czy też są wynikiem krystalizacji z różnych rozpuszczalników. Proste triacyloglicerole przyjmują trzy zasadnicze formy polimorficzne:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ . Z kolei w przypadku triacylogliceroli mieszanych i nieparzystowęglowych występuje dodatkowa czwarta postać  $\beta'$ . Postać  $\alpha$  może być uzyskana w wyniku powolnego schładzania stopionego glicerydu lub przez termostatowanie postaci  $\gamma$  w pobliżu jej temperatury topnienia. Postać  $\beta$  jest z kolei trwałą formą polimorficzną triacylogliceroli i powstaje przy bardzo powolnym schładzaniu tłuszczu. Postać najmniej trwała – forma  $\gamma$  może być otrzymana przez szybkie schłodzenie stopionego tłuszczu. Podobnie nietrwała jest postać  $\beta'$  – jej temperatura topnienia oscyluje pomiędzy temperaturą topnienia form  $\alpha$  i  $\beta$ . Przekształcenie jednej formy w drugą istotnie wpływa na właściwości reologiczne (konsystencję, plastyczność) oraz inne cechy fizyczne wielu produktów tłuszczowych. Z punktu widzenia zastosowań spożywczych oraz przemysłowych jest to raczej zjawisko niepożądane. Podejmuje się zatem wiele starań, aby przemiany krystaliczne

tłuszczów podczas zabiegów produkcyjnych odbywały się w ściśle kontrolowanych warunkach, zapewniając im odpowiednią i stabilną formę krystaliczną.

### 3.1.4.3. Kwasy tłuszczowe

Kwasy tłuszczowe stanowią podstawowy składnik tłuszczów. Są to substancje o ogólnym wzorze chemicznym R-COOH (R – grupa alkilowa, -COOH – grupa karboksylowa). Niezależnie czy mają charakter nasycony czy nienasycony należą do związków o prostym (nierozgałęzionym) łańcuchu i parzystej liczbie atomów węgla w cząsteczce. Występować mogą zarówno w stanie ciekłym jak też jako ciała stałe. W porównaniu z węglowodorami kwasy tłuszczowe zbudowane z podobnej długości podstawników alkilowych charakteryzują się wyjątkowo wysokimi temperaturami wrzenia. Jest to związane z obecnością grupy karboksylowej w cząsteczce kwasu, w obrębie której tworzą się bardzo trwałe wiązania wodorowe stabilizujące cały układ. Temperatury topnienia kwasów tłuszczowych rosną z kolei wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej, a maleją gdy w łańcuchu pojawiają się wiązania podwójne.

W zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce kwasów zmienia się również ich rozpuszczalność. Kwasy tłuszczowe o łańcuchu zawierającym do 4 atomów węgla są rozpuszczalne w wodzie, z kolei od 4 do 12 atomów węgla słabo rozpuszczalne, natomiast powyżej 12 atomów węgla to praktycznie substancje nierozpuszczalne w wodzie. Zdecydowanie lepiej związki te rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak: benzen, etanol, benzyna, izopropanol. Składnikami tłuszczy spożywczych są dwa zasadnicze typy kwasów tłuszczowych: nasycone i nienasycone.

**Kwasy tłuszczowe nasycone** – nie zawierają wiązań podwójnych w cząsteczce, są najczęściej parzystowęglowe i mają łańcuch prosty. Większość z nich w temperaturze pokojowej występuje w stanie stałym. Przykłady najważniejszych nasyconych kwasów tłuszczowych podano w Tabeli 8.

**Tabela 8.** Ważniejsze nasycone kwasy tłuszczowe i ich występowanie (wg Drozdowski B. Lipidy. W: Sikorski Z.E. (red) *Chemia żywności* Wyd. 5, Tom 2, WNT, Warszawa, 2007, str. 78)

Liczba atomów węgla	Nazwa kwasu		Występowanie
	systematyczna	zwyczajowa	
4	butanowy	masłowy	masło, olej kokosowy, olej palmowy
6	heksanowy	karponowy	masło, olej kokosowy, oleje roślinne

8	oktanowy	kaprylowy	masło, olej kokosowy
10	dekanowy	kaprynowy	masło, olej kokosowy
12	dodekanowy	laurynowy	masło, olej kokosowy, olej palmowy
14	tetradekanowy	mirystynowy	większość tłuszczów zwierzęcych
16	heksadekano wy	palmitynowy	wszystkie tłuszcze zwierzęce, oleje roślinne
18	oktadekanowy	stearynowy	wszystkie tłuszcze zwierzęce, oleje roślinne
20	ejkozanowy	arachidowy	oleje rybne, oleje z roślin krzyżowych
22	dokozanowy	behenowy	olej słonecznikowy, olej rzepakowy
24	tetrakozanowy	lignocerynowy	olej arachidowy, oleje roślinne

Spośród kwasów nasyconych najbardziej rozpowszechnione są kwas palmitynowy (C<sub>16</sub>) i stearynowy (C<sub>18</sub>). Są one typowymi składnikami większości olejów roślinnych i tłuszczów zwierzęcych. Kwasy o krótkich łańcuchach (C<sub>4</sub> -C<sub>12</sub>) występują zdecydowanie rzadziej, wchodzi między innymi w skład masła czy oleju kokosowego i palmowego. Równie rzadko spotykane są też kwasy o łańcuchach węglowych dłuższych niż C<sub>18</sub> – przykładowo kwas ejkozanowy (C<sub>20</sub>) jest składnikiem olejów z ryb, zaś kwas dokozanowy (C<sub>22</sub>) występuje w oleju słonecznikowym i rzepakowym.

**Kwasy tłuszczowe nienasycone** – cząsteczki tych kwasów zawierają przynajmniej jedno wiązanie podwójne. W obrębie tej klasy związków wyróżnić można:

*monoenowe kwasy tłuszczowe* – mają tylko jedno wiązanie podwójne, które zazwyczaj usytuowane jest przy 9 atomie węgla ( $\Delta^9$ ) licząc od końcowej grupy metylowej; najczęściej występują w konfiguracji *cis*. Obecność dużej ilości *trans* izomerów w tłuszczach żywnościowych może być natomiast wynikiem procesów modyfikacyjnych, np. katalicznego uwodornienia. Najbardziej rozpowszechnionym w naturze monoenowym kwasem tłuszczowym jest kwas *cis*  $\Delta^9$  C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>COOH znany jako kwas oleinowy. Przykłady innych ważniejszych kwasów monoenowych podano w Tabeli 9.

**Tabela 9.** Ważniejsze monoenowe kwasy tłuszczowe i ich występowanie (wg Drozdowski B. Lipidy. W: Sikorski Z.E. (red) *Chemia żywności* Wyd. 5, Tom 2, WNT, Warszawa, 2007, str. 79)

Liczba atomów węgla	Nazwa kwasu		Występowanie
	systematyczna	zwyczajowa	
12	<i>cis</i> -5-dodecenowy	lauroleinowy	oleje rybne

14	<i>cis</i> -9-tetradecenowy	mirystoleinowy	olej wielorybi
16	<i>cis</i> -9-haksadecenowy	palmitoleinowy	tłuszcz mleczny, tłuszcze roślinne
18	<i>cis</i> -6-oktadecenowy	petroselinowy	olej z koriandra
18	<i>cis</i> -9-oktadecenowy	oleinowy	większość tłuszczów
18	<i>cis</i> -11-oktadecenowy	wakceny	tłuszcze zwierzęce i roślinne
20	<i>cis</i> -9-ejkozenowy	gadoleinowy	oleje zwierząt morskich

*polienowe kwasy tłuszczowe (PUFA)* – posiadają zazwyczaj od 2 do 6 wiązań podwójnych oddzielonych między sobą zazwyczaj jedną grupą metylenową (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-); najczęściej występują w konfiguracji *cis*. Przykładowe kwasy polienowe zestawiono w Tabeli 10. Niektóre z tych związków spełniają szczególną rolę biologiczną i są niezbędne do prawidłowego rozwoju i normalnego funkcjonowania organizmu. Są to tzw. niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT).

**Tabela 10.** Ważniejsze polienowe kwasy tłuszczowe i ich występowanie (wg Drozdowski B. Lipidy. W: Sikorski Z.E. (red) *Chemia żywności* Wyd. 5, Tom 2, WNT, Warszawa, 2007, str. 80)

Liczba atomów węgla	Nazwa kwasu		Występowanie
	systematyczna	zwyczajowa	
18	<i>cis,cis</i> -9,12-oktadekadienowy	linolowy	wiele tłuszczów roślinnych
18	<i>all cis</i> -9,12,15-oktadekatrienowy	linolenowy	olej lniany, oleje roślinne
20	<i>all cis</i> -5,8,11,14-ikozatetraenowy	arachidonowy	oleje z wątroby
20	<i>all cis</i> -4,8,12,16-ikozatetraenowy	-	olej z wieloryba, sardynek
22	<i>all cis</i> -4,7,10,13,16,19-dokozaheksaenowy	klupanodonowy	oleje rybie

**Niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe** – należą do grupy kwasów polienowych, mających przynajmniej dwa wiązania podwójne usytuowane w ściśle określonych miejscach łańcucha węglowego. Z uwagi na brak odpowiednich enzymów kwasy te nie

mogą być bezpośrednio syntezowane przez organizm człowieka i muszą być doprowadzane z zewnątrz (np. z pożywieniem). Trudno jednak jednoznacznie powiedzieć jaka powinna być optymalna dawka NNKT w diecie człowieka. Zapotrzebowanie na te kwasy w głównej mierze uzależnione jest od okresu życia czy też stanu fizjologicznego organizmu. Uważa się jednak, że ich udział powinien kształtować się w zakresie od 2 do 10% ogólnej kaloryczności diety. Największą zaletą nienasyconych kwasów tłuszczowych jest przede wszystkim:

- zapobieganie i leczenie miażdżycy oraz innych stanów chorobowych prowadzących do zaburzeń gospodarki lipidami w ustroju,
- obniżanie poziomu cholesterolu i triacylogliceroli w surowicy krwi,
- zapobieganie powstawaniu zakrzepów naczyniowych,
- regulowanie pracy serca i przepływu krwi przez naczynia wieńcowe.

Polienowe kwasy tłuszczowe wykazujące właściwości NNKT to przede wszystkim:

**kwasy linolowy** – *cis,cis-9,12-oktadekadienowy* – najbardziej popularny wśród NNKT; wstępuje prawie we wszystkich tłuszczach i olejach roślinnych; jest głównym składnikiem oleju sojowego i słonecznikowego.

**kwasy linolenowy** – *all cis-9,12,15-oktadekatrienowy* – główny składnik oleju lnianego (50-60%) oraz oleju sojowego i rzepakowego (6-10%).

**kwasy arachidonowy** – *all cis-5,8,11,14-ikozatetraenowy* – bardzo aktywny biologicznie, obecny przede wszystkim w fosfolipidach zwierzęcych (lipidach wątrobowych); jest prekursorem prostaglandyn, tromboksanów i leukotrienów.

W zależności od pochodzenia tłuszcze naturalne charakteryzują się różną zawartością kwasów tłuszczowych. Triacyloglicerole obecne w tłuszczach roślinnych zbudowane są w głównej mierze z nienasyconych kwasów tłuszczowych. W tłuszczach zwierzęcych przeważają natomiast kwasy nasycone.

Wśród kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład tłuszczów zwierząt lądowych, obecne są prawie wyłącznie 16- i 18-węglowe nasycone kwasy tłuszczowe. Udział procentowy kwasów 16-węglowych wynosi w tej grupie około 35% natomiast 18-węglowych 65%. Udowodniono również, że rodzaj paszy jaką karmione są te zwierzęta może znacząco wpływać na skład kwasów tłuszczowych.

Zdecydowanie bardziej różnorodny jest skład kwasów tłuszczowych tłuszczów zwierząt morskich. Występują tu głównie kwasy nienasycone, wśród których dominuje kwas oleinowy. Typowymi składnikami tych tłuszczów są ponadto kwasy 20:5 i 22:6, które

to nie występują w żadnych innych tłuszczach zarówno zwierzęcych jak też roślinnych. Kwas palmitynowy jest z kolei głównym przedstawicielem nasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład triacylogliceroli tych zwierząt.

Triacyloglicerole obecne w mleku przeżuwaczy charakteryzują się najbardziej urozmaiconym składem kwasów tłuszczowych spośród wszystkich rodzajów tłuszczu. Szczególnie bogate w kwasy tłuszczowe jest mleko krowie. Dominują w nim kwasy 16:0 i 18:1 (ponad 50%) aczkolwiek bardzo często można tam też spotkać kwasy krótkołańcuchowe (C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>).

Tłuszcze roślinne w głównej mierze wydobywa się z miąższu owoców i nasion. Skład kwasów tłuszczowych jest tutaj bardzo ściśle związany z gatunkiem rośliny, ale także może się zmieniać w zależności od warunków środowiska w jakich dana roślina jest uprawiana. Typowym składnikiem tłuszczów z miąższu owoców (np. olej palmowy i oliwkowy) są kwasy 16:0 i 18:1. Triacyloglicerole nasion zawierają z kolei kwasy 16:0, 18:1, 18:2 oraz niekiedy 18:3. Zdarza się również, że dany kwas jest charakterystyczny dla konkretnej rodziny roślin, np. kwas erukowy (22:1) występuje we wszystkich roślinach z rodziny krzyżowych.

#### 3.1.4.4. Tłuszcze jako składniki pożywienia

Jak już wspomniano, tłuszcze obecne w surowcach i produktach żywnościowych (*tłuszcze naturalne*) są wieloskładnikową mieszaniną różnych lipidów, w której podstawowym składnikiem są triacyloglicerole. Wszystkie inne lipidy zawarte w tłuszczach (oprócz triacylogliceroli) nazywa się *substancjami towarzyszącymi*. Ilość tych substancji zmienia się w zależności od: rodzaju i pochodzenia tłuszczu, sposobu jego wydobywania, czy też od zabiegów, jakim był poddawany przed i po wydzieleniu z surowca.

Z uwagi na dużą różnorodność tłuszczów naturalnych brak jest jednolitych kryteriów ich podziału. W zależności od konsystencji jaką tłuszcze przyjmują w temperaturze pokojowej wyodrębnić można *tłuszcze stałe* (zwane tłuszczami) oraz *tłuszcze ciekłe* (zwane olejami). Bardzo powszechny jest także podział tłuszczów naturalnych względem ich pochodzenia: *roślinne* i *zwierzęce*. Tłuszcze roślinne otrzymywane są z nasion lub miąższu owoców, natomiast zwierzęce pochodzą z tkanek lub mleka zwierząt lądowych, czy też z tkanek zwierząt morskich. Z uwagi na swe właściwości i skład chemiczny nie wszystkie tłuszcze naturalne mogą być wykorzystywane w celach konsumpcyjnych. W związku z powyższym wyróżnia się

również tłuszcze *jadalne* i *techniczne*. Podział ten nie jest jednak w pełni jednoznaczny, a to dlatego, że tłuszcze z grupy jadalnych mogą być także użyte do celów technicznych i odwrotnie. Tłuszcze naturalne bardzo często poddawane są różnym zabiegom technologicznym, w efekcie czego zostają przekształcane w nowe tłuszcze bądź produkty tłuszczowe. Otrzymane w ten sposób substancje nazywane są *tłuszczami modyfikowanymi* i należą tu np.: tłuszcze uwodornione, przeestryfikowane, emulsje tłuszczowe.

#### 3.1.4.5. Właściwości pokarmowe tłuszczów

Tłuszcze należą do podstawowych, wręcz niezbędnych składników pokarmowych w diecie każdego człowieka. Rodzaj i ilość tłuszczu w żywności znacząco wpływa na jej właściwości żywieniowe, fizyczne i sensoryczne. Do zasadniczych funkcji tłuszczu spożywczego należy jego działanie jako:

- składnika energetycznego pokarmu i źródła węgla w procesach biosyntezy,
- źródła i nośnika składników biologicznie czynnych takich jak: niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT), fosfolipidów, glikolipidów, sterydów, witamin.

Spośród wszystkich składników pokarmowych to właśnie tłuszcze są głównym i najbardziej skoncentrowanym źródłem energii. Z jednego grama tłuszczu uzyskać można ok. 9 kcal (37,7 kJ), co daje w przybliżeniu dwa razy więcej energii niż z analogicznej ilości białka czy sacharydów. Ponadto związki te pełnią w ustroju człowieka ważną rolę strukturalną. Triacyloglicerole, fosfolipidy, cholesterol i jego estry stanowią część składową komórek ustrojowych, m.in.: błon i organelli komórkowych. Dodatkowo triacyloglicerole są głównym składnikiem zapasowej tkanki tłuszczowej, która to z kolei chroni organizm przed utratą ciepła, a organy wewnętrzne przed wstrząsami i uszkodzeniami.

Dla prawidłowego funkcjonowania organizmu istotne są nie tylko wysokie walory energetyczne tłuszczu, ale również obecność w nich nienasyconych kwasów tłuszczowych, wśród których szczególną wartość mają kwasy: linolowy i arachidowy. NNKT obecne są również w niektórych tłuszczach zwierzęcych, aczkolwiek występują tam w zdecydowanie mniejszych ilościach.

Tłuszcze są również istotnym źródłem fosfolipidów (lecytyny, kefaliny, sfingomieliny). Składniki te stanowią integralną część struktur komórkowych,



szczególnie mitochondrialnych, a także biorą aktywny udział w przemianie materii. Dla wielu istotnych substancji, głównie witamin i karotenoidów, tłuszcze pełnią z kolei funkcję rozpuszczalnika, umożliwiając im w ten sposób wniknięcie do organizmu. Przykładem tego typu związków jest witamina D, której niedobór u dzieci może spowodować występowanie krzywicy, zaś u dorosłych odwapnienie kości.

Tłuszcze spełniają także wiele znaczących funkcji w technologii żywności. Stosuje się je między innymi jako czynnik kontrolowanego przenoszenia ciepła (np. tłuszcze smaźalnicze), co jednocześnie wiąże się z kształtowaniem cech organoleptycznych produktów tłuszczowych, takich jak: wygląd, tekstura, konsystencja, zapach, smak, mazistość. Poszczególne składniki tłuszczy, takie jak np. mono-, diacyloglicerole oraz lecytyna, są z kolei powszechnie stosowane jako emulgatory.

#### 3.1.4.6. Pozostałe lipidy

Do grupy lipidów, oprócz triacylogliceroli, należą następujące grupy związków:

**Woski.** Podobnie jak acyloglicerole woski to estry długołańcuchowych kwasów tłuszczowych i alkoholi innych niż glicerol. Występują najczęściej na powierzchni organizmów roślinnych oraz zwierzęcych razem z takimi związkami jak np.: długołańcuchowymi węglowodorami, alkoholami, kwasami tłuszczowymi. Z tego powodu też bardzo często nazwą *woski* określa się całą tę mieszaninę. Woski naturalne są stałe w temperaturze pokojowej, odporne na wodę, czynniki atmosferyczne i chemiczne. Dzięki swym właściwościom chronią tkanki przed utratą wody, drobnoustrojami czy też szkodliwym działaniem czynników mechanicznych. Najbardziej znanym i wartościowym jest воск pszczeli, воск z wełny (lanolina) oraz воск z Carnauba.

**Fosfolipidy.** Fosfolipidy należą do grupy lipidów złożonych; obok alkoholi i kwasów tłuszczowych zawierają w cząsteczce także estrowo związaną resztę kwasu fosforowego. Występują we wszystkich organizmach żywych, szczególnie obficie w tkankach nerwowych, mózgu czy też nasionach roślin oleistych. Stanowią jedyną grupę lipidów, która posiada zdolność rozpuszczania się w acetonie. Do najważniejszych fosfolipidów zaliczamy m.in.: glicerofosfolipidy i sfingofosfolipidy. Te pierwsze wykazują powinowactwo zarówno do wody jak i do tłuszczów, dzięki czemu odgrywają ważną rolę w przenoszeniu różnych związków przez błonę biologiczną. Wstępują zazwyczaj w postaci kompleksów z białkami przez co stanowią

ważny składnik osocza krwi. Sfingofosfolipidy są natomiast pochodnymi aminoalkoholu – sfingozyiny.

**Glikolipidy.** Glikolipidy podobnie jak fosfolipidy to związki należące do lipidów złożonych, zawierają przynajmniej jedną resztę cukrową połączoną wiązaniem glikozydowym z częścią lipidową. Przedstawicielem tej klasy lipidów są np.: glikoglicerolipidy. Występują głównie w roślinach wyższych i drobnoustrojach. Składnikiem cukrowym glikoglicerolipidów u roślin wyższych jest zazwyczaj galaktoza; wśród kwasów tłuszczowych wchodzących w skład tej grupy związków przeważają z kolei kwasy wielonienasycone.

**Alkohole lipidowe.** To tzw. nieglicerydowe składniki tłuszczów o stosunkowo niewielkim znaczeniu technologicznym. Należą tu przede wszystkim: alkohole alifatyczne zwane tłuszczowymi, sterole, alkohole triterpenowe, karotenole a także alkohole z grupy witamin rozpuszczalnych w tłuszczach. Większość z nich zostaje usunięta podczas procesów rafinacyjnych, tylko niektóre mają znaczenie w żywieniu (sterole, witaminy). Alkohole lipidowe mogą występować zarówno w postaci wolnej bądź zestryfikowanej.

**Węglowodory.** Węglowodory mogą być zarówno naturalnym składnikiem niektórych tłuszczów, jego zanieczyszczeniem, a także mogą powstawać jako produkty rozkładu tłuszczów w wyniku ich jełczenia. Przykładem naturalnie występujących węglowodorów w tłuszczach są karoteny i skwalen. Te pierwsze spotkać można zazwyczaj w tłuszczach roślinnych, skwalen zaś to typowy składnik wielu gatunków olejów z ryb.

### 3.1.5. Witaminy

Witaminy są to niskocząsteczkowe związki organiczne, o różnorodnej budowie chemicznej, rozpowszechnione w świecie roślinnym i zwierzęcym. Są one katalizatorami ogólnych lub swoistych reakcji biochemicznych, wchodzą w skład enzymów i koenzymów, są niezbędne do wzrostu i podtrzymania funkcji życiowych. Dla wielu organizmów, w tym zwierząt i człowieka są to na ogół związki egzogenne i muszą być dostarczane z pożywieniem. Niektóre z nich okazały się również egzogennymi czynnikami wzrostowymi dla różnych drobnoustrojów, a dwie niezbędnymi biokatalizatorami, dostarczany przez bakterie glebowe roślinom wyższym (witamina B12) i niższym (witamina B1). Aby odróżnić je od innych niezbędnych składników pokarmowych, witaminy rozważa się jako substancje działające w bardzo małych

ilościach; z wyjątkiem kwasu askorbinowego, codzienne zapotrzebowanie na pozostałe witaminy jest istotnie bardzo małe – nie przekracza 20 mg. Niektóre witaminy wytwarzają zwierzęta z odpowiednich związków syntetyzowanych przez rośliny. Takie związki nazywane są **prowitaminami** np.  $\beta$ -karoten.

Odkrycie witamin i udowodnienie ich roli w odżywianiu człowieka nastąpiło na przełomie XIX i XX wieku. W 1912 roku polski biochemik Kazimierz Funk nadał składnikowi wyizolowanemu z otrębów ryżowych nazwę **witamina**, tzn. amina niezbędna do życia. Nazwa ta jest powszechnie stosowana również we współczesnej terminologii, mimo że niektóre z później odkrytych witamin nie posiadają funkcji aminowych.

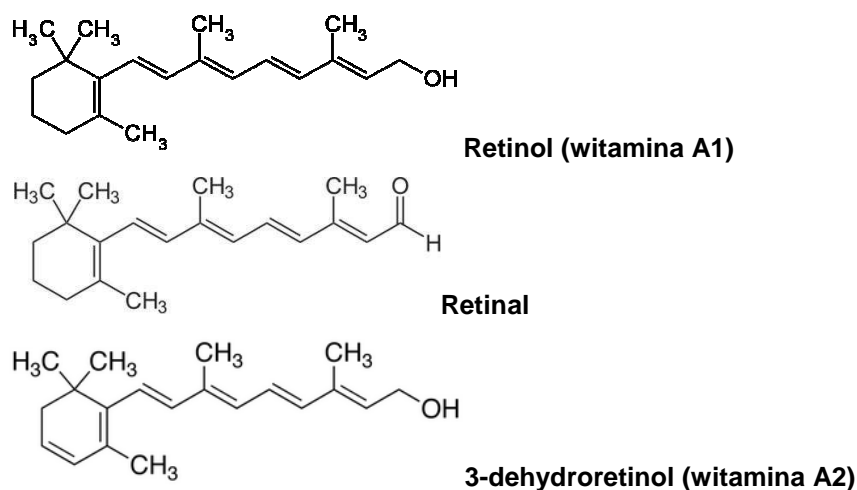
Źródłem witamin i provitamin są rośliny i bakterie żyjące w przewodzie pokarmowym, a także tkanki zwierząt. Rzeczywiste zapotrzebowanie ilościowe na poszczególne witaminy jest trudne do określenia min. ze względu na synergiczne działanie wielu z nich. Zależy ono od cech osobniczych, stanu zdrowia i okresu życia człowieka. Objawy wywołane całkowitym brakiem witamin zwane są *awitaminozami*. Często występują niekorzystne stany pośrednie między awitaminozą a optymalnym zaspokojeniem zapotrzebowania organizmu na określoną witaminę, czyli *hipowitaminozą*. Z kolei nadmierne przyjmowanie preparatów witaminowych, głównie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach, może prowadzić do szkodliwych dla organizmu objawów, zwanych *hiperwitaminozami*. Zawartość witamin w surowcach i produktach żywnościowych jest więc jednym z głównych wskaźników ich jakości oraz prawidłowości stosowanych zabiegów technologicznych. Większość witamin to substancje bardzo wrażliwe na działanie różnych czynników fizycznych i chemicznych, dlatego ich straty bywają stosunkowo duże.

Podstawową klasyfikacją witamin jest podział na:

- witaminy rozpuszczalne w tłuszczach
- witaminy rozpuszczalne w wodzie.

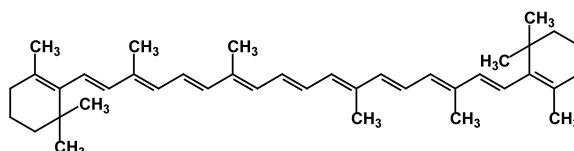
#### 3.1.5.1. Witaminy rozpuszczalne w tłuszczach

**Witamina A.** Zaliczamy do nich: retinol (wit. A1), retinal, 3-dehydroretinol (wit. A2) oraz niektóre stereoizomery retinolu (13-*cis*-retinol, 9-*cis*- i 9,13-*cis*-retinole) – Rys. 13.



**Rys. 13.** Wzory witamin z grupy A

Bezpośrednimi prekursorami witamin z grupy A są karoteny (Rys. 14).



**Rys. 14.** Wzór  $\beta$ -karotenu

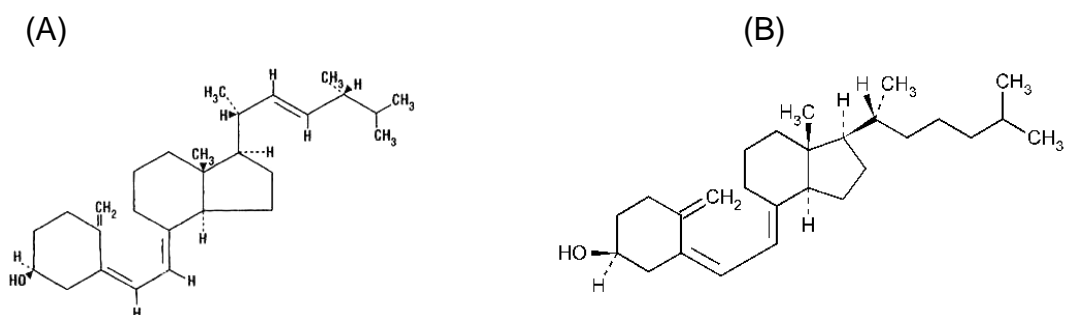
Witamina A oraz prowitaminy w środowisku beztlenowym są trwałe w temp. do 130 °C. W wyższej temperaturze oraz w obecności tlenu substancje te łatwo ulegają rozkładowi. Proces jest przyspieszany przez: promienie UV, enzymy, jony metali ciężkich, nadtlenki. Produkty utleniania witaminy A i karotenów są biologicznie nieczynne.

Aktywność biologiczna związków należących do witamin grupy A jest zróżnicowana. Ich uszeregowanie według malejącej aktywności jest następujące: retinol (A1) > retinal > 13-*cis*-retinol > 3-dehydroretinol (A2) > 9,13-*cis*-retinol. Witamina A2 wykazuje około 50% aktywności witaminy A1. Obecnie zaleca się wyrażanie aktywności za pomocą tzw. *równoważnika retinolu*. Przy określaniu ilości retinolu stosuje się następujące przeliczenia:

**1  $\mu$ g równoważnika retinolu = 1  $\mu$ g czystej formy retinolu (pochodzenia zwierzęcego)  
 = 6  $\mu$ g  $\beta$ -karotenu (pochodzenia roślinnego)  
 = 12  $\mu$ g innych karotenoidów (pochodzenia roślinnego)**

Dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka na witaminę A wyrażone w  $\mu\text{g}$  retinolu wynosi 1000. Najbogatszym jej źródłem są trany rybne oraz wątróbki zwierzęce, jak również owoce oraz warzywa: marchew, natka pietruszki, szpinak, dynia, mango, morele.

**Witamina D.** Związki z grupy witamin D należą do steroidów i są pochodnymi tych steroli, które w pierścieniu B mają układ dwóch sprzężonych wiązań podwójnych. Najważniejsze witaminy grupy D to: witamina D1 (kalcyferol), D2 (ergokalcyferol) – Rys. 15A oraz D3 (cholekalcyferol) – Rys. 15B.



**Rys. 15.** Wzory witamin D: (A) ergokalcyferol, (B) cholekalcyferol

Witamina D jest odporna na działanie podwyższonej temperatury i nie zmienia się w czasie długotrwałego przechowywania. Jest również trwała w środowisku zasadowym, natomiast jest wrażliwa na działanie kwasów. Pod wpływem silnego promieniowania UV ulega zniszczeniu. Roztwory tłuszczu stabilizują witaminę D, w środowisku beztłuszczowym w obecności tlenu łatwo ulega autooksydacji.

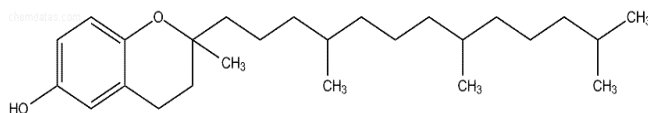
Z punktu widzenia żywienia człowieka najważniejsze są witaminy D2 i D3. W organizmie witaminy te mogą powstawać na skutek syntezy pod wpływem promieni UV (wit. D3), oraz być dostarczane z pożywieniem. Najbogatszym źródłem witaminy D jest tran (2 łyżeczki – 242 mg), ryby: śledź, makrela, łosoś, tuńczyk oraz mleko i jaja.

Najlepiej poznaną funkcją witaminy D, jest rola jaką odgrywa w gospodarce wapniowo-potasowej i w tworzeniu kości. Według norm obowiązujących w naszym kraju dzienne zapotrzebowanie dorosłego człowieka wynosi 5-20  $\mu\text{g}$ , czyli 200-800 j.m.

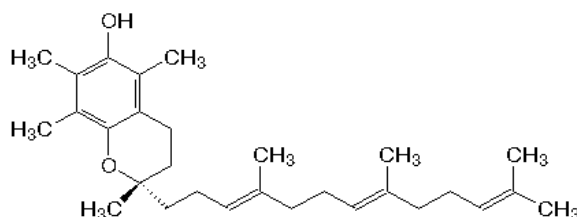
**Witamina E.** Witaminy grupy E są pochodnymi albo tokolu, czyli 2-metylo-2-(4',8',12'-trimetylotridecylo)-chroman-6-olu albo tokotrienolu, czyli 2-metylo-2-(4',8',12'-trimetylotrideka-3',7',11'-trienilo)-chroman-6-olu (Rys. 16A i 16B). Stwierdzono

występowanie w przyrodzie co najmniej 8 związków należących do dwóch grup witamin E, nazywanych odpowiednio tokoferolami i tokotrienolami (Rys. 17).

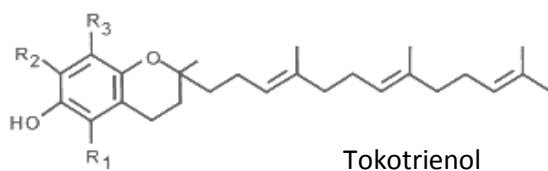
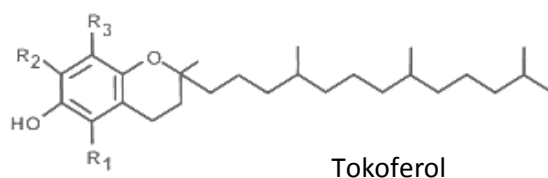
(A)



(B)



**Rys. 16.** Wzory związków chemicznych: (A) - tokolu, (B) – tokotrienolu



Związek	R1	R2	R3
$\alpha$ -tokoferol/ $\alpha$ -tokotrienol	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$ -tokoferol/ $\beta$ -tokotrienol	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$ -tokoferol/ $\gamma$ -tokotrienol	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$ -tokoferol/ $\delta$ -tokotrienol	H	H	CH <sub>3</sub>

**Rys. 17.** Wzory związków należących do dwóch grup witamin E

Największą czynność biologiczną wykazują związki  $\alpha$ .

Witaminy E w temperaturze pokojowej są substancjami oleistymi, nierozpuszczalnymi w wodzie, łatwo rozpuszczalnymi w tłuszczach. W środowisku

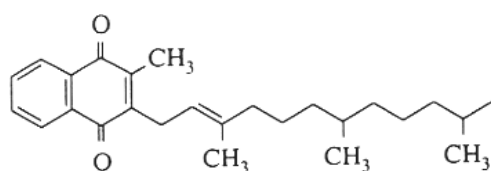
beztlenowym są odporne na działanie wysokiej temperatury, nawet do 200°C oraz kwasów i zasad. Są bardzo wrażliwe na działanie promieni UV oraz tlenu. W obecności soli żelaza łatwo ulegają utlenieniu, stąd podczas przyjmowania żelaza nie powinno się jednocześnie stosować witaminy E.

Stwierdzono, że witamina E jest odpowiedzialna za prawidłowe funkcjonowanie narządów rozrodczych. U dzieci stwierdzono dodatni wpływ witaminy E na wytwarzanie czerwonych krwinek w przypadku anemii. Zapotrzebowanie dorosłego człowieka na tę witaminę waha się w granicach 10-30 mg  $\alpha$ - tokoferolu na dzień. Witaminę E wyraża się w tabelach żywieniowych jako "równoważnik  $\alpha$ - tokoferolu" w mg;  $\alpha$ - tokoferol wykazuje 100% bioaktywności.

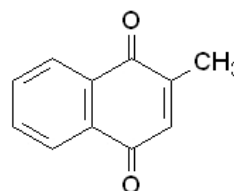
1 mg równoważnika  $\alpha$ - tokoferolu = 1 mg czystej formy  $\alpha$ - tokoferolu  
= 2 mg  $\beta$ - tokoferolu  
= 4 mg  $\gamma$ - tokoferolu  
= 5 mg  $\alpha$ - tokotrienolu

Bogatym źródłem tej witaminy są oleje roślinne, zwłaszcza z kiełków pszenicy, sojowy i bawełniany. Z innych produktów wymienić należy: sałatę, szpinak, kapustę, masło, jaja.

**Witamina K.** Związki wykazujące aktywność biologiczną witaminy K zawierają w swoim składzie aromatyczny układ 1,4-naftochinonu, podstawiony w pozycji 2 grupą metylową. Naturalnie występujące witaminy K mają w położeniu 3 długi węglowodorowy łańcuch boczny fitolowy lub poliprenylowy. Do grupy tej należą: witamina K1 (filochinon), witamina K2 (menachinon), witamina K3 (menadion) – Rys. 18.



Filochinon (K1)



Menadion (K3)

Rys. 18. Wzory witamin K

*Filochinon* w temperaturze pokojowej jest cieczą oleistą, nierozpuszczalną w wodzie. W temperaturze powyżej 100°C ulega rozkładowi. Jest wrażliwy na światło, na promieniowanie UV oraz na działanie zasad i mocniejszych kwasów. Występuje głównie w produktach roślinnych.

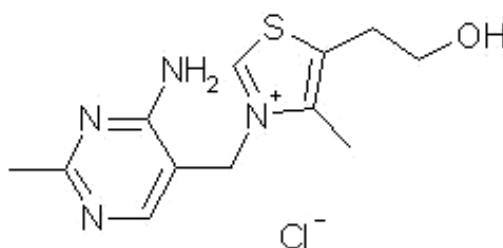
*Menachinony* są związkami krystalicznymi o temperaturze topnienia powyżej 35°C, nierozpuszczalnymi w wodzie. Ich wrażliwość na światło, kwasy i zasady jest podobna do właściwości filochinonu. Pod działaniem substancji utleniających ulegają rozkładowi. Menachinony znajdują się głównie w tkankach zwierzęcych i drobnoustrojach.

*Menadion* jest związkiem syntetycznym, wykazującym większą aktywność biologiczną niż witaminy naturalne, lepiej rozpuszcza się w wodzie i jest łatwiej przyswajany przez organizm.

Witamina K jest niezbędna organizmom zwierzęcym do tworzenia czynników zapewniających prawidłową krzepliwość krwi. Katalizuje syntezę protrombiny w wątrobie. Niezależnie od tych funkcji prawdopodobnie bierze udział w formowaniu tkanki kostnej, ponadto ma również właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, przeciwbólowe i przeciwzapalne. Witamina K występuje w znacznych ilościach w zielonych częściach roślin np. w kapuście i szpinaku.

### 3.1.5.2. Witaminy rozpuszczalne w wodzie

**Tiamina (witamina B1).** Witamina B1 składa się z podstawionego pierścienia pirymidynowego związanego przez grupę metylenową z podstawionym pierścieniem tiazolowym. W handlu dostępna jest jako chlorek amoniowy chlorku tiaminy (zwany też chlorkiem amoniowym tiaminy) – Rys. 19.



**Rys. 19.** Wzór chlorku amoniowego tiaminy

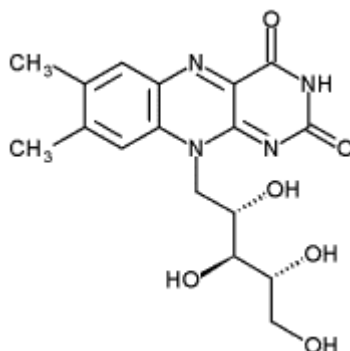
Tiamina jest bardzo rozpowszechniona w tkankach roślinnych i zwierzęcych. Najczęściej występuje jako difosforan tiaminy (pirofosforan), rzadziej jako niefosforylowana tiamina, bądź mono- lub trifosforan tiaminy.



Tiamina jest stosunkowo termostabilna, zwłaszcza w środowisku kwaśnym. W środowisku zbliżonym do obojętnego lub w zasadowym ulega rozkładowi na pojedyncze układy pierścieniowe, tracąc aktywność biologiczną. Destrukcyjnie działa na nią również SO<sub>2</sub>. Straty witaminy podczas zabiegów kulinarnych i technologicznych są zatem najmniejsze w środowisku kwaśnym i przy ograniczonym dostępie tlenu.

Witamina B1 stanowi istotny czynnik w reakcjach spalania węglowodanów w komórkach. Szczególnie ważną rolę pełni witamina B1 w czynnościach i regeneracji systemu nerwowego. Wspomaga również proces wzrostu oraz przyspiesza gojenie się ran i wykazuje działanie uśmierzające ból. Dzielne zapotrzebowanie człowieka na witaminę B1 wynosi przeciętnie 1-2 mg i zależy od ilości sacharydów spożywanych i spalanych w organizmie. Najważniejszym źródłem witaminy B1 są drożdże, przetwory zbożowe (ok. 40 %), a następnie produkty mięsne.

**Ryboflawina (witamina B2).** Ryboflawina – 7,8-dimetylo-10-(1'-D-rybitylo)-izoaloksazy-na (Rys. 20), jest częścią składową wielu enzymów i występuje w tkankach prawie zawsze w formie związanej jako tzw. flawoproteina.



Rys. 20. Wzór ryboflawiny

Witamina B2 obecna w żywności jest dość stabilna, natomiast jej straty występują podczas procesu rozdrabniania i płukania. Stwierdzono, że witamina ta jest bardziej trwała w środowisku kwaśnym niż alkalicznym. Pod wpływem światła łatwo rozkłada się do związków niewykazujących aktywności biologicznej.

Ryboflawina bierze udział w procesach utleniania i redukcji, współdziała w prawidłowym funkcjonowaniu układu nerwowego, błon śluzowych, dróg oddechowych, śluzówki przewodu pokarmowego, nabłonka naczyń krwionośnych i skóry, uczestniczy w przemianach aminokwasów i lipidów, odgrywa ważną rolę w funkcjonowaniu narządu wzroku. Wiele faktów wskazuje na to, że odgrywa także ważną

rolę w tworzeniu się czerwonych krwinek, jak i samej krwi. Dzielne zapotrzebowanie na witaminę B2 wynosi od 1,5 do 3 mg. Jej najbogatszym źródłem jest wątroba, mięso, jaja.

**Kwas nikotynowy i jego amid (witamina PP, B3).** Niacyna, czyli witamina B3, zwana też witaminą PP obejmuje amid kwasu nikotynowego, kwas nikotynowy oraz pochodne wykazujące biologiczną aktywność nikotynoamidu. Zaliczana jest do kompleksu witamin grupy B, a pod względem chemicznym jest pochodną pirydyny (Rys. 21).



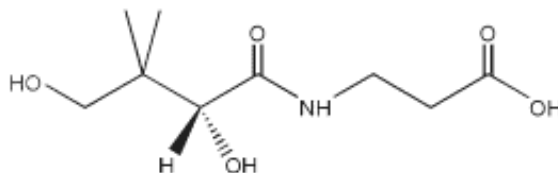
**Rys. 21.** Wzory witamin PP: (a) - amid kwasu nikotynowego, (b) kwas nikotynowy

Zarówno kwas nikotynowy, jak i jego amid są równocenne pod względem aktywności biologicznej; każda z tych substancji może łatwo ulegać przemianie w drugą i obie są obecne w produktach żywnościowych.

Witamina B3 jest termostabilna i niewrażliwa na odczyn środowiska oraz utlenianie. Największe straty tych związków w następują w wyniku rozdrabniania żywności.

Witamina PP uczestniczy w regulacji poziomu cukru we krwi (produkcja związków energetycznych), regulacji poziomu cholesterolu, w procesach utleniania i redukcji w organizmie. Wpływa też na odpowiedni stan skóry, uczestniczy w regulacji przepływu krwi w naczyniach oraz współdziała w syntezie hormonów płciowych. Dzielne zapotrzebowanie człowieka na witaminę PP wynosi 10-25 mg. Do bogatych źródeł tej witaminy należą wątroba, mięso, ryby, ziarna zbóż oraz drożdże.

**Kwas pantotenowy (witamina B5).** Zbudowany jest z reszt kwasu 2,4-dihydroksy-3,3-dimetylo-masłowego i  $\beta$ -alaniny, połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym (Rys. 22).



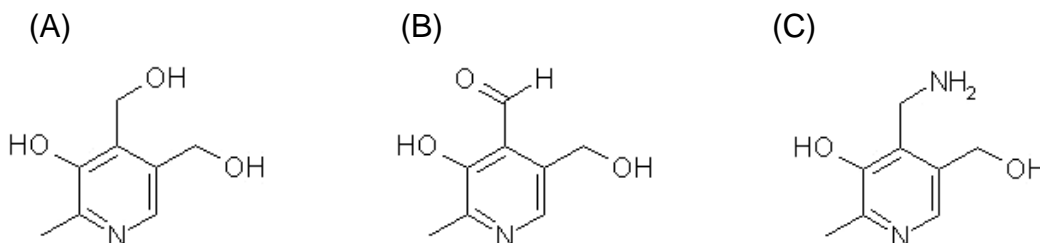
**Rys. 22.** Wzór kwasu pantotenowego

Kwas pantotenowy jest zaliczany do kompleksu witamin B.

Witamina B5 jest dość trwała, przy czym pochodne fosforanowe, odznaczają się większą trwałością, zwłaszcza w środowisku alkalicznym.

W układach biologicznych jest składnikiem koenzymu A, a także kompleksu wieloenzymowego katalizującego syntezę kwasów tłuszczowych. Kwas pantotenowy uczestniczy w syntezie hemu do hemoglobiny i cytochromów. Bierze udział w regeneracji komórek skóry i błon śluzowych, uczestniczy w wytwarzaniu przeciwciał. Wspomaga proces pigmentacji włosów. Dzielne zapotrzebowanie ocenia się na około 5 mg. Bogatym źródłem kwasu pantotenowego są min.: wątroba, mięso, jaja, groch oraz całe ziarna zbóż.

**Pirydoksyna, pirydoksal, pirydoksamina (witamina B6).** Nazwa witamina B6 jest używana jako określenie wszystkich pochodnych 3-hydroksy-2-metylopirydyny (Rys. 23). Czynnymi biologicznie formami witaminy B6 (koenzymami) są fosforanowe pochodne pirydoksaminy i pirydoksalu.



**Rys. 23.** Wzory witamin B6 (a) – pirydoksyna, (b) – pirydoksal, (c) pirydoksamina

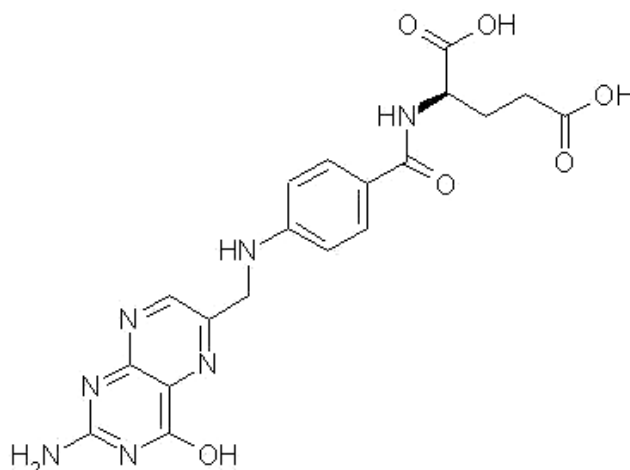
Enzymy z takimi koenzymami biorą udział głównie w przemianach aminokwasów, np. w racemizacji optycznie czynnych aminokwasów, dekarboksylacji aminokwasów,

transaminacji. Witamina B6 podnosi odporność immunologiczną organizmu i uczestniczy w tworzeniu przeciwciał. Pomaga w zamianie tryptofanu na witaminę PP, co zwiększa poziom tej witaminy w organizmie, jest również niezbędna w syntezie porfiryn (synteza hemu do hemoglobiny w produkcji krwinek czerwonych) i hormonów (np: histamina, serotonina).

Związki te są dość trwałe w procesach obróbki termicznej i nie ulegają wyraźnym przemianom pod wpływem tlenu atmosferycznego. Są stosunkowo wrażliwe na działanie światła, zwłaszcza w obojętnych i alkalicznych roztworach.

Dzienne zapotrzebowanie organizmu człowieka na tą witaminę nie jest ustalone, przypuszcza się, że wynosi ono kilka miligramów. Do najbogatszych źródeł witaminy B6 należą: wątroba, ryby, mięso, warzywa, produkty zbożowe.

**Kwas foliowy.** Należy do grupy witamin B i zwany jest także *kwasm pteroiloglutaminowym*, ponieważ zawiera „fragmenty” pochodnej pterydyny (2-amino-4-hydroksy-6-metylopterydynę), kwas *p*-aminobenzoesowy i kwas glutaminowy (Rys. 24).



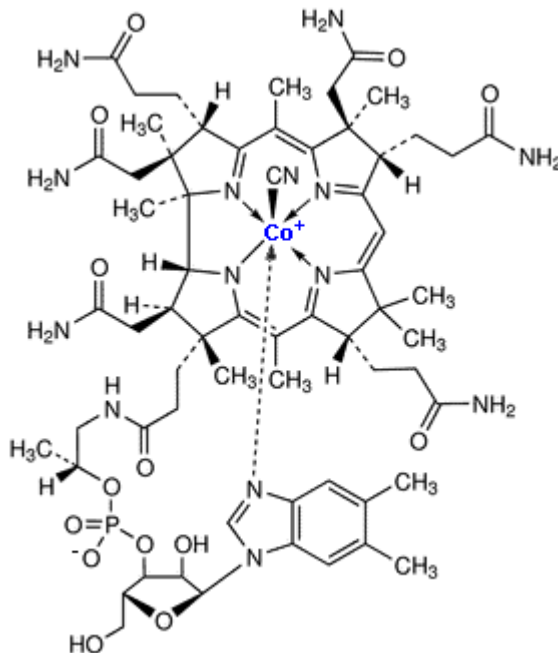
**Rys. 24.** Wzór kwasu foliowego

Obecnie termin „kwas foliowy” ma szersze znaczenie i dotyczy wielu związków, ze względu na dużą ilość analogów i związków pokrewnych. W przyrodzie występują kwasy foliowe, które mają do siedmiu reszt kwasu glutaminowego połączonych wiązaniami peptydowymi.

W czasie ogrzewania, w środowisku kwaśnym lub alkalicznym następuje hydrolityczne odszczepienie od kwasu foliowego reszty *p*-aminobenzoiloglutaminowej. W środowisku obojętnym jego rozkład jest nieznaczny. Jest on wrażliwy na światło, czynniki utleniające i redukujące.

Kwas foliowy, uczestniczy w tworzeniu kwasów nukleinowych DNA i RNA, syntezie aminokwasów, puryn, pirymidyn, bierze udział w procesie podziału komórek, pełni ważną funkcję w procesie tworzenia czerwonych ciałek krwi (wraz z witaminą B12) oraz w procesach mielizacji (tworzenie osłonki mielinowej) neuronów i przy przekształcaniu homocysteiny w metioninę. Jako koenzym F w układach enzymatycznych uczestniczy w przenoszeniu reszt jednowęglowych. Dzielne zapotrzebowanie na tę witaminę wynosi ok. 0,4 mg. Po raz pierwszy kwas foliowy wyizolowano z liści szpinaku, jego bogatym źródłem są zielone części roślin, wątroba oraz drożdże.

**Cyjanokobalamina (witamina B12).** Witamina B12, należy do grupy korynoidów, gdyż zawiera w swoim składzie układ korynowy (pseudoporfirynowy). Układ ten jest zbudowany z czterech zredukowanych pierścieni pirolowych i umieszczonego centralnie, związanego kompleksowo, atomu kobaltu z przyłączoną do niego grupą cyjanową (Rys. 25). Oprócz tego w cząsteczce występuje fragment nukleotydowy z zasadą benzimidazolową. Rybozyd 5,6-dimetylobenzimidazolu jest połączony przez rybozę i resztę fosforanową z 1-amino-2-propanolem.



Rys. 25. Wzór cyjanokobalaminy

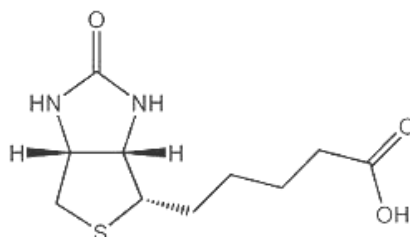
Inny związek z grupy B zawiera zamiast grupy cyjanowej – grupę hydroksylową – witamina B12b. Stwierdzono również występowanie związku, który zamiast 5,6

dimetylobenzimidazolu ma w cząsteczce resztę adeniny, związek ten nazwano pseudowitaminą B12.

Witamina B12 w stanie czystym jest termostabilna. Wodne roztwory są trwałe w zakresie pH 4-7, rozkładają się jednak pod wpływem światła.

W komórce występuje tylko w postaci koenzymu (adenozylkobalaminy lub metylokobalaminy) i dopiero po przekształceniu powstaje z niego cyjanokobalamina. Funkcje biochemiczne koenzymu B12 polegają na jego udziale w kilku typach reakcji min. izomeryzacji kwasów dikarboksylowych, przekształcania rybonukleotydów w deoksyrybonukleotydy, przenoszenia grup metylowych. Stwierdzono, że cyjanokobalamina jest czynnikiem zapobiegającym anemii złośliwej. Zapotrzebowanie dobowe na witaminę B12 wynosi około 0,003 mg. Do bogatszych źródeł witaminy B12 należą wątroba i nerki oraz mięso wołowe.

**Biotyna (witamina H).** Biotyna składa się z dwóch skondensowanych układów pierścieniowych – imidazolowego i tetrahydropyridynowego, podstawionego w pozycji 2 resztą kwasu *n*-walerianowego (Rys. 26).



Rys. 26. Wzór biotyny

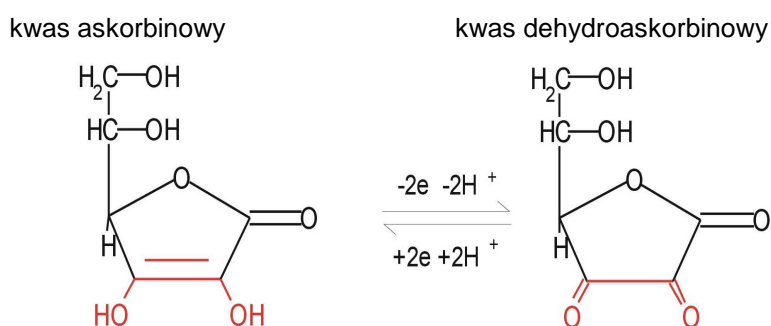
Spośród ośmiu izomerów optycznie czynnych i czterech mieszanin racemicznych jedynie D-biotyna jest aktywna biologicznie.

Związek ten jest termostabilny w środowisku obojętnym. Pod wpływem silniejszych kwasów i zasad rozkłada się.

Witamina H pełni rolę przekaźnika ditlenku węgla w różnych procesach przemiany materii. Bierze udział w metabolizmie białek i tłuszczów, uczestniczy w syntezie kwasów tłuszczowych, jak też przy wchłanianiu witaminy C. Współdziała w przemianie aminokwasów i cukrów jak również uczestniczy z witaminą K w syntezie protrombiny białka odpowiedzialnego za prawidłowe krzepnięcie krwi. Wpływa na właściwe funkcjonowanie skóry oraz włosów, zapobiega siwieniu włosów oraz łysieniu. Przepuszczalne dzienne zapotrzebowanie człowieka na biotynę wynosi około

100 µg. Do głównych źródeł biotyny należą drożdże, wątroba, w mniejszych ilościach występuje w innych produktach, np.: w żółtku jaj, grochu, kalafiorze.

**Kwas L-askorbinowy (witamina C).** Właściwości witaminy C wykazuje kwas L-askorbinowy oraz jego forma utleniona -kwas L-dehydroaskorbinowy. Pod względem chemicznym kwas L-askorbinowy jest laktonem endiolu kwasu 2-okso-L-gulonowego, a kwas L-dehydroaskorbinowy laktonem kwasu 2,3-diokso-L-gulonowego (Rys. 27).



**Rys. 27.**Wzory chemiczne: kwasu askorbinowego i kwasu dehydroaskorbinowego

Kwas L-askorbinowy jest związkem krystalicznym, dobrze rozpuszczalnym w wodzie a jego roztwory mają smak kwaśny. Wykazuje właściwości redukujące. W warunkach beztlenowych jest odporny na wysoką temperaturę. Kwas dehydroaskorbinowy jest mniej trwały w tych warunkach i tym tłumaczy się straty witaminy C podczas ogrzewania. W obecności tlenu obie formy ulegają nieodwracalnemu utlenianiu do produktów nieaktywnych biologicznie, zwłaszcza w obecności jonów niektórych metali, szczególnie  $Cu^{2+}$  i  $Fe^{3+}$ .

Biologiczne funkcje kwasu askorbinowego nie zostały w pełni wyjaśnione. Układ oksydoredukcyjny kwas askorbinowy ↔ kwas dehydroaskorbinowy może uczestniczyć w regulowaniu potencjału oksydoredukcyjnego w komórce i brać udział w transporcie elektronów. Ponieważ witamina C występuje w znacznych ilościach w gruczołach nadnercza, przypuszcza się, że uczestniczy ona w syntezie hormonów sterydowych. Witamina C uczestniczy w syntezie kolagenu i podstawowych białek w całym organizmie oraz w metabolizmie tłuszczów, cholesterolu i kwasów żółciowych. Jako jeden z najważniejszych przeciwutleniaczy pełni także istotną funkcję w reakcjach

odtruwania i odporności organizmu chroniąc go przed procesami utleniania. Jest czynnikiem stabilizującym układ odpornościowy i immunologiczny, hamuje powstawanie w żołądku rakotwórczych nitrozoamin. Ma właściwości bakteriostatyczne i bakteriobójcze w stosunku do niektórych drobnoustrojów chorobotwórczych. Zapotrzebowanie człowieka na witaminę C jest bardzo duże i wynosi średnio 50-100 mg. Do głównych źródeł witaminy C należą owoce i warzywa: czarna porzeczka, papryka czerwona, brukselka, kalafior, szpinak, kapusta kiszona, cytryny. Z uwagi na wysokie zapotrzebowanie organizmu na tę witaminę oraz straty w procesach kulinarnych i technologicznych duże znaczenie ma produkcja produktów wzbogaconych w witaminę C oraz witaminy syntetycznej.

### 3.1.6. Związki mineralne

Składniki mineralne, podobnie jak witaminy, są niezbędne do prawidłowego rozwoju naszego organizmu i muszą być dostarczane wraz z pożywieniem, ponieważ nie są przez nasz organizm wytwarzane.

#### 3.1.6.1. Występowanie i właściwości

W skład soli mineralnych wchodzi:

- **makroskładniki** występujące w większych ilościach w organizmie (np. węgiel, azot, tlen, wapń), których zawartość w organizmie przekracza 50 mg/kg suchej masy tkanek;
- **mikroskładniki** obecne w organizmie w mniejszych ilościach; które są jednak niezbędne do jego prawidłowego funkcjonowania regulując wiele procesów zachodzących w komórkach; należą do nich m.in. żelazo, miedź, mangan, jod, kobalt, cynk i fluor;
- **substancje balastowe** pochodzące bezpośrednio lub pośrednio z zanieczyszczonego środowiska, niespełniające zazwyczaj żadnych pożytecznych funkcji fizjologicznych, często charakteryzujące się działaniem toksycznym.

Takie makroelementy jak: C, H, O, N, Ca, Mg, P, Na, K, S i Cl stanowią prawie 98,8% masy roślin i zwierząt i są głównym składnikiem białek, lipidów, cukrów, nukleotydów i układu kostnego oraz szkieletu zewnętrznego zwierząt. W postaci soli regulują ciśnienie osmotyczne i równowagę kwasowo-zasadową organizmu.



Mikroelementy nie spełniają funkcji materiału budulcowego, niemniej wpływają na aktywność enzymów, hormonów, witamin i innych czynników regulujących różnorodne funkcje życiowe organizmu. Za pierwiastki niezbędne dla wszystkich organizmów żywnych uznano: B, Br, Co, Cu, F, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Si, V i Zn, z kolei: As, Cr, Li i Se są konieczne tylko dla zwierząt, natomiast Al i Ti tylko dla roślin. Niektóre mikroelementy, np. Se, Mn, Co, I są potrzebne w tak małej ilości, że nazywa się je często pierwiastkami śladowymi. Należy zaznaczyć, że nie tylko niedobór mikrośladników w znacznym stopniu zakłóca prawidłową pracę naszego organizmu, nadmiar mikroelementów także wywiera często działanie szkodliwe, a różnica między dawką niezbędną i toksyczną jest często bardzo mała.

Substancje mineralne występują w organizmie zazwyczaj w postaci prostych lub złożonych soli. Należy przy tym podkreślić, że do mineralnych składników żywności nie zalicza się związków węgla, tlenu, azotu i wodoru, które po spaleniu nie pozostawiają popiołu. Możliwość spełnienia funkcji fizjologicznych przez substancje mineralne zależy od:

- budowy powłok elektronowych,
- wartościowości,
- potencjału jonizacyjnego,
- potencjału redoks,
- łatwości zmiany stopnia utlenienia,
- wielkości atomów,
- zdolności tworzenia wiązań podwójnych, wodorowych i jonowych,
- rodzaju i trwałości tworzonych przez pierwiastki jonów,
- ich zdolności przenikania przez błony biologiczne,
- rozpuszczalności soli,
- dostępności w środowisku.

Właściwości te wpływają również na przemiany zachodzące w żywności podczas obróbki cieplnej, utrwalania, składowania czy przetwarzania żywności.

### 3.1.6.2. Zawartość w produktach żywnościowych

Ilość i skład związków mineralnych obecnych w produktach żywnościowych jest zróżnicowany i zależy głównie od rodzaju produktu, procesu produkcyjnego, sposobu przechowywania oraz stopnia zanieczyszczenia środowiska naturalnego. Zawartość

związków mineralnych w surowcach roślinnych zależy od stężenia tych substancji w glebie, wodach gruntowych, stosowanych nawozach i aerozolach znajdujących się w powietrzu. Skład i ilość tych substancji w mięsie zwierząt hodowlanych i innych surowcach pochodzenia zwierzęcego zmienia się w stopniu mniejszym niż w produktach roślinnych i zależy głównie od dostępności tych pierwiastków w paszy, gatunku zwierząt, ich stanu fizjologicznego i wieku. Pewna ilość pierwiastków występujących w żywności może pochodzić także z aparatury i urządzeń stosowanych w procesie produkcji, opakowań żywności (puszki, folie aluminiowe), bądź jest dodawana celowo w procesie produkcyjnych (chlorek sodu, konserwanty, barwniki, polifosforany). Ważnym źródłem składników mineralnych jest także woda pitna, w której zawsze znajdują się różnorodne sole.

Aby ograniczyć straty składników mineralnych w procesie produkcji żywności należy unikać takich procesów jak obieranie, rozdrabnianie, gotowanie, rozmrażanie czy blanszowanie. Straty pojawiają się na skutek usunięcia niektórych tkanek podczas wstępnej obróbki surowca, wycieku zawartości uszkodzonych komórek, ekstrakcji rozpuszczalnych w wodzie składników tkanek, czy też adsorpcji jonów przez składnik, który jest usuwany w procesie produkcji żywności.

Część pierwiastków utraconych w procesie przetwórstwa żywności zostaje uzupełniona poprzez wprowadzanie do żywności soli mineralnych, melasy, otrębów, „drożdży selenowych” i innych produktów pochodzenia organicznego. Przykładem takiego działania jest wprowadzenie do soli kuchennej jodku potasu oraz wzbogacanie żywności dietetycznej, pieczywa i innych produktów zbożowych w węglan wapnia, siarczan żelaza(II) czy mleczan i glukonian wapnia i żelaza(II).

Należy zaznaczyć, że składniki mineralne znajdujące się w żywności są wykorzystywane przez organizm tylko częściowo. Stopień ich wchłaniania w przewodzie pokarmowym jest bardzo zmienny i zależy od rodzaju pierwiastka, formy jego występowania, stopnia utlenienia oraz stanu fizjologicznego organizmu i zapotrzebowania na dany pierwiastek.

### **3.1.7. Niebiałkowe związki azotowe**

Niebiałkowymi związkami azotowymi są wolne aminokwasy i peptydy, kwasy nukleinowe, nukleotydy i produkty ich metabolizmu, tlenek trietyloaminy i mocznik oraz powstające z nich lotne aminy i amoniak, a także glukozydy i heterozydy cyjanogenne,

alkaloidy oraz tiazole, oksazole, pirole i pirazyny. Zawartość niebiałkowych związków azotowych w produktach żywnościowych zależy od rodzaju żywności, czasu i sposobu przechowywania oraz od ich obróbki. Składniki niebiałkowe mają duży udział w ogólnej ilości związków azotu w mięsie, rybach i bezkręgowcach morskich (do 55% w przeliczeniu na azot). Mięśnie czerwone charakteryzują się zazwyczaj znacznie większą zawartością azotu niebiałkowego w porównaniu do mięśni białych. Niebiałkowe związki azotowe mięsa ryb składają się przede wszystkim z kreatyny, wolnych aminokwasów białkowych, tlenku trimetyloaminy, nukleotydów i peptydów. W warzywach azot związków niebiałkowych może stanowić 20-60% ogólnej ilości azotu. Duży wpływ na zapach i smak żywności mają niebiałkowe związki azotowe i powstające z ich rozkładu bezazotowe lotne produkty, a niektóre z nich w większych stężeniach mogą być szkodliwe dla zdrowia człowieka.

#### 3.1.7.1. Wolne aminokwasy i peptydy

Aminokwasy są na ogół dobrze rozpuszczalne w wodzie, a szczególnie dużą rozpuszczalność wykazuje prolina, hydroksyprolina, glicyna i alanina, natomiast słabo rozpuszczalne są cystyna i tyrozyna. Rozpuszczalność aminokwasów w środowisku zasadowym i kwaśnym jest większa niż w wodzie. Aminokwasy aromatyczne absorbują promieniowanie UV z maksimum w zakresie 200-230 nm oraz 250-290 nm, a histydyna, cysteina i metionina w zakresie 200-210 nm. Te właściwości aminokwasów wykorzystuje się podczas analiz HPLC. Aminokwasy, przeważnie mają smak obojętny, słodki lub gorzki, natomiast peptydy mają smak obojętny lub gorzki. Tylko dipeptydy kwasu glutaminowego i asparaginowego są kwaśne, a estry dipeptydów kwasu L-asparaginowego są słodkie.

Głównym źródłem wolnych aminokwasów w surowcach i produktach żywnościowych jest metabolizm komórek oraz działalność drobnoustrojów. Związki te są obecne w wielu produktach żywnościowych, np.: w mięsie zwierząt rzeźnych, skorupiaków, ryb, fok, w bulwach ziemniaka, warzywach, miodzie czy zielonej i czarnej herbacie

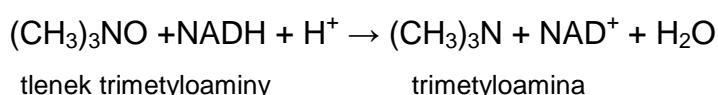
Podczas przechowywania i przetwarzania żywności, np. podczas obróbki w procesach technologicznych oraz w wyniku działania mikroflory, wolne aminokwasy ulegają korzystnym i niekorzystnym zmianom. Związki te ulegają reakcjom syntezy,

deaminacji i eliminacji amoniaku, uwalniania amoniaku z amidów, deaminacji przez odwodornienie lub przy udziale tlenu i bakteryjnymu rozkładowi.

### 3.1.7.2. Aminy i ich pochodne

W produktach piekarskich, piwie, winach, herbacie, czekoladzie, kawie, owocach, warzywach, przetworach zbożowych, serach, przetworach mlecznych, mięsie, rybach i grzybach obecne są wolne aminy, które są naturalnymi i powszechnie występującymi składnikami żywności. Prekursorami wolnych amin w żywności są aminokwasy i fosfolipidy. Aminy mogą powstawać z aminokwasów w skutek dekarboksylacji pod wpływem endogennych enzymów. Częściej jednak aminy powstają z aminokwasów przy udziale dekarboksylaz drobnoustrojów, a także w wyniku rozkładu cieplnego. Dodatkowo, aminy powstają w żywności także jako produkty aminacji i transaminacji aldehydów. Zawartość niektórych lotnych związków azotowych wykorzystuje się jako wskaźnik świeżości, a wiele nielotnych amin może działać toksycznie.

Dużo lotnych amin (metyloamina, dimetyloamina, propyloamina, butyloamina, izobutyloamina i izoamyloamina) wykryto wśród związków zapachowych, np. piwa, wina, herbaty i czekolady. Produkty rybne, mięsne i mleczarskie charakteryzują się dużą zawartością metyloamin. W mięsie zwierząt morskich źródłem lotnych amin jest tlenek trimetyloaminy. Po śnięciu ryb związek ten ulega redukcji pod wpływem enzymów do trimetyloaminy, która daje charakterystyczny rybi zapach. Proces ten został przedstawiony na poniższym równaniu (Rys. 28).



**Rys. 28.** Schemat powstawania trimetyloaminy

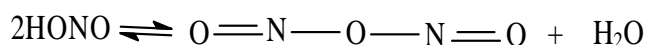
### 3.1.7.3. Histamina i alifatyczne poliaminy

W wielu artykułach żywnościowych występują histamina, putrescyna, kadaweryna, spermidyna i tyramina. Związki te występują w produktach wytwarzanych i dojrzewających przy udziale procesów fermentacyjnych oraz w nieświeżych lub silnie zanieczyszczonych mikrobiologicznie. Putrescyna i spermidyna są powszechne w komórkach roślinnych, w których pełnią funkcje regulacyjne w okresach wzrostu i dojrzewania. Prekursorami tych amin są aminokwasy uwalniane z białek wskutek hydrolizy.

W produktach rybnych największe znaczenie ma histamina, która gromadzi się przede wszystkim w mięśniach bogatych w histydynę w postaci wolnej lub związanej w białkach. Główną przyczyną powstawania histaminy w śniętych rybach jest działanie enzymów bakteryjnych. W rybach morskich zidentyfikowano drobnoustroje należące do kilkunastu gatunków, które dekarboksylują histydynę. Szybkość wytwarzania histaminy zależy od wielu czynników, między innymi od stężenia wolnej histydyny w mięśniach, od właściwości i liczebności populacji bakterii, od obecności aktywatorów i inhibitorów dekarboksylaz histydyny, a także od temperatury.

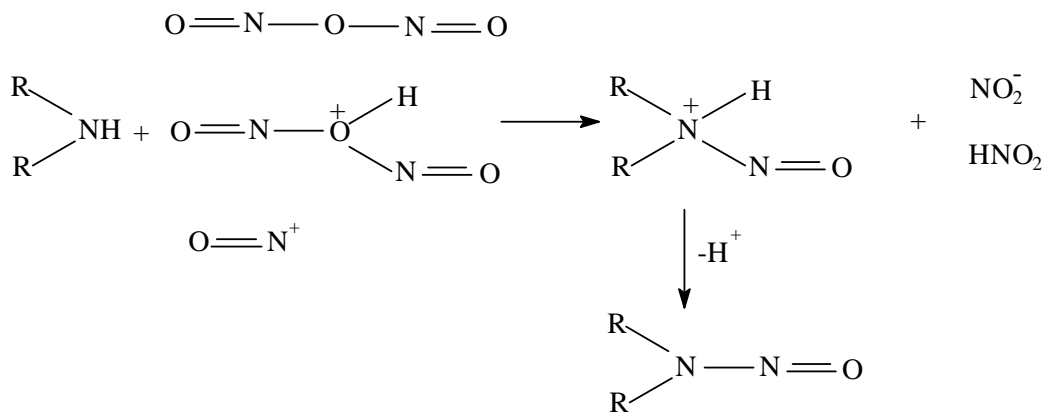
#### 3.1.7.4. Nitrozoaminy

Związki te wykazują silne działanie rakotwórcze. Występują przede wszystkim w peklowanym mięsie, wędzonych rybach, a także w piwie, sosie sojowym i wielu innych produktach spożywczych. W celu ograniczenia powstawania szkodliwych nitrozoamin bardzo skuteczne jest dodawanie związków o charakterze przeciwutleniaczy (witamin C i E) w trakcie obróbki produktów spożywczych. Toksyczne związki *N*-nitrozowe w żywności mogą powstawać w reakcji amin z azotanami(III). Około 90% z nich wykazuje działanie rakotwórcze. Najsilniejsze działanie rakotwórcze wykazuje *N*-nitrozodimetyloamina. Drugorzędowe i trzeciorzędowe aminy oraz amidy ulegają nitrozowaniu w reakcji z azotanami(III). Szybkość tej reakcji jest największa przy pH od 2 do 4, ponieważ ze wzrostem pH maleje stężenie czynników nitrozujących. W kwaśnym środowisku powstaje z azotanu (III) nietrwały HNO<sub>2</sub>, a z niego bezwodnik N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Rys. 29):



**Rys. 29.** Schemat powstawania bezwodnika N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Czynnikami nitrozującymi są bezwodnik N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, bezwodnik protonowany i kation nitrozoniowy oraz halogenki nitrozyli O=N-X i tiocyjanian nitrozoniowy O=N-NCS. Czynniki nitrozujące tworzą z aminami drugorzędowymi *N*-nitrozoaminy, co ilustruje poniższy schemat (Rys. 30):



**Rys. 30.** Schemat powstawania *N*-nitrozoamin

Niektóre trzeciorzędowe aminy aromatyczne ulegają powolnemu nitrozowaniu w pierścieniu aromatycznym, natomiast alifatyczne podlegają reakcji utleniającego dealkilowania. *N*-nitrozoaminy tworzące się w reakcji amin pierwszorzędowych izomeryzują do nietrwałych kwasów diazowych R-N=N-OH, a te w środowisku kwaśnym przechodzą w sole diazoniowe, rozkładające się z wydzieleniem azotu.

### 3.1.7.5. Heterocykliczne aminy aromatyczne i kwasy nukleinowe oraz nukleotydy

Heterocykliczne aminy aromatyczne działają mutagennie i rakotwórczo. Są one produktami pirolizy aminokwasów i białek oraz pochodnymi wytwarzanymi z kreatyniny, aminokwasów i sacharydów. Dotychczas zidentyfikowano około 20 heterocyklicznych amin aromatycznych. Ilość heterocyklicznych amin aromatycznych zależy od wielu czynników, m.in. od obecności prekursorów, aktywatorów i inhibitorów oraz temperatury, czasu reakcji i odczynu środowiska. W produktach żywnościowych występują niewielkie ilości kwasów nukleinowych. Kwas rybonukleinowy jest obecny głównie w rybosomach, a kwas deoksyrybonukleinowy przede wszystkim w jądrze komórkowym. Obydwa kwasy występują w połączeniach z zasadowymi białkami jako nukleoproteiny. W artykułach żywnościowych występują również nukleotydy i produkty ich przemian. Są to wolne nukleotydy i produkty rozkładu kwasów nukleinowych.

## 3.2. Zanieczyszczenia żywności

Żywność narażona jest na działanie czynników chemicznych, fizycznych i biologicznych. Do zanieczyszczeń żywności może dojść podczas jej wytwarzania,

pakowania, transportu oraz przechowywania, a także w czasie przygotowania do spożycia.

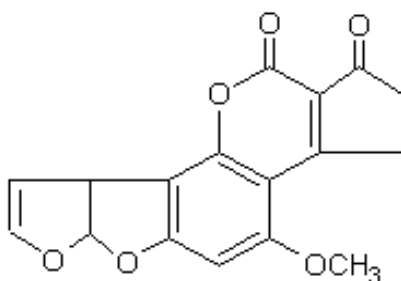
Do chemicznych zanieczyszczeń żywności, które mogą być szkodliwe dla zdrowia człowieka należą:

- składniki naturalne, które są produktami metabolizmu surowców roślinnych i zwierzęcych,
- substancje wchłonięte ze środowiska przez organizmy roślinne i zwierzęce,
- pozostałości nawozów mineralnych i środków ochrony roślin,
- związki stosowane w hodowli i lecznictwie zwierząt oraz w produkcji pasz,
- substancje wprowadzone do produktów żywnościowych wskutek procesów technologicznych,
- substancje pochodzące z urządzeń, sprzętu, naczyń i opakowań,
- substancje obecne w żywności wskutek działania drobnoustrojów.

Zanieczyszczenia fizyczne żywności najczęściej stanowią fragmenty opakowań. Tego typu zanieczyszczenia są eliminowane podczas prawidłowo przeprowadzonego procesu technologicznego. Znacznie bardziej niebezpieczne dla zdrowia człowieka są zanieczyszczenia biologiczne. Do produkcji żywności mogą być dostarczane produkty rolne skażone mikrobiologicznie. Z tych względów konieczna jest kontrola mikrobiologiczna surowców i produktów żywnościowych na każdym etapie procesu technologicznego. W badaniach mikrobiologicznych żywności, na podstawie oznaczeń ilościowych drobnoustrojów, można stwierdzić stan higieniczny i trwałość danego produktu. Dlatego w normach ilościowych poszczególnych produktów podana jest górna, dopuszczalna granica ogólnej liczby bakterii i liczby drobnoustrojów szkodliwych. W celu określenia liczby drobnoustrojów najczęściej stosowane są metody mikroskopowe, hodowlane i wskaźnikowe. Ilościowe metody mikroskopowe polegają na liczeniu komórek bezpośrednio w polu widzenia mikroskopu, a wynik obejmuje wszystkie komórki: żywe i martwe. Metody hodowlane oparte są na wzroście drobnoustrojów, dlatego oznaczane są wyłącznie komórki żywe. Natomiast metody wskaźnikowe polegają na ujawnieniu określonych właściwości drobnoustrojów. Stosowane są one w badaniach wzrostu kultur drobnoustrojów i mierzona jest ilość produktów metabolizmu, właściwości redukujące, poziom azotu w biomasie, zmętnienie pożywki itp.

### 3.2.1. Mikotoksyny

Mikotoksyny są silnie toksycznymi produktami wtórnego metabolizmu grzybów (pleśni) należących do rodzajów: *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*. Tworzą się w okresie wegetacji lub zbioru, a także w wyniku nieprawidłowego przechowywania licznych produktów żywnościowych. Zanieczyszczenia mikotoksynami występują głównie w zbożu i jego przetworach, orzechach, przyprawach, kukurydzy, kawie, kakao, herbacie, owocach suszonych, piwie, winie i mleku. Ze względu na zróżnicowany charakter toksycznego oddziaływania mikotoksyn na organizmy wyższe podzielono je na 6 grup: aflatoksyne, ochratoksyna A, patulina, fumonizyny, deoksyniwalenol i zearalenon. Najbardziej toksyczna spośród wszystkich rodzajów mikotoksyn jest aflatoksyne B<sub>1</sub> (Rys. 31).



Rys. 31. Wzór aflatoksyne B<sub>1</sub>

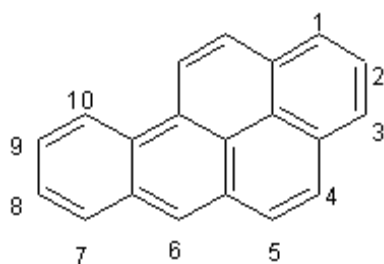
Mikotoksyny, które znajdują się w żywności mogą być powodem mikotoksykoz. Dlatego żywność powinna być wytwarzana, transportowana i przechowywana w odpowiednich warunkach, tak aby zabezpieczyć ją przed wilgocią oraz niekorzystną temperaturą. Efekt toksyczny mikotoksyn zależy od rodzaju oraz ilości toksyny, która została spożyta wraz z produktami żywnościowymi. Długotrwałe narażenie organizmu na mikotoksyny może powodować różne przewlekłe choroby, np. nowotwory wątroby i nerek. Istnieją również ostre zatrucia po pobraniu jednorazowo dużej dawki mikotoksyn.

Zapobieganie powstawania mikotoksyn polega na zapewnieniu odpowiednich warunków produkcji pasz i żywności. Dodatkowo, w produkcji pasz stosowane są grzybobójcze środki chemiczne. W zapobieganiu wytwarzaniu mikotoksyn biorą udział także naturalne mechanizmy obronne roślin poprzez wytwarzanie związków antygrzybowych.



### 3.2.2. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)

WWA są to wysoce niebezpieczne substancje wykazujące właściwości zarówno kancerogenne, jak i mutagenne. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) szacuje, że narażenie na WWA jest w 99% wynikiem konsumpcji żywności. Jedynie około 0,9% tych związków dostaje się do organizmu wskutek wdychania, zaś 0,1-0,3% z wodą pitną. W żywności związki te mogą powstawać albo w trakcie procesów jej przetwarzania (prażenie kawy, suszenie zbóż), bądź też podczas termicznej obróbki (pieczenie, smażenie, grillowanie), a także w trakcie jej utrwalania (wędzenie). Ponadto duże ilości WWA znajdujące się w produktach spożywczych pochodzą z zanieczyszczenia środowiska, np. ryby wyławiane z rejonów wysoce uprzemysłowionych. Najbardziej znanym przedstawicielem tej grupy mutagenów jest benzo[a]piren (Rys. 32).



Rys. 32. Wzór benzo[a]pirenu

Stwierdzono, że WWA zawierające powyżej 3 pierścieni są rakotwórcze i mutagenne. Do tych związków należą m.in. benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten i dibenzo(a,e)piren. WWA są metabolizowane przez mikrosomalne enzymy cytochromu P 450 do związków mogących tworzyć trwałe połączenia z DNA (np. epoksydy), co może prowadzić do wysoce prawdopodobnego procesu tworzenia nowotworów. W celu oceny toksyczności wszystkich rakotwórczych WWA, wprowadzono tzw. względny współczynnik rakotwórczości ( $k$ ), odnoszący się do rakotwórczości benzo[a]pirenu (BaP), dla którego przyjęto wartość równą 1 (Tabela 11). Obecnie, jako miarę narażenia na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne przyjmuje się wskaźnik będący sumą iloczynów stężeń 9 WWA i ich względnych współczynników rakotwórczości.

**Tabela 11.** Wartości względnych współczynników rakotwórczości (wg. Pośniak M., Makhniashvili I., Kozieł E., Kowalska J., *Bezpieczeństwo Pracy* 9/2001, str. 12)

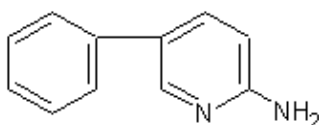
Lp	WWA	Względny współczynnik rakotwórczości <i>k</i>
1	Dibenzo(a,h)antracen	5
2	Benzo(a)piren	1
3	Benzo(a)antracen	0,1
4	Benzo(b)fluoranten	0,1
5	Benzo(k)fluoranten	0,1
6	Indeno(1,2,3-c,d)piren	0,1
7	Antracen	0,01
8	Chryzen	0,01
9	Benzo(g,h,i)perylene	0,01

WWA do żywności przenika z powietrza, gleby i wody, czyli ze wszystkich elementów środowiska. Rośliny mogą syntezować, wchłaniać i rozkładać WWA. Przykładowo, obecność benzo(a)pirenu stwierdzono w sałacie, szpinaku i szczypiorze. Również ryby, mięczaki, wodorosty i plankton zawierają ten związek. Wzrost zawartości WWA obserwowany jest podczas obróbki termicznej żywności wraz ze wzrostem temperatury i czasu jej działania.

### 3.2.3. Heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA)

HAA powstają na skutek obróbki cieplnej żywności, przede wszystkim tej o dużej zawartości białka. W zależności od temperatury w jakiej prowadzony jest proces przetwarzania produktów spożywczych powstawać mogą różne rodzaje

heterocyklicznych amin aromatycznych. W temperaturze wyższej niż 300°C powstają produkty pirolizy aminokwasów i białek, z kolei w niższych temperaturach (150-200°C) tworzą się pochodne chinoliny, chinoksaliny i pirydyny. W efekcie związki te występują w smażonym i pieczonym mięsie oraz w smażonych rybach. Przedstawicielem tej grupy mutagenów jest 2-amino-5-fenylpirydyna, w skrócie Phe-P-1 (Rys. 33).



Rys. 33. Wzór 2-amino-5-fenylpirydyny Phe-P-1

#### 3.2.4. Azotany(V) i azotany(III)

Stosowanie nawozów mineralnych, obecność azotanów(V) w wodach powierzchniowych, zanieczyszczenia ściekami komunalnymi i przemysłowymi oraz odchody zwierzęce to główne źródła azotanów(V) w żywności. Duża zawartość azotanów(V) występuje w warzywach liściastych, takich jak: burak, seler, szpinak, rzodkiewka, sałata, marchew i kapusta. Zawartości azotanów(V) w warzywach zależy od intensywności nawożenia, właściwości gleby, klimatu, ale także od gatunku rośliny i czasu wegetacji. Azotany(III) w warzywach występują w małych ilościach. Tylko podczas przechowywania zawartość ich może wzrosnąć na skutek redukcji azotanów(V). Azotany(V) i azotany(III) występują także w produktach pochodzenia zwierzęcego, a źródłem ich jest pasza i woda. Związki te stosowane są w przetwórstwie mięsa i serowarstwie. Dzięki ich zastosowaniu, produkty zyskują różową barwę oraz charakterystyczny smak i zapach. Oprócz tego, azotany(III) działają przeciwutleniająco, zmniejszają odporność cieplną przetrwalników bakterii i hamują rozwój drobnoustrojów. Azotany(V) są mało toksyczne, jednak mogą powodować podrażnienia błony śluzowej przewodu pokarmowego. Głównym źródłem pobrania azotanów(III) są peklowane przetwory mięsne. Pobrane z żywnością są wchłaniane z przewodu pokarmowego i wydalane z moczem. U niemowląt szybkość redukcji azotanów(V) jest znacznie większa ze względu na niższą kwasowość soku żołądkowego. Zatrucie azotanami(III) objawia się bólami brzucha, zaczerwienieniem twarzy i skóry, zawrotami głowy, sinicą,

duszną i spadkiem ciśnienia krwi, co może doprowadzić do zapaści. Niedotlenienie następuje, gdy stężenie methemoglobiny przekracza 20%, zgon następuje gdy ta wartość wynosi 50%. Dawką śmiertelną dla osoby dorosłej jest około 4 g azotanów(III). Azotany(V) i azotany(III) mogą być źródłem *N*-nitrozoamin.

### 3.2.5. Metale ciężkie

Metale ciężkie są to pierwiastki o gęstości powyżej 4,5 g/cm<sup>3</sup>. Występują w sposób naturalny w środowisku człowieka. Niektóre z nich, w niewielkich stężeniach są niezbędne dla prawidłowego rozwoju człowieka i katalizują wiele reakcji biochemicznych (tzw. mikroelementy – cynk i miedź). Inne mogą być zbędne lub niebezpieczne (ołów, kadm, rtęć, arsen, chrom, kobalt, nikiel). Metale przenikają do żywności zarówno z powietrza, gleby, jak i wody. Głównymi źródłami metali ciężkich, które zanieczyszczają środowisko są: procesy spalania paliw, transport, składowanie i spalanie odpadów. Dodatkowym źródłem metali ciężkich w produktach spożywczych są środki ochrony roślin i nawozy stosowane w ich uprawie. Stosowanie odpowiednich zabiegów agrotechnicznych daje możliwość ograniczenia zawartość metali ciężkich w warzywach. Można to osiągnąć stosując:

- wapnowanie,
- utrzymanie stabilnego odczynu (pH 6,5–7),
- nawożenie organiczne (obornik, kompost, nawozy zielone).

Ponadto metale osadzają się na powierzchni liści wraz z pyłami i tylko w niewielkim stopniu są wchłaniane w głąb tkanek, dlatego też stosunkowo łatwo można je usunąć poprzez mycie. Źródłem skażeń żywności metalami ciężkimi mogą być również procesy technologiczne, naczynia, sprzęt, aparatura służąca do jej produkcji i przetwarzania, a także opakowania i pojemniki, w których jest ona transportowana i przechowywana.

Spośród metali ciężkich największe zagrożenie dla człowieka stwarzają: ołów, kadm, rtęć oraz cynk. Posiadają one zdolność bioakumulacji oraz długi okres biologicznego półtrwania i w związku z tym mogą wykazywać tzw. toksyczność chroniczną. Zatrucia ostre zdarzają się bardzo rzadko.

Metale ciężkie mogą powodować:

- zmiany w syntezie białek,
- zaburzenia wytwarzania ATP,
- uszkodzenia błon i organelli komórkowych (mitochondriów, lizosomów),

- reakcje z grupami sulfhydrylowymi, karboksylowymi i fosforanowymi ligandów biologicznych,
- uszkodzenia w układzie pokarmowym, oddechowym, nerwowym, krążenia, krwiotwórczym i wydalniczym,
- działanie rakotwórcze.

Okolo 90% metali ciężkich dostaje się do organizmu wraz z pożywieniem (zwłaszcza pochodzenia roślinnego), natomiast pozostała część wchłaniana jest przez układ oddechowy. Obróbka technologiczna (blanszowanie, gotowanie) znacznie obniża zawartość metali ciężkich w żywności. Również składniki pokarmowe takie jak: białka, błonnik, witaminy C, D i E oraz niektóre składniki mineralne ograniczają ich przyswajalność.

Metale ciężkie można spotkać m.in. w mięsie, wątrobie, nerkach zwierząt hodowlanych i łownych, a także w mleku, jajach i miodzie. Poszczególne metale wykazują różnorodne efekty toksyczne:

- **Pb** wywołuje zaburzenia w funkcjonowaniu wątroby, nerek, ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego, układu pokarmowego i sercowo-naczyniowego,
- **Hg** powoduje zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym,
- **Cd** wykazuje działanie rakotwórcze i mutagenne oraz embriotoksyczne. Efektem jego działania są zmiany morfologiczne i czynnościowe układu oddechowego i nerek,
- **Zn** prowadzi do uszkodzenia trzustki, a także powoduje zmiany morfologiczne mózgu, działa mutagennie i embriotoksycznie, powoduje zahamowanie wzrostu, wywołuje zaburzenia w układzie krążenia i metabolizmie metali niezbędnych dla funkcjonowanie organizmu,
- **Sn** powoduje powiększenie i zwyrodnienie wątroby, zaburzenie funkcjonowania układu nerwowego,
- **Cu** wywołuje uszkodzenie wątroby, nerek i naczyń włosowatych oraz zmniejsza stężenie hemoglobiny, krwinek czerwonych i hemakrytu.

#### 3.2.5.1. Zanieczyszczenia wód metalami ciężkimi

Zanieczyszczenie wód następuje z przyczyn naturalnych, jak i antropogenicznych. W związku z działalnością człowieka, najbardziej narażone są powierzchniowe wody śródlądowe, płytkie gruntowe i wody atmosferyczne, a najmniej zanieczyszczane są wody podziemne. Zanieczyszczenia wód powodowane

są głównie ściekami przemysłowymi i komunalnymi. Dopuszczalne zawartości pierwiastków śladowych w wodach powierzchniowych i w ściekach odprowadzanych do wód lub do gleby określa Rozporządzenie Ministra Ochrony Środowiska, Zasobów Naturalnych i Leśnictwa z dnia 5.11.1991 r. Dz.U. z 16 grudnia 1991 r.

### 3.2.5.2. Zanieczyszczenia roślin metalami ciężkimi

Nadmiar metali ciężkich, zarówno niezbędnych dla roślin, jak i niespełniających żadnej roli biochemicznej jest szkodliwy dla człowieka. Rośliny występujące na terenach zanieczyszczonych rozwijają mechanizmy adaptacyjne. Polega to na unikaniu nadmiernego pobierania pierwiastków, wydzielaniu ich, a także na wiązaniu ich w miejscu, w którym będą one nieszkodliwe. Wśród roślin uprawnych istnieją takie, które posiadają podatność do akumulowania metali: sałata – Cd, Pb, szpinak – Cd, Pb, kapusta – Cd, Zn, Pb, marchew – Cd, buraki – Cu, Ni, Zn, ziemniaki – Cd, Pb, rośliny strączkowe – Cu. Rośliny zbożowe zazwyczaj pobierają mniej metali ciężkich od roślin dwuliściennych. Oprócz działania fitotoksycznego, duże ilości metali ciężkich stwarzają zagrożenie zanieczyszczenia łańcucha żywieniowego. Na podstawie badań toksykologicznych na zwierzętach i obserwacji ludzi ustalono dawki, jakie mogą być pobierane przez człowieka przez okres całego życia, bez zagrożenia dla jego zdrowia. Dopuszczalne zawartości pierwiastków śladowych w środkach spożywczych pochodzenia roślinnego, stanowiących podstawę diety dorosłego człowieka określa Zarządzenie Ministra Zdrowia i Opieki społecznej z dnia 31.03.1993 r. Dopuszczalne zawartości wybranych metali ciężkich w żywności pochodzenia roślinnego zostały przedstawione w Tabeli 12.

**Tabela 12.** Dopuszczalne zawartości wybranych metali ciężkich w żywności pochodzenia roślinnego (mg/kg świeżej masy) (wg Kabata-Pendias A., Pendias H. *Biogeochemia pierwiastków śladowych* PWN, Warszawa, 1999, str. 102)

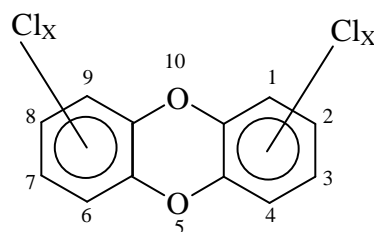
<b>Żywność pochodzenia roślinnego</b>	<b>Cd</b>	<b>Pb</b>	<b>Hg</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>
Warzywa bez korzeniowych i liściastych	0,05	0,3	0,02	4,0	10,0
Warzywa korzeniowe i liściaste bez rzodkiewki i kapusty	0,08	0,5	0,02	4,0	10,0
Owoce bez jagodowych	0,03	0,2	0,01	4,0	10,0
Owoce jagodowe	0,04	0,3	0,01	4,0	10,0

Pszenica	0,10	0,4	0,02	6,0	50,0
Kukurydza	0,03	0,3	0,01	6,0	30,0
Zboża bez pszenicy i kukurydzy	0,10	0,5	0,02	6,0	50,0
Ziemniaki	0,05	0,25	0,02	4,0	10,0

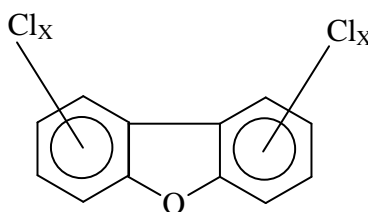
### 3.2.6. Dioksyne

Dioksyne (PCDD) to substancje należące do związków silnie toksycznych, sztucznie wytworzonych przez człowieka. Powstają jako produkty uboczne podczas procesów spalania odpadów zawierających chlor, a także w procesie wytwarzania papieru metodą Krafta. Największe stężenie dioksyn obserwuje się w mleku, przetworach mlecznych oraz w rybach. Ponadto związki te mogą przenikać do żywności z produktów papierniczych takich jak: filtry do kawy, serwetki, talerze papierowe. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem zakwalifikowała dioksyne jako kancerogen grupy A, chociaż tak naprawdę do dzisiaj nie udowodniono do końca ich rakotwórczego, teratogenne i mutagenne działanie.

Budowa dioksyn (PCDD) została przedstawiona na Rys. 34. Dioksyne stanowią grupę 75 związków o różnym stopniu podstawienia chlorem, natomiast występujące z dioksynami, polichlorowane dibenzofurany (PCDF) stanowią grupę 135 związków o różnych miejscach i różnym stopniu podstawienia chlorem (Rys. 34).



PCDD



PCDF

**Rys. 34.** Wzory dioksyn i dibenzofuranów

Toksyczność tych związków zależy od liczby atomów chloru i miejsca ich rozmieszczenia w cząsteczce. Najbardziej toksyczne są związki, które posiadają przynajmniej 3 atomy chloru w pozycjach 2, 3, 7 lub 8. Zatrucia dioksynami mogą prowadzić do trądzikowych zmian skóry, porfirii (tzn. wydalanie z moczem dużych ilości porfiryn), uszkodzeń wątroby i polineuropatii (zwyrodnienia nerwów). Toksyczność dioksyn została wyznaczona w stosunku do 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioksyny. Współczynniki toksyczności TFE (*toxicity equivalent factor*) umożliwiają oszacowanie całkowitej toksyczności wszystkich izomerów w danych produktach żywnościowych.

### **3.2.7. Polichlorowane bifenyle (PCB)**

Polichlorowane bifenyle zaliczane są przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem do grupy 2A – związków o prawdopodobnym działaniu rakotwórczym dla człowieka. Należą do tzw. ksenoestrogenów, czyli substancji mających zdolność do naśladowania estrogenów przy jednoczesnym zmniejszaniu aktywności tych hormonów. Związki te tworzą się w trakcie chlorowania wody pitnej i bardzo dobrze rozpuszczają się w tłuszczach. Podobnie jak pestycydy wykazują zdolność do bioakumulacji, przez co w miarę wydłużania się łańcucha troficznego, ich zawartość rośnie w organizmach na wyższych poziomach troficznych. Szczególnie dużo PCB odkłada się w organizmach żyjących w wodzie, głównie w wątrobie i tkance tłuszczowej ryb.

### **3.2.8. Radionuklidy**

Zagrożeniem dla zdrowia ludzi może być także żywność skażona radioaktywnymi izotopami. Substancje te stanowią zagrożenie dla człowieka z powodu łatwej przyswajalności i zdolności odkładania się w organizmie, a ponadto posiadają długi okres połowicznego rozkładu. Naturalne izotopy promieniotwórcze obecne są środowisku i nie stanowią zagrożenia dla człowieka. Zagrożenie stanowią skażenia promieniotwórcze spowodowane próbami nuklearnymi, awariami reaktorów atomowych oraz niewłaściwym zabezpieczeniem odpadów radioaktywnych. Spośród radionuklidów najczęściej przenikają do żywności i stanowią największe zagrożenie dla zdrowia człowieka:  $^{90}\text{Sr}$  (okres półtrwania 28 lat),  $^{89}\text{Sr}$  (okres półtrwania 51 dni),  $^{137}\text{Cs}$  (okres półtrwania 30 lat),  $^{131}\text{I}$  (okres półtrwania 8 dni) i  $^{140}\text{Ba}$  (okres półtrwania 1 dzień). Radionuklidy te mają zdolność do bioakumulacji w łańcuchach troficznych, których



konsumentem ostatniego rzędu jest człowiek. Owoce czarnej porzeczki i podgrzybki brunatne ze względu na dużą zdolność bioakumulacji radionuklidów mogą być wskaźnikami skażenia środowiska. Radionuklidy przyjmowane wraz z pożywieniem uszkadzają błony i komórki przewodu pokarmowego. W wyniku działania promieniowania tworzą się rodniki  $\cdot\text{H}$  i  $\cdot\text{OH}$ , które reagują z makrocząsteczkami komórkowymi lub z sobą i powstaje silny utleniacz, jakim jest  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Również rodnik  $\text{HO}_2\cdot$  może ulec redukcji do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Oddziaływanie tych rodników i  $\text{H}_2\text{O}_2$  z kwasami nukleinowymi może powodować rozerwanie nici DNA, aberracje chromosomalne, mutacje punktowe i śmierć komórki. Radionuklidy wykazują wiele różnorodnych efektów toksycznych:

- $^{226}\text{Ra}$  wywołuje zmiany nowotworowe kości,
- $^{90}\text{Sr}$  powoduje białaczkę szpikową,
- $^{137}\text{Cs}$  jest przyczyną zaniku szpiku,
- $^{144}\text{Ce}$  prowadzi do promiennego zapalenia płuc, martwicy wątroby, zaniku szpiku, białaczki szpikowej oraz zmian nowotworowych wątroby i kości,
- $^{238}\text{U}$  wykazuje działanie nefrotoksyczne oraz powoduje zmiany włókniste płuc, przerost komórek nabłonka płuc i nowotwory płuc,
- $^{239}\text{Pu}$  powoduje zmiany włókniste płuc i zmiany nowotworowe oskrzeli.

### 3.2.9. Pestycydy

Pestycydy to szeroka grupa związków pochodzenia naturalnego oraz syntetycznego wykazująca dużą aktywność biologiczną. Można je podzielić na zoocydy, bakteriocydy, herbicydy i fungicydy. Głównym źródłem zanieczyszczeń żywności pestycydami jest stosowanie nadmiernych ilości środków ochrony roślin oraz stosowanie ich w nieodpowiednich terminach wegetacji roślin. Środki ochrony roślin to substancje lub ich mieszaniny, które są przeznaczone do:

- ochrony roślin uprawnych przed organizmami szkodliwymi,
- niszczenia niepożądanych roślin i regulowania wzrostu,
- rozwoju i innych procesów biologicznych roślin uprawnych.

Substancja biologicznie czynna to z kolei aktywna część środka ochrony roślin zwalczająca organizmy szkodliwe. Główne grupy środków ochrony roślin zawierają podobną liczbę substancji czynnych: herbicydy - 109, zoocydy - 97 i fungicydy - 92.

W skład herbicydów, zoocydów i fungicydów wchodzi odpowiednio: 30, 17 i 20 klas chemicznych.

Najliczniejszymi klasami herbicydów, zoocydów i fungicydów są:

1. Fenoksykwasy (8 substancji biologicznie czynnych),
2. Chloroacetanilidy (8),
3. Pochodne sulfonilomocznika (9),
4. 1,3,5-Triazyny (7),
5. Związki fosforoorganiczne (22),
6. Piretroidy (14),
7. Karbaminiany (13),
8. Azole (23),
9. Fenyloaminy (6),
10. Benzimidazole (5),
11. Karbaminiany (5).

Organizmy lądowe (rośliny wyższe, mikroorganizmy i zwierzęta) i morskie (algi, gąbki i korale) wytwarzają substancje, które są insektycydami naturalnego pochodzenia. Ponad 2000 gatunków roślin wyższych syntezuje insektycydy, a ponad 60 składników o takim działaniu wyizolowano z różnych gatunków grzybów.

Ze względu na zagrożenie jakie stanowią środki ochrony roślin określono m. in. najwyższe dopuszczalne poziomy pozostałości chemicznych środków ochrony roślin:

- w środkach spożywczych przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci,
- które mogą znajdować się w środkach spożywczych pochodzenia roślinnego lub na ich powierzchni,
- które nie mogą być stosowane w uprawach surowców przeznaczonych do wyrobu przetworzonych produktów zbożowych i żywności dla niemowląt i małych dzieci.

### **3.3. Rakotwórcze i mutagenne składniki żywności**

Żywność stanowi istotny element w życiu każdego człowieka. Zawarte w niej substancje odżywcze są niezbędne do prawidłowego rozwoju i funkcjonowania organizmu. Niestety wśród składników żywności występują również związki niepożądane, mające właściwości rakotwórcze i mutagenne. Substancje te są bardzo groźne i niebezpieczne dla naszego zdrowia, a nawet życia. *Mutageny* powodują zmiany w zapisie genetycznym, prowadzą do jego uszkodzenia i pojawienia się

groźnych mutacji. *Kancerogeny* (substancje rakotwórcze) przyczyniają się z kolei do powstawania nowotworów bez ingerencji w kod genetyczny. Czynniki odpowiedzialne za inicjowanie w zdrowej komórce zmian, w wyniku których może rozwinąć się komórka nowotworowa dzieli się na:

- *epigenetyczne* – dotyczą nowotworów powstających wskutek zakłócenia gospodarki hormonalnej, działania drażniących substancji stałych (np. azbestu) oraz w wyniku uszkodzenia tkanki, np. przez często powtarzane iniekcje,
- *genotoksyczne* – to w głównej mierze substancje o działaniu mutagennym; mają zdolność do uszkodzania materiału genetycznego poprzez wiązanie się z cząsteczką DNA, w efekcie czego następuje błędne kodowanie w czasie replikacji DNA. Uszkodzone w ten sposób DNA może być z kolei przyczyną powstania różnego rodzaju mutacji genowych, chromosomalnych, co w dalszej kolejności prowadzi do rozwoju komórek nowotworowych.

Opisane tu kancerogeny inicjują proces transformacji zdrowej komórki w komórkę nowotworową, aczkolwiek aby ostatecznie doszło do powstania nowotworu muszą zadziałać dodatkowe czynniki, zwane *promotorami*. Substancje te nie wykazują właściwości rakotwórczych a jedynie zwiększają częstotliwość pojawienia się nowotworów lub skracają czas potrzebny do ich rozwijania się. Czynniki promotorowe obecne w żywności to np: nienasycone kwasy tłuszczowe, bromian (V) potasu, polichlorowane bifenyle, czy też duża zawartość tłuszczu i białka. Szczególnie niebezpieczne są częściowo zredukowane cząsteczki tlenu (rodniki tlenowe) powstające jako produkt uboczny normalnego metabolizmu substancji odżywczych. To właśnie one w szczególności przyczyniają się do formowania substancji genotoksycznych w organizmie.

Potencjalne mutageny i kancerogeny występujące w żywności można podzielić na trzy grupy:

- związki występujące naturalnie – toksyny roślinne,
- związki tworzące się podczas przechowywania i przetwórstwa żywności,
- związki pochodzące z pestycydów, środków przeciwgrzybiczych i dodatków do żywności.

### **3.3.1. Mutageny i kancerogeny pochodzenia naturalnego**

Jest to szeroka grupa związków reprezentowanych między innymi przez pochodne hydrazyny, alkenylobenzeny, alkaloidy pyrolizydynowe. Dzielne spożycie tych substancji przez człowieka może sięgać nawet rzędu kilku gramów.

Naturalnie występujące prekursorzy mutagenów zostały wyizolowane już w latach 80 XX wieku z ziaren kawy i kapusty chińskiej. Następnie w 1994 roku Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) odnotowała obecność kancerogennych akryloamidów w ziemniakach. W czerwonym mięsie, warzywach i produktach mlecznych stwierdzono z kolei występowanie kwasu  $\alpha$ -linolenowego, mogącego powodować wzrost ryzyka występowania raka prostaty. Ponadto wykryto także obecność azotowych prekursorów mutagenów między innymi w nasionach fasoli *Vicia faba* a także w sosie sojowym i grzybach.

### **3.3.2. Mutageny tworzone podczas przechowywania i przetwórstwa żywności**

Najczęstszą przyczyną tworzenia mutagenów i kancerogenów w żywności jest przetwórstwo, a w szczególności obróbka termiczna. To właśnie w trakcie takich procesów jak: smażenie, pieczenie na ruszcie czy też grillowanie powstają między innymi wysoce rakotwórcze wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) oraz heterocykliczne aminy aromatyczne (HAA). Z kolei podczas peklowania mięsa, wędzenia ryb oraz produkcji sosu sojowego i wywaru piwowarskiego powstają inne związki rakotwórcze – nitrozoaminy. Są one między innymi podejrzewane o powstawanie raka jelita grubego. Pomimo, że procesy przetwórstwa żywności są głównym źródłem mutagenów i kancerogenów w produktach spożywczych, to jednak z drugiej strony znacząco poprawiają ich walory smakowe, a także zwiększają ich trwałość. W takiej sytuacji istnieje zatem duża potrzeba inwestowania w rozwój nowoczesnych technologii przetwórstwa żywności, które to ograniczyłyby powstawanie szkodliwych substancji, a jednocześnie pozwoliłyby zachować dotychczasowe walory produktów spożywczych. W Tabeli 13 zebrano najważniejsze mutageny, które powstają w efekcie złego przechowywania i przetwórstwa żywności.

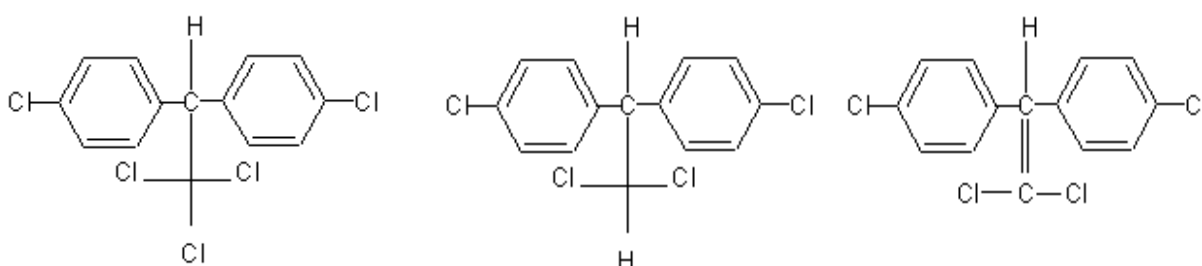
**Tabela 13.** Przykłady mutagenów powstałych w skutek złego przechowywania i przetwórstwa żywności (wg. Sikorski Z.E., *Chemia Żywności*, wyd. 5, WNT, Warszawa, 2007)

Rodzaj mutagenu	Przedstawiciele	Przykłady występowania	Działanie
MIKOTOKSYNY	aflatoksyna B <sub>1</sub>	kukurydza, orzechy ziemne	hepatokancerogenne
	ochratoksyna	wszystkie zboża	nefrotoksyczne i nefrokancerogenne
	patulina	jabłka, sok jabłkowy	mutagenne
NITROZOAMINY	N,N-dimetylo-nitrozoamina	peklowane mięso	wywołują nowotwór jelita grubego
WWA	benzo[a]piren	grillowane mięso	silnie rakotwórcze
HAA	2-amino-5-fenylopirydyna	mięsa i ryby pieczone nad otwartym ogniem	silnie mutagenne, kancerogenne

### 3.3.3. Mutageny pochodzące z pestycydów, środków przeciwgrzybiczych i dodatków do żywności

Mutageny należące do tej kategorii ku zaskoczeniu odgrywają jedynie marginalne znaczenie dla powstawania nowotworów u ludzi, a to głównie z uwagi na małe stężenia w jakich występują w produktach spożywczych. Spośród tej klasy czynników rakotwórczych najbardziej groźne wydają się być pestycydy, a szczególnie dichlorodifenylotrichloroetan (DDT) (Rys. 35). Związki te używane są do zwalczania chorób roślin, regulacji ich wzrostu a także do usuwania chwastów. Wiele z nich za pośrednictwem żywności kumuluje się w organizmie człowieka. W badaniach prowadzonych na zwierzętach odnotowano niekorzystny wpływ DDT między innymi na: układ nerwowy, wątrobę, nerki i układ odpornościowy. Stosowanie tego specyfiku

w Polsce jest co prawda zabronione od 1976 roku, ale w środowisku w dalszym ciągu obecne są jego równie niebezpieczne metabolity, takie jak DDE oraz DDD. Szeroko prowadzone badania własności toksykologicznych DDT i jego metabolitów generalnie nie wykazują u nich właściwości rakotwórczych. Jak dotąd w pełni udokumentowano jedynie związek pomiędzy DDT a występowaniem u kobiet raka piersi. Niemniej jednak Agencja Ochrony Środowiska (EPA) klasyfikuje DDT, DDE i DDD w klasie B2 „prawdopodobnych ludzkich czynników rakotwórczych”. Z kolei Międzynarodowa



Agencja Badań nad

Rakiem klasyfikuje je jako „możliwe substancje rakotwórcze”.

DDT

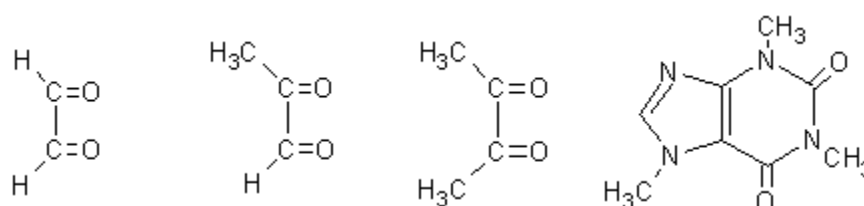
DDD

DDE

Rys. 35. Wzór chemiczny dichlorodifenylotrichloroetanu (DDT) i jego dwóch metabolitów: DDD i DDE

### 3.3.4. Pozostałe czynniki ryzyka rozwoju chorób nowotworowych

Przedstawione powyżej związki rakotwórcze i mutagenne, z jakimi możemy się spotkać w żywności, są najczęściej wymieniane i opisywane w literaturze. Należy jednak wspomnieć, że istnieje również szeroka grupa innych czynników ryzyka rozwoju chorób nowotworowych. Są nimi chociażby substancje obecne w codziennych użytkach, jak np. w kawie, herbacie, alkoholu. Produkty te zawierają w swym składzie m.in. kwas chlorogenowy – naturalnie występujący związek mutageny. Ponadto w wyniku pirolizy tworzyć się mogą dodatkowo metyloglioksal, a także mniej aktywny glioksal i biacetyl (Rys. 36). Kawa i herbata zawierają ponadto kofeinę, która to również może przyczynić się do rozwoju chorób nowotworowych.



**Rys. 36.** Wzory glioksalu, metyloglioksalu, biacetylu i kofeiny

Źródłem wielu substancji rakotwórczych może być również sam alkohol. W wyniku jego metabolizmu dochodzi bowiem do powstania bardzo szkodliwych aldehydów np. octowego. Dodatkowo zaznaczyć trzeba, że ryzyko rozwoju choroby nowotworowej wzrasta szczególnie szybko, gdy oprócz spożywania alkoholu dodatkowo palimy papierosy. Dym z papierosów zawiera bowiem około 40 rakotwórczych substancji, wśród których znajdują się wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, nitozoaminy a nawet DDT.

Do rozwoju niektórych rodzajów nowotworów u ludzi przyczyniać się może również duże spożycie tłuszczów. Niewłaściwa dieta, np. wysokokaloryczna czy też bogata w produkty białkowe, wpływa na wzrost stężenia rodników tlenowych. Jak już wspomniano wcześniej rodniki te należą do tzw. promotorów - zwiększają częstotliwość pojawienia się nowotworów lub skracają czas potrzebny do ich rozwijania. Ponadto obecne w tłuszczach nienasycone kwasy tłuszczowe i cholesterol podczas obróbki cieplnej ulegają utlenieniu do rodników, nadtlenuków, epoksydów kwasów tłuszczowych oraz aldehydów. One z kolei mogą zapoczątkować łańcuchową reakcję peroksydacji lipidów prowadzących do powstania licznych mutagenów, promotorów i kancerogenów.

Innym czynnikiem, który może mieć wpływ na zwiększenie ryzyka rozwoju choroby nowotworowej, jest dieta zawierająca duże ilości wysokoprzetworzonych produktów spożywczych. Produkty takie mają znacznie obniżoną zawartość błonnika, który to odgrywa ważną rolę ochronną. Jest on odpowiedzialny m.in. za wiązanie substancji rakotwórczych w przewodzie pokarmowym uniemożliwiając im w ten sposób wchłanianie. Ponadto ma zdolność wiązania kwasów żółciowych, jednych z wielu groźnych promotorów transformacji nowotworowej.

### **3.4. Przeciwrakotwórcze składniki żywności**

Podstawową funkcją żywności jest dostarczenie człowiekowi energii i niezbędnych składników do jego prawidłowego rozwoju i funkcjonowania. Coraz częściej jednak w żywności upatruje się także funkcji prozdrowotnej. Stwierdzono bowiem, że oprócz substancji odżywczych składnikami żywności są również substancje wykazujące aktywność biologiczną (tzw. substancje nieodżywcze), które to mogą

działać profilaktycznie, a niekiedy wspomagać leczenie różnych chorób, w tym nowotworów. Do takich właśnie substancji ochronnych zalicza się tzw. *związki przeciwrakotwórcze*. Są to związki mające zdolność zapobiegania powstawania lub rozrostowi nowotworów; mogą być zarówno pochodzenia naturalnego oraz przemysłowego. Dzielimy je na trzy zasadnicze grupy:

- czynniki blokujące,
- czynniki supresorowe,
- czynniki uodparniające się.

Przykłady różnych substancji przeciwrakotwórczych występujących w żywności pochodzenia roślinnego przedstawiono w Tabeli 14.

**Tabela. 14.** Substancje o działaniu przeciwrakotwórczym w żywności pochodzenia roślinnego (wg. Sikorski Z.E, *Chemia Żywności*, wyd. 5, WNT, Warszawa, 2007)

Czynnik przeciwrakotwórczy	Przykładowa substancja	Występowanie
Czynniki blokujące	witamina E	oleje roślinne
	glutation	cebula
	karoten	marchew
Czynniki supresorowe	witamina A	warzywa pomarańczowe
	izotiocyjaniiny	kapusta
	genistein	soja
Czynniki uodparniające	izoflawony	soja
	witamina D	tran
	kwas fitynowy	ziarno sezamowe

**Czynniki blokujące.** Są to substancje, które chronią komórkę przed czynnikami rakotwórczymi. Mogą działać na trzy różne sposoby:

- uniemożliwiają aktywację związków rakotwórczych lub promotorowych, działanie takie wykazuje m.in. witamina C, która hamuje tworzenie się rakotwórczych nitrozoamin z amin i azotanów (III),
- obniżają aktywację enzymów odpowiedzialnych za wzbudzenie kancerogenów (enzymy fazy I) oraz indukcję enzymów zaangażowanych w detoksykację (enzymy fazy II); zdolności tego typu wykazują: ditiolotiony oraz izotiocyjaniiny bardzo powszechnie występujące w warzywach z rodziny krzyżowych – kapuście, oraz



katechiny będące składnikami herbaty,

- wyłapują rakotwórcze metabolity – właściwości takie wykazują w szczególności związki zawierające siarkę np. glutation, obecne przede wszystkim w czosnku i cebuli; bakterie mlekowe licznie występujące w jogurtach i innych przetworach mlecznych; przeciwutleniacze – stanowiące szczególnie dużą grupę czynników blokujących, wykazują zdolność neutralizacji rodników tlenowych, a zalicza się do nich: *witaminy A, C, E, karoten, polifenole, flawonoidy, terpenoidy* obecne m.in. w zielonej herbacie, szpinaku, burakach, kapuście, ziołach i w wielu innych warzywach i owocach.

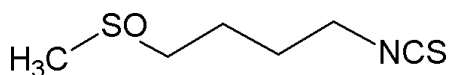
**Czynniki supresorowe.** Ingerują w procesy przemiany komórki przedrakowej w komórkę w pełni rakową. Dokładne mechanizmy działania tych czynników nie są w pełni poznane, aczkolwiek wiadomo, że obejmują one:

- stymulację różnicowania komórek – np. retinol czyli inaczej witamina A w czystej postaci, występuje m.in. w tranie z wątroby dorsza i innych ryb.
- hamowanie aktywacji onkogenów – np. izotiocyjaniany obecne w kapuście.
- selektywną inhibicję proliferacji komórek nowotworowych oraz hamowanie procesu tworzenia naczyń krwionośnych guza niezbędnych do jego wzrostu np. genistein obecny w nasionach soi.

**Czynniki uodparniające.** Mechanizmy prowadzące do uodpornienia się komórki na transformację nowotworową są najmniej poznane ze wszystkich. Uważa się jednak, że następuje tu hamowanie podziałów komórkowych, do których zdolne są np. wapń, fosfor, witamina D a także niektóre składniki czosnku. W tej grupie czynników wymienia się również izoflawony, które zdecydowanie ograniczają wzrost raka piersi. Substancje te są naturalnymi fitoestrogenami roślinnymi występującymi w dużych ilościach w nasionach soi.

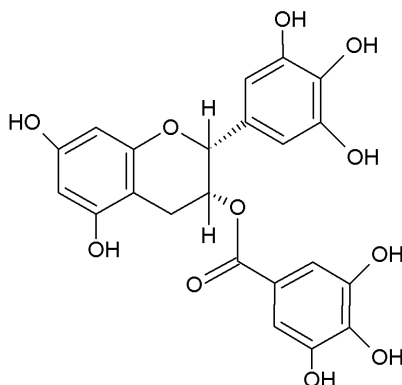
Obecnie prowadzi się szereg badań nad wieloma związkami, które to mogłyby być wykorzystane w chemioprolaktyce nowotworowej. Przykłady takich związków podano poniżej:

**Sulforafan** – to izocyjanian produkowany przez warzywa z rodziny krzyżowych np. brokuły; wykazuje zdolność do pobudzania enzymów wątrobowych powodujących detoksykację szkodliwych związków rakotwórczych (Rys. 37).



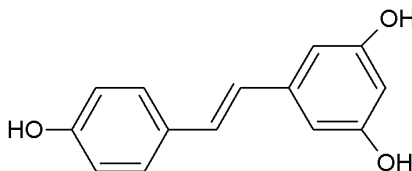
Rys. 37. Częsteczka sulforafanu

**Galusan epigalokatechiny** – to substancja wyizolowana z zielonej lub czarnej herbaty. Jest silnym przeciwutleniaczem (Rys. 38).



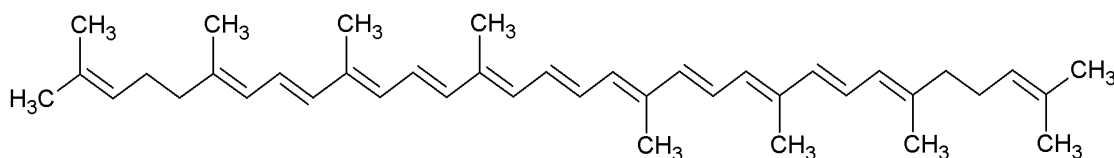
Rys. 38. Wzór galusanu epigalokatechiny

**Resweratrol** – substancja wyizolowana z winogron, należy do grupy fitoaleksyn; wykazuje zdolność aktywacji wielu mechanizmów przeciwdziałających powstawaniu nowotworów. Posiada właściwości antyoksydacyjne oraz stymuluje różnicowanie się komórek (Rys. 39).



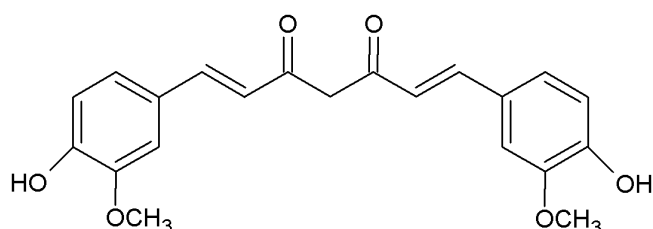
Rys. 39. Wzór resweratrolu

**Likopen** – to przedstawiciel karotenoidów o bardzo silnych właściwościach przeciwutleniających; występuje głównie w pomidorach; zmniejsza ryzyko występowania nowotworu prostaty u mężczyzn oraz nowotworu szyjki macicy u kobiet. Związek ten znacznie lepiej przyswajany jest z przetworów pomidorowych np. ketchupu niż ze świeżych pomidorów (Rys. 40).



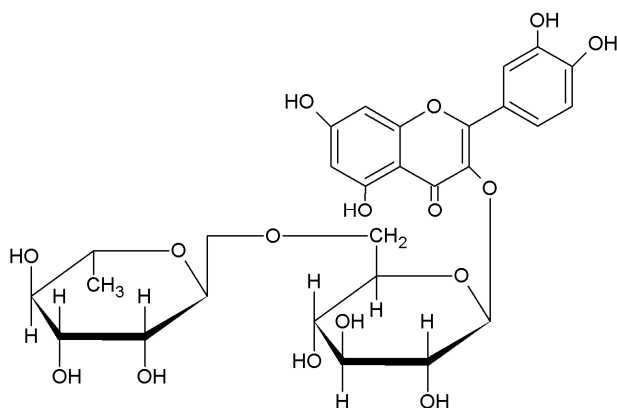
Rys. 40. Wzór likopenu

**Kurkumina** – to główny składnik kurkumy, tradycyjnej indyjskiej przyprawy używanej jako barwnik; związek ten jest przeciwutleniaczem i chroni organizm przed procesem peroksydacji lipidów (Rys. 41).



Rys. 41. Wzór kurkuminy

**Rutyna** – to związek występujący w dużej ilości w gryce, a także w bzie czarnym, dziurawcu zwyczajnym oraz w szczawiu; wykazuje właściwości przeciwutleniające (Rys. 42).



Rys. 42. Wzór rutyny

### 3.5. Dodatki do żywności

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 że:

- *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.

### 3.5.1. 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,
- 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 15).

**Tabela 15.** Kategorie dodatków do żywności (wg Dyrektywy 89/10/EEC)

Zapobiegające zepsuciu	Sensoryczne	Teksturotwórcze	Pomocnicze
Konserwanty	Barwniki	Emulgatory	Enzymy
Kwasy	Nabłyszczające	Przeciwzbrylające	Gazy wypierające
Bufory	Kwaszące	Skrobia modyfikowana	Polepszacze mąki
Przeciwutleniacze	Słodziki	Spulchniające	Pianotwórcze
Sekwestranty	Wzmacniające smakowość	Stabilizatory	Przeciwpieniące
Stabilizatory	Aromaty	Zagęszczacze	Rozpuszczalniki
Gazy (atmosfera kontrolowana)		Zwiększające masę	
		Zwilżające	
		Żelujące	

### 3.5.2. Dodatki zapobiegające psuciu się żywności

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

- **drobnoustroje**, czyli konserwanty, kwasy;
- **tlen z powietrza**, czyli przeciwutleniacze (antyoksydanty), synergenty,

**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. Wpływają one na procesy biochemiczne komórki przez:

- zmianę przepuszczalności ścian komórkowych lub błon cytoplazmatycznych, ingerencję w mechanizm genetyczny, np.: przez jego uszkodzenie,
- inaktywację niektórych enzymów np.: poprzez redukcyjne działanie siarczanów(IV) na wiązania disulfidowe,
- 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 konserwanta 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 działają w stanie niezdisocjowanym, ze wzrostem pH wzrasta stopień ich dysocjacji). Kwasy: propionowy, sorbowy, octowy, hydroksybenzoesowy są trwałe przy pH = 4,5 i niższym, natomiast powyżej pH 6 szybko ulegają dysocjacji 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 benzoowy i jego sole. Na grzyby pleśniowe i drożdże silnie działają; kwas sorbowy, kwas benzoowy 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 miękiszki 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 16 przedstawiono krótką charakterystykę wybranych konserwantów dopuszczonych do stosowania w Polsce.

**Tabela 16.** Charakterystyka wybranych konserwantów dopuszczonych do stosowania w Polsce

Nazwa	Właściwości	Metabolizm w organizmie człowieka, działanie na organizm	ADI* [mg/kg masy ciała]
<b>Kwas benzoesowy (E 210)</b>	Białe kryształy, bez zapachu, słabo rozpuszczalny w wodzie, dobrze w etanolu i eterze; w środowisku kwaśnym (pH 3-4,5) hamuje rozwój drożdży i pleśni, mniej skuteczny w stosunku do bakterii; działanie jego wspomaga obecność ditlenku siarki, soli, cukru oraz kwasu sorbowego i jego soli.	W przewodzie pokarmowym wchłania się szybko i jest wydalany z moczem, głównie w postaci kwasu hipurowego lub benzoilglukuronidu, a częściowo w postaci wolnej. W większych dawkach może wywołać objawy zatrucia (wymioty, bóle głowy, alergię, uczucie drapania w gardle, podrażnienie nabłonka, zakwaszenie organizmu).	0 – 5
<b>Kwas sorbowy (E 200)</b>	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.	W organizmie człowieka ulega procesowi $\beta$ oksydacji, typowej dla kwasów tłuszczowych. Jeden z bezpieczniejszych środków konserwujących, uznany za nietoksyczny dla organizmu człowieka.	0 – 25
<b>Ditlenek siarki (E 220)</b>	Bezbarwny, drażniący gaz, rozpuszczalny w wodzie i etanolu; skutecznie działa na bakterie i pleśnie, słabiej na drożdże (pH 1-6); posiada właściwości odkażające,	Może powodować podrażnienia przewodu pokarmowego oraz reakcje alergiczne; długotrwałe przyjmowanie, nawet w małych dawkach, obniża odporność organizmu.	0 – 0,7

	<p>wybielające, hamuje aktywność enzymów oksydoredukcyjnych (stabilizacja witaminy C); zapobiega enzymatycznemu nieenzymatycznemu brunatnieniu oraz tworzeniu się nitrozoamin.</p>		
<b>Nizyna (E 234)</b>	<p>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.</p>	<p>Jest całkowicie rozkładana przez trypsynę. Jest bezpiecznym związkiem; w badaniach na zwierzętach nie stwierdzono wpływu na mikroflorę przewodu pokarmowego i działania alergicznego.</p>	<p>0 – 33 tys. Jednostek/kg masy ciała</p>
<b>Azotany(III): azotan potasu (E249); azotan sodu (E250) i azotany(V): azotan sodu (E251) i potasu (E252)</b>	<p>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 łaseczek zgorzeli (<i>Clostridium perfringens</i>) oraz <i>Clostridium botulinum</i>, wytwarzającego silną toksynę – jad kiełbasiany; działanie antybakteryjne azotanów(V) jest słabe i występuje dopiero po ich redukcji do azotanów(III).</p>	<p>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>	<p>5  0,2</p>

\*ADI (dopuszczalne dzienne pobranie substancji konserwujących przez człowieka; z ang. *Acceptable Daily Intake*).



Zakres stosowania konserwantów w żywności jest stopniowo ograniczany poprzez rozwój fizycznych metod jej utrwalania, np.: niskie temperatury, naświetlanie nadfioletem, kontrolowana atmosfera, sterylizacja, stosowanie technologii aseptycznych oraz wprowadzenie procedur analizy zagrożeń i końcowej kontroli jakości HACCP.

**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 mączny,
- 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 jednak niewystarczające dlatego też w niektórych przypadkach aby zapobiec utlenianiu się żywności stosuje się dodatki przeciwutleniaczy naturalnych lub syntetycznych bądź synergentów.

**Przeciwutleniacze syntetyczne** to przede wszystkim estry: propylowy (E 310), oktylowy (E 311) i dodecylowy (E 312) kwasu galusowego oraz BHA czyli butylohydroksyanizol (E319) i BHT butylo-hydroksy 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  $\delta$ -tokoferol (E 308). W przyrodzie ich obecność zapobiega nie tylko jełczeniu nienasyconych kwasów tłuszczowych, chroni również przed utlenieniem inne substancje np. związki aromatyczne. Do naturalnych przeciwutleniaczy zalicza się także flawonoidy i fenylokwasy, 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.

**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.

### 3.5.3. Dodatki kształtujące cechy sensoryczne

Na decyzję konsumenta o wyborze produktu spożywczego w głównej mierze wpływają jego cechy wizualne, a więc forma i barwa, jednak o ostatecznej ocenie tego produktu decydują: smak, zapach i tekstura użytkowa. Obecnie, bardzo popularne stało się stosowanie dodatków barwiących i smakozapachowych, które to podnoszą atrakcyjność różnorodnych produktów żywnościowych. Istotnym postępowaniem w ostatnim czasie jest stosowanie jako dodatków surowców naturalnych, a także 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.

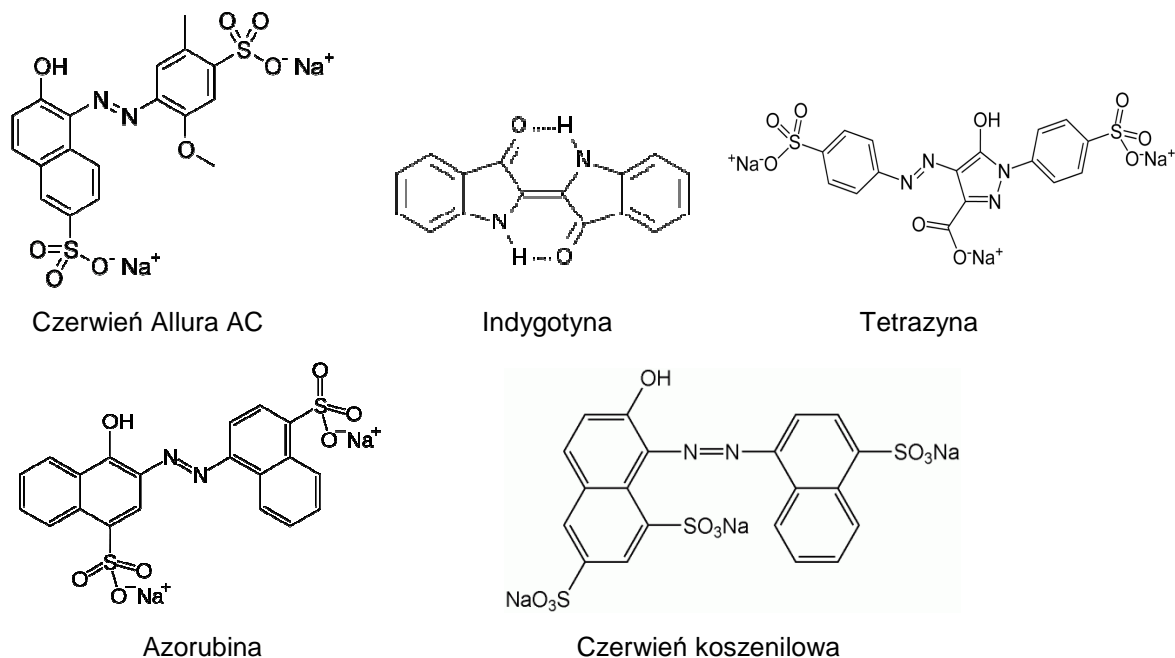
Do barwienia stosuje się:

- 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 naturalne barwniki 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 (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, luteinina i karmele. Barwniki otrzymane w procesie syntezy, identyczne z naturalnymi to: ryboflawina,  $\beta$ -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. Struktury wybranych syntetycznych barwników organicznych przedstawiono na Rys. 43.



**Rys. 43.** Wzory wybranych syntetycznych barwników organicznych

**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).

#### 3.5.4. 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.

**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 wyrobach 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. 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,
- oleoesencje, czyli esencje spożywcze w oleju roślinnym, np.: cytrynowa, arakowa.

**Aromaty syntetyczne** otrzymuje się na drodze syntezy organicznej lub biosyntezy. Wśród aromatów syntetycznych największą grupę stanowią alkohole, estry, aldehydy oraz izomery związków naturalnych (Tabela 17). Wiele z nich ma struktury terpenowe. Metodami biosyntezy uzyskano m.in. wanilinę, antranilan metylu, kwas 2-metylomasołowy. Zastosowanie aromatów syntetycznych w produkcji żywności wymaga zezwolenia służby zdrowia, wyjątkiem jest wanilina i etylowanilina.

**Tabela 17.** Przykłady syntetycznych aromatów stosowanych do żywności

Związek chemiczny	Typ aromatu	Związek chemiczny	Typ aromatu
Aldehyd benzoesowy	gorzkich migdałów	Maślan amylu	bananowy
Benzoesan etylu	anyżowy	Mrówczan izomyłu	śliwkowy
Furfural	świeżego chleba	Mrówczan etylu	rumowy
Geraniol	morelowy	Octan izobutyłu	ananasowy
Kwas masłowy	maślano-serowy		

**Syntetyczne substancje słodzące** 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 i jest zwykle dodawany do napojów bezalkoholowych, ciast, wyrobów cukierniczych. Substancje słodzące powinny spełniać szereg warunków, aby mogły być stosowane jako dodatki do żywności. Muszą być nietoksyczne, stabilne chemicznie (w różnym pH i w podwyższonej temperaturze), rozpuszczalne w wodzie i w etanolu oraz powinny wykazywać słodycz taką jak sacharoza lub większą. Poza tym nie mogą wpływać na barwę i zapach produktu ani pogarszać jego trwałości. Pożądane jest, aby nie pozostawiały posmaku w ustach. Powinny być tanie, wygodne w stosowaniu, nie powinny wywoływać skutków ubocznych (alergie, próchnica zębów), ani wymagać limitowania w stosowaniu. Substancje stosowane jako środki słodzące powinny być niemetabolizowane lub metabolizowane w organizmie w sposób typowy dla składników odżywczych. Dążenie do obniżenia kaloryczności spożywanych pokarmów wymaga, aby nowe substancje dostarczały mniej niż 2 % kalorii w porównaniu z tradycyjnymi środkami słodzącymi, przy stosowaniu w stężeniach dających jednakowe odczucie słodkości.

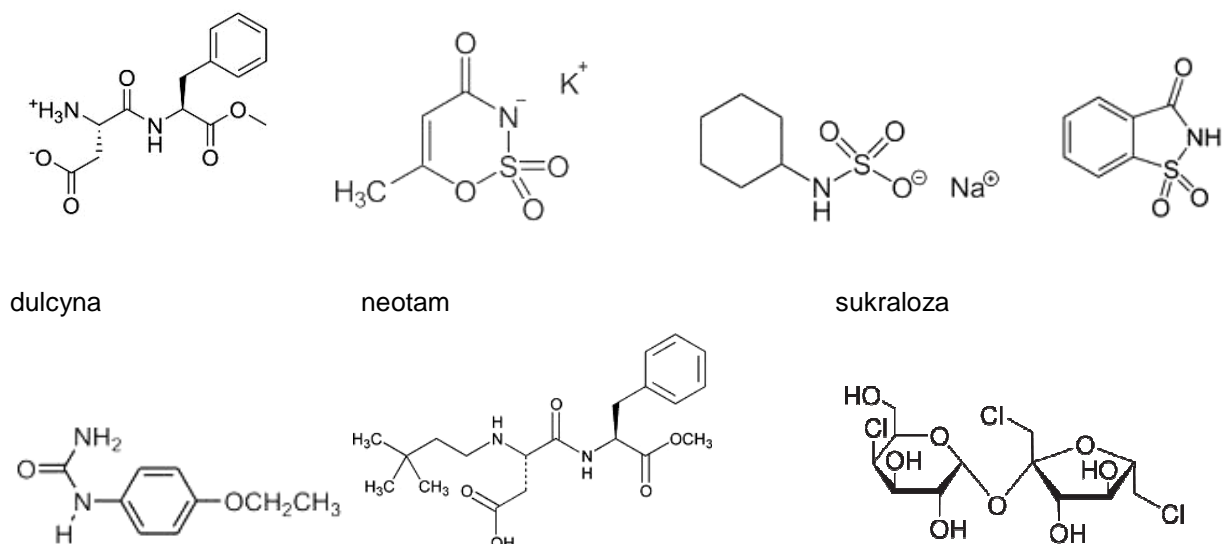
Struktury chemiczne syntetycznych i naturalnych substancji słodzących są przedstawione na Rys. 44.

aspartam

acesulfam K

cyklaminian sodu

sacharyna



Rys. 44. Wzory syntetycznych i naturalnych substancji słodzących

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.

### 3.5.5. 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:

#### 1. *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,

#### 2. *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 elastyczny żel.



Na efekt 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, kisieli (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.

### 3.5.6. 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.

**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.

### 3.5.7. Dodatki o wartościach odżywczych

**Dodatek witamin i soli mineralnych** ma na celu przywrócenie poziomu składników istotnych dla racjonalnego żywienia, a 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 pierwotnego produktu (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 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.

### 3.5.8. 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 18).

**Tabela 18.** Dodatki pomocnicze i ułatwiające wyrób

Rodzaj dodatku	Funkcja dodatku
----------------	-----------------

Preparaty enzymatyczne	przyspieszają reakcje biochemiczne
Polepszacze mąki	polepszają jakość wypiekową mąki lub ciasta
Spulchniacze	uwalniają CO <sub>2</sub> , powodując zwiększenie objętości ciasta
Nośniki	rozpuszczają, rozcieńczają, dyspergują dodatki w celu ułatwienia ich stosowania
Rozpuszczalniki	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

### 3.6. Zafałszowania żywności

Zafałszowanie żywności polega na zmianie składu produktu lub zastąpieniu składnika innym składnikiem (najczęściej tańszym), ukryciu wad jakościowych i rzeczywistego składu lub podaniu nieprawdy na opakowaniu, a także na nieprawdziwej deklaracji sposobu produkcji. Powodem zafałszowania żywności jest chęć producenta do osiągnięcia maksymalnego zysku poprzez zwiększenie sprzedaży, ukrycie niewłaściwej jakości lub błędów w procesie technologicznym, które mogą generować znaczne straty finansowe producenta żywności. Ze względu na skład chemiczny i właściwości biologiczne, żywność zafałszowana zazwyczaj posiada mniejszą wartość odżywczą. Może być również niebezpieczna dla zdrowia i życia konsumentów. Powodem tego mogą być dodatki substancji szkodliwych. Kontrolowaniem jakości produktów żywnościowych zajmuje się wiele instytucji państwowych m. in.: Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Ministerstwo Zdrowia, Ministerstwo Środowiska, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa, Inspekcja Ochrony Środowiska, Inspekcja Weterynaryjna, Inspekcja Handlowa, Państwowa Inspekcja Pracy oraz laboratoria referencyjne, a ujawnienie

zafałszowania żywności naraża firmę na utratę rynków zbytu oraz kary finansowe i administracyjne.

Najczęściej zafałszowywane są soki, napoje i przetwory owocowe, napoje alkoholowe, miody, oleje roślinne, ryby mrożone, sery żółte, masło, chleb i pieczywo, zboża i przetwory zbożowe, mięso i przetwory mięsne, wyroby wędliniarskie, warzywa i przetwory warzywne, drób i przetwory drobiowe, kawa, herbata, kakao, wina, wyroby cukiernicze, piwo, jaja, cukier, koncentraty spożywcze oraz mleko i produkty mleczarskie. Poniżej podano przykłady zafałszowań żywności:

- droższe soki i nektary są zastępowane sokami tańszymi,
- do masła i serów dojrzewających dodawane są tłuszcze niemleczne,
- w wyrobach z mięsa czerwonego zaniżany jest udziału mięsa wysokiej jakości, a także zwiększona jest ilości tłuszczu, skrobi i wody,
- oleje otrzymuje się z wykorzystaniem tańszego sposobu ekstrakcji, a także dodaje się tłuszcze zwierzęce,
- do oliwy z oliwek dodawane są inne oleje roślinne,
- mleko i śmietanę zagęszczane jest mąką i kredą,
- do mleka koziego i owczego dodawane jest mleko krowie,
- do mleka dodawany jest niewielkiej ilości proszek do prania,
- soki owocowe są zafałszowywane poprzez dodatek cukru, rozcieńczanie wodą, dodatek soku z części owoców oraz dodatek tańszego soku,
- zafałszowania win z reguły polegają na dodatku cukru trzcinowego i buraczanego, dodatku ekstraktów owoców bogatych w antocyjany w celu barwienia, nieprawdziwej deklaracji odmiany winogron i regionu pochodzenia,
- napoje alkoholowe są zafałszowywane poprzez nieprawdziwą deklarację gatunku wyrobów spirytusowych, maskowanie braku leżakowania napojów alkoholowych,
- przy produkcji piwa jęczmień zastępowany jest owsem, a chmiel innymi, gorzkimi ziołami,
- herbata jest mieszana z liśćmi wierzbowki wąskolistnej,
- miody są zafałszowywane dodatkiem cukru trzcinowego, kukurydzianego i buraczanego.

## 4. Charakterystyka metod stosowanych w analizie żywności

### 4.1. Zasady pobierania i przygotowania próbek żywności do analizy

Każdy proces analityczny rozpoczyna się od etapu pobierania próbki, a następnie przygotowania do analizy. Zasady pobierania i przygotowania próbek żywności do analiz są ściśle określone i sprecyzowane. W zależności od rodzaju badanego preparatu (woda, artykuły mocno zamrożone, ziarna zbóż, mięso), a także od rodzaju substancji, jaką chce się oznaczać w pobranej próbce żywności (np. oznaczanie pestycydów, mikotoksyn, dioksyn) należy posługiwać się różnego rodzaju dokumentami normalizacyjnymi. Są to między innymi Rozporządzenia Ministra Zdrowia, Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego, Polskie Normy, Dyrektywy Komisji Europejskiej i inne. Opisują one bardzo precyzyjnie zasady pobierania i przygotowania konkretnej próbki do konkretnej analizy.

#### 4.1.1. Podstawowe pojęcia

**Partia** – możliwa do zidentyfikowania ilość środka spożywczego dostarczona w jednym terminie, dla której urzędowo stwierdzono, że posiada te same wspólne cechy, jak: pochodzenie, odmiana, rodzaj opakowania, jednostka pakująca, dostawca i oznakowanie. Dla ryb porównywalna musi być także ich wielkość.

**Podpartia** – część partii wyznaczona w celu zastosowania na niej danej metody pobierania próbek. Każda podpartia musi być fizycznie wyodrębniona i możliwa do zidentyfikowania.

**Próbka pierwotna** – ilość materiału pobrana z jednego miejsca partii lub podpartii.

**Próbka zbiorcza (zmieszana)** – próbka otrzymana przez połączenie wszystkich próbek pierwotnych pobranych z partii lub podpartii; próbki zbiorcze uznaje się za reprezentatywne dla danych partii lub podpartii.

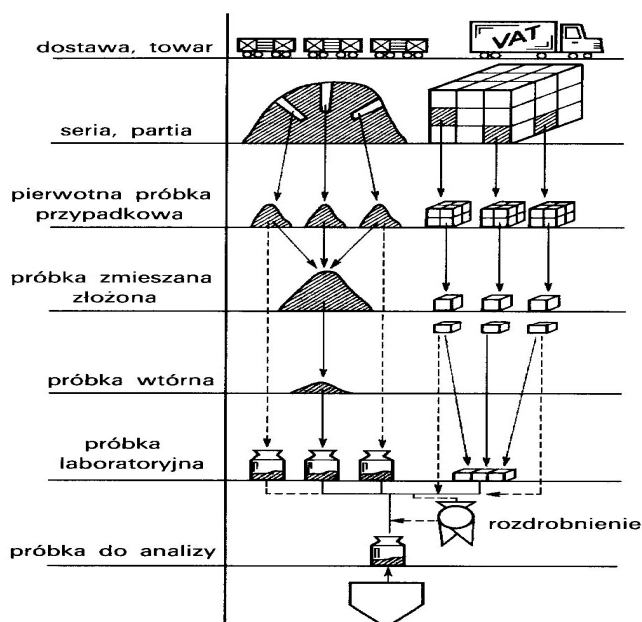
**Próbka laboratoryjna** – reprezentatywna część próbki zbiorczej przeznaczona do badania laboratoryjnego.

**Próbka do analizy** – próbka przygotowana ze średniej próbki laboratoryjnej np. po rozdronieniu próbki laboratoryjnej pobiera się z niej próbkę analityczną.

#### 4.1.2. Ogólne zasady pobierania próbek

Przygotowanie próbek do analiz jest zazwyczaj zadaniem złożonym, a operacje i różnego rodzaju czynności wchodzące w skład tego procesu mogą przyczyniać się zarówno do straty analitów, jak też mogą być źródłem dodatkowych zanieczyszczeń.

Jak już wspomniano wszelkie procedury pobierania próbek żywności do różnego rodzaju analiz są wyszczególnione w odpowiednich dokumentach normalizacyjnych. Każdy taki dokument zawiera także przepisy ogólne, mające zastosowanie przy pobieraniu każdego rodzaju próbek. Przepisy te mówią np., że próbki muszą być pobierane przez odpowiedni, upoważniony i wykwalifikowany personel w sposób zapewniający ich reprezentatywność. Informacje dotyczące próbki muszą stanowić dokładne matematyczne odbicie informacji przynależnych do badanego obiektu. Próbka reprezentatywna powinna mieć zatem przeciętny skład i właściwości materiału pobranego. Pobranie reprezentatywnej próbki uważane jest za wysoce newralgiczny punkt całego procesu analitycznego. Bardzo staranne wykonanie analizy próbki niereprezentatywnej, nie zmienia faktu uzyskania błędnej oceny całej partii produktu. Aby otrzymać reprezentatywną próbkę analityczną z masowej partii materiału należy przeprowadzić następujące operacje (Rys. 45).



**Rys. 45.** Schemat postępowania przy pobieraniu próbek (wg Namieśnik J. (red.) *Pobieranie próbek środowiskowych do analizy* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1995, str. 17-19

Próbki z każdej partii muszą być pobierane oddzielnie. Duże partie powinny być podzielone na podpartie, z których to próbki należy pobrać również oddzielnie. Zasady

podziału partii na podpartie zostaną omówione w następnym punkcie na konkretnym przykładzie.

Podczas pobierania próbek żywności do badań należy zastosować odpowiednie środki ostrożności aby zapobiec wszelkim zmianom, które mogłyby wpłynąć na zawartość zanieczyszczeń, niekorzystnie oddziaływać na wynik analizy lub spowodować, że próbki zbiorcze nie będą reprezentatywne. Należy zwrócić również uwagę aby nie zanieczyścić pobranej próbki w trakcie transportu. Próbki powinny być zatem pakowane w czyste, wykonane z obojętnego materiału pojemniki i odpowiednio zabezpieczone przed zanieczyszczeniem i uszkodzeniem podczas transportu. Każdą urzędowo pobraną próbkę żywności pieczętuje się w miejscu pobrania oraz sporządza dla niej protokół umożliwiający jednoznaczną identyfikację każdej partii lub podpartii. Protokół ten zawiera informację o dacie oraz miejscu pobrania próbki oraz wszelkie dodatkowe informacje, które mogą okazać się pomocne dla analityka.

#### **4.1.3. Szczegółowe zasady pobierania próbek żywności**

Przy pobieraniu i przygotowaniu próbek żywności do analizy zastosowanie mają nie tylko przytoczone wyżej zasady ogólne, ale też każdy badany produkt spożywczy wymaga odmiennej strategii. Zasady te omówione zostaną na przykładzie Rozporządzenia Komisji (WE) Nr 333/2007 z dnia 28 marca 2007 roku, zawierającego wytyczne w zakresie pobierania i analizy próbek żywności do celów urzędowej kontroli poziomów ołowiu, kadmu, rtęci, 3-MCPD (3-monochloropropano-1,2-diolu) oraz benzo[a]pirenu w środkach spożywczych. Dokument ten reguluje między innymi sposób dzielenia dużych partii na podpartie. I tak w przypadku produktów wprowadzanych do obrotu handlowego luzem (np. zboża) zastosowanie ma Tabela 19. W przypadku partii o masie przekraczającej 1500 ton masa jednej podpartii powinna wynosić 500 ton. Z kolei w odniesieniu do innych produktów (np. występujących w opakowaniach) odpowiednie dane zawiera Tabela 20. Ponieważ masa partii nie zawsze stanowi dokładną wielokrotność masy podpartii ustalono, że masa podpartii nie może przekroczyć 20 % masy partii.

**Tabela 19.** Podział partii na podpartie w przypadku produktów wprowadzonych do obrotu handlowego luzem (WE) Nr 333/2007



Masa partii (w tonach)	Masa lub liczba podpartii
≥ 1500	500 ton
> 300 i < 1500	3 podpartie
≥ 100 i ≤ 300	100 ton
< 100	–

**Tabela 20.** Podział partii na podpartie w przypadku innych produktów (WE) Nr 333/2007

Masa partii (w tonach)	Masa lub liczba podpartii
≥ 15	15 -30 ton
< 15	–

Rozporządzenie określa także minimalną liczbę próbek pierwotnych pobieranych z partii lub podpartii (Tabela 21). W przypadku produktów płynnych luzem partia lub podpartia powinna być jak najdokładniej wymieszana metodą ręczną lub mechaniczną, bezpośrednio przez jej pobranie. Zakłada się wówczas jednorodny rozkład zanieczyszczeń w danej partii lub podpartii. W tej sytuacji do utworzenia próbki zbiorczej należy pobrać trzy próbki pierwotne, które z kolei muszą mieć podobną masę (co najmniej 100 gram lub 1000 mililitrów). Masa próbki zbiorczej powinna wynosić co najmniej 1 kilogram lub 1 litr.

**Tabela 21.** Minimalna liczba próbek pierwotnych pobieranych z partii lub podpartii (WE) Nr 333/2007

Masa lub objętość partii/podpartii (w kg lub litrach)	Minimalna liczba próbek pierwotnych do pobrania
< 50	3
≥ 50 oraz ≤ 500	5
> 500	10

Nieco inaczej wygląda to w przypadku partii lub podpartii składających się z pojedynczych opakowań lub jednostek. Liczbę opakowań lub jednostek, które mają być pobrane w celu utworzenia próbki zbiorczej, podano w Tabeli 22.

**Tabela 22.** Liczba opakowań lub jednostek, które należy pobrać w celu utworzenia próbki zbiorczej (WE) Nr 333/2007

Liczba opakowań lub jednostek w partii/podpartii	Liczba opakowań lub jednostek do pobrania
≤ 25	Co najmniej 1 opakowanie lub jednostka
26 - 100	Około 5 %, co najmniej 2 opakowania lub jednostki
> 100	Około 5 %, nie więcej niż 10 opakowań lub jednostek

Ponieważ każdy produkt spożywczy posiada odmienne wytyczne w zakresie pobierania próbek do analiz, poniżej przedstawiono wykaz dokumentów normalizacyjnych dla przykładowych artykułów rolno-spożywczych (Tabela 23).

**Tabela 23.** Wykaz dokumentów normalizacyjnych dla wybranych produktów rolno-spożywczych

Produkt rolno-spożywczy	Dokumenty normalizacyjne
Makaron	Makaron. Pobieranie próbek i metody badań PN – 93/A – 74130
Pieczyno	Pieczyno. Pobieranie próbek i kontrola jakości PN – 86/A – 74104
Oleje i tłuszcze roślinne i zwierzęce	Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Pobieranie i przygotowanie próbek margaryn do badań chemicznych i fizykochemicznych PN-A-86929:1996  Oleje i tłuszcze roślinne oraz zwierzęce. Pobieranie próbek PN-EN ISO 5555:2002
Grzyby	Grzyby świeże i produkty grzybowe. Pobieranie i przygotowanie próbek PN-68/A-78508
Herbata	Herbata. Pobieranie próbek PN-ISO 1839:1996
Cukier	Cukier. Pobieranie i przygotowanie próbek PN-85/A-74856
Mleko i przetwory	Rozporządzenie MR i RW z dnia 25 sierpień 2004r w sprawie metod pobierania próbek mleka do badań zawartości tłuszczu w mleku oraz metod oznaczania

mleczne	<p>zawartości tłuszczu w mleku</p> <p>Mleko i przetwory mleczne. Pobieranie próbek PN-86/A-86041/Az1:2000</p> <p>Mleko i przetwory mleczne. Wytyczne do pobierania próbek PN-EN ISO 707:2008</p>
---------	--

#### 4.1.4. Błędy popełniane w trakcie pobierania próbek

W trakcie pobierania próbek popełnia się dwa rodzaje błędów: systematyczne oraz przypadkowe.

**Błędy systematyczne** – pojawiają się w momencie, kiedy stosowany sposób pobierania próbki nie daje możliwości wejścia w skład próbki analitycznej wszystkim elementom składowym partii. Błędy takie pojawiają się np. gdy podczas pobierania próbki cieczy wykazującej skłonność do rozwarstwiania się próbkę czerpiemy jedynie z jednej warstwy owej cieczy. Inny przykład to pobieranie próbek materiału ziarnistego narzędziem, którego otwór jest za mały aby duże ziarna mogły się swobodnie zmieścić. Aby uniknąć błędów tego typu powinno się stosować zasadę randomizacji, czyli losowego wybierania poszczególnych elementów partii we wszystkich etapach procesu pobierania próbek.

**Błędy przypadkowe** –mogą one powstawać np. podczas pobierania materiału ziarnistego, gdzie zachodzi konieczność wieloetapowego pomniejszania i rozdrabniania materiału. Błędy etapowe składają się na ogólny błąd przypadkowy.

#### 4.1.5. Przygotowanie próbek do analizy

Zdecydowana większość próbek żywności bezpośrednio po pobraniu zostaje poddana różnorodnym operacjom. Czynności te wykonuje się albo na miejscu pobrania, w trakcie transportu lub przechowywania. W zależności od typu próbki przeprowadza się np.:

- filtrację (np. soki z miąższem),
- utrwalanie (zakwaszanie, chłodzenie, zamrażanie),
- oddzielenie materiałów obcych (np. piasku z sałaty),
- suszenie,
- rozdrabnianie.

Większość stosowanych metod analitycznych (spektrofotometria UV-VIS, absorpcyjna spektrometria atomowa, potencjometria) wymaga przeprowadzenie próbek do roztworu.

W związku z powyższym następną czynnością po pobraniu próbki jest najczęściej jej rozpuszczenie.

#### 4.1.5.1. Rozpuszczanie próbek

Najprostsze, aczkolwiek nie zawsze skuteczne jest rozpuszczenie próbek w wodzie. Najczęściej jednak stosuje się tzw. roztwarzanie próbek w kwasach. Jest to proces, który polega na przeprowadzaniu substancji do roztworu w wyniku zachodzącej reakcji chemicznej. Roztwarzanie przeprowadza się przy użyciu kwasów (z reguły solnego, azotowego oraz siarkowego). Najkorzystniejsze jest wykorzystanie w tym celu kwasu solnego, gdyż jest to kwas nieutleniający, który łatwo usunąć przez odparowanie. Zaletą stosowania tego kwasu jest również to, że większość chlorków rozpuszcza się w wodzie. Kwas azotowy ma z kolei działanie utleniające, a powstające azotany, podobnie jak chlorki, są z reguły rozpuszczalne w wodzie. W zależności od stężenia kwas siarkowy może mieć z kolei właściwości utleniające (stężony) albo nieutleniające (rozcieńczony). Podczas roztwarzania próbek najpierw stosuje się rozcieńczony kwas siarkowy (2 mol/l), a dopiero gdy jest on nieskuteczny stosuje się kwas stężony.

Czasami rozpuszczanie niektórych substancji wymaga użycia silniejszego utleniacza niż stężony kwas azotowy. W takich przypadkach bardzo często stosuje się mieszaninę stężonego kwasu solnego i stężonego kwasu azotowego w stosunku objętościowym 3:1 (tzw. woda królewska). W przypadku utleniania siarczków wykorzystuje się z kolei mieszaninę o tym samym składzie, ale w stosunku objętościowym 1:3 (tzw. mieszanina Leforta).

Spośród innych rozpuszczalników, używanych w procesie roztwarzania zastosowanie mają również:

- kwas fluorowodorowy – ułatwia rozpuszczanie, gdyż tworzy liczne kompleksy; rozkłada krzemionkę tworząc lotny  $\text{SiF}_4$ ,
- kwas nadchlorowy – nie ma zdolności tworzenia kompleksów z metalami, stężony (70%) działa utleniająco i odwadniająco; w obecności substancji redukujących rozkłada się wybuchowo,
- roztwory wodorotlenków sodu i potasu – stosuje się do rozpuszczania niektórych metali o charakterze amfoterycznym.

#### 4.1.5.2. Stapianie próbek

W niektórych przypadkach roztwarzanie próbek w kwasach lub alkaliach może być nieskuteczne. W takich sytuacjach nieroztworzone substancje nieorganiczne stapia się z odpowiednio dobranym topnikiem. Po stopieniu próbkę bardzo łatwo można przeprowadzić do roztworu. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje topników:

- alkaliczne – np. NaOH, KOH, bezwodny  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w mieszaninie z  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ; stosuje się je do stapiania próbek o charakterze kwasowym (np. krzemianów, glinokrzemianów),
- kwaśne – np. pirosiarczan potasu  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_7$ , wodorosiarczan potasu, wodorofluorki potasu i amonu, tlenek boru; używane są do stapiania próbek o charakterze zasadowym (np.  $\text{BeO}_3$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{ZrO}_2$ ).

W zależności od zastosowanego topnika stapianie próbek przeprowadza się w tyglach platynowych, kwarcowych, niklowych, srebrnych lub żelaznych. Na dno tygla wprowadza się warstwę sproszkowanego topnika, następnie dobrze wymieszaną próbkę z kilkakrotnym nadmiarem topnika. Na wierzch wprowadza się ponownie czysty topnik. Wypełnienie tygla nie powinno zajmować więcej niż 2/3 jego pojemności. Tygiel przykrywa się pokrywką, a następnie ogrzewa na początku małym płomieniem, po czym stopniowo zwiększa się temperaturę reakcji.

#### 4.1.5.3. Mineralizacja próbek

Mineralizacja to proces całkowitego usunięcia z próbki składników organicznych w celu oznaczenia składników nieorganicznych. W wyniku tego procesu węgiel substancji organicznej zostaje utleniony do ditlenku węgla, wodór do wody, a azot związany w wolny. Mineralizacja powinna przebiegać ilościowo, tzn. część organiczna próbki w całości powinna ulec utlenieniu, natomiast część nieorganiczna pozostać, aby następnie można ją było przeprowadzić do roztworu. Spośród wszystkich metod roztwarzania próbek produktów spożywczych mineralizacja jest sposobem najczęściej stosowanym. Wykonuje się ją zazwyczaj przed oznaczaniem jonów metali ciężkich jako zanieczyszczeń w produktach spożywczych. Wyróżnia się dwa zasadnicze rodzaje mineralizacji: mineralizację suchą oraz mineralizację mokrą.

**Mineralizacja sucha** – polega na spalaniu części organicznej w powietrzu. Próbkę umieszcza się w tyglu i ogrzewa na palniku lub w piecu. W trakcie rozkładu powstaje popiół (złożony głównie z węglanów i tlenków), który następnie roztwarza się

w odpowiednim kwasie lub mieszaninie kwasów. Proces prowadzi się zazwyczaj w temperaturze 400-600°C. Jeżeli w próbce oznaczane są produkty gazowe to mineralizację prowadzi się w odpowiedniej aparaturze, w powietrzu wzbogaconym w tlen (w piecu rurowym) lub w tlenie pod ciśnieniem (mineralizacja niskotemperaturowa w plazmie tlenowej). W celu ułatwienia spalania węgla bardzo często do próbki dodaje się związki utleniające np.  $\text{Na}_2\text{O}_2$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{KOH}$ . W tej grupie można wyróżnić także tzw. mineralizację suchą z dodatkiem. Wprowadzanie specjalnych dodatków zapobiega utlenieniu niektórych składników próbki, np. dodatek tlenku wapnia zapobiega utlenieniu się boru, gdyż wiąże się go w borany.

**Mineralizacja mokra** – polega na działaniu ciekłych utleniaczy, najczęściej kwasów: azotowego, siarkowego, nadchlorowego. Przykładem takiej mineralizacji jest oznaczanie azotu w związkach organicznych metodą Kjeldahla poprzez działanie stężonym kwasem siarkowym. Wykonując mineralizację mokrą unika się strat związków z ulatnianiem się składników oznaczanych podczas mineralizacji suchej. Inne techniki to np.: mineralizacja z wykorzystaniem ultradźwięków, mineralizacja promieniami UV, mineralizacja mikrofalowa.

#### 4.1.5.4. Ekstrakcja próbek

W celu przygotowania próbek żywności do analizy właściwej bardzo często poddaje się je różnym metodom ekstrakcyjnym. Najbardziej popularne są: ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz, ekstrakcja w układzie ciecz-ciało stałe, ekstrakcja do fazy stałej oraz mikroekstrakcja do fazy stałej.

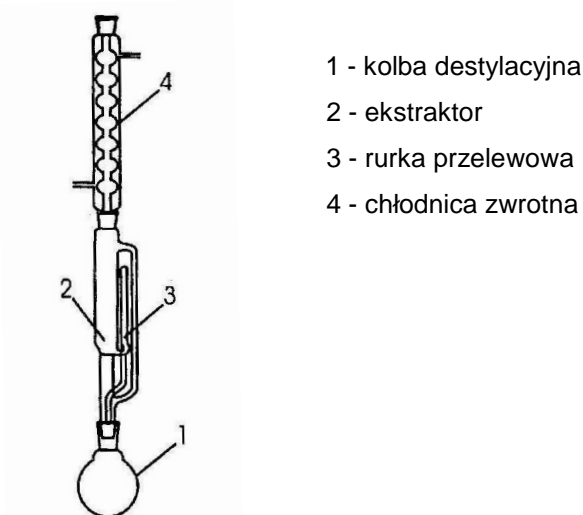
#### **Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz**

Jest to technika izolacji i wzbogacania analitów, którą zalicza się do grupy procesów dyfuzyjnych. Z uwagi na różnicę stężeń, związki badane przemieszczają się do odpowiednio dobranego rozpuszczalnika i dzielą między matrycę a ekstrahent zgodnie z prawem podziału Nernsta. Ekstrakcję tę prowadzi się przy wykorzystaniu rozpuszczalnika niemieszającego się z matrycą. Zazwyczaj jest to układ: woda-rozpuszczalnik organiczny. Technika ta może być stosowana zarówno w temperaturze pokojowej jak też niższej, przez co nadaje się do izolacji substancji nietrwałych. W pierwszej kolejności analizowane próbki wstrząsa się wraz z rozpuszczalnikiem w specjalnych rozdzielaczach, a następnie rozdziela się obie fazy poprzez np. wirowanie czy odstawianie, a na końcu wydziela się anality poprzez np. destylację,

liofilizację czy krystalizację. Podstawową niedogodnością tego typu ekstrakcji jest duże zużycie rozpuszczalnika, co daje zbyt dużą objętość ekstraktu w stosunku do potrzeb analizy. Ekstrakt trzeba zatem zatężyć przez co proces jest pracochłonny oraz może prowadzić do pewnych strat analitu. Ponadto zatężony rozpuszczalnik może być źródłem zanieczyszczeń próbki końcowej - minimalna obecność interferenta w rozpuszczalniku powoduje po jego zatężeniu pojawienie się sygnału, mogącego zdecydowanie zmienić interpretację wyników oznaczeń.

### Ekstrakcja w układzie ciecz-ciało stałe

Ekstrakcję typu ciecz - ciało stałe przeprowadza się w celu wyekstrahowania z ciała stałego określonego składnika rozpuszczalnego w danym rozpuszczalniku. Metoda ta polega na wybiórczym rozpuszczaniu substancji znajdującej się w stałej próbce. Ekstrakcję tego typu najczęściej prowadzi się w aparacie Soxhleeta (Rys. 46)

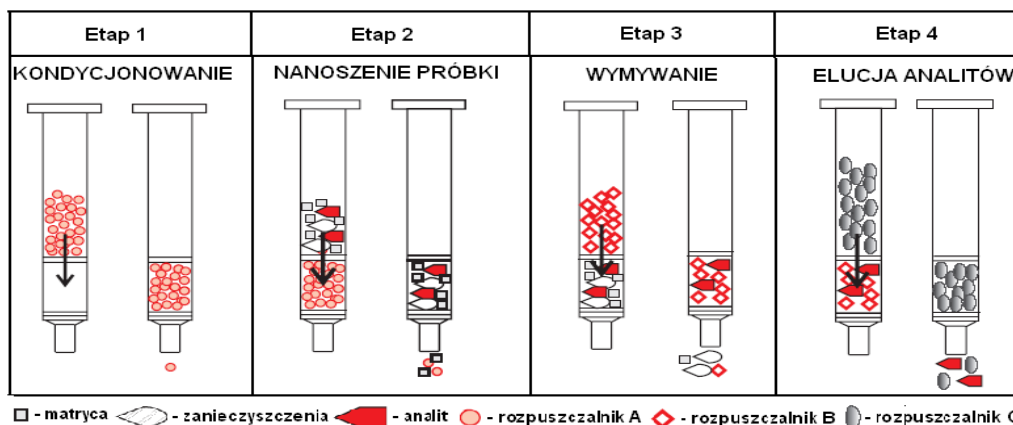


Rys. 46. Aparat Soxhleeta

Aparat Soxhleeta składa się z czterech części: kolby destylacyjnej (1), ekstraktora (2), rurki przelewowej (3) i chłodnicy zwrotnej (4). Ekstrahowane ciało stałe umieszcza się w bibułowej gilzie w środkowej części aparatu. W kolbie znajduje się łatwo lotny rozpuszczalnik, który w wyniku podgrzania zaczyna wrzeć, a jego pary przedostają się do chłodnicy zwrotnej. Po skropleniu rozpuszczalnik gromadzi się w środkowej części aparatu, gdzie znajduje się gilza. W dalszej kolejności ciecz z wyekstrahowaną substancją samoczynnie przelewa się do kolby, gdzie następuje ponowne oddestylowanie rozpuszczalnika. W efekcie wydzielona substancja pozostaje w kolbie rozpuszczona w nadmiarze rozpuszczalnika.

## Ekstrakcja do fazy stałej SPE

Ekstrakcja do fazy stałej (*Solid Phase Extraction*, SPE) to technika izolowania analitu w układzie ciecz - ciało stałe oparta na chromatografii przy użyciu zmodyfikowanych powierzchniowo materiałów krzemionkowych czy polimerycznych. Są to zazwyczaj adsorbenty takie jak żel krzemionkowy, florisil, tlenek glinowy, krzemionka modyfikowana grupami alkilowymi (np. C-18), fenyłowymi, cyjanowymi, propyloaminowymi lub fazy stacjonarne typu SCX – kwas sulfonowy oraz SAX – czwartorzędowe aminy, czy też różnego rodzaju modyfikacje polimeru diwinylobenzenu (DVB). Zasada rozdzielania metodą SPE zależy głównie od natury sorbentu, natomiast cały proces składa się z czterech etapów: kondycjonowanie kolumny, nanoszenie próbki, wymywanie zanieczyszczeń oraz elucja analitów (Rys. 47)



Rys. 47. Etapy procesu ekstrakcji do fazy stałej

*Kondycjonowanie kolumny* - złożę przemywa się rozpuszczalnikiem (takim samym jaki zastosowany zostanie do elucji) w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń z kolumny. Następnie poprzez dodanie rozpuszczalnika o właściwościach najbardziej zbliżonych do właściwości matrycy próbki, sorbent zostaje aktywowany, dzięki czemu złożę jest przygotowane do selektywnego zatrzymywania analitu. Przykładowo stosując niepolarną fazę stacjonarną taką jak żel krzemionkowy z grupami oktadecylowymi, podczas kondycjonowania, wstępnie skręcone łańcuchy alkilowe rozprostowują się, co zwiększa powierzchnię adsorpcji. Należy zwrócić uwagę, aby przed przystąpieniem do kolejnego etapu nad powierzchnią złoża pozostało



ok. 1 mm cieczy, co zapobiega wysuszeniu złoża. W przeciwnym wypadku kondycjonowanie należy powtórzyć.

*Nanoszenie próbki* - uprzednio przefiltrowaną lub odwirowaną próbkę wprowadza się przy pomocy np. pipety Pasteura w całości na powierzchnię złoża, a następnie za pomocą próżni lub nadciśnienia powoli przepuszcza przez złożę. Przepływ nie powinien przekraczać 5 ml/min. Ekstrahując duże ilości próbki, może dojść do utraty przez sorbent właściwości selektywnej adsorpcji analitów. Aby je utrzymać do próbki dodaje się niewielką ilość rozpuszczalnika organicznego stosowanego podczas kondycjonowania (do 10%).

*Wymywanie* - może być przeprowadzone na dwa sposoby:

- W pierwszym przypadku badane związki pozostają w złożu, natomiast zanieczyszczenia usuwane są za pomocą rozpuszczalnika, w którym znajdowała się próbka, bądź innego, który nie usunie analitów (jest słabszym eluentem od rozpuszczalnika użytego do elucji analitów, a silniejszym od matrycy),
- W drugiej metodzie to anality zostają wymyte z kolumny. Sorbent przemywa się roztworem, w którym znajdowała się próbka. W tym przypadku jest to ostatni etap procesu ekstrakcji do fazy stałej.

*Elucja analitów* – w celu wymycia analitów zatrzymanych na kolumnie stosuje się od 200 µl do 2 ml eluentu. Przepływ powinien być powolny, natomiast dla uzyskania lepszej skuteczności wymywania eluent powinien być podawany dwiema mniejszymi porcjami. Wyciek zbiera się i przygotowuje do dalszej analizy.

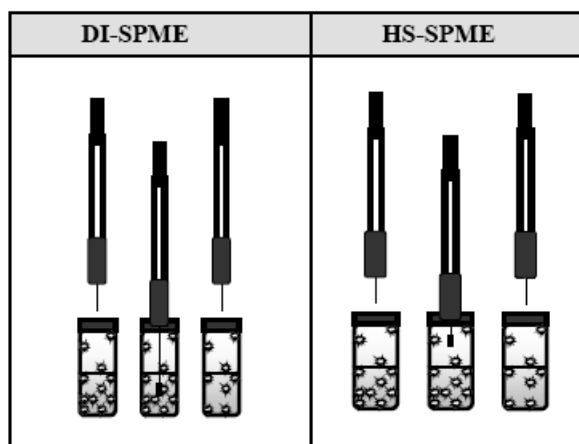
### **Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)**

Podstawą tej metody ekstrakcji jest cienkie włókno ze stopionej krzemionki, którego powierzchnię pokryto cienką warstwą sorbentu. Włókno to przymocowane jest do tłoka mikrostrzykawki, dzięki czemu może być wysuwane lub wsuwane do igły strzykawki. Najczęściej stosowanymi sorbentami są: polidimetylosiloksan (PDMS), poliakrylan (PA) i różne ich mieszaniny, np. polidimetylosiloksan-polidiwinylobenzen (PDMS/DVB), Carbowax, Carboxen. Rodzaj i grubość włókna są dobierane w zależności od właściwości fizycznych analitów. Technika ta może być stosowana zarówno do próbek ciekłych jak i do próbek stałych i gazowych (HS).

Analiza techniką SPME składa się z dwóch etapów:

- I etap – włókno jest zanurzane bezpośrednio w badanej próbce ciekłej (DI- Direct Immersion SPME) lub jest umieszczony w fazie nadpowierzchniowej (HS- Head

Space SPME) gdzie następuje podział związków organicznych pomiędzy fazę stacjonarną osadzoną na włóknie i matrycę (Rys. 48),



**Rys. 48** Schemat bezpośredniej mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej (DI-SPME) oraz mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej w warstwie nadpowierzchniowej (HS-SPME)

- II etap – to desorpcja termiczna odbywająca się w dozowniku chromatografu gazowego, gdzie wysoka temperatura powoduje znaczną zmianę współczynnika podziału związków zatrzymanych na fazie stacjonarnej w kierunku desorpcji do fazy gazowej.

Wydajność tej metody ekstrakcji można modyfikować, przeprowadzając analizy w pochodne. Ze względu na miejsce przeprowadzania procesu derywatyzacji możemy tu wyróżnić:

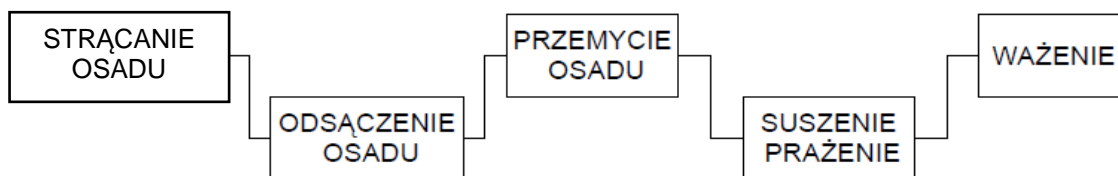
- derywatyzację bezpośrednio w matrycy „in situ” – pochodne otrzymane w wyniku reakcji ekstrahuje się do włókna SPME;
- derywatyzację na włóknie SPME – włókno jest impregnowane odczynnikami derywatyzującym, a następnie anality są wyodrębniane z matrycy do włókna, gdzie ulegają derywatyzacji;
- derywatyzację w komorze dozownika chromatografu – wprowadzenie wyekstrahowanego analitu do włókna w postaci pary jonowej, a następnie do dozownika chromatografu gazowego, gdzie dzięki wysokiej temperaturze zachodzi reakcja.

## 4.2. Metody chemiczne

Metody chemiczne to metody oparte na zjawiskach chemicznych, w których sygnał analityczny uzyskuje się w wyniku reakcji chemicznej. W badaniach nad żywnością wykorzystuje się zarówno metodę wagową jak i miareczkowanie. W metodzie wagowej sygnałem analitycznym jest masa otrzymanego osadu, natomiast w analizie miareczkowej objętość roztworu mianowanego zużyta do zmiareczkowania próbki.

#### 4.2.1. Metoda wagowa

Analiza wagowa (grawimetria) polega na strącaniu oznaczanego składnika w postaci trudno rozpuszczalnego osadu. Strącony osad po odsączeniu, przemyciu, wysuszeniu lub prażeniu waży się na wadze analitycznej. Schemat czynności w analizie wagowej przedstawiono na Rys. 49.



**Rys. 49.** Schemat czynności w analizie wagowej (wg Cygański A. *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej* WNT, Warszawa, 1993, str. 53)

##### 4.2.1.1. Mechanizm strącania osadów

W metodach wagowych kluczową rolę odgrywa mechanizm strącania osadów. Jest to proces stosunkowo prosty w wykonaniu, aczkolwiek otrzymanie osadu o odpowiedniej czystości i postaci wcale nie jest łatwe.

Osad krystaliczny powstaje w wyniku procesu krystalizacji, który inicjują bardzo małe kryształy, zwane zarodkami krystalizacji. Sposób, w jaki powstają owe zarodki nie jest do końca poznany. Wiadomo jednak, że warunkiem tworzenia się zarodków jest, aby roztwór był przesycony. W kolejnym etapie dochodzi do wzrostu kryształów. Jeśli szybkość wzrostu kryształów jest większa od szybkości tworzenia się nowych zarodków krystalizacji powstają osady gruboziarniste; w przeciwnym przypadku tworzą się osady drobnoziarniste. Zasadniczy wpływ na postać osadów odgrywa również szybkość takich procesów jak:

- *agregacja* – proces łączenia się poszczególnych zarodków w skupienia,
- *aglomeracja* – proces tworzenia się i wzrostu agregatów,
- *rekrytalizacja* – przejście pierwotnych skupień o nieuporządkowanej budowie

w uporządkowaną sieć krystaliczną.

#### 4.2.1.2. Współstrącanie osadów

Nieodłącznym procesem związanym ze strącaniem osadów jest tzw. *współstrącanie*. Polega ono na jednoczesnym strącaniu z roztworu, wraz z trudno rozpuszczalnym osadem, makroskładnika rozpuszczalnego w danych warunkach. W efekcie następuje zanieczyszczenie strąconego osadu. Współstrącanie może zachodzić w wyniku:

- *adsorpcji powierzchniowej jonów* czyli zagęszczenia się substancji na granicy dwóch faz: fazy skondensowanej i płynnej; proces ten zachodzi pod wpływem sił powierzchniowych,
- *okluzji* – procesu zachodzącego w trakcie formowania osadu, polegającego na włączaniu (adsorpcji) do osadu cząsteczek substancji obcych, które to na skutek szybkiej krystalizacji zostają zatrzymane w jego wnętrzu,
- *tworzenia kryształów mieszanych*, które oprócz zasadniczego macierzystego składnika zawierają drugi składnik wbudowany i rozprowadzony w sieci krystalicznej macierzystego składnika,
- *powstawania określonych związków chemicznych*, spowodowanego tworzeniem związków między osadami a współstrącającymi się jonami,
- *strącania następczego* – polegającego na wytrącaniu na powierzchni osadu innej substancji, zazwyczaj o wspólnym jonie z osadem.

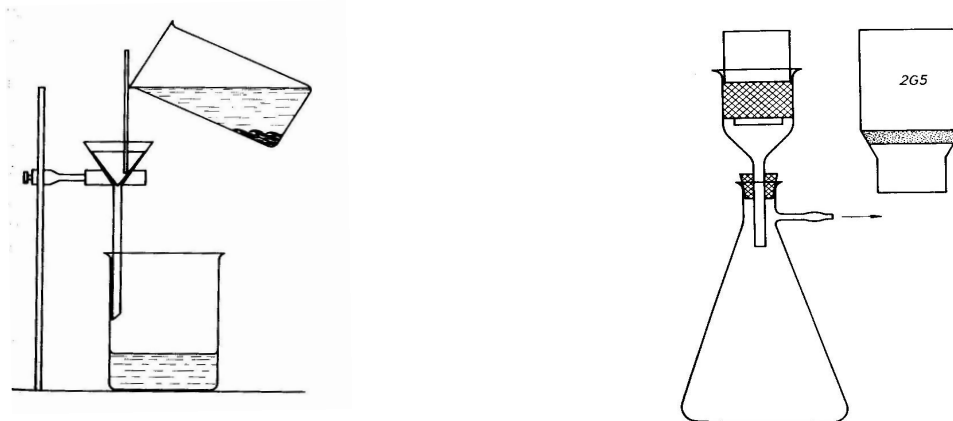
Aby zapobiec współstrącaniu się zanieczyszczeń wraz z osadem, odczynnik strącający dodaje się stopniowo, do energicznie mieszanych, rozcieńczonych roztworów. Ponadto stosuje się podwyższoną temperaturę i unika dużego nadmiaru odczynnika strącającego. Strącony osad można oczyścić z różnego rodzaju domieszek poprzez np. przemywanie czy też kilkukrotne strącanie.

#### 4.2.1.3. Oddzielanie osadu od roztworu

W celu oddzielenia osadu od roztworu macierzystego należy go w pierwszej kolejności odsączyć a następnie przemyć.

**Sączenie osadów** - jest to mechaniczne rozdzielanie mieszaniny roztwór-osad za pomocą różnego typu sączków filtracyjnych czy spieków porowatych. Wybór sposobu sączenia jest uzależniony od dalszego postępowania z osadem. Sączenie

przez bibułę stosuje się np. gdy osad następnie będzie prażony, natomiast jeżeli osad będzie tylko suszony sączy się go przez szklane tygle z dnem porowatym. Poniżej przedstawiono typowy zestaw do sączenia przez bibułę oraz przez tygle z dnem porowatym (Rys. 50).



A)

B)

**Rys. 50.** Zestaw do A) sączenia przez bibułę, B) sączenia próżniowego przez tygiel z dnem porowatym

**Przemywanie osadów** – jest to działanie mające na celu oczyszczenie strąconego i odsączonego osadu z zanieczyszczeń o charakterze powierzchniowym. Stosuje się dwa podstawowe typy przemywania osadów:

- *przemywanie na sączku* – osad przemywa się przy pomocy tryskawki bezpośrednio na sączku,
- *przemywanie przez dekantację* – polega na zalaniu osadu cieczą przemywającą, wymieszaniu i po opadnięciu osadu, zlanie cieczy przez sączek. Tego typu działanie stosuje się w przypadku osadów, których przemycie na sączku nie jest skuteczne, np. dla osadów bezpostaciowych.

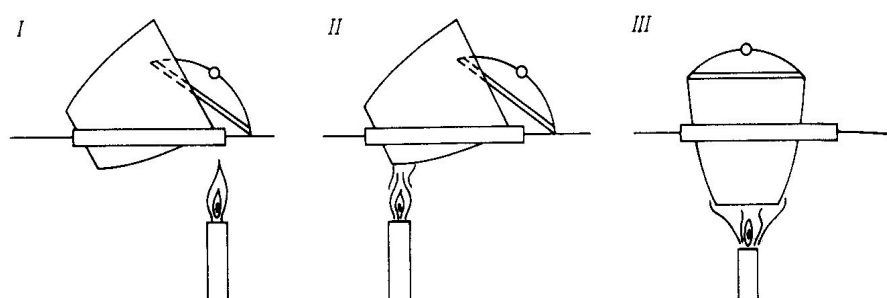
#### 4.2.1.4. Suszenie i prażenie osadów

Przed ostatecznym zważeniem osad musi być wysuszony lub wyprażony w temperaturze zależnej od właściwości osadu. Procesy te mają na celu otrzymanie osadu o ściśle zdefiniowanym składzie.

**Suszenie** - prowadzi się zazwyczaj w suszarkach elektrycznych w temperaturze 105-140°C. Czas suszenia do pierwszego ważenia wynosi na ogół 1-2 godzin, a następnie po upływie 30 min sprawdza się stałość masy. Ważne jest aby do suszarki, gdzie już suszą się różne substancje, nie wstawiać nowych, wilgotnych próbek.

Po wysuszeniu z kolei konieczne jest, aby tygiel lub naczynko wagowe wstawić na kilkanaście minut do eksykatora, aby ochłodziło się do temperatury pokojowej i nie absorboowało wilgoci z powietrza.

**Prażenie** - prażenie osadów prowadzi się albo na palnikach gazowych albo w piecach elektrycznych. Jeżeli trzeba przeprowadzić prażenie osadu odsączonego na bibule to najpierw należy wysuszyć osad wraz z sączkiem a następnie całość spalić nad palnikiem. Osad jest całkowicie wyprażony dopiero wtedy, gdy różnica dwóch kolejnych ważeń nie przekracza 0.0005 g. Poszczególne etapy spalania sączka na mokro ilustruje poniższy rysunek (Rys. 51).



Rys. 51. Etapy spalania sączka: I-suszenie, II-zwęglanie, III-prażenie osadu

#### 4.2.2. Analiza miareczkowa

Analiza miareczkowa (analiza objętościowa) polega na oznaczaniu substancji badanej w roztworze za pomocą dodawania małych porcji roztworu odczynnika (titranta) o dokładnie znanym stężeniu (mianie). Obliczenia zawartości oznaczanej substancji dokonuje się na podstawie zmierzonej objętości roztworu miareczkującego w oparciu o równanie reakcji.

*Podstawowe pojęcia używane w analizie miareczkowej:*

**Miano roztworu** – jest to liczba gramów substancji rozpuszczonej, znajdująca się w  $1 \text{ cm}^3$  roztworu lub liczba gramów substancji oznaczanej reagująca z  $1 \text{ cm}^3$  danego roztworu mianowanego. Jednostka miana to  $\text{g/cm}^3$ .

**Roztwór mianowany** – roztwór o dokładnie znanym stężeniu.

**Titrant** – roztwór miareczkujący o dokładnie znanym stężeniu.

**Punkt równoważnikowy** (PR, punkt nasycenia równoważnikowego) – punkt miareczkowania, w którym została doprowadzona taka ilość titranta, która jest równoważna chemicznie ilości substancji oznaczanej.

**Punkt końcowy miareczkowania** (PK) – punkt, w którym za pomocą metod instrumentalnych lub zmiany barwy wskaźnika można zaobserwować punkt

równoważnikowy (koniec miareczkowania). Punkt końcowy powinien pokrywać się z punktem równoważnikowym.

**Błąd miareczkowania** – różnica między punktem końcowym a punktem równoważnikowym. Powinno się tak dobrać wskaźnik lub metodę instrumentalną, by błąd miareczkowania nie był większy niż 0.05-0.1%. Kiedy PK znajduje się za PR, otrzymujemy zawyżone wyniki (błąd dodatni), natomiast w przeciwnym przypadku wyniki są zaniżone (błąd ujemny).

**Indykator** – wskaźnik.

**Krzywa miareczkowania** – graficzny sposób przedstawienia przebiegu procesu miareczkowania. W układzie współrzędnych na osi odciętych przedstawia się objętość titranta ( $\text{cm}^3$ ) lub % zmiareczkowania, natomiast na osi rzędnych wartości liczbowe parametru odpowiadającego stężeniu substancji oznaczanej.

**Procent zmiareczkowania** – jest to stosunek ilości substancji miareczkowanej, która przereagowała z titrantem, do całkowitej początkowej ilości tej substancji, wyrażony w %.

**Skok miareczkowania** – gwałtowna zmiana w pobliżu punktu równoważnikowego, spowodowana dodaniem jednej kropli roztworu miareczkującego.

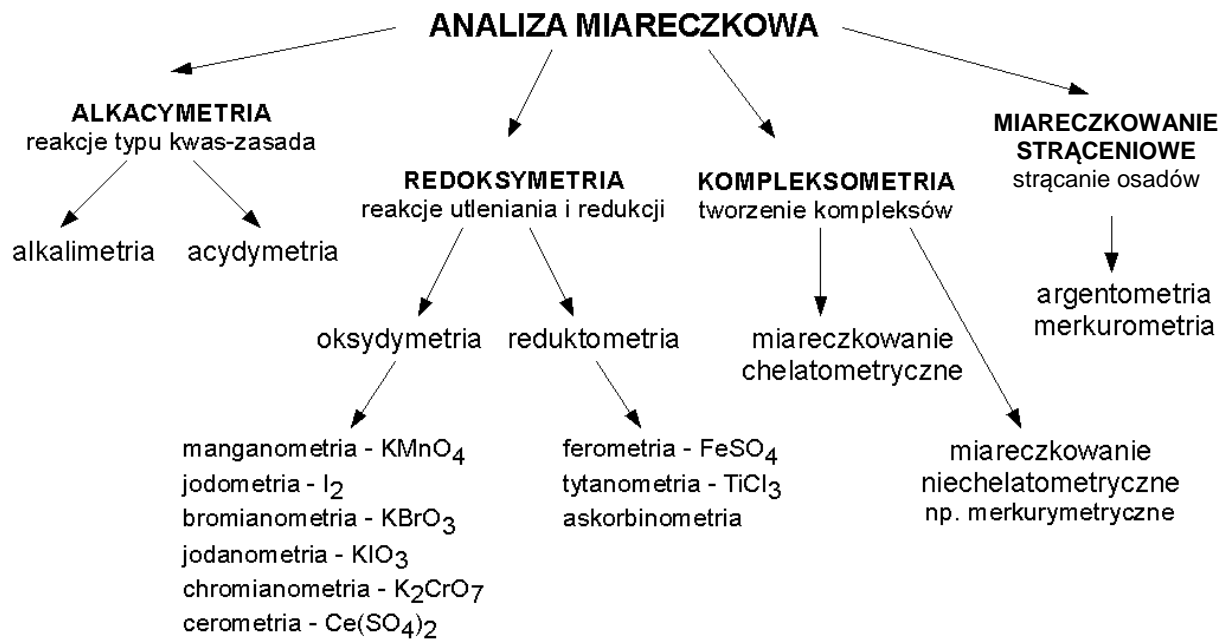
#### 4.2.2.1. Klasyfikacja metod miareczkowania

Metody miareczkowe dzieli się według trzech podstawowych kryteriów:

- typu reakcji zachodzącej podczas miareczkowania i związku będącego titrantem,
- sposobu przeprowadzania oznaczenia miareczkowego,
- sposobu wyznaczenia punktu końcowego.

#### *Podział według typu reakcji zachodzącej podczas miareczkowania i związku będącego titrantem*

Biorąc pod uwagę typ zachodzącej reakcji analizę miareczkową dzieli się na cztery podstawowe działy: alkacymetrię, redoksymetrię, miareczkowanie strąceniowe oraz kompleksometrię (Rys. 52).



**Rys. 52.** Podział metod miareczkowych ze względu na typ reakcji i związek będący titrantem (wg Cygański A. *Chemiczne metody analizy ilościowej* Wyd. 4, WNT, Warszawa, 1994, str. 214)

#### *Podział według sposobu przeprowadzania oznaczenia miareczkowego*

**Miareczkowanie bezpośrednie** – polega na wykorzystaniu do miareczkowania tylko jednego roztworu titranta, który bezpośrednio reaguje z substancją oznaczaną.

**Miareczkowanie pośrednie** – podczas miareczkowania oznaczana substancja nie reaguje w sposób bezpośredni z roztworem miareczkującym a np. z inną substancją, którą się miareczkuje. Metodę tę możemy podzielić na:

- *miareczkowanie odwrotne* – wymaga przygotowania dwóch roztworów mianowanych; najpierw dodajemy w nadmiarze roztwór substancji reagującej z substancją oznaczaną, a w dalszej kolejności nadmiar miareczkuje się drugim roztworem mianowanym,
- *miareczkowanie podstawieniowe (substytucyjne)* – w tym przypadku nie miareczkuje się oznaczanego składnika, ale jego podstawnik, który może być produktem reakcji oznaczanego składnika z odpowiednim odczynnikiem.



*Podział według sposobu wyznaczania punktu końcowego*

**Metody wizualne** – gdy następuje wyraźnie zauważalna zmiana barwy roztworu w wyniku zmiany barwy wskaźnika, utworzenia barwnego produktu przez nadmiar titrantu, bądź pojawienia się nadmiaru barwnego titranta.

**Metody instrumentalne** – polegają na pomiarze zmian właściwości fizycznych lub fizykochemicznych roztworu (np. miareczkowanie potencjometryczne, konduktometryczne, spektrofotometryczne).

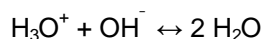
Spośród wszystkich typów miareczkowania w analizie składników żywności najczęściej stosuje się alkacymetrię, i dlatego też została ona omówiona nieco szerzej w następnym podrozdziale.

#### 4.2.2.2. Miareczkowanie alkacymetryczne

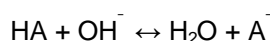
Podstawą alkacymetrii są reakcje kwas-zasada. Podczas miareczkowania następuje ciągła zmiana stężenia jonów hydroniowych  $[H_3O^+]$  czyli pH roztworu. Punkt końcowy wyznacza się zarówno wizualnie jak i metodami instrumentalnymi (np. potencjometrycznie lub konduktometrycznie).

W przypadku miareczkowania alkalimetrycznego (kwas oznaczany jest mianowanym roztworem zasady) wyróżnia się:

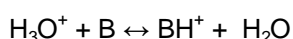
- *miareczkowanie mocnego kwasu mocną zasadą*



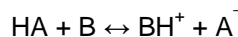
- *miareczkowanie słabego kwasu (w tym kwasów wieloprotonowych) mocną zasadą*



- *miareczkowanie mocnego kwasu słabą zasadą*



- *miareczkowanie słabego kwasu słabą zasadą*

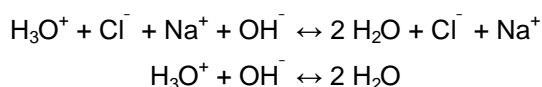


Podobnie jest w przypadku miareczkowania acydymetrycznego (zasada oznaczana jest mianowanym roztworem kwasu):

- *miareczkowanie mocnej zasady mocnym kwasem,*
- *miareczkowanie słabej zasady (w tym zasad wielowodorotlenkowych) mocnym kwasem,*
- *miareczkowanie mocnej zasady słabym kwasem,*
- *miareczkowanie słabej zasady słabym kwasem.*

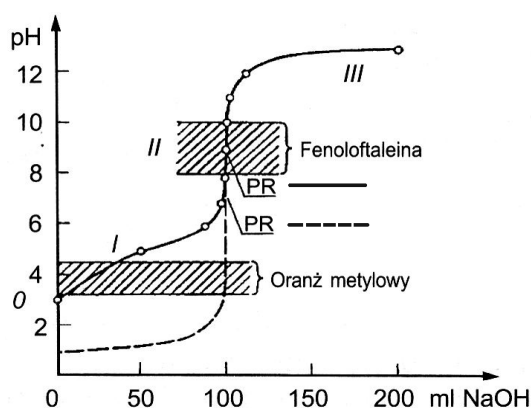
## Miareczkowanie mocnego kwasu mocną zasadą

Jednym z najprostszych przykładów tego typu miareczkowania jest miareczkowanie 0,1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu HCl (100 cm<sup>3</sup>) za pomocą 0,1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu NaOH (Rys. 53).



W punkcie „0” miareczkowania mamy tylko roztwór kwasu solnego, który jest całkowicie zdysocjowany (mocny kwas).

$$\text{pH} = -\lg [\text{H}_3\text{O}^+] = -\lg c_{\text{HCl}} = -\lg 10^{-1} = 1$$



**Rys. 53.** Krzywe miareczkowania: linia ciągła – słabego kwasu mocną zasadą; linia przerywana – mocnego kwasu mocną zasadą (wg Kocjan R. (red.) *Chemia analityczna* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2000, str. 471)

Przed PR (I etap) stężenia jonów hydroniowych  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  maleją w miarę dodawania titranta (łączą się z  $\text{OH}^-$ ). Wartość pH rośnie powoli. Obliczając przykładowo wartość pH po dodaniu 50 cm<sup>3</sup> roztworu NaOH otrzymujemy:

$$c_1 \cdot c_2 = V_1 \cdot V_2$$
$$c_1 = 0,1 \text{ mol/dm}^3; V_1 = 50 \text{ cm}^3; V_2 = 150 \text{ cm}^3$$
$$c_2 = 0,033 \text{ mol/dm}^3$$
$$\text{pH} = -\lg 0,033 = 1,48$$

W pobliżu PR następuje gwałtowny wzrost pH. W punkcie równoważnikowym (II etap miareczkowania) do obliczenia pH korzysta się z iloczynu jonowego wody:

$$[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$$
$$\text{w PR } [\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-]$$
$$[\text{H}_3\text{O}^+]^2 = 10^{-14}$$
$$\text{pH} = 7$$

Za punktem równoważnikowym (III etap miareczkowania) pojawia się nadmiar jonów  $\text{OH}^-$ . W celu obliczenia wartości pH należy skorzystać z iloczynu jonowego wody:

$$[\text{H}_3\text{O}^+][\text{OH}^-] = 10^{-14}$$

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = 10^{-14} / [\text{OH}^-]$$

$$\lg[\text{H}_3\text{O}^+] = -14 - \lg[\text{OH}^-]$$

$$\text{pH} = 14 - \text{pOH}$$

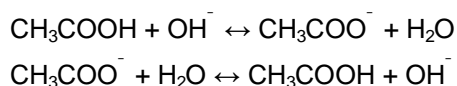
Przykładowe obliczenia punktów krzywej miareczkowania mocnego kwasu mocną zasadą podano w Tabeli 24.

**Tabela 24.** Obliczanie punktów krzywej miareczkowania mocnego kwasu mocną zasadą - 100 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> HCl miareczkowany 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH; V<sub>k</sub><sup>0</sup>- początkowa objętość kwasu (cm<sup>3</sup>); V<sub>z</sub>- objętość zasady (cm<sup>3</sup>); c<sub>z</sub>- stężenie zasady (mol/dm<sup>3</sup>); c<sub>k</sub>- stężenie kwasu (mol/dm<sup>3</sup>) (wg Kocjan R. (red.) *Chemia analityczna* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2000, str. 468)

Etap miareczkowania	Ilość ml dodanego NaOH	Skład roztworu	Stężenie nie zubożonego HCl [mol/dm <sup>3</sup> ]	Obliczenie pH roztworu	pH
0	0,0	HCl	0,1	$\text{pH} = -\lg [\text{H}_3\text{O}^+] = -\lg c_{\text{HCl}}$	1,00
I	10,0 50,0 90,0 99,0 99,9	HCl, NaCl	$c_{\text{HCl}} = \frac{c_z \cdot V_k^0 - c_z \cdot V}{V_k^0 + V_z}$ 8,2 · 10 <sup>-2</sup> 3,4 · 10 <sup>-2</sup> 5,3 · 10 <sup>-3</sup> 5,0 · 10 <sup>-4</sup> 5,0 · 10 <sup>-5</sup>	$\text{pH} = -\lg [\text{H}_3\text{O}^+] = -\lg c_{\text{HCl}}$	1,08 1,48 2,27 3,30 4,31
II (PR)	100,00	NaCl		$\text{pH} = -\lg \sqrt{10^{-14}}$	7,00
III	100,1 101,0	NaOH, NaCl	Stężenie nadmiaru zasady (mol/dm <sup>3</sup> ) $c_z = [\text{OH}^-] = \frac{c_z \cdot V_z - c_k \cdot V_k^0}{V_k^0 + V_z}$ 5,0 · 10 <sup>-5</sup> 5,0 · 10 <sup>-4</sup>	$\text{pH} = \text{pKw} - \text{pOH} = 14 + \lg c_z$	9,70 10,70

### Miareczkowanie słabego kwasu mocną zasadą

Przykładem takiego miareczkowania jest miareczkowanie kwasu octowego roztworem zasady sodowej. W miarę dodawania roztworu zasady następuje zubożenie roztworu, ale jest ono zakłócone przez dysocjację tworzącej się zasady anionowej czyli hydrolizę soli słabego kwasu i mocnej zasady.



Przykładowa krzywa miareczkowania przedstawiona jest na Rys. 53, natomiast sposób obliczania poszczególnych punktów na tej krzywej zamieszczony jest w Tabeli 25.

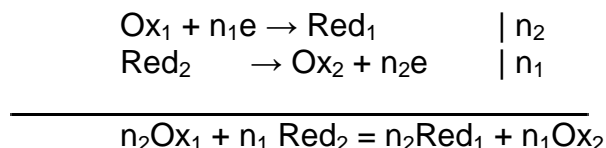
**Tabela. 25.** Obliczanie punktów krzywej miareczkowania słabego kwasu mocną zasadą - 100 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> CH<sub>3</sub>COOH miareczkowany 0,1 mol/dm<sup>3</sup> NaOH; V<sub>k</sub><sup>0</sup>- początkowa objętość kwasu (cm<sup>3</sup>); V<sub>z</sub>- objętość zasady (cm<sup>3</sup>); c<sub>z</sub>- stężenie zasady (mol/dm<sup>3</sup>); c<sub>k</sub>- stężenie kwasu (mol/dm<sup>3</sup>) (wg Kocjan R. (red.) *Chemia analityczna* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, W-arszawa, 2000, str. 472)

Etap miareczkowania	Ilość ml dodanego NaOH	Skład roztworu	Stężenie roztworu lub stosunek stężeń $\frac{c_s}{c_k}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	Wzór do obliczanie pH roztworu	pH
0	0,0	CH <sub>3</sub> COOH słaby kwas	c <sub>k</sub> = 0,1	pH = ½ pK <sub>k</sub> - ½ lg c <sub>k</sub>	2,90
I	10,0 50,0 90,0 99,0 99,9	CH <sub>3</sub> COOH CH <sub>3</sub> COONa  mieszanina buforowa	stosunek stężeń $\frac{c_s}{c_k}$  $\frac{c_z \cdot V_z}{c_k \cdot V_k^0 - c_z \cdot V_z}$	pH = pK <sub>k</sub> + lg c <sub>s</sub> /c <sub>k</sub>	3,80 4,75 5,70 6,70 7,70
II (PR)	100,00	Zasada anionowa CH <sub>3</sub> COONa sól słabego kwasu i mocnej zasady	stężenie c <sub>s</sub>  $\frac{c_k \cdot V_k^0}{V_k^0 + V_z}$	pH = 7 + ½ pK <sub>k</sub> + lg c <sub>s</sub>	8,70
III	100,1 101,0	NaOH, CH <sub>3</sub> COONa nadmiar mocnej zasady	stężenie NaOH  c <sub>z</sub> = [OH <sup>-</sup> ] =  $\frac{c_z \cdot V_z - c_k \cdot V}{V_k^0 + V_z}$	pH = 14 - pOH	9,70 11,70

Przed rozpoczęciem miareczkowania w roztworze obecny jest tylko słaby kwas. W I etapie miareczkowania powstaje mieszanina buforowa złożona ze słabego kwasu i sprzężonej z nim zasady anionowej – jonu octanowego. W PR w roztworze będzie obecna jedynie słaba zasada sprzężona z miareczkowanym kwasem, a jej dysocjacja powoduje, że odczyn roztworu będzie zasadowy. Po przekroczeniu punktu równoważnikowego o pH roztworu decyduje jedynie nadmiar dodanej mocnej zasady.

### 4.2.2.3. Miareczkowanie redoksymetryczne

Reakcje utleniania i redukcji, będące podstawą miareczkowania redoksymetrycznego, przebiegają znacznie wolniej od reakcji jonowych (np. alkacymetria). Wymiana elektronów pomiędzy jonami przebiega w kilku etapach, a najwolniejszy z nich decyduje o szybkości całego procesu. Ogólne równanie reakcji redoks można schematycznie zapisać



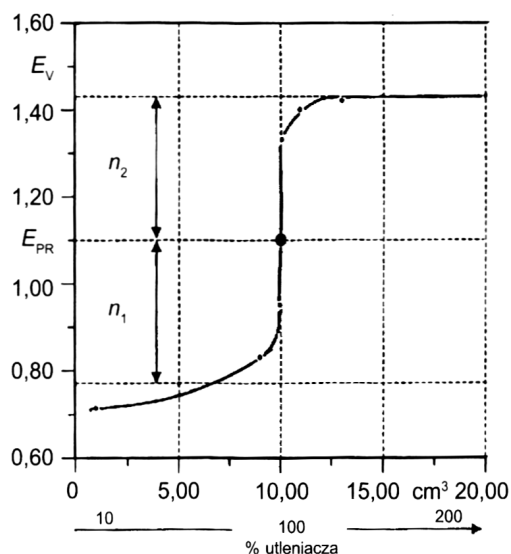
Układ, w którym postać utleniona jest związana z postacią zredukowaną tylko wymianą elektronów, nazywany jest sprzężoną parą redoks (np.  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ). Krzywą miareczkowania redoksymetrycznego wykreśla się na podstawie wartości potencjałów redoks obliczonych ze wzoru Nernsta.

$$E = E_0 + 0,059/n \times (\log[\text{utl}]/[\text{red}])$$

W punkcie równoważnikowym  $E_{\text{PR}} = E_1 = E_2$

$$E_{\text{PR}} = (E_1^0 \times n_1 + E_2^0 \cdot n_2) / (n_1 + n_2)$$

Przykładową krzywą miareczkowania 10 cm<sup>3</sup> 0,1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu jonów  $\text{Fe}^{3+}$  roztworem 0,1 mol/dm<sup>3</sup> jonów  $\text{Ce}^{4+}$  w 1 mol/dm<sup>3</sup> HCl przedstawiono poniżej.

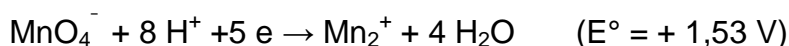


Krzywa miareczkowania jonów  $\text{Fe}^{2+}$  roztworem jonów  $\text{Ce}^{4+}$  (wg R. Kocjan (red.) *Chemia analityczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, W-wa 2000)

### Miareczkowanie manganometryczne

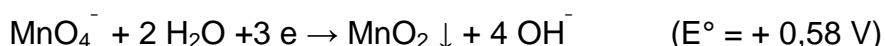
Jako roztworu miareczkującego używa się manganianu(VII) potasu o silnie fioletowym zabarwieniu, który w zależności od środowiska reakcji (ze zmianą pH zmienia się potencjał redoks układu) ulega różnym przemianom:

a) środowisko kwaśne



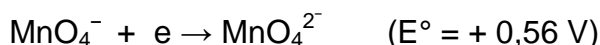
roztwór ulega odbarwieniu

b) środowisko obojętne lub słabo zasadowe lub słabo kwasowe



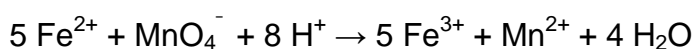
wytrąca się brunatny osad  $\text{MnO}_2$

c) środowisko mocno zasadowe



roztwór przybiera zieloną barwę.

Metodą miareczkowania manganometrycznego można oznaczać żelazo w postaci jonów dwuwartościowych. Reakcję przeprowadza się w środowisku kwasu siarkowego(VI).



Sole żelaza(III) mają intensywną żółtą barwę, która mogłaby zakłócić obserwację końca miareczkowania, dlatego też wiąże się je w bezbarwny kompleks z kwasem

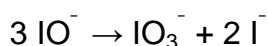
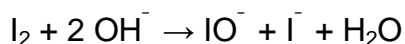
fosforowym(V). Duży wpływ na błędne oznaczenie ma obecność jonów chlorkowych w roztworze, które mogą utleniać się do wolnego chloru lub nawet chloranów(I), a oznaczane jony żelaza indukują tę reakcję. Aby zapobiec takim niepożądanym reakcjom, przed rozpoczęciem miareczkowania wprowadza się mieszaninę Zimmermana i Reinhardta, w której skład wchodzi: siarczan(VI) manganu, kwas siarkowy(VI) i kwas fosforowy(V). Jeśli w miareczkowanym roztworze obecne są również jony  $\text{Fe}^{3+}$ , należy je zredukować do  $\text{Fe}^{2+}$ . W tym celu jako reduktorów używa się chlorek cyny(II), siarkowodór, kwas siarkowy(VI) lub niektóre metale (Zn, Cd, Al. – często w postaci amalgamatów).

### Miareczkowanie jodometryczne

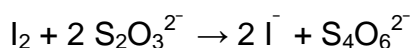
Podstawą wszystkich oznaczeń jodometrycznych jest odwracalna reakcja



Miareczkowanie jodometryczne przeprowadza się w środowisku kwaśnym, ponieważ potencjał układu  $\text{I}_2/2 \text{I}^-$  nie zależy od stężenia jonów wodorowych w zakresie do pH. W roztworach bardziej alkalicznych, potencjał ten maleje na skutek reakcji



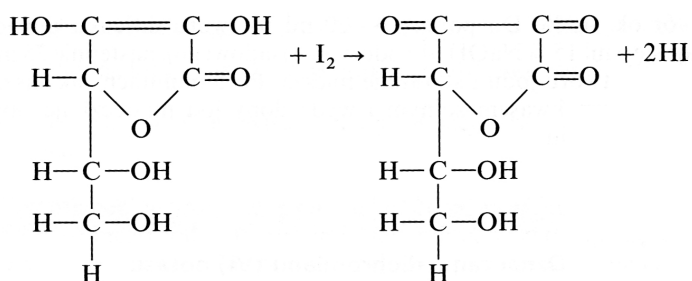
Jodometria jest jedną z najważniejszych metod analizy miareczkowej. W zależności od wartości potencjału utleniającego substancji oznaczanych możemy podzielić ją na dwie grupy. Substancje, których potencjały utleniające są niższe od potencjału  $\text{I}_2/2 \text{I}^-$  można miareczkować bezpośrednio mianowanym roztworem jodu (siarczki, siarczany(IV), arsen(III), cyna(II), tiosiarczany). Substancje o wyższym potencjale utleniającym niż potencjał układu  $\text{I}_2/2 \text{I}^-$  utleniają jony jodkowe do jodu, który następnie miareczkuje się mianowanym roztworem tiosiarczanu sodu.



W taki pośredni sposób oznacza się liczne substancje utleniające (bromiany, jodany, manganiany(VII), chlor, cer(IV), miedź(II), żelazo(III)).

Wskaźnikiem używanym w oznaczeniach jodometrycznych jest zawiesina skrobi, która tworzy z jodem połączenie o charakterze addycyjnym o intensywnym niebieskim zabarwieniu.

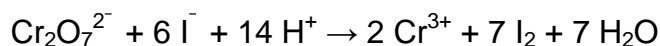
Przykładem bezpośredniego miareczkowania metodą jodometryczną jest oznaczanie kwasu askorbinowego (witaminy C). Kwas ten ma właściwości redukujące i utlenia się pod wpływem jodu do kwasu dehydroaskorbinowego.



KWAS ASKORBINOWY  
(postać zredukowana)

KWAS DEHYDROASKORBINOWY  
(postać utleniona)

Jodometryczne oznaczanie dichromianu(VI) potasu w środowisku kwaśnym jest przykładem miareczkowania pośredniego. Roztwór dichromianu(VI) potasu zakwasza się kwasem siarkowym(VI), a następnie miareczkuje roztworem KI.



Wydzielony jod miareczkuje się następnie tiosiarczanem(VI) sodu, dodając pod koniec miareczkowania wskaźnika skrobiowego. Moment, w którym zanika barwa niebieska, a pojawia się barwa żółtozielona lub fioletowa kompleksów Cr(III), oznacza punkt końcowy miareczkowania

### 4.3. Metody instrumentalne

Obecność zanieczyszczeń chemicznych w żywności jest jednym z podstawowych kryteriów oceny bezpieczeństwa produktów żywnościowych. Konieczne jest więc dysponowanie odpowiednimi metodami analizy instrumentalnej, pozwalającymi na uzyskanie bardzo niskiej granicy oznaczalności. Wybór właściwej techniki oznaczeń końcowych podyktowany jest przede wszystkim właściwościami oznaczanych składników.

Najczęściej stosowanymi metodami instrumentalnymi w analizie żywności są: spektrofotometria UV-Vis, chromatografia gazowa (GC); wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz techniki łączone (GC-MS oraz LC-MS).



### 4.3.1. Chromatografia gazowa

W chromatografii składniki rozdzielane ulegają podziałowi między fazę stacjonarną a ruchomą. Jeżeli fazą ruchomą (mobilną) jest gaz, to jest to chromatografia gazowa (GC). Częściej stosowana jest chromatografia w układzie gaz – ciecz (podziałowa chromatografia gazowa, GLC). Rozdzielanie mieszanin na składniki polega na różnicach w powinowactwie poszczególnych związków do fazy stacjonarnej. Wyraża to równanie Nernsta (Rys. 54):

$$K_c = \frac{c_s}{c_m}$$

**Rys. 54.** Równanie Nernsta;  $c_s$  i  $c_m$  - stężenia substancji badanej w fazie stacjonarnej i ruchomej,  $K_c$  - współczynnik podziału

Chromatografia gazowa jest skuteczną metodą rozdzielania złożonych mieszanin związków organicznych, dlatego też znalazła ogromne zastosowanie w analizie żywności. Praktycznie każdy związek, który charakteryzuje się stabilnością termiczną i odpowiednią lotnością może być analizowany przy pomocy tej techniki.

Rozdzielanie ma charakter dynamiczny i dlatego analizy przeprowadza się w temperaturze powyżej temperatury wrzenia rozdzielanych związków. Strategia analizy, o ile to konieczne, polega na przeprowadzeniu związków w bardziej lotne pochodne w procesie derywatyzacji. Ze względu na znaczne różnice w temperaturach wrzenia analizowanych związków, w celu poprawy rozdzielania i uniknięcia długich czasów retencji, analizę prowadzi się metodą programowanej temperatury z izotermą na początku i końcu analizy. W analizie GC, jako ciekłą fazę stacjonarną stosuje się najczęściej polisiloksany (Tabela 26).

**Tabela 26.** Przykłady faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii gazowej

Rodzaj fazy	Skład fazy	Maksymalna temperatura pracy [°C]	Kolumna
polarne	90% biscyjanopropylo/10% fenylocyjanopropylopolisiloksan	275	Rt-2330
średniopolarne	14 %-cyjanopropylofenylo-86 % dimetylopolisiloksan	320	OV-1701
	glikol polietylenowy	260	DB-Wax,

			Supelcowax 10
niepolarne	dimetylopolisiloksan	360	DB-1, Rt-1, SPB-1, SP-2100, OV-1, OV-101

Analiza metodą chromatografii gazowej przebiega w następujących etapach:

- nastrzyk próbki do dozownika chromatografu gazowego,
- rozdzielanie związków w kolumnie chromatograficznej,
- wykrywanie związków przez detektor.

Chromatografia gazowa służy do analizy jakościowej i ilościowej stosunkowo lotnych związków chemicznych. Analizę jakościową przeprowadza się na podstawie porównania następujących parametrów retencyjnych analizowanych związków i wzorców:

- **całkowity czas retencji**  $t_R$  (Rys. 55) jest to czas liczony od momentu wprowadzenia próbki do momentu pojawienia się na chromatogramie maksimum sygnału związku:

$$t_R = \frac{L}{u} \times (1 + k)$$

**Rys. 55.** Całkowity czas retencji; L - długość kolumny chromatograficznej, u - średnia, liniowa prędkość przepływu gazu nośnego, k - współczynnik retencji

- **zerowy czas retencji**  $t_M$  (czas martwy) jest to czas przebywania na kolumnie substancji, która nie oddziałuje z fazą stacjonarną. Czas zerowy jest równy czasowi przepływu fazy ruchomej przez kolumnę.

- **zredukowany czas retencji**  $t'_R$  (Rys. 56) jest to różnica pomiędzy całkowitym czasem retencji danego składnika a zerowym czasem retencji:

$$t'_R = t_R - t_M$$

**Rys. 56.** Zredukowany czas retencji

Wielkość ta charakteryzuje zatrzymywanie się danego składnika na fazie stacjonarnej.

- **względny czas retencji** (Rys. 57) wyraża poniższy wzór:

$$r_{i,w} = \frac{t'_{Ri}}{t'_{Rw}}$$

**Rys. 57.** Względny czas retencji

Indeks "i" oznacza dowolną substancję, a indeks "w" oznacza wzorzec.

- **współczynnik retencji k** (Rys. 58) zdefiniowany jest wzorem:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

**Rys. 58** Współczynnik retencji

Im większą wartość przyjmuje współczynnik  $k$ , tym silniej substancja jest zatrzymywana przez fazę stacjonarną.

- **indeks retencji Kovátsa  $I_x$**  (Rys. 59) jest to wielkość charakterystyczna dla danej substancji, analizowanej na danej fazie stacjonarnej, służąca do analizy jakościowej. Indeks retencji substancji jest równy  $100 \times$  liczba atomów węgla hipotetycznego n-alkanu mającego taki sam zredukowany czas retencji jak badana substancja. Alkany mają w każdej temperaturze i dla każdej fazy ciekłej indeks równy liczbie atomów węgla  $\times 100$ , czyli np. n-pentan 500, n-oktan 800. Indeksy retencji analizowanych związków można obliczyć korzystając ze wzoru:

$$I_x = 100m \frac{\log t'_{R_x} - \log t'_{R_z}}{\log t'_{R_{(z+m)}} - \log t'_{R_z}} + 100z$$

**Rys. 59.** Indeks retencji Kovátsa;  $I_x$  - indeks retencji nieznanego związku,  $t'_{R_x}$  - zredukowany czas retencji nieznanego związku,  $t'_{R_z}$  - zredukowany czas retencji n-alkanu zawierającego  $z$  atomów węgla,  $t'_{R_{(z+m)}}$  - zredukowany czas retencji n-alkanu o  $(z + m)$  atomach węgla,  $m$  najczęściej wynosi 1, przy czym

$$t'_{R_z} < t'_{R_x} < t'_{R_{(z+m)}}.$$

Do obliczenia indeksu retencji związku wybiera się dwa n-alkany, których czasy retencji leżą poniżej i powyżej czasu retencji nieznannej substancji. Alkany te dodaje się do próbki i wykonuje analizę GC. Indeks retencji jest w znacznym stopniu niezależny od warunków analizy i przez to jest parametrem charakterystycznym dla danego związku w danej temperaturze i dla określonej fazy ciekłej. Zależność temperaturowa jest przy tym stosunkowo niewielka i wynosi zazwyczaj od 2 do 6 jednostek indeksu przy zmianie temperatury o  $10^\circ\text{C}$ .

W chromatografii gazowej ważnymi parametrami są również:

- **sprawność kolumny chromatograficznej.** Na sprawność kolumn chromatograficznych wpływa liczba póltek teoretycznych. Im więcej póltek teoretycznych posiada kolumna, tym jest ona sprawniejsza. W wyniku analiz z wykorzystaniem kolumn o wysokiej sprawności sygnały są wąskie i lepiej rozdzielone.
- **półka teoretyczna** jest to objętość kolumny, w której zostaje osiągnięty stan równowagi pomiędzy stężeniami substancji w fazie ruchomej i w fazie stacjonarnej. Kolumna chromatograficzna składa się z  $N$  póltek teoretycznych (Rys. 60):

$$L = N \times H$$

**Rys. 60.** Długość kolumny chromatograficznej;  $L$  - długość kolumny chromatograficznej,  $H$  (lub  $WRPT$ ) – wysokość równoważna półce teoretycznej,  $N$  - liczba póltek teoretycznych

Liczbę póltek teoretycznych można obliczyć z następujących wzorów (Rys. 61):

$$N = 16 \times \left( \frac{t_R}{w} \right)^2$$

$$N = 5,54 \times \left( \frac{t_R}{w_{1/2h}} \right)^2$$

$$N = \left( \frac{t_R}{\sigma} \right)^2$$

**Rys. 61.** Wzory pozwalające na obliczenie liczby póltek teoretycznych;  $w$  - szerokość pików mierzona u podstawy,  $w_{1/2h}$  - szerokość pików mierzona w połowie wysokości pików,  $\sigma$  - odchylenie standardowe krzywej (szerokość pików na wysokości równej 0,882 wysokości)

Wszystkie wielkości mierzone są w jednostkach czasu.

- **współczynnik selektywności  $\alpha$**  (Rys. 62) jest miarą selektywności rozdzielania chromatograficznego dwóch związków:

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{RB}}{t_{RA}}$$

**Rys. 62.** Współczynnik selektywności;  $k_A$  - współczynnik retencji związku A,  $t'_{RB}$  - zredukowany czas retencji związku B ( $t'_{RB} > t'_{RA}$ )

- **rozdzielczość**  $R_s$  (Rys. 63) jest miarą skuteczności rozdzielenia składników mieszaniny:

$$R_s = 2 \times \frac{t_{RB} - t_{RA}}{w_A + w_B}$$

**Rys. 68.** Rozdzielczość;  $t_{RA}$  oraz  $t_{RB}$  są czasami retencji związków A oraz B,  $w_1$  oraz  $w_2$  to szerokości pików mierzone przy podstawie

Rozdzielczość, czas retencji, selektywność i liczbę pól teoretycznych łączy ze sobą wzór Purnella (Rys. 64):

$$R_s = \frac{1}{4} \times \left[ \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \times \left[ \frac{k_2}{1 + k_2} \right] \times \sqrt{N_2}$$

**Rys. 64.** Wzór Purnella;  $\alpha$  - współczynnik selektywności,  $k_2$  - współczynnik retencji dla związku 2,  $N_2$  - liczba pól teoretycznych dla związku 2

Na podstawie tego wzoru można stwierdzić, że:

- podwojenie długości kolumny powoduje wzrost rozdzielczości tylko  $\sqrt{2}$  razy,
- całkowite rozdzielenie związków następuje gdy  $R_s > 1,5$ ,
- wartość  $R_s$  zależy od trzech czynników: selektywności wyrażanej współczynnikiem selektywności, sprawności kolumny i retencji wyrażonej współczynnikiem retencji.

#### 4.3.1.1. Budowa chromatografu gazowego

Chromatograf gazowy składa się z następujących elementów:

- zbiornika gazu nośnego,
- regulatora przepływu gazu nośnego,
- dozownika,
- kolumny chromatograficznej umieszczonej w piecu chromatograficznym,
- detektora,
- rejestratora (komputera).

Oczyszczony gaz nośny (faza ruchoma, np. argon) jest doprowadzony z butli i płynie przez regulator przepływu do dozownika, a następnie przez kolumnę umieszczoną w termostacie i w efekcie trafia do detektora. Temperatury dozownika, detektora i kolumny są odpowiednio regulowane. Do dozownika wprowadza się próbkę, która po odparowaniu, miesza się ze strumieniem gazu nośnego a następnie trafia

do kolumny. W kolumnie następuje rozdzielanie składników próbki, które to następnie po opuszczeniu kolumny trafiają wraz z gazem nośnym do detektora, a ten reaguje sygnałem elektrycznym na obecność chromatografowanego związku chemicznego.

**Zbiornik gazu nośnego.** W chromatografii gazowej gazem nośnym może być hel, argon, azot lub wodór. Najważniejszą cechą gazu nośnego jest obojętność wobec fazy stacjonarnej, elementów przyrządu oraz składników badanych mieszanin. Bardzo ważna jest również czystość gazu nośnego, ponieważ zanieczyszczenia mogą powodować dezaktywację faz stacjonarnych i zakłócenia pracy detektora. Z tych powodów, zwykle przed kolumną znajdują się filtry (różnego rodzaju adsorbenty), które służą do usuwania wody, tlenu i zanieczyszczeń organicznych. Przed wlotem na kolumnę znajduje się również regulator przepływu, pozwalający na utrzymanie stałego ciśnienia gazu.

**Dozownik.** Chromatografia gazowa służy do analiz substancji, których temperatura wrzenia nie przekracza 300-400°C. Dozowniki pozwalają na wprowadzenie do strumienia gazu nośnego analizowanych substancji, dlatego dozownik jest ogrzewany do temperatury, która pozwala aby wprowadzone substancje przeszły w stan gazu. W przypadku kolumn kapilarnych stosuje się zwykle dwa typy dozowników:

- dozowniki z dzieleniem strumienia (ze spliterem, *split injection*). Do gorącego dozownika (przez membranę) wprowadza się próbkę za pomocą strzykawki. Większość odparowanej próbki jest usuwana na zewnątrz chromatografu ze strumieniem gazu nośnego i tylko niewielka jej część trafia wraz z gazem do kolumny. Pozwala to na dozowanie próbki w ilości optymalnej dla kolumn kapilarnych o małej średnicy. Dozowniki tego typu pozwalają również na zmianę stopnia podziału strumienia. Możliwe jest również dozowanie całej próbki (dozownik *split – splitless*),
- dozowniki typu *on-column*. W tym dozowniku ciekła próbka jest dozowana poprzez nieogrzewany dozownik bezpośrednio do kolumny o temperaturze 20-60°C i dopiero wtedy kolumna jest ogrzewana, co powoduje odparowanie rozpuszczalnika, a następnie składników próbki. Ta technika dozowania zmniejsza prawdopodobieństwo termicznego rozkładu związków o małej stabilności w wyższych temperaturach. Pozwala również na dozowanie stosunkowo małych ilości analitów (cała próbka dozowana jest na kolumnę). Istnieje jednak ryzyko

zanieczyszczenia początkowego odcinka kolumny substancjami nielotnymi lub słabo lotnymi, które są wprowadzane razem z próbką.

**Kolumny chromatograficzne.** W chromatografii gazowej, głównie stosuje się kolumny kapilarne. Są one elastyczne i trwałe, wykonane ze stopionego kwarcu, a ich długość wynosi od 10 do nawet 300 metrów. Najczęściej stosowane są kolumny o długości 15-60 metrów. Średnica wewnętrzna takich kolumn wynosi 0,2-0,3 mm, a warstwa filmu ciekłej fazy stacjonarnej, pokrywającej ściankę wewnętrzną, ma zwykle grubość rzędu ułamka mikrometra. Można wyróżnić trzy podstawowe typy kolumn:

- kolumny do chromatografii w układzie gaz – ciało stałe z porowatą warstwą adsorbentu na ściankach (*porous layer open tubular*, PLOT),
- kolumny z naniesionym na ścianki nośnikiem nasyconym ciekłą fazą stacjonarną (*support coated open tubular*, SCOT),
- kolumny ze ściankami pokrytymi ciekłą fazą stacjonarną (*wall-coated open tubular*, WCOT).

**Detektor.** Zadaniem detektora jest wykrywanie substancji, które opuszczają kolumnę chromatograficzną. Detektor powinien charakteryzować się dużą czułością i wykrywalnością, możliwie szerokim zakresem liniowości wskazań (proporcjonalności powstającego sygnału do stężenia związku), niskim poziomem szumów linii zerowej, a także możliwie niską ceną i łatwością obsługi. Detektory w chromatografii gazowej można podzielić na:

- nieselektywne, które reagują na wszystkie składniki próbki (detektory uniwersalne),
- selektywne, które wykrywają pewną grupę związków o podobnych właściwościach chemicznych lub fizycznych,
- specyficzne, które reagują na pojedynczy związek chemiczny.

Najczęściej stosowanym detektorem jest *detektor płomieniowo-jonizacyjny* (FID). Detektor FID jest czuły, pozwala wykryć już  $10^{-12}$  g substancji. Jest to detektor uniwersalny, zdolny do wykrywania niemal wszystkich związków organicznych. Detektor FID nie wykrywa jedynie związków nieorganicznych oraz niektórych związków węgla: CO, CO<sub>2</sub>, CS<sub>2</sub>, HCOOH, COCl<sub>2</sub>. Do tego detektora doprowadzone są dwa gazy: wodór i powietrze. Gaz nośny wypływający z kolumny jest mieszany z wodorem i kierowany przez dyszę do komory, przez którą przepływa powietrze. Wodór spala się tworząc płomień wodorowy. Składniki próbki doprowadzone wraz z gazem nośnym do płomienia ulegają spalaniu. W komorze znajdują się dwie elektrody: jedną jest dysza palnika,

a drugą stanowi pierścień umieszczony w odpowiedniej odległości od dyszy. Powstający prąd jonowy jest wzmacniany i rejestrowany przez potencjometr. Sygnał z detektora jest proporcjonalny do liczby atomów węgla niezwiązanych z tlenem, czyli w przybliżeniu jest proporcjonalny do masy analizowanej substancji.

#### 4.3.1.2. Połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS)

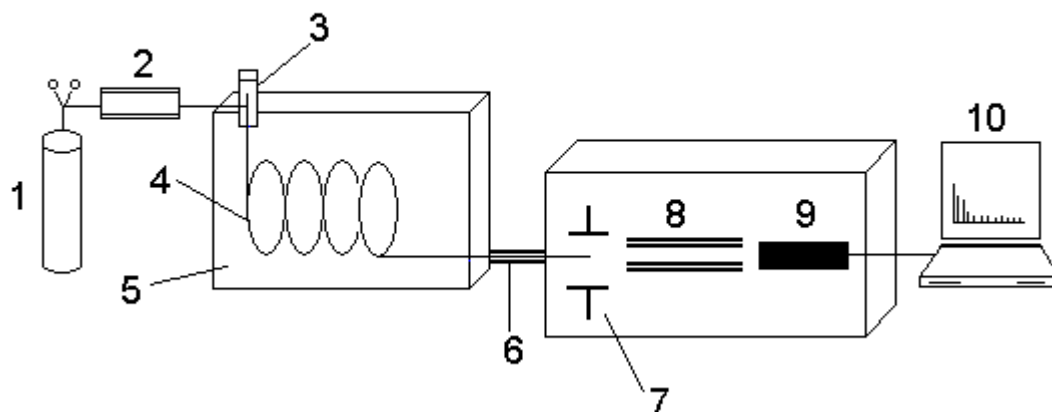
Sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas jest jedną z podstawowych technik analitycznych w analizie żywności. Polega ono na połączeniu chromatografu gazowego ze spektrometrem mas. Jest wykorzystywana głównie do identyfikacji składników mieszanin związków organicznych, ale także może być stosowana do analiz ilościowych. Oznaczanie ilościowe metodą GC-MS stosuje się, gdy badana mieszanina składa się z wielu składników, a stężenie oznaczanego składnika jest niewielkie. Analiza takiej mieszaniny z wykorzystaniem chromatografii gazowej nie daje pewności czy dany sygnał odpowiada oznaczanemu związkowi i wtedy niezbędne jest zastosowanie połączenia ze spektrometrem mas. Kolumna chromatografu gazowego podłączona jest bezpośrednio do źródła jonów spektrometru mas. Związki organiczne eluują się kolejno z kolumny do źródła jonów, gdzie zachodzi jonizacja.

Zaletą technik sprzężonych jest możliwość jednoczesnego rozdzielania, jednoznacznej identyfikacji i analizy ilościowej. Ze względu na wysoką czułość detekcji (na poziomie  $10^{-9}$  -  $10^{-12}$  g), spektrometr mas pozwala na efektywną analizę śladowych ilości związków występujących w skomplikowanych matrycach naturalnych. Chromatograf gazowy stanowi układ wprowadzania próbki, a spektrometr mas pełni rolę detektora nieselektywnego rejestrując całkowity prąd jonowy w czasie, TIC (*Total Ion Current*) lub detektora selektywnego - rejestrując wybrane jony, SIM (*Selective Ion Monitoring*).

Każdy spektrometr mas składa się z następujących elementów (Rys. 65):

- układu wprowadzenia próbki,
- źródła jonów,
- analizatora,
- detektora,
- rejestratora.





**Rys. 65.** Zestaw GC-MS: 1 - zbiornik gazu nośnego, 2 - regulator przepływu gazu, 3 - dozownik, 4 - kolumna, 5 - piec chromatograficzny, 6 - linia transferowa, 7 - źródło jonów, 8 - analizator (kwadropol), 9 - detektor, 10 - rejestrator (komputer)

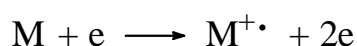
Eluat w fazie gazowej, z kolumny chromatograficznej trafia do komory jonizacyjnej. Najczęściej stosowaną metodą wytwarzania jonów jest jonizacja elektronami, EI (*Electron Ionization*). Elektrony bombardują cząsteczkę, prowadząc do utraty przez nią elektronu i powstania jonu molekularnego, który jest kationorodnikiem. Następnie jon molekularny, w wyniku nadmiaru energii wewnętrznej, ulega dalszej fragmentacji. Powstałe jony są kierowane do analizatora, gdzie następuje rozdzielanie mieszaniny jonów w zależności od wartości masy do ładunku ( $m/z$ ). Rozdzielone jony są wykrywane i mierzone ilościowo w detektorze. Identyfikację przeprowadza się na podstawie widm mas, które są charakterystyczne i niepowtarzalne dla danej substancji.

**Układ wprowadzania próbki.** Próbki jednorodnie chemicznie wprowadza się bezpośrednio do spektrometru mas. Próbki będące ciałami stałymi wprowadza się bezpośrednio za pomocą sondy, która przechodzi przez próżniową śluzę. Próżnia w śluzie jest wytwarzana przez olejową pompę rotacyjną. Zastosowanie śluzy jest konieczne, ponieważ w źródle jonów panuje wysoka próżnia ( $10^{-6}$  mm Hg), wytwarzana przez pompę dyfuzyjną lub turbomolekularną. Ze względu na wysoką próżnię oraz ogrzewanie sondy możliwe jest wykonanie analiz dość trudno lotnych związków organicznych. Niewielką ilość próbki (około  $10^{-6}$  g) rozpuszcza się w rozpuszczalniku i wprowadza mikrostrzykawką do tygielka znajdującego się na końcu sondy. Do lotnych próbek (cieczy) stosuje się wprowadzenia składające się z komory, do której wstrzykuje się próbkę oraz zaworu dozującego próbkę do przyrządu. Próbki niejednorodnie

chemicznie i mieszaniny związków organicznych wprowadza się przez chromatograf gazowy (technika GC-MS).

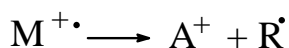
**Źródło jonów.** W źródle jonów następuje jonizacja cząsteczek związków chemicznych. Elektrony emitowane przez katodę, którą jest zwykle żarzące się włókno wolframowe, mają kierunek prostopadły do kierunku przepływu badanej próbki w stanie gazowym. Jonizacja cząsteczek próbki zachodzi w wyniku zderzeń z elektronami. Powstałe jony dodatnie są następnie odpychane przez dodatnio naładowaną elektrodę odpychającą i po zbliżeniu do elektrody przyciągającej są przyspieszane przechodząc do analizatora. Najczęściej stosowana jest jonizacja elektronami i jonizacja chemiczna.

*Jonizacja elektronami (EI, electron impact)* polega na bombardowaniu wiązką elektronów analizowanych cząsteczek znajdujących się w stanie gazowym. Wiązka elektronów jest emitowana z katody wykonanej z trudno topliwych metali - wolframu lub renu. Katoda ogrzewana jest prądowo do temperatury kilku tysięcy stopni. Energię elektronów można zmieniać przez zmianę napięcia między katodą a anodą, do której kierowana jest wiązka elektronów z katody. Zazwyczaj stosuje się standartową energię 70eV. Bombardowanie par cząsteczek substancji organicznej wiązką elektronów prowadzi do oderwania elektronów od badanych cząsteczek i w efekcie powoduje powstawanie tzw. jonów molekularnych:



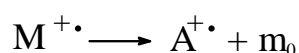
$M^{+\bullet}$  jon molekularny

Jony molekularne mogą ulegać dalszemu rozpadowi tworząc jony fragmentacyjne. Jony molekularne mogą rozpaść się na jony parzystoelektronowe i nieparzystoelektronowe:



$A^+$  jon parzystoelektronowy

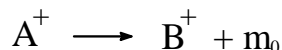
$R^\bullet$  rodnik



$A^{+\bullet}$  jon nieparzystoelektronowy

$m_0$  cząsteczka obojętna

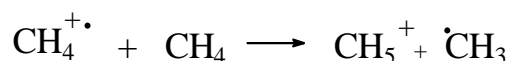
Powstające jony fragmentacyjne mogą także rozpaść się tworząc nowe jony fragmentacyjne: jony nieparzystoelektronowe mogą rozpaść się dwojako, tak jak jony molekularne. Natomiast jony parzystoelektronowe rozpadają się wyłącznie na jony parzystoelektronowe i cząsteczki obojętne:



$B^+$  jon parzystoelektronowy

Powstające w źródle jonów jony pod wpływem napięcia przyspieszającego od 2 do 8 kV kierowane są ze źródła jonów do analizatora.

*Jonizacja chemiczna* (CI, *chemical ionization*), w tym procesie w wyniku jonizacji wiązką elektronów, z gazu reagującego (np. metan) pod ciśnieniem  $10^{-4}$  mm Hg, powstają jony molekularne  $CH_4^+$ . Na skutek zderzeń powstałych jonów z cząsteczkami gazu reagującego powstają z kolei jony wtórne:

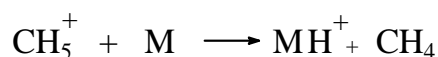


$CH_4^{+\bullet}$  jon molekularny

$CH_5^+$  jon wtórny

$\bullet CH_3$  rodnik

Reakcja jonów z cząsteczkami obojętnymi jest możliwa ze względu na stosunkowo niższą próżnię (rzędu  $10^{-4}$  mm Hg), co powoduje duże prawdopodobieństwo zderzeń jonów z cząsteczkami obojętnymi. Jony wtórne gazu reagującego są silnymi kwasami Lewisa, dlatego łatwo oddają proton badanym cząsteczkom:



$MH^+$  pozorny jon molekularny

W wyniku tej reakcji tworzą się pozorne jony molekularne  $MH^+$ . Jony te ulegają w małym stopniu dalszemu rozpadowi, ponieważ nie mają one dużego nadmiaru energii wewnętrznej. Jony  $MH^+$  są z reguły jonami o dużej intensywności (często są jonami podstawowymi), czyli jonami o największej intensywności (o intensywności względnej 100%). Z tego powodu chemiczna jonizacja jest często stosowana do analiz związków,

których jony molekularne w przypadku zastosowania jonizacji elektronami, są małej intensywności.

**Analizator.** W analizatorze zachodzi rozdzielanie jonów na podstawie stosunku ich masy do niesionego ładunku ( $m/z$ ). Najczęściej stosowanymi analizatorami są: analizator magnetyczny i kwadrupolowy. Podstawową zależność opisującą zachowanie się jonów w analizatorze magnetycznym przedstawia poniższe równanie (Rys. 66):

$$\frac{m}{z} = \frac{r^2}{2} \frac{H^2}{V}$$

**Rys. 66.** Podstawowa zależność opisującą zachowanie się jonów w analizatorze magnetycznym;  $z$  - ładunek jonów,  $r$  - promień krzywizny toru jonów,  $V$  - napięcie przyspieszające,  $H$  - natężenie pola magnetycznego

Zwiększając natężenie pola magnetycznego ( $H$ ) w sposób ciągły do detektora dochodzą kolejno jony o wzrastającym stosunku masy do ładunku ( $m/z$ ). Jest to tzw. przemiatanie polem.

Trzema podstawowymi cechami analizatorów są: zakres mas, przepuszczalność (transmisja) i zdolność rozdzielcza (rozdzielczość). Zakres mas jest to zakres wartości  $m/z$ , w którym możliwy jest pomiar (w praktyce chodzi o górną granicę mas). Przepuszczalność analizatora jest to stosunek liczby jonów docierających do detektora do liczby jonów wytwarzanych w źródle jonów. Natomiast zdolność rozdzielcza określa zdolność rozróżniania sygnałów pochodzących od dwóch jonów o sąsiadujących wartościach  $m/z$ . Rozdzielczość  $R$  definiuje się wzorem (Rys. 67):

$$R = \frac{M_n}{M_n - M_m}$$

**Rys. 67.** Rozdzielczość;  $M_n$  i  $M_m$  – masy dwu najbliższych jonów, które można uznać za rozdzielone ( $M_n > M_m$ )

**Detektor.** Najbardziej czułym detektorem stosowanym w spektrometrach mas jest powielacz elektronowy. Zbudowany jest w formie rogu z rury wykonanej ze szkła ołowiowego. Materiał ten posiada dobre właściwości emisji elektronów wtórnych. Jon docierający do anody konwersyjnej powoduje emisję elektronów, a następnie każdy elektron docierający do wewnętrznej powierzchni detektora, powoduje emisję kolejnych elektronów. Następnie, elektrony są przyspieszane przez pole elektryczne do wnętrza rury i ponownie zderzają się ze ścianką powodując emisję elektronów wtórnych

(powielanie kaskadowe w kierunku wnętrza powielacza). Powstający prąd przekazywany jest do elektrometru.

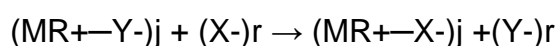
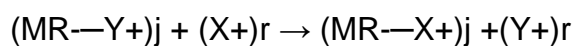
**Rejestrator.** Komputer, w który wyposażony jest spektrometr mas, rejestruje otrzymywane dane i przedstawia je w postaci widma mas oraz chromatogramu całkowitego prądu jonowego (TIC). Komputer może zawierać bibliotekę widm, gdzie są zamieszczone widma mas związków. Porównanie otrzymanego widma z widmem z bazy danych komputera ułatwia interpretację otrzymanych wyników.

#### 4.3.2. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC - *High Performance Liquid Chromatography; High Pressure Liquid Chromatography*) jest dziś najpopularniejszą i najbardziej uniwersalną techniką chromatograficzną. Jest to technika kolumnowa, ciśnieniowa, w której faza ruchoma przepływa przez kolumnę wypełnioną fazą stacjonarną pod ciśnieniem. Stałość przepływu i wysokie ciśnienie zapewnia specjalna pompa, a jako detektor najczęściej stosuje się spektrofotometr UV, który sprzężony z rejestratorem lub komputerowym urządzeniem rejestrującym wykreśla chromatogram, na podstawie którego można dokonać analizy jakościowej i ilościowej.

Ze względu na naturę zjawisk, będących podstawą procesu rozdzielania chromatografię cieczową dzielimy na:

- **adsorpcyjną**, głównym zjawiskiem determinującym przebieg procesu chromatograficznego jest zjawisko adsorpcji; zjawisko to polega na tym, że cząsteczka substancji łączy się w sposób nietrwały (głównie siłami o charakterze wiązania wodorowego) z powierzchnią adsorbenta (np. żel krzemionkowy, tlenek glinu),
- **podziałową**, w której rozdzielanie związane jest z różnymi wartościami współczynnika podziału składników mieszaniny między dwie niemieszające się fazy, z których jedną jest faza stacjonarna (ciecz na nośniku), a drugą faza ruchoma (gaz, ciecz lub płyn w stanie nadkrytycznym),
- **jonowymienną**, w której podstawą rozdzielania są różnice w sile oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy jonami z roztworu a jonami związanymi z fazą stacjonarną (zwaną jonitem). Jonity są to nierozpuszczalne substancje wielkocząsteczkowe o budowie jonowej, zdolne do wymiany jonów zgodnie z równaniami reakcji:

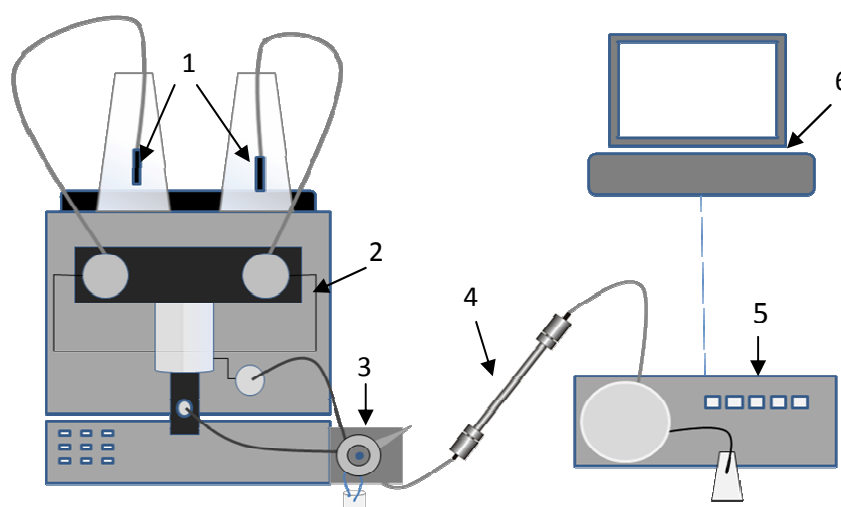


Indeks “j” oznacza fazę jonitu, a indeks “r” fazę roztworu. Technikę tę stosuje się przede wszystkim do rozdzielania związków jonowych, zjonizowanych lub ulegających jonizacji, a także dla związków niejonowych, po wcześniejszym przeprowadzeniu ich w kompleksy jonowe,

- **sitową**, zwaną inaczej chromatografią żelową, sączeniem molekularnym lub chromatografią wykluczania, w której o rozdzielaniu składników mieszaniny decydują rozmiary cząsteczek.

#### 4.3.2.1. Budowa i zasada działania chromatografu cieczowego

Schemat budowy chromatografu cieczowego przedstawiono na Rys. 68. Pompa ze zbiornika (lub zbiorników) zasysa fazę ruchomą i przez dozownik tłoczy do kolumny chromatograficznej. Kolumna jest niekiedy umieszczana w termostacie. Analizowaną próbkę wstrzykuje się za pomocą dozownika na szczyt kolumny chromatograficznej, a następnie składniki mieszaniny rozdzielają się w kolumnie i na wyjściu z niej są wykrywane przez detektor. Sygnał elektryczny z detektora po wzmocnieniu jest zapisywany na papierze rejestracyjnym lub rejestrowany za pomocą integratora albo komputera w postaci sygnału chromatograficznego. Przepływ cieczy przez układ jest kontrolowany manometrem bądź przepływomierzem. W niektórych przyrządach możliwe jest zbieranie rozdzielonych składników w kolektorze frakcji.



**Rys. 68.** Schemat chromatografu cieczowego, 1 – zbiornik fazy ruchomej, 2 – pompa, 3 – dozownik, 4 – kolumna chromatograficzna, 5 – detektor, 6 – komputer

**Pompy.** Pompa jest ważnym elementem chromatografu cieczowego ponieważ w sposób ciągły, odtwarzalny i z optymalną prędkością wymusza przepływ fazy ruchomej przez kolumnę chromatograficzną. Dobre pompy powinny charakteryzować się stałym przepływem fazy ruchomej z możliwą regulacją w granicach 0,1 – 10 cm<sup>3</sup>/min, odpornością chemiczną materiału pompy na fazę ruchomą, małą objętością wewnętrzną, bezpulsacyjnym przepływem oraz możliwością uzyskania ciśnień roboczych do 35 MPa. Pompy stosowane w chromatografii cieczowej można podzielić na stałociśnieniowe i stałoprzepływowe. Do pomp stałociśnieniowych należą pompy wyporowe i pompy z tłokami z napędem pneumatycznym. Obecnie stosowane są rzadko ze względu na możliwość niepożądanych zmian przepływu fazy ruchomej. Lepsze właściwości odtwarzania wymuszonego przepływu mają pompy stałoprzepływowe i dlatego są stosowane częściej. Najbardziej rozpowszechnionym typem pomp stałoprzepływowych są pompy tłokowe. Są to najczęściej pompy z jednym lub dwoma tłokami. Tłoki przesuwają się w cylindrach o małej objętości (0,03 cm<sup>3</sup> – 1 cm<sup>3</sup>), a ruch tłoków jest zsynchronizowany z otwieraniem i zamykaniem zaworów kulkowych, które kontrolują przepływ fazy ruchomej. Objętościowa prędkość przepływu regulowana jest albo wielkością skoku tłoka albo częstością ruchu tłoka. Pompy tłokowe zapewniają możliwość pracy ciągłej w zakresie 0,1 - 30 cm<sup>3</sup>/min, a ich wadą może być pulsacja cieczy powodująca niestaość linii zerowej i spadek czułości detektora.

**Dozowniki.** Przez dozownik chromatografu cieczowego (port iniekcyjny) wprowadza się próbki pod ciśnieniem atmosferycznym do kolumny, w której panuje ciśnienie kilkudziesięciu MPa. We współczesnych chromatografach cieczowych do dozowania próbek analizowanych substancji stosuje się najczęściej zawory dozujące zaopatrzone w pętlę dozowniczą. Kierunek przepływu fazy ruchomej zależy od położenia zaworu, w jednym położeniu dźwigni może omijać pętlę a w drugim - przechodzić przez nią. Do napełnienia pętli dozującej wykorzystuje się strzykawki szklane. Pojemność pętli dozowniczej może być różna i wynosić od kilku  $\mu$ l do kilku cm<sup>3</sup>.

**Detektory.** Detektor HPLC to instrument mierzący stężenie, albo strumień masy substancji w eluacie wypływającym z kolumny chromatograficznej i przepływającym przez naczynie pomiarowe detektora lub dopływającym do czujnika pomiarowego detektora. Detektor jest więc urządzeniem określającym zmiany w składzie eluatu, na podstawie różnic pomiędzy właściwościami fizykochemicznymi eluentu i substancji

oznaczanej (analitu). Niezależnie od rodzaju detektora i właściwości wykorzystanej podczas detekcji, eluent zawierający substancję oznaczaną (eluat), po wyjściu z kolumny jest kierowany do przepływowego naczynka pomiarowego. W większości przypadków o wyborze detektora decyduje skład zastosowanego eluentu i właściwości substancji rozdzielanych.

Detektory działające na zasadzie absorpcji światła nadfioletowego (UV) lub nadfioletowego i widzialnego (UV-VIS) łącznie są najlepsze i najbardziej rozpowszechnione wśród detektorów stosowanych w kolumnowej chromatografii cieczerwowej. Stosuje się je do wykrywania związków zawierających w cząsteczce wiązania nienasycone i grupy chromoforowe, olefin.

Najprostsze monochromatyczne **detektory UV** umożliwiają wykrywanie rozdzielanych substancji przy jednej długości fali - 254 nm. Jest to długość fali światła pochłanianego przez większość substancji organicznych (około 65%). Obecnie powszechnie stosowane są detektory spektrofotometryczne, w których możliwa jest płynna regulacja długości fali. Detektor UV jest niewrażliwy na zmiany przepływu fazy ruchomej i na zmiany temperatury. Wykrywalność analizowanej substancji przy dobrze dobranej długości fali nadfioletu wynosi średnio 1 ng w próbce.

Niektóre firmy produkują **detektory z matrycą fotodiodową** (ang. *diode array detector*, DAD). Światło z lampy deuterowej jest skupiane przez układ optyczny w komórce przepływowej, w której część światła jest absorbowana przez substancje zawarte w próbce. Następnie promień światła rozszczepiony na siatce dyfrakcyjnej pada na matrycę diodową. Diody tej matrycy mogą rejestrować natężenie światła w zakresie 190-600 nm w ciągu 10 milisekund (10 ms). W matrycy umieszcza się np. 211 fotodiod, z których każda jest przeznaczona do pomiaru wąskiego spektrum światła. Jednoczesna rejestracja prądów z poszczególnych fotodiod umożliwia rejestrację całego widma absorpcji analizowanego związku chemicznego. Widmo to może być przedstawione w układzie trójwymiarowym - czas retencji, długość fali i absorbancja. Możliwe też jest rejestrowanie zwykłego chromatogramu z maksimum absorbancji dla każdego składnika próbki rejestrowanego na chromatogramie w postaci sygnału chromatograficznego.

**Detektor refraktometryczny** jest najbardziej uniwersalnym detektorem spośród stosowanych w chromatografii cieczerwowej. Detekcja polega na pomiarze różnicy współczynnika załamania światła eluentu i eluatu.



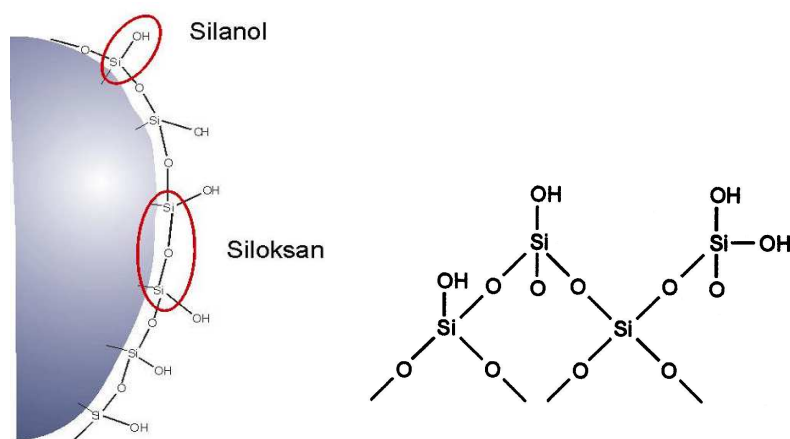
Zasada działania **detektora aerozolowego promieniowania rozproszonego** polega na tym, że eluat z kolumny rozpylany jest ditlenkiem węgla w nebulizatorze podgrzany do temp. 42°C. Wskutek tego eluent ulega odparowaniu a nielotne składniki próbki tworzą aerozol. Aerozol w strumieniu CO<sub>2</sub> i par eluentu jest przenoszony przez rurkę dyfuzyjną i komórkę pomiarową poza detektor. W komórce pomiarowej aerozol rozprasza promień światła emitowany z lasera. Rozproszone promieniowanie jest doprowadzane przez światłowód do fotopowielacza, a prąd fotopowielacza po wzmocnieniu w elektrometrze rejestruje się w postaci chromatogramu.

#### 4.3.2.2. Wypełnienia kolumn

W wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosuje się najczęściej wypełnienia o rozmiarze ziaren 5-10 µm. Drobnodziarniste wypełnienia zapewniają krótką drogę dyfuzji cząsteczek substancji rozdzielanych do wnętrza ziaren i dzięki temu, przy względnie dużych prędkościach fazy ruchomej uzyskuje się wysokie sprawności kolumn. Właściwości kinetyczne sorbentu są tym lepsze, im cieńsza jest grubość warstwy aktywnej. Można to uzyskać stosując **sorbenty o porowatej powierzchni na nieporowatym wnętrzu** (np. szklanym). Zaletą ich jest to, że można je łatwo otrzymywać w postaci cząstek o kształtach zbliżonych do kulistego. Rozmiary cząstek takich sorbentów są zwykle większe niż sorbentów objętościowo-porowatych, więc wypełnianie nimi kolumn jest stosunkowo łatwe, a ponadto stawiają one mały opór przepływowi fazy ruchomej. Kolumny napełnione sorbentami powierzchniowo-porowatymi mają jednak małą powierzchnię sorpcyjną i małą sprawność dlatego też obecnie stosowane są rzadko. Powszechnie używane są **sorbenty objętościowo-porowate**. Wprawdzie stawiają one dość duży opór przepływowi fazy ruchomej, ale przy zastosowaniu odpowiedniej pompy, nie stanowi to problemu. Ciśnienie potrzebne do przetłaczania fazy ruchomej przez kolumnę wynosi 5-15 MPa (~50-150 atm). Wypełnienie sorbentami objętościowo-porowatymi zapewnia wysoką sprawności dużą pojemność sorpcyjną kolumny. Stosowane są jako wypełnienia kolumn do rozdzielania preparatywnego.

W chromatografii adsorpcyjnej, prowadzonej w normalnym układzie faz, jako wypełnienie kolumn stosuje się przede wszystkim **żel krzemionkowy**. Bardzo rzadko używany jest tlenek glinu i inne polarne adsorbenty przydatne do pewnych,

szczególnych przypadków rozdzielania. Żel krzemionkowy jest materiałem amorficznym, porowatym i jako wypełnienie kolumn ma dużo zalet: posiada uziarnienie o pożądanej wielkości i odpowiednich rozmiarach porów, określoną powierzchnię właściwą i dużą wytrzymałość mechaniczną. Żele krzemionkowe wytwarzane są przez wiele firm i noszą różne nazwy. Chemiczna struktura powierzchni żelu krzemionkowego związana jest z obecnością grup silanolowych  $-Si-O-H$  lub siloksanowych  $-Si-O-Si-$  i może być przedstawiona schematycznie na Rys. 69:

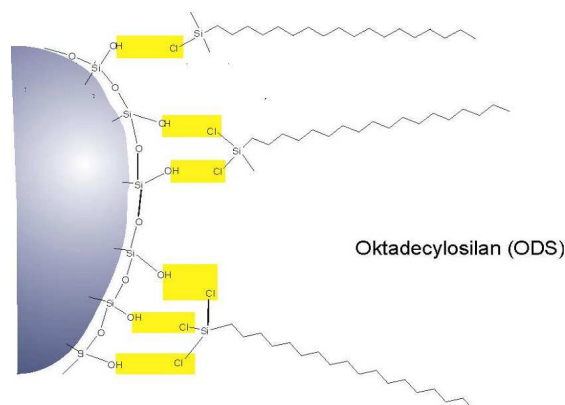


**Rys. 69.** Budowa powierzchni żelu krzemionkowego

Obecnie dużo większe znaczenie niż żel krzemionkowy mają wypełnienia otrzymane w wyniku jego modyfikacji, polegającej na wiązaniu z aktywnymi grupami żelu krzemionkowego związków organicznych. Zwykle z powierzchnią żelu krzemionkowego wiązane są łańcuchy alkilowe lub łańcuchy alkilowe zakończone grupami funkcyjnymi. Otrzymane w ten sposób wypełnienia nazywa się w skrócie **fazami związanymi**. Przyjmuje się, że mechanizm działania tych faz jest podziałowy. W rzeczywistości znaczny udział w procesie rozdzielania mają zjawiska adsorpcji. Spośród faz związanych największe znaczenie mają fazy otrzymywane w wyniku modyfikacji żelu krzemionkowego alkilochlorosilanami. Związane z powierzchnią żelu krzemionkowego łańcuchy alkilowe nadają jego powierzchni charakter niepolarny (hydrofobowy). Polarność zmodyfikowanej powierzchni zależy od długości i ilości związanych z nią łańcuchów alkilowych. Największe znaczenie praktyczne posiadają te sorbenty, w których z powierzchnią żelu krzemionkowego związane są łańcuchy alkilowe zawierające 2, 8 lub 18 atomów węgla w cząsteczce. Im dłuższy jest łańcuch alkilowy

oraz im mniej jest wolnych grup hydroksylowych na powierzchni żelu, tym mniejsza jest jego polarność.

Najpopularniejszą fazą niepolarną (hydrofobową) jest faza oktadecylosilanowa (ODS) o 18 atomach węgla w łańcuchu (C18) (Rys. 70).



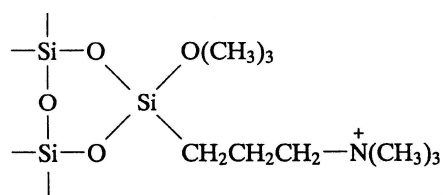
Rys. 70. Faza oktadecylosilanowa

Rzadziej stosowane są fazy zawierające w łańcuchu alkilowym 8 (C8) lub 2 (C2) atomy węgla. Czasami łańcuch alkilowy zakończony jest grupą fenyłową (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) lub difenyłową (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>. Fazy związane hydrofobowe są podstawowymi wypełnieniami stosowanymi do chromatografii w **odwróconym układzie faz (RP)** (ang. *reversed phase*, RP). Stosowane są do rozdzielania substancji nierozpuszczalnych lub słabo rozpuszczalnych w wodzie. Należą do nich węglowodory aromatyczne, polimery, steroidy i alkaloidy. Inną grupę faz związanych stanowią hydrofilowe fazy stacjonarne o pośredniej polarności (żel krzemionkowy zmodyfikowany grupami propylocyjanowymi -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CN lub propyloaminowymi -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>).

Fazy związane z silnie polarnymi grupami funkcyjnymi, podobnie jak żel krzemionkowy, stosowane są do chromatografii w **normalnym układzie faz (NP)**.

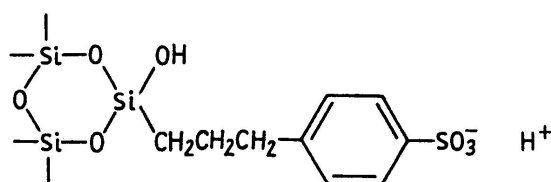
Do rozdzielania składników niektórych mieszanin potrzebne są specjalne wypełnienia kolumn. Grupę takich faz stacjonarnych, stosowanych do rozdzielania izomerów optycznie czynnych (mieszanin racemicznych) stanowią **żele krzemionkowe modyfikowane grupami chiralnymi** (optycznie czynnymi).

Do analizy związków jonowych stosuje się **wymieniacze jonowe**. Do rozdzielania w oparciu o wymianę anionów stosuje się wymieniacze anionowe, np. czwartorzędowe aminy (Rys. 71),



Rys. 71. Wymieniacz anionowy

a do rozdzielania na zasadzie wymiany kationów służą wymieniacze kationowe (Rys. 72), np. aromatyczne kwasy sulfonowe.



Rys. 72. Wymieniacz kationowy

W **chromatografii sitowej** (nazywaną często chromatografią żelową) jako fazy stacjonarne stosuje się żele polimerowe o określonych wielkościach porów. Umożliwia to rozdzielanie substancji w zależności od wielkości ich cząsteczek. Przykładem fazy stacjonarnej używanej w chromatografii sitowej są różne typy Sephadeksów i żele poliakryloamidowe (Bio-Gel-e) używane np. do rozdzielania związków wielkocząsteczkowych.

W **chromatografii par jonowych** (jonowo-asocjacyjnej) stosuje się zwykłe fazy ODS. Nie zaleca się jednak używać tej samej kolumny do chromatografii RP i do chromatografii par jonowych, ponieważ odczynniki używane w chromatografii par jonowych mogą powodować trwałe zmiany aktywności kolumny jeśli zastosujemy ją do chromatografii RP. W ostatnich latach coraz większe znaczenie mają związane fazy stacjonarne nowej generacji, w których znajdują się fragmenty naturalnie występujące w układach biologicznych. Ich cechą charakterystyczną jest to, że umożliwiają rozdzielanie związków na podobnych zasadach jak na granicy faz w organizmach żywych, np. mózg – krew czy otoczenie oraz wewnątrz komórki. Fazy nowej generacji stosowane są głównie do analizy związków aktywnych biologicznie. Od zwykłych faz stacjonarnych różnią się tym, że różne związki chemiczne powiązane są z powierzchnią żelu krzemionkowego za pośrednictwem grupy aminopropylowej, specyficznej dla rozdzielanych analitów.

#### 4.3.2.3. Fazy ruchome

Fazy ruchome w chromatografii cieczowej stanowią pojedyncze rozpuszczalniki lub ich dwu- lub więcej składnikowe mieszaniny. Faza ruchoma, którą wprowadza się do kolumny, nosi nazwę **eluentu**. W kolumnie w skład fazy ruchomej oprócz eluentu mogą wchodzić także składniki rozdzielanej mieszaniny. Po rozdzieleniu składniki te są obecne w wycieku z kolumny, który nosi nazwę **eluatu**. Faza ruchoma w chromatografii cieczowej jest czynnikiem aktywnym, a rodzaj i ilość rozpuszczalników ją stanowiących ma istotny wpływ na proces rozdzielania. Przy wyborze fazy ruchomej należy uwzględnić rodzaj i skład rozdzielanej mieszaniny, rodzaj zastosowanego wypełnienia kolumny oraz rodzaj detektora.

Przy doborze eluentu należy wziąć pod uwagę jego **siłę elucyjną**, którą można charakteryzować wielkością siły oddziaływania jego cząsteczek z powierzchnią adsorbentu. W chromatografii na adsorbentach polarnych siłę elucji wyznacza polarność i polaryzowalność cząsteczek eluentu. Siła ta jest tym większa, im większa jest polarność rozpuszczalnika. W przypadku adsorbentów niepolarnych polarność i polaryzowalność nie mają większego wpływu na siłę elucji rozpuszczalnika. Zależy ona natomiast od niespecyficznych sił van der Waalsa (oddziaływań dyspersyjnych). W tym przypadku siła elucji wzrasta ze wzrostem rozmiarów niepolarnych fragmentów cząsteczek rozpuszczalników. W celu ułatwienia wyboru właściwego rozpuszczalnika jako eluentu rozpuszczalniki ułożono w szeregi eluotropowe. W przypadku polarnych faz stacjonarnych (np. żelu krzemionkowego lub tlenku glinu) rozpuszczalniki ułożone wg rosnącej mocy eluowania (miarą której są **indeksy polarności**) mają kolejność następującą: n-pentan < n-heksan < cykloheksan < tetrachlorek węgla < toluen < benzen < eter dietylowy < chloroform < dichlorometan < tetrahydrofuran < dichloroetan < aceton < octan etylu < acetonitryl < pirydyna < etanol < metanol < woda < kwas octowy. Moc elucji przy chromatografowaniu na niepolarnej fazie stacjonarnej (np. węglowej **fazie odwróconej**) jest odwrotna.

Oprócz polarności ważną cechą eluentów jest ich lepkość. Wpływa ona na wysokość ciśnienia potrzebnego do wywołania odpowiedniego przepływu rozpuszczalnika przez kolumnę (należy stosować eluenty o małej lepkości). Z innych właściwości fizykochemicznych eluentów mających wpływ na ich przydatność w chromatografii cieczowej wymienić należy współczynnik załamania światła (w przypadku zastosowania detektora refraktometrycznego) oraz granicę długości fali

promieniowania elektromagnetycznego, przy której rozpuszczalnik staje się nieprzezroczysty dla nadfioletu (w przypadku stosowania absorpcyjnego detektora UV). W Tabeli 27 zebrano podstawowe właściwości niektórych rozpuszczalników stosowanych jako eluenty w chromatografii adsorpcyjnej.

**Tabela 27.** Właściwości niektórych rozpuszczalników stosowanych w cieczowej chromatografii adsorpcyjnej (wg. Witkiewicz Z., *Podstawy chromatografii*, 2005, str. 205)

Rozpuszczalnik	Gęstość g/cm <sup>3</sup>	Lepkość w temp. 20°C	Siła elucji ε	Współczynnik załamania światła	Graniczna długość pochłanianej fali UV, nm
n-Pentan	0,629	0,23	0,00	1,358	205
n-Heksan	0,659	0,33	0,01	1,375	195
Cykloheksan	0,779	1,00	0,04	1,427	205
Cyklopentan	0,740	0,47	0,05	1,406	210
1-Penten	0,640	0,24	0,08	1,371	215
Disiarczek węgla	1,260	0,37	0,15	1,626	380
Tetrachlorek węgla	1,590	0,97	0,18	1,466	265
m-Ksylene	0,864	0,62	0,26	1,500	290
Eter n-dipropylowy	0,747	0,37	0,28	1,368	220
2-Chloropropan	0,862	0,33	0,29	1,378	225
Toluen	0,867	0,59	0,29	1,496	285
1-Chlorobutan	0,873	0,35	0,30	1,397	225
Chlorobenzen	1,106	0,80	0,30	1,525	
Eter diizopropylowy		0,33		1,368	
Eter dietylowy	0,713	0,23	0,38	1,353	220
Chloroform	1,500	0,57	0,40	1,443	245
Chlorek metylenu		0,44	0,42	1,424	235
Tetrahydrofuran	0,880	0,85	0,45	1,408	215
1,2-Dichloroetan	1,250	0,79	0,49	1,445	225
Keton etylowo- metylowy	0,805	0,40	0,51	1,381	330
1-Nitropropan	1,001	0,84	0,53	1,400	380
Aceton	0,818	0,32	0,56	1,359	330

Dioksan	1,033	1,54	0,56	1,422	220
Octan etylu	0,901	0,45	0,58	1,370	260
Octan metylu	0,927	0,37	0,60	1,362	260
Pentanol	0,815	4,10	0,61	1,410	210
Anilina	1,022	4,40	0,62	1,586	
Dietyloamina	0,702	0,38	0,63	1,387	275
Acetonitryl	0,782	0,37	0,65	1,344	190
Pirydyna	0,983	0,94	0,71	1,510	305
2-Metoksyetanol	0,965	1,72	0,74	1,401	220
2-Propanol	0,786	2,30	0,82	1,380	205
Etanol	0,789	1,20	0,88	1,361	205
Metanol	0,796	0,60	0,95	1,329	200
Kwas octowy	1,049	1,26	duża	1,372	
Woda	1,000	1,00	duża	1,330	

W **chromatografii sitowej** eluent powinien być obojętny zarówno w stosunku do substancji rozdzielanej, jak i do wypełnienia kolumny, a jego jedynym zadaniem jest przenoszenie składników mieszaniny wzdłuż kolumny. Gdy wypełnienie stanowią organiczne stacjonarne fazy hydrofobowe, wówczas fazami ruchomymi są rozpuszczalniki średnio polarne: dichlorometan, chloroform, toluen lub tetrahydrofuran. Natomiast, gdy wypełnienie kolumny stanowi polarny związek nieorganiczny, eluentem musi być woda, ewentualnie alkohole. Wodne fazy ruchome stosuje się także w przypadku faz stacjonarnych takich jak Sepharose i Sephadex.

Inne zadanie spełnia eluent w **chromatografii jonowej**. Fazy ruchome zawierają jony przeciwnego znaku (przeciwjony) względem ładunków elektrycznych na powierzchni wymienniczy jonowych. Substancje jonowe silnie dysocjujące, rozdzielane słabym eluentem, silnie oddziałują z wymienniczem i mają długie czasy retencji. Substancje chromatografowane słabo dysocjujące nie mogą wypierać jonów osadzonych na wymienniczu jonowym z eluentu o silnym charakterze jonowym i mają bardzo krótkie czasy retencji. Siła jonowa jest najważniejszym czynnikiem charakteryzującym eluent w chromatografii jonowymiennej. Na właściwości eluentu wpływa też pH i obecność modyfikatora organicznego.

Do rozdzielania składników niektórych mieszanin (zwłaszcza związków biologicznie czynnych) stosuje się **chromatografię z tworzeniem par jonowych**. W tym rodzaju chromatografii do eluentu dodaje się substancję tworzącą jony hydrofobowe (np.  $C_7H_{15}SO_3^-$ ) zwane przeciwjonami. Jony te oddziałując z jonami próbki tworzą neutralne pary jonowe, które podlegają zwykłemu rozdzielaniu chromatograficznemu w odwróconym układzie faz (RP). Wybór przeciwjonów zależy od rodzaju analizowanej próbki. Próbki zasadowe są zwykle analizowane przy zastosowaniu przeciwjonów soli sodowych alkilosulfonianów przy pH około 3. Próbki kwasowe są analizowane przy użyciu np. fosforanu tetrabutylamoniowego przy pH około 7-8. Dobre wyniki uzyskuje się stosując bromek cetylotrimetyloamoniowy do tworzenia par jonowych z pochodnymi kwasów karboksylowych.

W przypadku stosowania **normalnego układu faz**, tzn. polarnych faz stacjonarnych, jako fazy ruchome używane są rozpuszczalniki mające mniejszą od nich polarność. Eluentami w tym układzie są np.: heksan, izooktan, chloroform i dichlorometan. Jeżeli faza stacjonarna jest słabo polarna lub niepolarna, to faza ruchoma musi być bardziej polarna. Fazą ruchomą może być: tetrahydrofuran, acetonitryl, metanol, woda. Dobierając skład eluentów, należy pamiętać, że wzrost zawartości wody wydłuża czasy retencji chromatografowanych substancji niepolarnych, a wzrost ilości rozpuszczalnika organicznego - skraca ich czasy retencji.

### **Elucja izokratyczna i elucja gradientowa**

W różnych metodach chromatografii cieczowej czas retencji składników próbki można regulować przez odpowiedni dobór mocy elucyjnej eluentu. Może to być dobór składu mieszaniny rozpuszczalników (chromatografia adsorpcyjna, chromatografia podziałowa z fazami związanymi w układzie NP i RP) lub pH roztworu i siły jonowej roztworu w przypadku chromatografii jonowymiennej.

Wyróżnić można dwa przypadki:

- skład eluentu jest jednakowy przez cały czas analizy – jest to tzw. **elucja izokratyczna**,
- skład eluentu zmienia się podczas analizy – jest to tzw. **elucja gradientowa**.

Elucja gradientowa ma szerokie zastosowanie w przypadku rozdzielania mieszanin złożonych, zawierających składniki różniące się znacznie polarnością. W elucji gradientowej proces rozdzielania rozpoczyna się eluentem o małej mocy elucyjnej,



a następnie dodając rozpuszczalnika o dużej mocy elucyjnej, zwiększa się moc elucyjną mieszaniny w czasie. W przypadku chromatografii jonowymiennej moc elucyjną reguluje się przez zmianę pH i siły jonowej eluentu.

#### 4.3.2.4. Połączenie chromatografii ciekowej ze spektrometrią mas (LC-MS)

W analizie żywności stosowana jest chromatografia ciekowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS). W technice LC-MS anality są najpierw rozdzielane w kolumnie chromatograficznej, a następnie eluowane za pomocą odpowiednio dobranych rozpuszczalników. W wielu przypadkach, preferowane jest zastosowanie rozdzielania chromatograficznego w odwróconym układzie faz, stosując kolumny chromatograficzne z niepolarną fazą stacjonarną oraz polarne rozpuszczalniki i ich mieszaniny. Do tego celu najczęściej stosowane są mieszaniny metanol/woda, acetonitryl/woda przy odpowiednio dobranym pH z dodatkiem octanu amonu, mrówczanu amonu lub/i kwasu mrówkowego czy octowego, których dodatek powoduje zwiększenie czułości oznaczenia i poprawę jonizacji próbki. Identyfikacja rozdzielanych w kolumnie chromatograficznej substancji jedynie na podstawie parametrów retencji jest na ogół metodą niewystarczającą, ponieważ w próbkach rzeczywistych istnieje wiele różnych substancji o charakterze interferentów, które mogą mieć bardzo zbliżony lub nawet identyczny czas retencji jak badane związki. Z tego względu, w celu dokonania poprawnej analizy jakościowej, produkty rozdzielania chromatograficznego są wraz z fazą ruchomą kierowane do spektrometru mas, gdzie następuje ich jonizacja i fragmentacja, natomiast identyfikacja poszczególnych związków potwierdzana jest na podstawie analizy ich widm mas. Możliwe jest zastosowanie chromatografii ciekowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją na drodze elektrorozpraszania ESI (ang. *Electrospray Ionization*) lub z chemiczną jonizacją pod ciśnieniem atmosferycznym APCI (ang. *Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*). Jonizacja metodą elektrorozpraszania zaliczana jest do tak zwanych „miękkich” technik jonizacji próbki, prowadzących do otrzymania wyraźnego jonu molekularnego i w chwili obecnej jest najczęściej stosowaną techniką jonizacji związków polarnych. Natomiast dla średnio polarnych i mniej polarnych bardziej odpowiednia jest druga technika.

**Elektrozpraszanie (ESI).** W metodzie jonizacji poprzez elektrorozpraszanie między ogrzewaną kapilarę a cylindryczną ściankę komory jonizacyjnej przykładana jest odpowiedniej wielkości potencjał, rzędu 3-6 kV. Następuje odparowywanie kropelek

rozpuszczalnika, co powoduje wzrost gradientu potencjału przy powierzchni kropli i prowadzi w efekcie do desorpcji jonów z kropli. Jonizacja metodą elektrorozpraszania prowadzi najczęściej do otrzymania wyraźnego jonu pseudomolekularnego ( np.  $[M+1^+]$ ).

**Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI).** W przypadku jonizacji chemicznej pod ciśnieniem atmosferycznym, eluat z kolumny najpierw zostaje poddany nebulizacji. Powstały aerozol przemieszcza się w kierunku igły wyładowawczej (2-3,5 kV), gdzie jonizacji ulegają cząsteczki rozpuszczalnika. Kolejnym etapem jest jonizacja – w wyniku kolizji następuje przeniesienie protonu z utworzeniem jonów  $[M+H]^+$  lub  $[M-H]^-$ . W wyniku jonizacji powstaje jon pseudomolekularny (w zależności od trybu pracy:  $[M-H]^-$  dla ujemnej jonizacji lub  $[M+H]^+$  w przypadku dodatniej jonizacji), który następnie ulega rozpadowi, dając inne jony fragmentacyjne. Oprócz jonów pseudomolekularnych powstających w wyniku protonowania cząsteczki, powstają także jony będące produktami przyłączenia, np. jonu amonowego lub jonów metali alkalicznych  $[M+NH_4]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$ . W warunkach tworzenia jonów ujemnych może tworzyć się jon  $[M+COOH]^-$ . Powstałe w ten sposób jony są następnie rozdzielane w zależności od stosunku  $m/z$  w analizatorze, skąd przemieszczają się do detektora, który przekształca prąd jonowy w mierzalny sygnał.

**Analizatory.** Najczęściej stosowanymi analizatorami mas jest pojedynczy lub potrójny kwadrupol (ang. *quadrupol*, Q lub *triple quadrupol*, QqQ), pułapka jonowa (ang. *Ion Trap Detector*, ITD) lub rzadziej analizator czasu przelotu (ang. *Time of Flight*, TOF). Stosowane są różnego rodzaju detektory, takie, które dokonują bezpośredniego pomiaru ładunków docierających do detektora jak i zwiększające intensywność wykrywanego sygnału. Uzyskiwane ze spektrometru mas dane są przekształcane w zależności od potrzeb przez komputer w wykres zależności intensywności pików od wartości stosunku  $m/z$ .

#### 4.3.3. Spektrofotometria UV-VIS

W metodach spektroskopowych sygnał analityczny powstaje w wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego lub korpuskularnego na badaną próbkę. Promieniowanie elektromagnetyczne składa się z fotonów, czyli kwantów promieniowania (kwantów energii), których charakterystyczną właściwością jest energia wyrażona wzorem:

$$E = h \cdot \nu$$

gdzie:  $E$  - energia fotonu wyrażona w jednostkach energii (zgodnie z układem SI w dżulach, poprzednio w ergach lub w kaloriach:  $1 \text{ J} = 10^7 \text{ erg} = 0,2389 \text{ cal}$ );  $h$  - stała uniwersalna Plancka -  $6,626 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$  ( $6,626 \times 10^{-27} \text{ erg}\cdot\text{s}$ ,  $1,583 \times 10^{-34} \text{ cal}\cdot\text{s}$ );  $\nu$  - częstotliwość drgań promieniowania emitowanego lub absorbowanego, wyrażona w hercach (Hz).

Promieniowanie elektromagnetyczne określa się także przy pomocy długości fali:

$$\lambda = \frac{c}{\nu}$$

gdzie:  $c$  - prędkość światła w próżni ( $3 \times 10^8 \text{ m/s}$ ).

Spektroskopia molekularna (cząsteczkowa) obejmuje badanie widm cząsteczkowych. W ogólnym pojęciu widma cząsteczkowego są zawarte trzy rodzaje widm promieniowania elektromagnetycznego: widmo rotacyjne, widmo oscylacyjno-rotacyjne oraz elektronowo-oscyłacyjno-rotacyjne danej cząsteczki. Całkowitą energię cząsteczki  $E$  można zatem przedstawić jako sumę trzech składników odpowiadających trzem rodzajom ruchu w cząsteczce:

$$E = E_e + E_{os} + E_{rot}$$

gdzie:  $E_e$  - energia elektronowa (związana z ruchem elektronów),  $E_{os}$  - energia oscylacyjna (związana z ruchem oscylacyjnym),  $E_{rot}$  - energia rotacyjna (związana z ruchem rotacyjnym).

Energia elektronowa w cząsteczce (wartość podobna jak w atomie) jest wielokrotnie większa od energii oscylacyjnej, a ta z kolei jest większa od energii rotacyjnej. Różnice pomiędzy poziomami elektronowymi wynoszą kilka elektronowoltów, pomiędzy poziomami oscylacyjnymi dziesiąte i setne części eV, a pomiędzy poziomami rotacyjnymi tysięczne części eV. Stosunek wartości poszczególnych rodzajów energii jest w przybliżeniu następujący:

$$E_e : E_{os} : E_{rot} = 1000 : 10 : 1$$

Znaczne różnice wartości poszczególnych rodzajów energii powodują, że odpowiednie widma pojawiają się w różnych zakresach spektralnych. Pochłonięcie kwantów promieniowania z zakresu dalekiej podczerwieni jako najmniej energetycznego może powodować tylko zmiany energii rotacji; powstaje wtedy widmo rotacyjne. Zaabsorbowana energia nie wystarcza do zmiany energii oscylacji i energii

elektronowej. Promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni, o większej energii, powoduje przejścia pomiędzy poziomami oscylacyjnymi. Ponieważ zmianom energii oscylacyjnej towarzyszą zmiany energii rotacyjnej, powstają widma oscylacyjno-rotacyjne. Zmiany energii elektronowej może wywołać tylko zaabsorbowanie promieniowania z zakresu widzialnego i nadfioletu. Ponieważ zmianom tej energii towarzyszą zazwyczaj zmiany energii oscylacyjnej i rotacyjnej, powstaje widmo elektronowo-oscyłacyjno-rotacyjne.

Energie rotacji, oscylacji i elektronowa mogą przyjmować tylko wartości określone warunkami kwantowymi. Podstawowe warunki kwantowe są następujące:

- aby nastąpiła absorpcja promieniowania muszą istnieć takie dwa stany kwantowe cząsteczki  $\Psi_m$  i  $\Psi_n$ , których różnica energii odpowiada energii promieniowania padającego  $h\nu$ :

$$E_n - E_m = h\nu_{n,m} = \Delta E$$

- Dla 1 mola substancji  $\Delta E$  przyjmie wartość:

$$\Delta E = h\nu N_A = \frac{hcN_A}{\lambda} = \frac{1,2 \cdot 10^8}{\lambda} J/mol$$

gdzie:  $N_A$  - stała Avogadra,  $h$  - stała Plancka,  $\lambda$  - długość fali w nm,  $\nu$  - częstotliwość promieniowania.

- absorpcja promieniowania musi być związana ze zmianą momentu dipolowego cząsteczki  $\mu$ . W sposób ilościowy warunek ten opisuje tzw. moment przejścia między stanami elektronowymi, określający prawdopodobieństwo absorpcji dopasowanego, zgodnie z poprzednim warunkiem, fotonu:

$$R_{n,m} = \int \Psi_n \mu \cdot \Psi_m d\tau$$

gdzie:  $R_{n,m}$  - moment przejścia,  $\Psi_n, \Psi_m$  - elektronowe funkcje stanów, między którymi zachodzi przejście elektronów,  $\mu$  - moment dipolowy cząsteczki,  $d\tau$  - element objętości.

Przejście elektronowe dozwolone jest wtedy, gdy  $R_{n,m} \neq 0$ . Przejścia spełniające reguły wyboru noszą nazwę przejść dozwolonych, a niespełniające reguły wyboru - przejść wzbronionych. Miarą intensywności pasma absorpcji jest wartość molowego współczynnika absorpcji  $\epsilon_{max}$ , przy długości fali w maksimum absorpcji  $\lambda_{max}$ . Wartość  $\epsilon_{max}$  jest miarą prawdopodobieństwa przejścia i dla przejść wzbronionych  $\epsilon$  przyjmuje

małe wartości (rzędu kilku l/mol·cm) a dla przejść dozwolonych wartości duże (do  $1,5 \cdot 10^5 \text{ dm}^3/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ).

#### 4.3.3.1. Prawa absorpcji

Promieniowanie elektromagnetyczne, przechodząc przez roztwór, może ulegać: absorpcji, odbiciu i rozproszeniu. Natężenie wiązki padającej wyraża się wzorem:

$$I_o = I_a + I_t + I_r$$

gdzie:  $I_a$  - natężenie promieniowania zaabsorbowanego przez roztwór,  $I_t$  - natężenie promieniowania przechodzącego przez roztwór,  $I_r$  - natężenie promieniowania odbitego i rozproszonego.

Ponieważ pomiary absorpcji promieniowania wykonuje się najczęściej w stosunku do roztworu porównawczego (odnośnika), którego skład powinien być zbliżony do składu próbki i który znajduje się w identycznych kuwetach, promieniowanie odbite i rozproszone ( $I_r$ ) w obu przypadkach jest jednakowe i może być pominięte. Roztwór odnośnika w warunkach pomiaru nie absorbuje promieniowania, gdyż nie zawiera substancji oznaczanej i można przyjąć, że natężenie wiązki promieniowania przechodzącej przez roztwór odnośnika jest równe natężeniu wiązki padającej na roztwór badanej próbki. Stosunek natężenia promieniowania przechodzącego przez próbkę ( $I_t$ ) do natężenia promieniowania padającego na próbkę ( $I_a$ ) (równego natężeniu promieniowania przechodzącego przez odnośnik), nazywamy transmitancją lub przepuszczalnością i oznaczamy:

$$T = \frac{I_t}{I_o}$$

Transmitancję najczęściej wyrażamy w procentach:

$$T = \frac{I_t}{I_o} \cdot 100\%$$

Może ona przybierać wartości od 0% do 100%.

Natężenie promieniowania zaabsorbowanego zależy od stężenia roztworu i od grubości warstwy absorbującej. Matematycznie zależność tę opisuje prawo Lamberta-Beera, które w postaci logarytmicznej przyjmuje postać:

$$A = \lg \frac{I_o}{I_t} = kcl$$

Logarytm dziesiętny stosunku natężenia wiązki promieniowania padającego na badaną próbkę ( $I_0$ ) do natężenia wiązki promieniowania przechodzącego przez badaną próbkę ( $I_t$ ) nazywany jest absorbancją. Przyjmuje ona wartości z przedziału od 0 do nieskończoności. Gdy stężenie roztworu ( $c$ ) jest wyrażone w  $\text{mol/dm}^3$ , a grubość warstwy ( $l$ ) jest wyrażona w cm, współczynnik proporcjonalności  $k$  nosi nazwę molowego współczynnika absorpcji ( $\epsilon$ ).

$$A = \epsilon l c$$

Jest to podstawowe prawo spektrofotometrii.

Zależność między absorbancją a transmitancją wyraża zależność:

$$A = \lg \frac{1}{T}$$

lub gdy transmitancja jest wyrażona w procentach

$$A = \lg \frac{100}{T}$$

Zależność odwrotną tj. transmitancji od absorbancji wyraża wzór:

$$T = \frac{1}{10^A} \quad \text{a w procentach} \quad T = \frac{100}{10^A}$$

Czułość metody spektrofotometrycznej określa współczynnik proporcjonalności z prawa Lamberta-Beera:

- molowy współczynnik absorpcji właściwej ( $\epsilon$ ) dla stężenia wyrażonego w  $\text{mol/dm}^3$ , którego jednostką jest  $\text{dm}^3/(\text{mol}\cdot\text{cm})$ ;
- masowy współczynnik absorpcji ( $a$ ) dla stężenia ( $\rho$ ) wyrażonego w  $\text{g/dm}^3$ , którego jednostką jest  $\text{dm}^3/(\text{g}\cdot\text{cm})$ . Liczbowo współczynnik absorpcji właściwej jest równy absorbancji roztworu substancji oznaczanej o stężeniu  $1 \text{ g/dm}^3$ , w kuwecie o grubości 1 cm.

$$a = \frac{\epsilon}{M}$$

Absorbancję właściwą wyraża się w  $\text{cm}^3/(\mu\text{g}\cdot\text{cm})$ ; jest ona wtedy liczbowo równa absorbancji roztworu oznaczanej substancji o stężeniu  $1 \mu\text{g/cm}^3$  (dawniej ppm) w kuwecie o grubości warstwy 1 cm.

Jeżeli w badanym roztworze znajduje się kilka składników, oznaczanie spektrofotometryczne można wykonać poprawnie tylko wtedy, gdy spełnione jest prawo

addytywności absorpcji, wg którego absorpcja mieszaniny jest równa sumie absorpcji poszczególnych składników, a absorpcja pojedynczego składnika jest taka, jakby tylko on jeden znajdował się w badanej próbce. Matematycznie prawo to określają następujące wzory:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \sum_{i=1}^n A_i$$

$$A = \varepsilon_1 c_1 l + \varepsilon_2 c_2 l + \dots + \varepsilon_n c_n l = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i c_i l$$

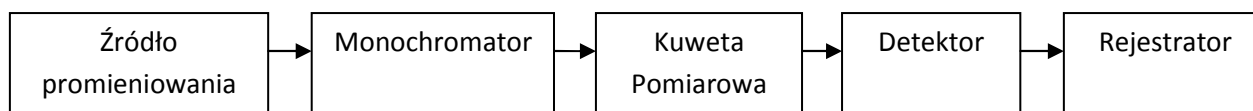
a dla stężenia masowego;

$$A = a_1 \rho_1 l + a_2 \rho_2 l + \dots + a_n c \rho_n l = \sum_{i=1}^n a_i \rho_i l$$

gdzie:  $A$  - absorpcja mieszaniny,  $A_1, A_2, A_n$  - absorpcje poszczególnych składników,  $c_1, c_2, c_n$  - stężenia molowe poszczególnych składników,  $\varepsilon_1, \varepsilon_2, \varepsilon_n$  - molowe współczynniki absorpcji poszczególnych składników,  $a_1, a_2, a_n$  - współczynniki absorpcji właściwej poszczególnych składników,  $\rho_1, \rho_2, \rho_n$  - stężenia masowe poszczególnych składników.

#### 4.3.3.2. Budowa aparatury

Do pomiarów absorpcji służą spektrofotometry. Rys. 73 przedstawia blokowy schemat spektrofotometru.



**Rys. 73.** Blokowy schemat spektrofotometru UV-Vis

Źródło  $Z$  wysyła ciągłe promieniowanie elektromagnetyczne. Wyodrębniona przez monochromator  $M$  monochromatyczna wiązka promieniowania przechodzi na przemian przez kuwetę  $K$  z badaną substancją i przez identyczną kuwetę porównawczą  $K_0$  (z odnośnikiem). Kuweta  $K_0$  w przypadku pomiarów absorpcji roztworów jest wypełniona tą samą cieczą, w której rozpuszczono substancję badaną. W niektórych przyrządach (tzw. spektrofotometry dwuwiązkowe) promieniowanie wychodzące z monochromatora jest dzielone na dwie wiązki o jednakowym natężeniu, z których jedna przechodzi przez  $K$  a druga, jednocześnie, przez  $K_0$ . W obu przypadkach, w układzie detektora  $D$ , następuje pomiar natężenia wiązki, która przeszła przez kuwetę  $K$  ( $I_p$ ) i przechodzącej przez kuwetę  $K_0$  ( $I_0$ ). Rejestrator  $R$  kreśli widmo absorpcyjne badanej substancji w postaci krzywej  $A = f(\lambda)$ .

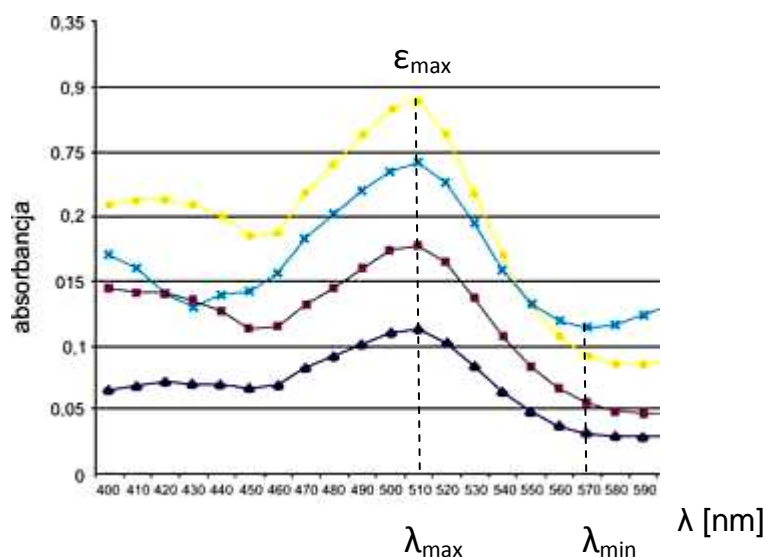
Prostoliniowy przebieg tej zależności w badanym zakresie świadczy o spełnieniu przez układ prawa Lamberta-Beera. Współczynnik kierunkowy otrzymanej prostej (tangens kąta nachylenia) jest to współczynnik absorpcji oznaczanej substancji (przy jednostkowej grubości warstwy pochłaniającej).

#### 4.3.3.3. Wybór długości fali i stężeń roztworów wzorcowych

W spektrofotometrii ilościowej należy dokonać wyboru:

- analitycznej długości fali przy której będą wykonane pomiary,
- odpowiednich stężeń substancji oznaczanej,
- metody pomiaru.

Analityczną długość fali  $\lambda$  wybiera się na podstawie krzywej absorpcji (Rys. 74).



**Rys. 74.** Porównanie dokładności pomiaru absorpcji roztworu dla różnych długości fali, krzywe absorpcji

Pomiary wykonywane przy  $\lambda_{max}$  odznaczają się największą dokładnością i czułością. Bardzo małe stężenia substancji barwnej w roztworze są oznaczane z dużym błędem, gdyż przepuszczalność roztworu badanego jest podobna do przepuszczalności roztworu odniesienia i najczęściej bliska 100%. W przypadku intensywnie zabarwionych roztworów tylko mała część promieniowania przechodzi przez roztwór, co także powoduje zwiększenie wyników pomiaru. Przygotowując robocze roztwory wzorcowe przez rozcieńczenie wzorcowego roztworu podstawowego, najkorzystniej jest tak dobrać stężenia, aby otrzymać optymalny dla danego spektrofotometru zakres wartości



mierzonej absorpcji. Najczęściej używany zakres wartości pomiarowych dla aparatów punktowych wynosi 0,2 - 0,8 wartości absorpcji.

#### 4.4. Metody analizy ilościowej

##### Metoda wzorca wewnętrznego

Spośród różnych metod oceny ilościowej, w analizie chromatograficznej, największe znaczenie ma *metoda wzorca wewnętrznego*. W metodzie tej do badanej próbki dodaje się określoną ilość wzorca (substancji standardowej), dobrze oddzielającego się w danych warunkach analizy od wszystkich badanych składników. Wzorzec powinien mieć właściwości maksymalnie zbliżone do właściwości substancji badanej, nie może znajdować się w analizowanej próbce, poza tym powinien być nietlotny, trwały i dostępny w postaci czystej. Ilość dodanego wzorca powinna być porównywalna z ilością badanej substancji. Sygnał większości detektorów zależy od rodzaju analizowanych związków i dlatego stosunek powierzchni sygnałów dwu składników nie jest równy stosunkowi ich zawartości w mieszaninie. Odpowiedź detektora płomieniowo-jonizacyjnego (FID) jest wprost proporcjonalna do liczby atomów węgla niezwiązanych z tlenem a nie do masy związku. Trudności tej można uniknąć stosując metodę standardu wewnętrznego i wyznaczając tzw. współczynniki detekcji (odpowiedzi). W tym celu należy wyznaczyć zależność między stosunkiem stężeń badanej substancji i wzorca a stosunkiem odpowiedzi detektora dla badanej substancji i wzorca zgodnie ze wzorem:

$$\frac{m_s}{m_w} = f \frac{h_s}{h_w}$$

gdzie:  $m_s$ ,  $m_w$  - masa oznaczanej substancji i wzorca,  $h_s$ ,  $h_w$  - wysokości pików (lub powierzchnie) odpowiadające sygnałom badanej substancji i wzorca,  $f$  - współczynnik detekcji (odpowiedzi).

##### Metoda dodawania wzorca

Procedura oznaczeń w metodzie dodawania wzorca jest następująca:

a) przygotowujemy próbkę analizowaną i przeprowadzamy dla niej pomiar, mierząc wartość  $Y_0$  (w naszym przypadku wielkość absorpcji promieniowania UV, która jest proporcjonalna do wysokości lub powierzchni sygnału chromatograficznego),

b) do tej samej próbki dodajemy znaną ilość substancji oznaczanej (wzorca), roztwór mieszamy i mierzymy wartość  $Y_i$ . Wartość parametru mierzonego wzrasta, a wzrost jest proporcjonalny do ilości dodanego wzorca.

Stężenie analitu można wyliczyć na podstawie równań:

$$Y_0 = a \cdot c$$

$$Y_i = a(c+c_s)$$

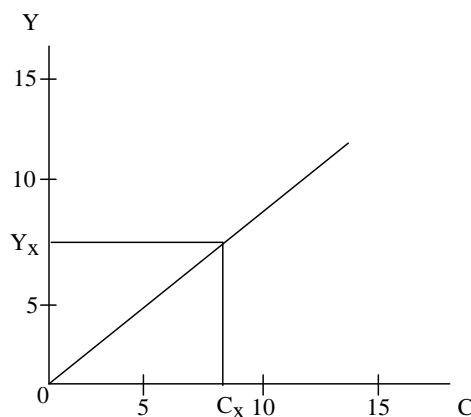
gdzie:  $Y_0$  oznacza pole powierzchni lub wysokość sygnału chromatograficznego analitu zmierzony dla próbki bez dodatku wzorca,  $a$  – współczynnik proporcjonalności,  $Y_i$  – pole powierzchni lub wysokość sygnału chromatograficznego analitu zmierzony dla próbki po dodaniu wzorca,  $c$  – stężenie analitu w próbce,  $c_s$  – stężenie wzorca w próbce.

Po dokonaniu odpowiednich przekształceń otrzymamy :

$$Y_i = Y_0 / c \cdot (c + c_s)$$

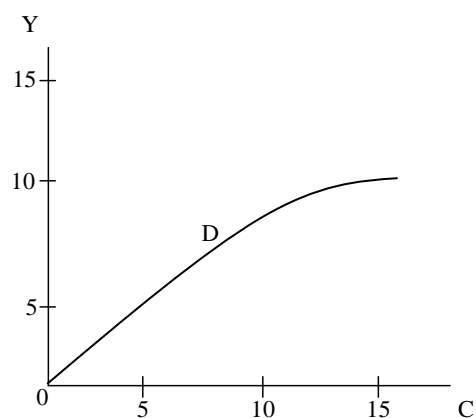
### Metoda krzywej kalibracyjnej

W metodzie krzywej kalibracyjnej przygotowuje się szereg roztworów o znanych stężeniach substancji analizowanych oraz tzw. ślełą próbę – roztwór, w którym są wszystkie składniki roztworów wzorcowych **z wyjątkiem analitu** i dla każdego roztworu mierzy się wartość  $Y$ . Zależność  $Y$  od  $c$  wzorców wykreśla się (Rys. 75) lub wylicza równanie prostej. Wartość  $Y$  mierzy się również dla próbki badanej, nanosi na krzywą kalibracyjną i odczytuje stężenie lub oblicza z równania prostej.



Rys. 75. Krzywa kalibracyjna  $Y = a c$

Przed przystąpieniem do oznaczeń metodą krzywej kalibracyjnej należy zbadać zakres prostoliniowej zależności wartości mierzonej od stężenia analitu (Rys. 76).



**Rys. 76.** Krzywa kalibracyjna o ograniczonym zakresie stosowania

Na przedstawionej na Rys. 76 krzywej kalibracyjnej do celów analitycznych nadaje się zakres stężeń od 0 do 5 (odcinek krzywej 0D). Krzywą kalibracyjną należy wykonywać w dniu pomiarów, zmiana warunków pomiarów (np. temperatury) czy użycie innej partii odczynników może powodować przesunięcie krzywej kalibracyjnej na osi Y lub zmianę nachylenia prostej  $Y = f(c)$ .

#### 4.5. Analiza sensoryczna

**Analiza sensoryczna** zajmuje się oznaczaniem jakości sensorycznej żywności za pomocą jednego lub kilku zmysłów stosowanych jako aparat pomiarowy, przy zachowaniu odpowiednich wymagań względem osób ją przeprowadzających, zapewnieniu prawidłowych warunków oceny oraz przy użyciu właściwych - do stawianego zadania - metod. Zadaniem analizy sensorycznej jest dostarczenie informacji nie o chemicznych lub fizycznych właściwościach analizowanego produktu, lecz o reakcjach (wrażeniach) wywoływanych przez ten produkt, który działa na nasze zmysły (wzrok, węch, smak, dotyk i częściowo także słuch) jako bodziec. W ramach analizy sensorycznej opracowano szereg metod, które dostarczają istotnych informacji o cechach żywności postrzeganych zmysłami. Mają one szerokie zastosowanie nie tylko w pracach badawczych nad wpływem różnych czynników (surowcowych, technologicznych i przechowalniczych) na jakość gotowych produktów spożywczych, ale też w praktyce przemysłowej (kontrola jakości, porównanie jakości produktów

konkurencyjnych, opracowanie nowych technologii, zapewnianie odpowiedniej jakości sensorycznej, badania marketingowe).

#### 4.5.1. Analiza sensoryczna i badania konsumenckie (hedoniczne)

W percepcji sensorycznej reakcja na bodziec (m.in. żywność) może mieć charakter:

- wrażenia jakościowego, następuje wówczas rozpoznawanie i identyfikowanie bodźca, jest ono wyrażane słownie (np. identyfikowanie smaków czy zapachów),
- wrażenia ilościowego, następuje określenie intensywności bodźca (np. niska lub wysoka słodycz),
- reakcji hedonicznej, która wyraża stopień odczuwanej (przy ocenie) przyjemności.

W ocenie jakości sensorycznej produktów wyróżnia się dwa rodzaje ocen:

- oceny analityczne odnoszące się do wrażeń jakościowych i ilościowych,
- oceny konsumenckie (hedoniczne) związane z reakcją hedoniczną.

Obie te oceny mają odmienne cele i zadania, wymagają zapewnienia innych warunków ocen oraz różnych kwalifikacji osób biorących udział w ocenach (Tabela 28).

**Tabela 28.** Badanie jakości sensorycznej produktów (wg Kostyra E. Wprowadzenie do analizy sensorycznej. W: Klepacka M.(red.) *Analiza żywności* Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 2005, str. 8)

	<b>Sensoryczne badania analityczne</b>	<b>Badania konsumenckie (ocena hedoniczna)</b>
<b>Cel badań</b>	Opracowanie nowych produktów, Zapewnienie jakości sensorycznej produktów, Porównanie jakości produktów konkurencyjnych.	Określenie reakcji konsumentów na produkty.
<b>Zadania stawiane oceniającym</b>	Wykrywanie różnic, Porównywanie ze standardem, Analiza opisowa.	Akceptacja lub odrzucenie, Określenie preferencji w warunkach wyboru, Określenie stopnia „lubienia” produktu.
<b>Wymagania odnośnie zespołu</b>	Przeszkolony zespół osób odpowiednio przygotowany do stosowanej metodyki (6-12 oceniających ekspertów).	Grupa nieprzeszkolonych konsumentów o odpowiedniej liczebności (100 osób lub więcej).

<b>Wymagania odnośnie warunków</b>	Laboratorium analiz sensorycznych (indywidualne stanowiska ocen).	Laboratorium analiz sensorycznych, Miejsca publiczne (domy handlowe, kawiarnie), Warunki domowe.
--	--	---

#### 4.5.2. Laboratoryjna analiza sensoryczna

Sensoryczne metody analityczne stosowane są przede wszystkim do porównania jakości produktów konkurencyjnych, opracowania nowych produktów oraz zapewniania odpowiedniej jakości sensorycznej żywności.

Najczęściej stosowanymi metodami laboratoryjnej analizy sensorycznej są:

- metody różnicowe,
- metoda kolejności (szeregowania),
- metody skalowania,
- metoda ilościowej analizy opisowej (ang. *Quantitative Descriptive Analysis* – QDA),
- metody określania zmian intensywności wrażeń sensorycznych w czasie (ang. *Time-Intensity* - T-I).

**Metody różnicowe** – mają na celu wykrywanie różnic w jakości sensorycznej produktów (np. w wyniku zmian procesu technologicznego) pod względem wybranej cechy jakościowej; ewentualnego stwierdzenia kierunku różnicy (metoda trójkątowa).

Wśród metod różnicowych wyróżniamy:

a) *metodę parzystą* – polega na porównywaniu próbek w parach; do oceny podaje się jedną lub kilka par próbek w celu stwierdzenia różnicy w jakości sensorycznej wybranej cechy (np. twardości). Zadaniem oceniającego jest dokonanie wyboru badanej próbki ze względu na badaną cechę (np. która jest bardziej aromatyczna). Do oceny statystycznej istotności różnicy wyników stosuje się odpowiednie tablice statystyczne.

b) *metodę trójkątową* – porównanie próbek w elementach trójkowych; w każdym z nich dwie są identycznej jakości, a trzecia odmienna pod względem badanej cechy. Zadaniem oceniającego jest wskazanie, które są identyczne oraz wskazaniu odmiennej. Do oceny statystycznej istotności (lub jej braku) stosuje się odpowiednie tablice statystyczne. Czasami zadaniem oceniającego jest również wskazanie kierunku różnicy, np. czy jest bardziej czy mniej intensywna, przy czym wówczas stosuje się inne tablice statystyczne.

c) *metodę duo – trio* – polega ona na porównaniu dwóch próbek nieznanego jakości (jedna jest standardem a druga jest odmienna) ze wskazanym i zaznaczonym standardem (próbka porównawcza) i stwierdzeniu, która z dwóch jest identyczna ze standardem, a która jest odmienna; stosowane są te same tablice co w metodzie parzystej.

**Metoda kolejności (szeregowania)** – ma charakter pośredni pomiędzy metodami różnicowymi a metodami skalowania. Polega ona na uszeregowaniu kilku próbek, podanych w przypadkowej kolejności, pod względem wybranej cechy jakościowej (np. od najbardziej do najmniej słodkiej). Skala trudności zadania zależy od wielkości różnic między próbkami. Jej zaletą są proste zadania i szybkość przeprowadzenia oceny. Do oceny statystycznej wyników stosuje się tablice statystyczne Kramera.

**Metody skalowania** – służą do ilościowego wyrażania jakości i intensywności sensorycznej produktu pod względem wybranych cech (wyróżników). W metodach tych zakłada się, że każda liczba (lub punkt na skali) jest proporcjonalna do intensywności cechy jakościowej będącej obiektem oceny. Stosowane są następujące rodzaje skal:

a) *skala kategorii* – przedstawia różne, hierarchicznie uporządkowane określenia słowne przypisane odpowiednim poziomom jakości. Określenia mogą być specjalnie dostosowane lub ogólne. Skale te mogą być bardziej lub mniej rozbudowane (należy do nich m.in. skala ocen szkolnych).

b) *skala liczbowa* – różnym poziomom jakości przyporządkowane są odpowiednie liczby (skale mają najczęściej 5, 7 lub 9 stopni). Zadaniem oceniającego jest zaznaczenie na skali liczby odpowiadającej wrażeniu podczas oceny.

c) *skala graficzna* – stanowi ją odcinek linii prostej o określonej długości z odpowiednimi określeniami brzegowymi. Dzieli się na dwie kategorie: skale strukturyzowane - podzielone na równe odcinki i skale niestrukturyzowane - posiadające tylko określenia brzegowe. Oceniający nanosi swoją ocenę w odpowiedniej kratce lub zaznacza ją za pomocą prostopadłej kreski. Wynik oceny zamienia się następnie na wartości liczbowe wyrażane w jednostkach umownych.

**Metoda ilościowej analizy opisowej (QDA) (Quantitative Descriptive Analysis)** – jest jedną z najbardziej złożonych (kompleksowych), ale też dynamicznie rozwijających się i szeroko stosowanych metod analizy sensorycznej. Metody te, nazywane również metodami profilowania, wykorzystuje się do jakościowo-ilościowego określenia kompleksowej i szczegółowej charakterystyki produktu spożywczego. Podstawowym

ich założeniem jest stwierdzenie iż smakowitość, zapach lub tekstura, nie jest pojedynczą cechą jakości produktu, lecz kompleksem wielu cech jednostkowych, które można rozróżnić, zidentyfikować i określić ich intensywność. Charakterystyczne cechy jednostkowe analizowanych produktów są wybierane według specjalnej procedury wstępnej i ustalane są ich definicje. Ocenę ilościową każdej z cech przeprowadza się na skali liniowej (lub liczbowej) o odpowiednich określeniach brzegowych. Wyniki oceny zamienia się na wartości liczbowe, poddaje obróbce statystycznej i przedstawia w postaci wykresów (biegunowych lub słupkowych). Należy zaznaczyć, że nie uwzględnia się w nich zmian wrażeń sensorycznych w czasie.

**Metody określania zmian intensywności wrażeń sensorycznych w czasie (T-I ang. *Time-Intensity*)** – głównym zadaniem tej metody jest monitorowanie zmian intensywności sensorycznej określonej cechy próbki w czasie i zapisu tego przebiegu. Dostarcza cennych informacji o jakości produktu spożywczego, niedostępnych przy zastosowaniu innych metod (np. analiza jakości gumy do żucia). Stosowanie tej metody wymaga specjalnego przygotowania i treningu osób oceniających oraz dysponowania skomputeryzowanym systemem do ciągłego zapisu wyniku oceny.

Analiza sensoryczna przeprowadzana jest przez zespół wykwalifikowanych specjalistów, którzy spełniają szereg wymogów:

- cechują się zdolnością skupienia nad zadaniem oceny, spostrzegawczością, wrażliwością sensoryczną, zdolnością do identyfikowania i słownego określania różnych cech jakościowych,
- pozytywnie zaliczają testy oceniające wrażliwość sensoryczną (m.in. próbę na daltonizm smakowy czy zdolność rozróżniania natężenia smaku),
- przechodzą szkolenia na temat zasad analitycznych metod sensorycznych,
- charakteryzują się znajomością zarówno teorii jak i stosowania jej w praktyce.

Analizy opisowe (profilowe) przeprowadzane są przez 6-10 ekspertów (ocena w dwóch lub trzech powtórzeniach), w metodach różnicowych do oceny przystępuje 15-30 osób w zależności od stopnia ich wykszolenia i doświadczenia oraz trudności zadania.

Analizy sensoryczne wymagają dużej koncentracji oceniających, aby uzyskać poprawne i powtarzalne wyniki. Konieczne jest zatem zapewnienie odpowiednich warunków fizycznych (określona, stała temperatura, wilgotność względna, wymiana powietrza, oświetlenie), wyeliminowanie czynników rozpraszających (hałas, rozmowy, obce zapachy) oraz zapewnienie komfortu oceny (indywidualne, wygodne stanowiska

robocze). Aby spełnić te warunki analizy sensoryczne przeprowadzane są w laboratorium sensorycznym. Składa się ono najczęściej z:

- *pomieszczenia do przeprowadzania ocen* - od 4 do 8 indywidualnych stanowisk roboczych, oddzielonych przegrodami, które umożliwiają samodzielną, niezakłóconą wpływami postronnymi ocenę,
- *części przeznaczonyj do przygotowania próbek* – obok pomieszczenia do przeprowadzania ocen, wyposażona w sprzęty potrzebne do przygotowywania badanych produktów,
- *miejsce spotkań osoby prowadzącej ocenę z oceniającymi*.

#### **4.5.3. Badania konsumenckie (ocena hedoniczna)**

W przeciwieństwie do analitycznej oceny sensorycznej oceny konsumenckie (hedoniczne) mają na celu określenie reakcji konsumentów na badany produkt. Podstawowym zadaniem oceniających jest określenie stopnia akceptacji lub odrzucenia danego produktu, określenie preferencji w warunkach wyboru oraz określenie stopnia tej akceptacji („lubienia”). Metody te są stosowane głównie w celu ustalenia spodziewanego popytu na dany produkt, opracowania nowego artykułu spożywczego zanim wprowadzi się go na rynek oraz ustalenia upodobań i preferencji żywieniowych różnych grup konsumentów.

Metody hedoniczne dzielą się na dwie zasadnicze grupy ocen:

- **preferencji**, podczas których dokonuje się wyboru próbki bardziej pożądanej spośród dwóch lub więcej próbek; stosuje się wówczas metodę parzystą oraz metodę szeregowania. Różnica polega na zadaniu jakie oceniający ma wykonać; pytania odnoszą się do preferencji – np. „którą próbkę z dwóch przedstawionych preferujesz?”, „uszereguj próbki pod względem ich preferencji – od najlepszej do najgorszej”,
- **akceptacji**, w których wyraża się stosunek do ocenianej próbki współdecydujący o jej wyborze; wykorzystuje się metodę skali hedonicznej i jej modyfikacje. Najczęściej stosowana jest 9-stopniowa skala hedoniczna określająca poszczególne stopnie, np. w kategoriach lubienia oraz skala graficzna ustrukturowana i niestrukturowana z odpowiednimi określeniami brzegowymi. Ocena może dotyczyć zarówno ogólnej akceptacji produktu, jak i akceptacji poszczególnych cech (barwa, konsystencja, smakowość).



W badaniach konsumenckich rolę oceniających pełnią osoby, które nie podlegają żadnemu szkoleniu i nie biorą udziału w jakichkolwiek testach analitycznych. Podstawowym kryterium doboru takich osób jest ich reprezentatywność (wiek, płeć, wykształcenie, częstotliwość spożywania produktu) dla określonej populacji konsumentów. Ponieważ ocena produktu jest często bardzo subiektywna w badaniach konsumenckich uczestniczy zwykle ponad 100 osób. W przypadku mniejszej liczby uczestników (30-40 osób) oceny traktowane są jako oceny semikonsumenckie; wyniki badań uzyskane przez testy prowadzone przez 15-20 osób traktowane są jako wstępne i orientacyjne.

Oceny konsumenckie przeprowadzane są w różnych warunkach:

- *w laboratorium analizy sensorycznej* – do zalet takich warunków badań należy kontrola warunków otoczenia oraz względnie niski koszt analiz; wadą są nietypowe - jak dla konsumentów - warunki ocen;
- *w miejscach publicznych* (kawiarnie, duże domy towarowe) – plusem takich analiz jest duża ilość osób, populacja losowa, przypadkowa, duża ilość wyników w krótkim czasie; wadą powyższej lokalizacji jest brak możliwości skupienia nad oceną, ograniczona możliwość kontroli przebiegu oceny;
- *w warunkach domowych* – warunki oceny najbardziej zbliżone do warunków konsumpcji, Nielimitowana ilość testowanego produktu, możliwość kilkakrotnej oceny (zalety); wadą tej lokalizacji jest wysoki koszt badań oraz długi czas ich trwania.

Procedury przygotowania próbek do analiz zależą od rodzaju produktu oraz wykorzystywanej metody, np.: *cukierki, chipsy, wędliny* – poddaje się ocenie w niezmienionym stanie, po przygotowaniu z nich próbek jednostkowych; *ziemniaki, drób, mięso* – wymagają obróbki cieplnej, są ściśle kontrolowane; *przyprawy czy dodatki aromatyzujące* – rozcieńcza się w neutralnym medium nie zmieniającym ich charakterystyki jakościowej. Sposób podawania próbek do oceny musi spełniać kryteria dotyczące:

- a) *anonimowości* – próbki oznaczane są tylko np. 3 cyfrowym kodem,
- b) *rodzaju naczyń* – muszą być bezwonne, nie reagować z próbkami, jednakowe dla wszystkich oceniających,
- c) *wielkości jednostkowej próbek* – zależnie od typu metody i produktu, dla każdego taka sama ilość,

- d) temperatury* – na stałym poziomie, temp. pokojowa (chipsy, soki) 37°C (oleje), 5°C (zimne napoje), 65°C (dania gorące); nie powinna przekraczać 75°C, gdyż wrażliwość sensoryczna ulega znacznemu obniżeniu,
- e) liczby próbek* – zależy od typu produktu, liczby ocenianych cech, rodzaju testu, charakteru i stopnia wyszkolenia zespołu,
- f) kolejność prezentacji* – losowa, inna dla każdego oceniającego.

## 5. Metody oznaczania podstawowych składników żywności

### 5.1. Oznaczanie wody

Woda jest normowanym składnikiem żywności, a jej oznaczanie jednym z głównych elementów bieżącej kontroli towaroznawczej. Istnieje kilka typów metod oznaczania zawartości wody i suchej substancji w produktach spożywczych:

- a) metody suszenia termicznego w różnych warunkach temperatury i ciśnienia,
- b) metoda destylacji azeotropowej,
- c) metody densymetryczne,
- d) metody refraktometryczne,
- e) metody chemiczne (określenie ilości wydzielonego gazu w reakcji chemicznej lub obliczenie stechiometryczne na podstawie reakcji z określonym odczynnikiem),
- f) metody elektryczne,
- g) pomiar za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR).

#### Metody suszenia termicznego

Metody suszenia termicznego polegają na usunięciu wody z próbki za pomocą suszenia w temperaturze pokojowej lub podwyższonej oraz pod normalnym lub zmniejszonym ciśnieniem, przy czym parametry te (temperatura i ciśnienie) dobiera się stosownie do właściwości badanego produktu. Ponadto suszenie można prowadzić do uzyskania stałej masy lub w ciągu umownego czasu.

W odniesieniu do wielu produktów spożywczych stosuje się suszenie do stałej masy w temp. 100-105°C pod ciśnieniem normalnym. W przypadku niektórych, np. zbóż i przetworów zbożowych, lepszą dokładność i powtarzalność wyników daje suszenie w temp. 130°C w ciągu 60 min. Stosowanie tej temperatury jest dopuszczalne w odniesieniu do produktów niezawierających związków wrażliwych na podwyższoną temperaturę lub zawierających je w niewielkiej ilości (dotyczy to przede wszystkim monosacharydów). W stosunku do produktów o dużej zawartości związków termolabilnych stosuje się suszenie w warunkach obniżonego ciśnienia w odpowiednio niższej temperaturze lub w temperaturze otoczenia przy jednoczesnym zastosowaniu związków pochłaniających wodę, takich jak np. chlorek wapnia, stężony kwas siarkowy(VI) czy bezwodnik kwasu fosforowego(V). Jeżeli składniki są szczególnie

wrażliwe na utlenianie, suszenie powinno prowadzić się w atmosferze azotu lub ditlenku węgla.

Niektóre produkty, np. sery czy mięsa, tworzą w początkowym etapie suszenia na swojej powierzchni błonkę, która utrudnia, a czasami wręcz uniemożliwia dalsze odparowanie wody. W takich przypadkach zwiększa się powierzchnię parowania próbki przez zmieszanie jej z odpowiednim materiałem sypkim (najczęściej jest to przemyty wodą, kwasem i wyprażony piasek morski bądź gruboziarnisty pumeks).

Produkty półpłynne, np. przeciera owocowe i warzywne, suszy się dwustopniowo: wstępnie próbkę podsusza się na wrzącej łaźni wodnej, a następnie umieszcza ją w suszarce w temp. 100-105°C na 1 godzinę. Do wstępnego podsuszenia można zastosować alkohol, który parując, stosunkowo szybko porywa ze sobą wodę.

Suszenie produktów płynnych, np. mleka, prowadzi się na zwiniętych paskach bibuły filtracyjnej, celem zwiększenia powierzchni parowania. W tym przypadku suszenie przeprowadza się w ciągu 6 godzin w temp. 60°C, a następnie w 102°C.

W przypadku wielu produktów spożywczych, przed etapem właściwego suszenia, próbkę należy rozdrobnić lub poddać wstępnemu suszeniu w temperaturze 50-60°C. W czasie suszenia termicznego z produktu usuwana jest woda wolna i słabo związana, nie usuwana jest natomiast woda krystaliczna i związana chemicznie.

### **Metoda destylacji azeotropowej**

Metoda destylacji azeotropowej zaliczana jest do bezpośrednich metod oznaczania zawartości wody. Polega ona na wydzieleniu wody z badanej próbki na drodze destylacji z cieczami niemieszającymi się z wodą, lecz tworzącymi z nią mieszaniny azeotropowe o temperaturze wrzenia powyżej 100°C. Oznaczenie przeprowadza się w specjalnych aparatach, gdzie skroplony w chłodnicy destylat jest odbierany w kalibrowanej probówce, stąd objętość warstwy wodnej odczytuje się bezpośrednio na skali probówki (po rozdzieleniu się destylatu na dwie warstwy). Stosowane w tej metodzie rozpuszczalniki powinny być praktycznie nierozpuszczalne w wodzie, powinny charakteryzować się dostatecznie wysoką (ale nie za wysoką) temperaturą wrzenia oraz mieć gęstość znacznie różną od 1 g/cm<sup>3</sup> (najczęściej poniżej 1 g/cm<sup>3</sup>), jest to np. toluen (temp. wrz. 111°C, d – 0,867 g/cm<sup>3</sup>) czy ksylen (temp. wrz. 140°C, d – 0,862 g/cm<sup>3</sup>).

Metoda ta jest przydatna do oznaczania zawartości wody w produktach nieulegających rozkładowi w temperaturze wrzenia zastosowanego rozpuszczalnika

oraz niezawierających składników lotnych, rozpuszczalnych w wodzie po oddestylowaniu. Badany produkt powinien zawierać nie mniej niż 0,5% i nie więcej niż 40% wody (np. produkty przemiału zboża).

Źródłem błędów w tej metodzie może być niedokładne odczytanie objętości wody w odbieralniku na skutek tworzenia się emulsji rozpuszczalnika z wodą, bądź zatrzymywanie się kropelek wody w górnej części aparatury.

### **Metody densymetryczne**

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

### **Metody refraktometryczne**

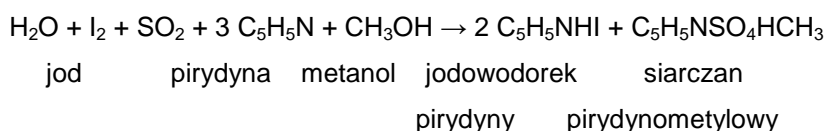
Metody refraktometryczne opierają się na pomiarze współczynnika załamania światła (refrakcji). Jego wartość zależy od długości fali światła padającego, rodzaju substancji i jej stężenia w badanym roztworze oraz w znacznym stopniu od temperatury. Metody refraktometryczne są stosowane przede wszystkim do oznaczania zawartości ekstraktu w przetworach owocowych (marmolady, konfitury, dżemy) i warzywnych (soki i pasty pomidorowe). Niektóre typy refraktometrów mają dwie skale, z których jedna podaje wartości współczynnika załamania światła, a druga, tzw. skala cukrowa, procentową zawartość ekstraktu. W przypadku produktów zawierających, oprócz sacharozy, duże ilości innych składników (np. koncentraty pomidorowe) nie należy korzystać ze skali cukrowej lecz dokonać odczytu współczynnika załamania światła i przeliczyć za pomocą odpowiednich wzorów lub tabel na zawartość suchej substancji.

### **Metody chemiczne**

Metody chemiczne umożliwiają oznaczenie całkowitej ilości wody, zarówno wolnej jak i związanej, charakteryzują się dość dobrą dokładnością i powtarzalnością wyników. Istnieje wiele chemicznych metod oznaczania wody, ale przy badaniach produktów żywnościowych stosuje się głównie metodę Karla-Fishera oraz metodę z węglikiem wapnia.

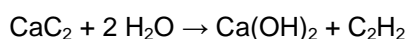
*Metoda Karla Fischera* – oznaczenie polega na bezpośrednim miareczkowaniu metanolowego roztworu próbki badanego produktu odczynnikiem Fischera (metanolowy roztwór jodu, tlenku siarki(IV) i pirydyny) i obliczeniu procentowej zawartości wody na podstawie objętości odczynnika Fischera zużytego w trakcie miareczkowania. Warunkiem uzyskania prawidłowego wyniku jest nieobecność w produkcie innych substancji mogących reagować ze składnikami odczynnika Fischera absorbującymi jod.

Sumarycznie reakcja przebiega następująco:



Tlenek siarki(IV) redukuje jod w roztworze metanolu i pirydyny stechiometrycznie do ilości wody zawartej w próbce; obecność pirydyny jest konieczna do zubożenia nadmiaru kwasu siarkowego(VI) tworzącego się w początkowym etapie reakcji. Metoda Fischera należy do bardzo dokładnych metod i nadaje się do oznaczania zawartości wody w produktach zawierających jej stosunkowo niewiele, np. w suszach.

*Metoda z węglikiem wapnia* – polega na pomiarze ilości wydzielonego acetyleny w reakcji węglika wapnia ( $\text{CaC}_2$ ) z wodą.



Pomiaru dokonuje się najczęściej w biurze gazometrycznej nad stężonym roztworem chlorku potasu (KCl). Zmierzoną objętość acetyleny sprowadza się do warunków normalnych (temp. 273 K, ciśnienie 760 mm Hg) według wzoru:

$$V_o = \frac{273 \cdot v \cdot P}{(273 + t) \cdot 760}$$

gdzie:  $V_o$  – objętość acetyleny w warunkach normalnych [ $\text{dm}^3$ ],  $v$  - objętość acetyleny w temperaturze pomiaru  $t^\circ\text{C}$ , [ $\text{dm}^3$ ],  $P$  – ciśnienie barometryczne [mm Hg].

### **Metody elektryczne**

Zastosowane metody elektryczne oparte są na zależności między przewodnością elektryczną i wartością stałej dielektrycznej produktu a zawartością wody w badanym produkcie (ze wzrostem wilgotności produktu zwiększa się jego przewodność i wartość stałej dielektrycznej). Oznaczenia przeprowadza się za pomocą wilgotnościomierzy elektrycznych różnej konstrukcji, w których sygnał elektryczny przetwarzany jest wprost na wilgotność próby lub jednostki umowne, które za pomocą dołączonych do aparatu

wykresów lub tablic przelicza się na wilgotność (odpowiednich dla danego produktu). Stosuje się je często w skupie, obrocie, przetwórstwie i przechowywaniu ziarna zbóż, roślin strączkowych i rzepaku.

### **Pomiar za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)**

Metoda magnetycznego rezonansu jądrowego wykorzystuje zjawisko pochłaniania energii pola elektromagnetycznego z zakresu fal radiowych przez jądra atomów wodoru wody znajdującej się w badanym produkcie. Metoda ta ma wiele zalet: charakteryzuje się dużą dokładnością i powtarzalnością wyników, jest szybka, nadaje się do pomiarów seryjnych oraz do oznaczeń w szerokim zakresie wilgotności (od 3-100%), wynik nie zależy od składu chemicznego, granulacji czy opakowania próby; zasadniczą wadą jest wysoki koszt aparatury.

## **5.2. Oznaczanie białek**

Ilościowe oznaczanie białka w produktach żywnościowych opiera się głównie na obecności w ich strukturze atomów azotu i przeprowadza się *metodami bezpośrednimi i pośrednimi*.

Do *bezpośrednich metod oznaczania białka* należą metody spektrofotometryczne (metoda biuretowa i metoda Lovry'ego), nefelometryczne oraz refraktometryczne.

*Metody pośrednie* (np. metoda Kjeldahla) polegają najczęściej na określeniu zawartości azotu, a następnie przeliczeniu go na białko przy użyciu odpowiednich współczynników przeliczeniowych. W produktach spożywczych oznacza się tzw. azot ogólny, w skład którego obok azotu białkowego wchodzi azot pochodzący z produktów odbudowy białek, a także azot z innych związków organicznych. Przeciętna zawartość azotu w białkach wynosi około 16%, dlatego też dla tzw. białka surowego współczynnik przeliczeniowy wynosi 6,25 ( $100:16 = 6,25$ ). Ponieważ białka produktów spożywczych różnią się między sobą zarówno składem jakościowym jak i ilościowym, odmienna jest także zawarta w nich ilość azotu. Dlatego też dla poszczególnych produktów spożywczych stosuje się różne wskaźniki przeliczeniowe, i tak np. dla białka jaja kurzego – 6,67, białka mleka – 6,38, białka mięsa – 6,25 czy dla białka żyta, pszenicy i owsa – 5,70. Stosowane mnożniki podaje się obok oznaczonej zawartości białka, np. dla mleka N 6,38. Metody pośrednie można stosować tylko wówczas, gdy badany produkt nie zawiera innych związków azotowych lub zawiera ich bardzo mało.

Według innego podziału metody oznaczania białka dzielą się na następujące grupy:

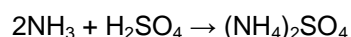
- metoda Kjeldahla,
- metody oparte na wbudowaniu barwnika do białka,
- miareczkowanie formolowe,
- metody spektrofotometryczne,
- metody immunologiczne.

### Metoda Kjeldahla

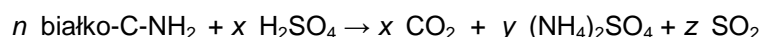
Znana od 1883 i niewiele modyfikowana jest najczęściej stosowaną metodą oznaczania azotu w artykułach spożywczych; jest to także metoda referencyjna. Polega ona na przeprowadzeniu mineralizacji produktu za pomocą stężonego kwasu siarkowego(VI) („na mokro”), zalkalizowaniu roztworu, a następnie oddestylowaniu i jakościowym oznaczeniu powstałego amoniaku. Analiza przebiega w trzech etapach:

- 1) mineralizacja próbki,
- 2) destylacja amoniaku z parą wodną,
- 3) miareczkowanie.

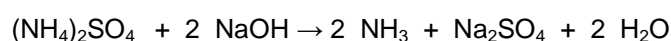
Podczas *mineralizacji* próby w kolbie Kjeldahla następuje utlenianie związków organicznych do ditlenku węgla, wody i amoniaku. Mineralizację prowadzi się przy pomocy stężonego kwasu siarkowego w obecności katalizatorów. Jako katalizatory najczęściej stosuje się siarczan(VI) miedzi(II) lub rtęci(II), albo mieszaninę selenowo-miedziową. Czasami stosuje się środki podwyższające temperaturę mineralizacji, np. siarczan(VI) sodu lub potasu oraz środki utleniające. Powstały w czasie mineralizacji amoniak tworzy w środowisku kwasu siarkowego(VI) sól amonową:



Sumaryczny przebieg powyższych reakcji przedstawia następujący schemat:

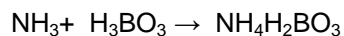


Siarczan(VI) amonu rozkłada się po zalkalizowaniu roztworu wodorotlenkiem sodu:

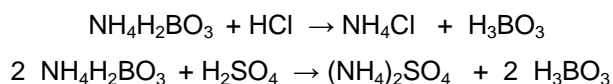




Wydzielony amoniak oddestylowuje się do odbieralnika zawierającego roztwór słabego kwasu, np. kwasu borowego występującego w nadmiarze. Następuje wiązanie amoniaku w formę soli amonowej kwasu borowego



Związany amoniak jest następnie oznaczany przez miareczkowanie mianowanym roztworem silnego kwasu, np. kwasu solnego lub kwasu siarkowego.



Ilość azotu w próbie oblicza się z ilości mililitrów kwasu zużytego do miareczkowania.

Metodą Kjeldahla, oprócz azotu zawartego w białkach, oznaczany jest azot pochodzący z innych związków (z jonów amonowych, grup amidowych, aminowych oraz iminowych); nie oznaczany jest azot pochodzący z azotanów(III), azotanów(V) oraz azot aromatycznych pierścieni heterocyklicznych. Do oznaczeń należy pobrać taką próbę, aby zawierała około 0,02 g azotu (z reguły jest to około 0,5-1,5 g produktu).

Zasada metody Kjeldahla została wykorzystana do skonstruowania automatycznego urządzenia służącego do oznaczania azotu. Zestaw obejmuje aparat do mineralizacji, jednostkę do destylacji lub destylacji i automatycznego miareczkowania i pozwala na wykonanie ponad stu analiz dziennie (Rys. 77).



**A) jednostka do mineralizacji B) aparat do destylacji z parą wodną**

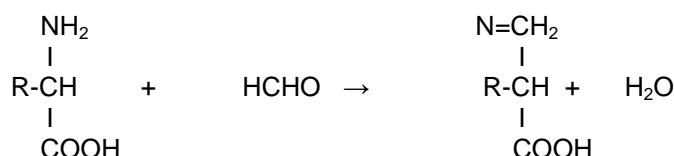
**Rys. 77.** Zestaw do automatycznego oznaczania białka metodą Kjeldahla firmy Donserv: **A – jednostka do mineralizacji:** 1 – odprowadzenie oparów kwasu siarkowego(VI), 2 – termoodporne próbki ze mineralizowanymi próbkami, 3 – płaszcz grzejny, 4 – włącznik; **B- aparat do destylacji z parą wodną:** 1 – panel sterowania, 2 – chłodnica wodna, 3 – próbówka z destylowaną próbką, 4 – odbieralnik destylatu

### Metody oparte na wbudowaniu barwników

Metody te oparte są na tworzeniu barwnych kompleksów białek z pewnymi organicznymi barwnikami, np. czernią amidową 10B, oranżem G, błękitem Coomassie G-250. W pewnych ściśle określonych warunkach, zwykle poniżej punktu izoelektrycznego białka, białko i barwnik reagują ilościowo, tworząc nierozpuszczalne kompleksy, które można oddzielić poprzez wirowanie lub sączenie od reszty roztworu. Natężenie barwy uzyskanego roztworu zależy od ilości barwnika niezwiązanego z białkiem (barwnik dodawany jest w nadmiarze), czyli jest odwrotnie proporcjonalne do ilości białka w analizowanej próbce. Zasada wbudowywania się czerni amidowej 10B do białek została wykorzystana w aparacie Pro-Milk, stosowanym do szybkiego oznaczania białek mleka w przemyśle mleczarskim.

## Miareczkowanie formolowe

Polega na zobojętnieniu kwaśnych soli znajdujących się w badanym białku (np. obecnych w mleku) roztworem wodorotlenku sodu, zablokowaniu formaliną niezwiązanych grup aminowych i odmiareczkowaniu wolnych grup karboksylowych występujących w białku (kwas asparaginowy i kwas glutaminowy) roztworem wodorotlenku sodu.



*Przykładowa procedura postępowania przy oznaczaniu kazeiny w mleku metodą formolową:* Do zlewki pobrać 10 cm<sup>3</sup> mleka, dodać 0,5 cm<sup>3</sup> fenoloftaleiny i miareczkować 0,1 mol/dm<sup>3</sup> roztworem NaOH do uzyskania lekko różowego zabarwienia. Następnie dodać 2 cm<sup>3</sup> 20% roztworu formaliny i miareczkować ponownie 0,1 mol/dm<sup>3</sup> roztworem NaOH do momentu uzyskania lekko różowego zabarwienia, utrzymującego się przez 30 sekund.

Procentową zawartość kazeiny w mleku oblicza się wg wzoru:

$$X = a \cdot 1,92$$

gdzie: a oznacza objętość 0,1 mol/dm<sup>3</sup> roztworu NaOH zużytego do miareczkowania po dodaniu formaliny, w cm<sup>3</sup>.

## Metody spektrofotometryczne

W *metodzie biuretowej* wykorzystano reakcję zachodzącą w środowisku zasadowym pomiędzy wiązaniami peptydowymi a jonami miedzi Cu<sup>2+</sup>, w wyniku której powstają barwne kompleksy. Stosowanie tej metody jest ograniczone obecnością soli amonowych, które również dają reakcję barwną z jonami miedzi.

*Metoda Lovry'ego* służy do oznaczania białek obecnych w roztworze. Oznaczenie przebiega w dwóch etapach; w pierwszym następuje przyłączenie jonów miedzi do białka (reakcja biuretowa), w drugim etapie kompleks białkowo-miedziowy redukuje odczynnik Folina-Ciocolteau fosforomolibdeniano-fosforowolframowy. W wyniku reakcji tworzy się barwny kompleks, którego absorbancja (mierzona przy długości fali 750 nm) jest proporcjonalna do stężenia białka.

Metody spektrofotometryczne wykorzystuje się do oznaczania białek rozpuszczalnych, które decydują o właściwościach funkcjonalnych surowca. Ma to

szczególne znaczenie w analizie jakości preparatów białek roślinnych i zwierzęcych oraz przy ocenie mięsa ryb składowanego przez dłuższy czas w warunkach zamrażalniczych.

*Oznaczanie białka rozpuszczalnego* polega na wyekstrahowaniu białka z próbki za pomocą odpowiedniego buforu, a następnie określeniu ilości białka za pomocą bezpośredniego pomiaru spektrofotometrycznego uzyskanego roztworu, bądź po przeprowadzeniu go w barwny kompleks, stosując odczynnik biuretowy (stężenie białka 1-10 mg/cm<sup>3</sup>) czy odczynnik Folina-Ciocolteau (stężenie białka 10-100 µg/cm<sup>3</sup>).

*Metoda spektrofotometrii w zakresie nadfioletu (UV)* pozwala także oznaczyć zawartość białka w analizowanym produkcie. Białka, zawierają aminokwasy aromatyczne (fenyloalanina, tryptofan oraz tyrozyna), które wykazują zdolność pochłaniania wiązki światła monochromatycznego z zakresu UV, stąd mierzona absorbancja jest proporcjonalna do zawartości białka w próbce.

*Promieniowanie w zakresie podczerwieni (IR)* wykorzystywane jest także określenia ilości białka. Selektywne pochłanianie promieniowania elektromagnetycznego z tego zakresu przez odpowiednie grupy białek było podstawą konstrukcji urządzeń o nazwie Infratec firmy Tecator, w których oprócz białek ogółem oznaczana jest woda i tłuszcz w mięsie.

### **Metody immunologiczne**

Ostatnio coraz częściej do oznaczania białek stosuje się metodę immunoenzymatyczną (ELISA), która polega na utworzeniu połączeń specyficznych przeciwciał z analizowanym białkiem oraz odpowiednim enzymem. Enzym ten, reagując z bezbarwnym substratem, przeprowadza go w barwny związek, którego stężenie można oznaczyć spektrofotometrycznie. Metoda ELISA jest bardzo czułą metodą, pozwalającą oznaczyć nie tylko poszczególne klasy białek w badanym produkcie, ale także określić stopień ich denaturacji. Z uwagi na to, że oznaczenie końcowe polega na pomiarze absorbancji, metoda ta zaliczana jest także do metod spektrofotometrycznych.

## **5.3. Oznaczanie sacharydów**

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 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:

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

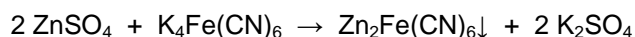
Wartości poszczególnych składników żywności (wody, popiołu, białka, tłuszczu) oznacza się analitycznie i wyraża w procentach. Metoda ta jest stosowana przede wszystkim do ustalania wartości energetycznej produktu, daje jednak wyniki przybliżone, gdyż nie uwzględnia faktu, iż obliczona w ten sposób frakcja 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, będącej sumą skrobi i produktów jej rozkładu, niewchłanianą w jelicie cienkim zdrowego człowieka) wymaga zastosowania odmiennych metod oznaczania, gdyż charakteryzuje się ona innymi właściwościami fizyko-chemicznymi w porównaniu z sacharydami przyswajalnymi.

### **5.3.1. Wstępne przygotowanie próbek żywności do oznaczania sacharydów**

Sposoby przygotowania próbek żywności dostosowane są do konkretnego produktu i podaje się je wraz z procedurą oznaczania ilościowego. W przypadku oznaczania sacharydów w produktach stałych należy je rozpuścić w wodzie lub wodnych roztworach alkoholi. Uzyskane w ten sposób roztwory zawierają z reguły wiele substancji przeszkadzających w metodach analitycznych, stąd należy je oczyścić, np. przez traktowanie octanem ołowiu(II) ekstraktów roślinnych, syropów, produktów owocowych, warzywnych, napoi czy dodatek tlenku glinu do miodu. Substancje przeszkadzające (barwniki, białka, lipidy, inne substancje niesacharydowe o właściwościach redukcyjnych) usuwa się przez klarowanie i odbarwianie.

W przypadku oznaczania sacharydów metodami chemicznymi jedną z najlepszych metod odbiałczania i klarowania (usuwania związków wielkocząsteczkowych: białek, pektyn, garbników) jest **metoda Carreza**. Stosuje się w niej dwa płyny Carreza (heksacyjanożelazian(II) potasu i siarczan(VI) cynku(II), które dodaje się w jednakowej objętości. W trakcie klarowania zachodzi następująca reakcja:



Powstający w reakcji koloidalny heksacyjanożelazian(II) cynku(II) opadając w formie osadu współstrąca ze sobą związki wielkocząsteczkowe. Do klarowania stosuje się także – w zależności od produktu – wodorotlenek miedzi(II), octan ołowiu(II), azotan(V) rtęci(II) z wodorotlenkiem sodu, kwas chlorooctowy, 70% etanol, aceton.

### 5.3.2. Charakterystyka metod stosowanych w oznaczaniu sacharydów przyswajalnych

Metody oznaczania sacharydów przyswajalnych można podzielić na:

- **metody fizyczne:** densymetryczne, refraktometryczne, polarymetryczne;
- **metody chemiczne:** metoda Fehlinga, metoda Lane-Eynona, metoda Bertranda, metoda Luffa- Schoorla;
- **metody fizykochemiczne:** metoda antronowa, metoda rezorcynowa, metoda heksacyjanożelazianowa;
- **metody chromatograficzne:** chromatografia cienkowarstwowa lub bibułowa, chromatografia kolumnowa, chromatografia gazowa, wysokosprawna chromatografia cieczowa;
- **metody enzymatyczne.**

#### Metody fizyczne

Metody fizyczne mogą być stosowane jedynie do oznaczania sacharydów rozpuszczalnych w wodzie.

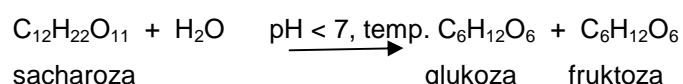
*Metody densymetryczne* – polegają na pomiarze gęstości wodnych roztworów sacharydów za pomocą areometru lub piknometru i odczytaniu z odpowiednich tablic odpowiadających im zawartości sacharydów w próbce. W przypadku pomiarów w roztworach zawierających oprócz sacharydów inne składniki rozpuszczalne w wodzie, uzyskany wynik odpowiada ekstraktowi ogólnemu i ma charakter przybliżony.

*Metody refraktometryczne* – mierzy się w nich współczynnik załamania światła (refrakcji) przez cząsteczki sacharydu rozpuszczonego w wodzie. W przypadku czystych roztworów sacharydów uzyskuje się bardzo dokładne i powtarzalne wyniki, ale dla roztworów wieloskładnikowych, w których pomiar współczynnika załamania jest wypadkową wszystkich rozpuszczonych w wodzie substancji, wynik ten określa ekstrakt ogólny, analogicznie jak w metodach densymetrycznych. Metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w badaniach produktów spożywczych z uwagi na prostotę i szybkość analizy oraz możliwość wykonywania oznaczeń seryjnych.

*Metody polarymetryczne* – polegają na pomiarze kąta skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego, przechodzącego przez badany roztwór sacharydu. Analizy wykonuje się za pomocą specjalnych polarymetrów zwanych sacharymetrami; badany roztwór musi być bezbarwny, klarowny i bez zawiesin koloidalnych.

### **Metody chemiczne**

W metodach chemicznych wykorzystuje się redukcyjne właściwości sacharydów, związane z obecnością w cząsteczce wolnej grupy karbonylowej (aldehidowej lub ketonowej); tak oznaczoną zawartość sacharydów nazywa się zawartością „cukrów redukujących”. Sacharydy, które są pozbawione właściwości redukcyjnych (mają zablokowane grupy karbonylowe), poddaje się hydrolizie (inwersji) do monosacharydów i oznacza jako tzw. „cukry ogółem”. Najczęściej stosowaną metodą inwersji jest *metoda Clergeta-Herzfelda*, polegająca na hydrolizie sacharydów w kwaśnych warunkach, w podwyższonej temperaturze:

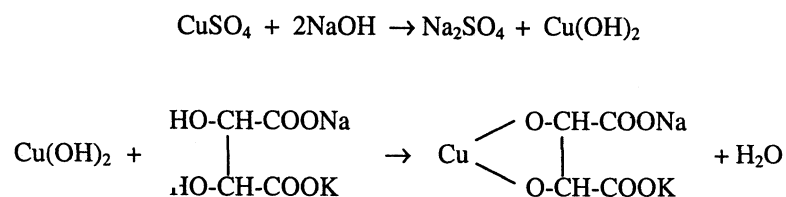


Należy ściśle przestrzegać warunków hydrolizy, gdyż przy zbyt niskim stężeniu kwasu lub przy zbyt niskiej temperaturze może nastąpić niecałkowite rozszczepienie wiązań glikozydowych, podczas gdy zbyt wysokie wartości powyższych parametrów reakcji mogą doprowadzić do rozkładu produktów inwersji.

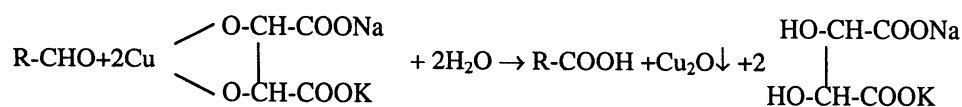
Metody oparte na właściwościach redukcyjnych nie są specyficzne tylko dla sacharydów, gdyż inne substancje obecne w produktach spożywczych (niektóre kwasy organiczne, np. kwas askorbinowy, zasady purynowe, niektóre aldehydy i aminokwasy, np. cysteina, kwas asparaginowy), także wykazują w tych warunkach

właściwości redukcyjne. Aby uniknąć podwyższenia wyników oznaczania, usuwa się je w procesie odbiałczania i/lub klarowania.

Największe znaczenie w ilościowym oznaczaniu sacharydów w produktach spożywczych mają metody oparte na redukcji soli miedzi(II) w środowisku alkalicznym. Odczynniki miedziowe stosowane w metodach miareczkowych to zasadowe roztwory siarczanu(VI) miedzi(II), zawierające winian sodu i potasu lub cytrynian sodu, glicerynę lub inny związek tworzący rozpuszczalny kompleks z jonami miedzi:



W środowisku zasadowym w podwyższonej temperaturze następuje przeprowadzenie sacharydów w formę łańcuchową, która ulega enolizacji. Powstałe endiolowe formy sacharydów utleniają się do kwasów (np. z glukozy powstaje kwas glukonowy); jednocześnie następuje redukcja jonów  $\text{Cu}^{+2}$  do jonów  $\text{Cu}^{+1}$ , które łącząc się z jonami wodorotlenkowymi, dają czerwony osad tlenku miedzi(I):



W metodzie tej bardzo ważne jest ściśle przestrzeganie warunków oznaczania, m.in. utrzymywanie stanu wrzenia, gdyż zabezpiecza się wtedy próbkę przed dostępem powietrza, które może ponownie utlenić zredukowaną miedź i barwnik. Wśród metod miareczkowych najczęściej stosowane są:

*Metoda Fehlinga* - polega ona na miareczkowym oznaczaniu ilości redukujących się sacharydów w roztworze, odpowiadających całkowitej redukcji miedzi zawartej w roztworze odczynników Fehlinga I ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) i Fehlinga II (winian sodu i potasu:  $\text{NaK}_4\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) wprowadzonych w jednakowej objętości (po  $10 \text{ cm}^3$ ). Winian sodu i potasu tworzy z jonami  $\text{Cu}^{+2}$  ciemnoniebieski, rozpuszczalny w wodzie kompleks; koniec miareczkowania rozpoznaje się po zaniku barwy niebieskiej, świadczącej o braku jonów  $\text{Cu}^{+2}$ .

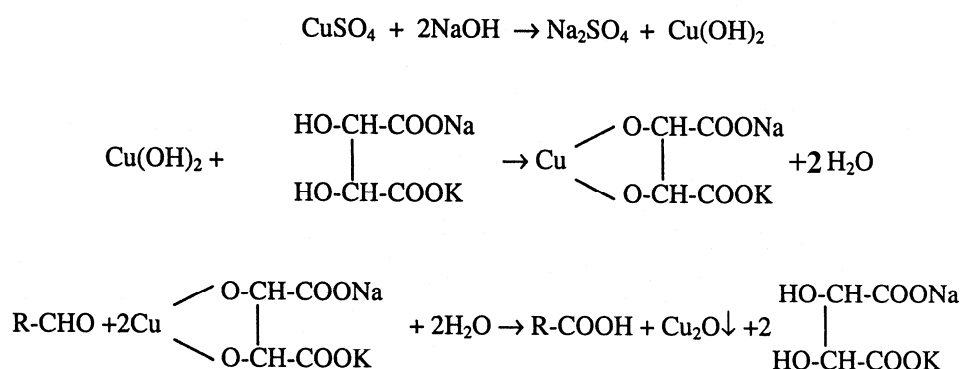
*Metoda Lane – Eynona* – jest rozwinięciem metody Fehlinga i może być stosowana do oznaczania sacharydów w roztworach bezbarwnych. Oznaczanie polega na bezpośrednim miareczkowaniu wrzącej mieszaniny roztworów Fehlinga I i II



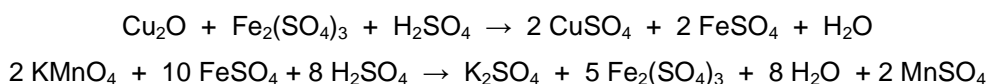
odpowiednio rozcieńczonym roztworem sacharydu (0,1 – 0,4%) w obecności błękitu metylenowego jako wskaźnika końca miareczkowania. Obecność soli Seignette'a (winianu potasu sodu) zapobiega strącaniu się wodorotlenku miedzi(II) i umożliwia prawidłowe przeprowadzenie redukcji, w której odbarwienie barwnika następuje dopiero po zredukowaniu całej miedzi zawartej w płynie Fehlinga. W metodzie tej stosuje się mniejsze ilości odczynników Fehlinga I i II (po 5 cm<sup>3</sup>).

Modyfikacją metody Lane–Eynona jest *metoda Munsona i Walkera*, w której roztwór sacharydów ogrzewa się w standardowych warunkach z odczynnikami Fehlinga, strącony osad Cu<sub>2</sub>O po przesączeniu jest oznaczany za pomocą miareczkowania manganometrycznego lub jodometrycznego.

*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<sup>+2</sup> 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<sup>+2</sup> do Cu<sup>+1</sup> 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<sup>+2</sup>, a jony Fe<sup>+3</sup> redukcji do jonów Fe<sup>+2</sup>. Ilość jonów Fe<sup>+2</sup> oznacza się przez miareczkowanie mianowanym roztworem manganianu(VII) potasu:

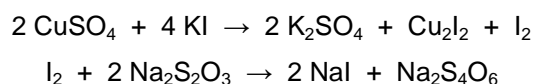


Na podstawie zużycia ilości manganianu(VII) potasu oblicza się ilość miedzi zredukowanej przez sacharyd obecny w badanej próbce, a zawartość poszczególnych sacharydów odczytuje się z odpowiednich tablic.

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.

*Metoda Luffa – Schoorla* – zasada oznaczenia opiera się na reakcji redukcji jonów  $\text{Cu}^{+2}$  zawartych w płynie Luffa przez sacharydy redukujące obecne w badanym roztworze. Reakcja zachodzi w środowisku zasadowym (pH ok. 9,5) w temperaturze wrzenia. W skład płynu Luffa wchodzi: siarczan(VI) miedzi(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), węglan sodu ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ ), kwas cytrynowy ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) - w porównaniu z poprzednimi metodami zastąpiono wodorotlenek sodu węglanem sodu, a winian sodu i potasu kwasem cytrynowym.

W środowisku zasadowym sacharydy redukują siarczan(VI) miedzi(II) do tlenku miedzi(I). Wprowadzenie do roztworu jodku potasu (KI) i kwasu siarkowego(VI) powoduje wydzielenie jodowodoru (HI). Ulega on reakcji z niezredukowanym przez sacharydy siarczanem (VI) miedzi(II) i powstaje jodek miedzi(I). Nadmiar jodu (z dodatku KI) odmiareczkuje się tiosiarczanem(VI) sodu ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ):



Wykonuje się ślepe próby, aby ustalić zużycie roztworu tiosiarczanu(VI) sodu na zmiareczkowanie jodu wydzielonego przez całkowitą ilość miedzi zawartej w płynie Luffa. Objętość tiosiarczanu(VI) sodu odpowiadająca ilości miedzi(II) podlegającej redukcji przez sacharydy oblicza się jako różnicę objętości uzyskanych z dwóch miareczkowań (próby ślepej i właściwej), a następnie z odpowiednich tablic odczytuje się zawartość sacharydów redukujących w analizowanej próbce. Zawartość sacharydów w roztworze użytym do oznaczeń nie powinna być wyższa niż 0,1-0,5%.

*Próba Benedicta* - jest to najbardziej czuła próba na cukry redukujące, w której używa się 1% wodny roztwór siarczanu(VI) miedzi(II), 10% roztwór cytrynianu sodu, 1% roztwór amoniaku i 10% roztwór węglanu sodu. Po dodaniu cukru redukującego i ogrzaniu pojawia się żółty, pomarańczowy lub czerwony osad tlenku  $\text{Cu}_2\text{O}$ . Za pomocą tej próby można wykryć cukier redukujący już przy stężeniu 0,1%.

## Metody fizykochemiczne

W najczęściej stosowanych metodach fizykochemicznych oznaczane sacharydy przeprowadza się w związki barwne, a następnie kolorymetrycznie mierzy intensywność powstałego zabarwienia. Do metod tych należy:

*Metoda antronowa* – polega ona na odwodnieniu sacharydów przez ogrzewanie ze stężonymi kwasami (octowym, siarkowym(VI), solnym). Powstały z pentoz - furfural i z heksoz - 5-hydroksymetylofurfural tworzą z antronem barwny roztwór. Pomiar intensywności zabarwienia (proporcjonalny do stężenia sacharydów) wykonuje się za pomocą metod spektrofotometrycznych przy długości fali  $\lambda = 620$  nm,

*Metoda rezorcynowa* – pozwala oznaczyć ketosacharydy, a także wyznaczyć zawartość ketopentoz i ketoheksoz obok siebie. Metoda ta polega na odwodnieniu ketosacharydów przez ogrzewanie z kwasem solnym, a następnie reakcji powstałych produktów z rezorcyną, w wyniku której tworzą się barwne kompleksy. Pomiar intensywności zabarwienia wykonuje się: dla ketoheksoz, przy długości fali  $\lambda = 520$  nm, dla ketopentoz, przy długości fali  $\lambda = 620$  nm,

*Metoda heksacyjanożelazianowa* – stosowana jest do oznaczania aldosaacharydów i polega na redukcji w środowisku zasadowym heksacyjanożelazianu(III) do heksacyjanożelazianu(II) przez aldosaacharydy. Powstały heksacyjanożelazian(II) tworzy z jonami  $\text{Fe}^{+3}$  błękit pruski; pomiar intensywności powstałego zabarwienia wykonuje się przy długości fali  $\lambda = 690$  nm.

## Metody chromatograficzne

Metody chromatograficzne wykorzystuje się zarówno do oznaczeń jakościowych, jak i ilościowych poszczególnych sacharydów. Do najczęściej stosowanych technik chromatograficznych należą:

*Chromatografia cienkowarstwowa lub bibułowa (TLC)* – pozwala m.in. na zidentyfikowanie pentoz, heksoz i disacharydów w mieszaninie cukrów. Identyfikację przeprowadza się przez porównanie współczynników  $R_f$  (ang. *retention factor* - wskaźnik opóźnienia, wskaźnik retencji) oraz na podstawie charakterystycznych dla poszczególnych sacharydów reakcji barwnych z odpowiednimi odczynnikami (np. roztwór kwasu siarkowego w metanolu). Jako fazę stacjonarną stosuje się najczęściej żel krzemionkowy (Silica gel), tlenek glinu (Alumina), ziemię okrzemkową oraz krzemian magnezu (Florisil).

*Chromatografia kolumnowa (LC)* – służy przede wszystkim do wstępnego oczyszczenia próbki, niemniej odpowiednio dobrane warunki rozdziału pozwalają dokonać nie tylko analizy jakościowej, ale także oznaczyć je ilościowo za pomocą omówionych metod, np. metod chemicznych, fizykochemicznych czy enzymatycznych. Rozdzielenia chromatograficzne prowadzi się zarówno na złożach jonowymiennych (kationowymiennych i anionowymiennych), fazach cyklodekstrynowych (możliwość rozróżnienia enancjomerów), związanych fazach aminowych, impregnowanych *in situ* aminami żelach krzemionkowych, niepolarnych fazach C18, czy na grafityzowanym węglu.

*Chromatografia gazowa (GC)* – sacharydy są nietlotne, stąd aby można było analizować je metodą chromatografii gazowej, muszą zostać przekształcone w bardziej lotne pochodne, np. trimetylosililowe. Po rozdzieleniu na odpowiednio dobranej kolumnie chromatograficznej identyfikacji sacharydów dokonuje się na podstawie porównania czasów retencji analizowanych związków z czasami retencji wzorców, natomiast ich ilość określa się na podstawie powierzchni pików chromatograficznych. I tak np. do oznaczenia glukozy i galaktozy w chlebie wykorzystano kolumnę zawierającą zmodyfikowaną fazę stacjonarną 3% SP-2330 na złożu 100/120 mesh Supelcoport, analizę prowadzono w temp. 215°C, a do detekcji posłużył detektor FID. Innym przykładem jest analiza zawartości glukozy, fruktozy, sacharozy i maltozy w miodzie, którą wykonano na kolumnie wypełnionej złożem 100/200 mesh Diatomite CQ zmodyfikowanym 10% E-20; program temperaturowy 100-230°C, detektor FID.

*Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)* – w analizie sacharydów najczęściej stosowanym detektorem jest detektor refraktometryczny (RID). Identyfikację sacharydów, jak i ich analizę ilościową, wykonuje się analogicznie jak podano wyżej. Przykładem zastosowania tej techniki jest oznaczanie glukozy, sacharozy i rafinozy w jogurcie, podczas którego do ekstrakcji analitów użyto 70% etanolu, a rozdział uzyskanego ekstraktu przeprowadzono z wykorzystaniem fazy stacjonarnej Spherisorb-NH<sub>2</sub>, fazę ruchomą stanowiła mieszanina woda/acetonitryl (36:64, v/v), do detekcji służył detektor refraktometryczny. Z kolei oznaczanie glukozy w hydrolizacie skrobiowym wykonano poprzez ekstrakcję analitu za pomocą wody, rozdzielenie chromatograficzne uzyskanej próbki na kolumnie Dextropak podczas którego do elucji wykorzystano wodę, a do detekcji detektor RID.

Metody chromatograficzne GC i HPLC charakteryzują się dużą precyzją oraz łatwością i szybkością wykonania w porównaniu z metodami chemicznymi. Technika HPLC jest wykorzystywana przede wszystkim do oznaczania średnio- i wysokocząsteczkowych węglowodanów i w porównaniu z metodą GC charakteryzuje się krótszym czasem analizy (o 50%), wyższymi wartościami odzysku i lepszą dokładnością oznaczeń. Z kolei technika GC stosowana jest głównie do analizy monosacharydów, do jej zalet zaliczamy wysoką czułość i doskonałą rozdzielczość (możliwość odróżnienia  $\alpha$  i  $\beta$  anomerów); do wad konieczność derywatywacji.

### **Metody enzymatyczne**

Metody enzymatyczne stosuje się głównie do oznaczania glukozy i fruktozy, przy czym w przypadku glukozy korzysta się najczęściej z oksydazy glukozowej lub dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu.

*Metoda z oksydazą glukozową* – w obecności tlenu oksydaza glukozowa katalizuje utlenianie  $\beta$ -D-glukozy do D-glukono- $\delta$ -laktonu. Jednocześnie następuje redukcja koenzymu FAD do FADH<sub>2</sub> i ponowne utlenienie do FAD, któremu towarzyszy przeniesienie atomów wodoru na tlen cząsteczkowy i powstanie nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Powstały H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, w obecności związku będącego donorem atomów wodoru np. di-o-anizydyny, jest rozkładany przez peroksydazę, a odwodorowany związek staje się barwny (np. żółty w przypadku di-o-anizydyny).

*Metoda z dehydrogenazą glukozo-6-fosforanową* – glukozo-6-fosforan reaguje z NADP<sup>+</sup>, który w obecności dehydrogenazy fosforoglukonianowej jest przekształcany w NADPH. Ilość powstałego NADPH jest proporcjonalna do ilości glukozy i oznaczana spektrofotometrycznie.

Metody enzymatyczne stosuje się przede wszystkim do oznaczania glukozy, galaktozy, sacharozy, laktozy i skrobi w produktach spożywczych, np. w miodzie.

### **5.3.3. Oznaczanie skrobi i błonnika pokarmowego**

Oznaczenie skrobi i błonnika pokarmowego (w tym tzw. skrobi odpornej) wymaga zastosowania odmiennych metod oznaczania, gdyż składniki te charakteryzują się innymi właściwościami fizykochemicznymi w porównaniu z sacharydami przyswajalnymi.

### **Metody oznaczania skrobi**

Do oznaczania skrobi stosuje się :

*Metody wagowe* – w których skrobię oznacza się wagowo po rozpuszczeniu jej i strąceniu z próbki. Przykładem tej grupy metod jest metoda wagowa Raska, w której próbkę ekstrahuje się kolejno: eterem dietylowym, 10% etanolem, kwasem solnym, 70% etanolem i na końcu 96% etanolem. Na podstawie masy osadu pozostałego po ekstrakcji wnioskuje się o zawartości skrobi. Metody te są czasochłonne i mało dokładne, ponadto nie można stosować ich do wielu produktów spożywczych.

*Metody chemiczne* – skrobię hydrolizuje się (wykorzystując enzymy amylolityczne lub hydrolizę kwasową) do glukozy, którą następnie oznacza się jedną z metod redukcyjnych. Ilość glukozy przelicza się na skrobię, stosując współczynnik przeliczeniowy 0,9 (iloraz masy molowej reszty glukozyłowej i masy molowej cząsteczki glukozy, 162/180).

*Metody polarymetryczne* – z uwagi na szybkość i prostotę wykonania należą do najczęściej stosowanych. Polegają na pomiarze kąta skręcania światła spolaryzowanego przez badany roztwór skrobi, z tym że roztwór przeznaczony do badania musi być bezbarwny, klarowny i bez zawiesin koloidalnych. Skrobię rozpuszcza się w roztworze kwasu solnego lub roztworze chlorku wapnia, poddaje klarowaniu, a następnie mierzy kąt skręcania w polarymetrze. W zależności od zawartości skrobi i sposobu ekstrakcji przyjmuje on wartości od 180 do 202°.

### **Metody oznaczania błonnika pokarmowego**

W skład błonnika wchodzi składniki o charakterze polisacharydowym i niepolisacharydowym. Ze względu na niejednorodność fizykochemiczną, analiza błonnika jest trudna. Istniejące metody różnią się między sobą sposobem izolacji poszczególnych frakcji, dlatego też przy podawaniu zawartości błonnika należy podać, która z metod została zastosowana. Do podstawowych metod oznaczania zawartości błonnika należą:

*Metody enzymatyczno-wagowe* – polegają na trawieniu badanej próbki enzymami *in vitro*, a następnie zważeniu pozostałości niestrawionej. Metody te są powszechnie stosowane w analizie błonnika pokarmowego i ciągle modyfikowane (poprzez wprowadzanie bardziej efektywnych enzymów).

*Metoda chemiczna* - błonnik pokarmowy zawarty w analizowanej próbce poddaje się hydrolizie kwasowej do glukozy, pentoz, kwasu galaktouronowego, alkoholi fenylopropenowych, a następnie uzyskane produkty analizuje się za pomocą HPLC,

w warunkach chromatograficznych odpowiadających tym, stosowanym dla sacharydów przyswajalnych. Na podstawie uzyskanych wyników można oszacować zawartość poszczególnych frakcji błonnika pokarmowego, np. ilość glukozy jest proporcjonalna do zawartości celulozy, pentozy odpowiadają hemicelulozie, kwas glukouronowy – pektynom, a alkohole fenylopropenowe – ligninie.

*Metoda Scharrera-Kürschnera* - polega na wagowym oznaczeniu substancji organicznych, które nie rozpuszczają się w mieszaninie kwasów podczas gotowania oraz po ekstrakcji alkoholem; oznaczona w ten sposób frakcja błonnika pokarmowego nosi nazwę *włókna surowego* (zawiera głównie celulozę); stosuje się ją do celów technicznych.

## 5.4. Oznaczanie lipidów

Oznaczanie lipidów należy do rutynowych analiz przeprowadzanych w celu ustalenia podstawowego składu chemicznego produktów spożywczych. Badania te pozwalają między innymi wnioskować o wartości odżywczej produktu czy też kontrolować przebieg procesów technologicznych. Przeprowadzenie kompletnej analizy lipidów w tłuszczach spożywczych jest jednak wysoce skomplikowanym zadaniem. Naturalne tłuszcze to bowiem substancje o niezwykle złożonej i różnorodnej budowie. Bardzo często związki te ulegają różnym przemianom wchodząc w reakcje zarówno same ze sobą, jak też z innymi składnikami żywności. Ponadto, lipidy należą do związków wyjątkowo labilnych, szczególnie słabo odpornych na działanie czynników utleniających. Analiza tak skomplikowanego materiału musi być zatem prowadzona z zachowaniem pewnych środków ostrożności, tak aby zminimalizować wszelkie niepożądane reakcje jak np. autooksydacji.

### 5.4.1. Metody oznaczania tłuszczu surowego w produktach żywnościowych

W analizie żywności terminem *tłuszcz* określa się wszystkie substancje, które można wyekstrahować rozpuszczalnikiem organicznym, a które nie są lotne przy suszeniu trwającym jedną godzinę w temperaturze 105°C. Wydzielony w ten sposób materiał nazywa się *tłuszczem surowym*. Składnikami takiego tłuszczu są różnej klasy lipidy, w głównej mierze acyloglicerole, ale także fosfolipidy, wolne kwasy tłuszczowe, sterole, witaminy, barwniki.

Do oznaczenia zawartości tłuszczu surowego w produktach żywnościowych wykorzystuje się metody: ekstrakcyjne, objętościowe oraz instrumentalne.

### **Metody ekstrakcyjne**

Polegają na wydzieleniu tłuszczu bezpośrednio przy użyciu odpowiedniego rozpuszczalnika albo po wstępnym traktowaniu próby roztworem kwasu lub zasady. Oznaczanie ilości wyekstrahowanego tłuszczu przeprowadza się wagowo, refraktometrycznie lub densymetrycznie. I tak:

- *metody ekstrakcyjno-wagowe* – w tym przypadku ekstrakcję przeprowadza się zazwyczaj przy użyciu eteru etylowego, eteru naftowego, heksanu czy też chloroformu, a następnie rozpuszczalnik odparowuje się i waży pozostałość. Jest to metoda czasochłonna aczkolwiek uznawana za najdokładniejszą. Powszechnie stosowane do oznaczanie tłuszczu surowego metody ekstrakcyjno-wagowe to ekstrakcja w aparacie Soxhleta, metoda Weibulla-Stoldta, Roesse-Gottlieba i Schmidta-Bondzyńskiego-Ratzlaffa.

- *ekstrakcyjno-refraktometryczne* – polegają na ekstrakcji tłuszczu z badanej próby za pomocą określonej ilości odpowiedniego rozpuszczalnika o ustalonym współczynniku załamania światła, a następnie refraktometrycznym pomiarze współczynnika załamania światła otrzymanego ekstraktu. Podstawą wyznaczenia zawartości tłuszczu jest w tym przypadku różnica między współczynnikami refrakcji rozpuszczalnika i badanego ekstraktu. Przy tego typu analizach bardzo ważne jest dobranie odpowiedniego rozpuszczalnika do ekstrakcji tłuszczu. Rozpuszczalnik taki powinien charakteryzować się między innymi wysoką wartością współczynnika załamania światła, wysoką temperaturą wrzenia oraz nie powinien być lotny w temperaturze pomiaru. Najczęściej wykorzystuje się w tym celu bromonaftalen.

- *ekstrakcyjno-densymetryczne* – w tej metodzie najpierw dokonuje się ekstrakcji tłuszczu z próbki a następnie wyznacza gęstość wyciągu tłuszczowego i porównuje z krzywą wzorcową. Zawartość tłuszczu wylicza się na podstawie zmian w gęstości czystego rozpuszczalnika oraz gęstości ekstraktu tłuszczowego. Z uwagi na małą lotność oraz dużą gęstość najczęściej jako rozpuszczalnika stosuje się tutaj czterochlorek węgla.

### **Metody objętościowe (butyrometryczne)**

Polegają na rozpuszczeniu zawartych w próbce substancji białkowych i związków



towarzyszących przy pomocy kwasu siarkowego(VI), a następnie wydzieleniu tłuszczu za pomocą rozpuszczalnika organicznego. Proces ten przeprowadza się w specjalnych przyrządach zwanych tłuszczomierzami lub butyrometrami. Metody objętościowe stosuje się głównie do oznaczenia zawartości tłuszczu surowego w mleku i produktach mleczarskich, w przetworach mięsnych oraz gotowych posiłkach. Ich zaletą jest prostota, szybkość wykonania, nieskomplikowana aparatura a także stosunkowo niskie koszty pomiaru. Przykładem objętościowej metody oznaczania zawartości tłuszczu jest tzw. metoda Gerbera.

### **Metody instrumentalne**

W celu szybkiego oznaczania zawartości tłuszczu surowego w próbkach żywności można wykorzystać również takie techniki jak: spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektroskopię w bliskiej podczerwieni (NIR). W ten sposób oznacza się m.in.: zawartość tłuszczu w nasionach, margarynie, mięsie, produktach mleczarskich oraz w czekoladzie.

#### **5.4.2. Metody oznaczania poszczególnych klas lipidów w produktach żywnościowych**

Oznaczenie lipidów w produktach żywnościowych nie polega wyłącznie na określeniu ich ogólnej zawartości w postaci tłuszczu surowego. Istotne jest również zidentyfikowanie poszczególnych klas lipidów w próbce (np. triacyloglicerole, fosfolipidy, glikolipidy, sterole, wolne kwasy tłuszczowe), a także ilościowe oznaczenie każdego składnika. Kompleksową analizę lipidów w produktach spożywczych przeprowadza się głównie przy pomocy chromatografii kolumnowej (LC), chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Przed analizą za pomocą techniki chromatografii gazowej (GC) i cieczowej (HPLC) próbkę żywności należy odpowiednio przygotować. Służy do tego najczęściej technika *ekstrakcji do fazy stałej (SPE)*, która ma na celu rozdzielenie mieszaniny lipidów na poszczególne klasy. Jako fazę stałą stosuje się tu zazwyczaj kolumny krzemionkowe lub amino-propylowe, natomiast poszczególne frakcje lipidowe wymywa się przy pomocy mieszaniny takich rozpuszczalników jak: eter dietylowy, heksan, chloroform czy też metanol. W odróżnieniu od tradycyjnej chromatografii kolumnowej (LC) rozdział lipidów techniką SPE odbywa się przy użyciu znacznie mniejszych ilości eluentów, co jest bardziej przyjazne zasadom zielonej chemii.

*Chromatografia kolumnowa (LC)* – to najczęściej stosowana metoda służąca do rozdelenia lipidów na poszczególne frakcje. Podział następuje tu w zależności od powinowactwa do fazy stacjonarnej lub ruchomej, natomiast wymywanie poszczególnych klas lipidów odbywa się poprzez zmianę składu eluenta. Przykładowo lipidy neutralne są eluowane z kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym za pomocą chloroformu, glikolipidy za pomocą acetonu zaś fosfolipidy za pomocą metanolu. Rozdzielone w ten sposób lipidy można z kolei rozdzielać dalej stosując inne żele krzemionkowe oraz inne układy eluentów. I tak na przykład frakcję lipidów neutralnych można rozdzielić dodatkowo na węglowodory, estry cholesterolu, triacyloglicerole, cholesterol i diacyloglicerole, monoacyloglicerole wymywając je odpowiednio heksanem, heksanem z dodatkiem 2% eteru, heksanem z dodatkiem 5% eteru, heksanem z dodatkiem 15% eteru i czystym eterem. Ocenę ilościową każdej z otrzymanych frakcji przeprowadza się z kolei albo wagowo po uprzednim odparowaniu rozpuszczalników, albo techniką chromatografii gazowej, dodając wzorca wewnętrznego i przeprowadzając je w odpowiednie lotne pochodne, np. acyloglicerole w estry metylowe.

*Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)* – uznawana za bardzo cenne narzędzie w analizie zarówno prostych jak też złożonych lipidów. Główną zaletą tej metody są niskie koszty, szybkość i prostota. W analizie lipidów techniką TLC stosuje się zazwyczaj płytki wykonane z żelu krzemionkowego (faza stacjonarna), a jako fazę ruchomą kombinację takich rozpuszczalników jak: heksan, eter dietylowy i kwas octowy. Ten system pozwala rozdzielić od siebie acyloglicerole, wolne sterole, estry steroli, wolne kwasy tłuszczowe oraz inne neutralne lipidy. Do rozdzielania fosfolipidów stosuje się z kolei kombinację takich rozpuszczalników jak: chloroform – metanol – woda albo chloroform – metanol - kwas octowy. Ocenę ilościową frakcji wyodrębnionych metodą TLC prowadzi się następnie densytometrycznie, choć należy zaznaczyć, że jest to metoda głównie wykorzystywana do analiz jakościowych a rzadziej do ilościowych.

*Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)* – w analizie lipidów stosuje się ją od niedawna (1980 r.); charakteryzuje się dużą zdolnością rozdzielania lipidów na poszczególne klasy, a także wymaga użycia niewielkiej ilości próbki do analiz. Początkowo wykorzystywano ją wyłącznie do analiz lipidów o charakterze nienasyconym, gdyż jako jedyne wykazywały one zdolność do absorpcji promieniowania UV i tym samym można było oznaczać je przy pomocy detektora UV.

Obecnie najbardziej uniwersalnym detektorem wykorzystywanym w badaniach nad lipidami techniką HPLC jest laserowy detektor promieniowania rozproszonego (LLSD). Pozwala on oznaczać jakościowo i ilościowo wszystkie klasy lipidów, zarówno polarne jak i niepolarne, o charakterze nasyconym i nienasyconym. W dodatku rozdzielanie lipidów na poszczególne klasy techniką HPLC-LLSD można prowadzić w normalnym i odwróconym układzie faz. Przykładowe warunki pracy zestawu HPLC-LLSD w normalnym układzie faz to: kolumna Econosil Silica, eucja gradientowa od 0% fazy A (eter naftowy) do 100% fazy B (83,5% dichlorometan, 15% aceton i 1.5% izopropanol) z narostem liniowym w 20 min, temp. rurki dyfuzyjnej detektora 42°C, ciśnienie CO<sub>2</sub> od 0,1 do 0,2 MPa.

#### **5.4.3. Oznaczanie składu kwasów tłuszczowych w produktach żywnościowych**

Skład kwasów tłuszczowych w tłuszczach spożywczych oznacza się przy użyciu dwóch zasadniczych technik analitycznych, mianowicie chromatografii gazowej (GC) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Dobór odpowiedniej techniki zależy w głównej mierze od rodzaju analizowanej próbki, a także od takich czynników jak: długość łańcucha węglowodorowego, stopień nienasycenia oraz obecność różnych grup funkcyjnych.

#### **Analiza kwasów tłuszczowych techniką chromatografii gazowej (GC)**

Największym ograniczeniem w analizie kwasów tłuszczowych techniką chromatografii gazowej jest ich mała lotność. Przed wykonaniem analizy właściwej istnieje zatem konieczność przeprowadzenia tych związków w odpowiednie pochodne. W większości przypadków przeprowadza się je w mniej polarne estry metylowe, a niekiedy także w estry butylowe oraz trimetylosililowe (TMS). Jedynie krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, takie jak octowy, propionowy, walerianowy, są na tyle lotne, że nie wymagają uprzedniego przeprowadzania w pochodne. Metoda otrzymywania estrów metylowych kwasów tłuszczowych zależy głównie od charakteru analizowanej substancji. Jeżeli próbka zawiera wyłącznie wolne kwasy tłuszczowe to w tym celu powinien być użyty kwaśny reagent (np. MeOH-HCl). Natomiast w przypadku kwasów związanych z glicerolem (acylogliceroli) preferowana jest alkaliczna metanoliza.

Kwasy tłuszczowe w postaci pochodnych metylowych można analizować przy użyciu kolumn kapilarnych o różnej polarności. Stwierdzono jednak, że najbardziej efektywne rozdziały tych związków uzyskuje się na kolumnach o bardzo polarnych fazach stacjonarnych. Są to zazwyczaj fazy cyjanoetylosilikonowe oraz cyjanopropylosilikonowe.

W przypadku gdy badana mieszanina kwasów tłuszczowych zawiera w swym składzie zarówno kwasy krótkołańcuchowe i długołańcuchowe, to analizę prowadzi się w programowanej temperaturze. W ten sposób uzyskać można kompletny rozdział wszystkich składników mieszaniny, co zdecydowanie ułatwia ich identyfikację oraz ocenę ilościową.

Najbardziej odpowiedni w analizie większości kwasów tłuszczowych techniką GC jest uniwersalny detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Charakteryzuje się między innymi wysoką czułością, stabilnością nawet podczas analiz z programowaną temperaturą, krótkim czasem odpowiedzi czy też liniowością w szerokim zakresie stężeń. W analizie estrów metylowych kwasów tłuszczowych wykorzystuje się również detektor wychwytu elektronów (ECD) a także spektrometr mas zazwyczaj sprzężony w układzie GC-MS.

Analizę jakościową estrów metylowych kwasów tłuszczowych przeprowadza się tradycyjnie w oparciu o parametry retencji. Ponadto identyfikacji można również dokonać poprzez zastosowanie odpowiedniego detektora jakościowego. W tym przypadku najczęściej wykorzystuje się połączenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS). Oprócz parametrów retencji układ ten rejestruje widma mas i tym samym umożliwia przeprowadzenie kompletnej identyfikacji. Ocenę ilościową dla tej grupy związków przeprowadza się z kolei zazwyczaj albo poprzez zastosowanie metody wzorca wewnętrznego albo wyliczając procentowy udział każdego ze składników analizowanej mieszaniny.

### **Analiza kwasów tłuszczowych techniką wysokosprawnej chromatografii ciekłej (HPLC)**

Podczas analizy kwasów tłuszczowych techniką HPLC zazwyczaj wykorzystuje się dwa zasadnicze typy detekcji: detektor UV oraz detektor fluorescencyjny. W zależności od rodzaju stosowanej do analiz detekcji kwasy tłuszczowe należy uprzednio przeprowadzić w odpowiednie pochodne. W tym celu w przypadku detektora UV kwasy estryfikuje się alkoholem lub amidami, natomiast przy detekcji fluorescencyjnej

do estryfikacji kwasów stosuje się alkohol mający właściwości fluorescencyjne np. antranol.

Analizy kwasów tłuszczowych techniką chromatografii cieczowej prowadzi się zazwyczaj w odwróconym układzie faz (RP-HPLC). Stosowane w tym celu fazy stacjonarne to najczęściej żele krzemionkowe modyfikowane grupami oktadecylowymi (C18) oraz oktylowymi (C8). Rozdzielenie wykonuje się zarówno w warunkach izokratycznych jak też w gradiencie przy użyciu rozpuszczalników polarnych, takich jak: metanol, acetonitryl, woda. Kolejność elucji poszczególnych kwasów tłuszczowych zależy od długości łańcucha węglowodorowego (czasy retencji wzrastają wraz ze wzrostem długości łańcucha) oraz ilości wiązań podwójnych w cząsteczce kwasu (czasy retencji maleją wraz ze wzrostem ilości wiązań podwójnych). Technikę HPLC wykorzystuje się m.in. do ilościowych analiz krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

#### 5.4.4. Oznaczanie parametrów jakości tłuszczu

W trakcie przechowywania tłuszczu zachodzi wiele niekorzystnych zmian, w efekcie których pogarsza się ich jakość bądź też całkowicie ulegają zepsuciu. Procesy te nazywa się *jełczeniem*, a zachodzą głównie pod wpływem czynników zewnętrznych takich jak temperatura, światło, powietrze. Wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje zmian zachodzących w tłuszczach:

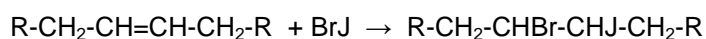
- zmiany hydrolityczne – powstają w wyniku działania warunków zewnętrznych, mikroorganizmów i enzymów tkankowych; prowadzą do uwalniania z glicerydów wolnych kwasów tłuszczowych, a także powodują rozpad wyższych kwasów tłuszczowych na kwasy o krótszym łańcuchu węglowym.
- zmiany spowodowane działaniem tlenu na nienasycone wiązania przy udziale światła i katalizatorów, np. jonów żelaza; w efekcie dochodzi do utlenienia (autooksydacji) tłuszczu i powstania nadtlenków, a następnie aldehydów i ketonów.

W celu określenia niekorzystnych zmian zachodzących w tłuszczach podczas jego przechowywania wprowadzono tzw. *liczby tłuszczowe*.

- **Liczba kwasowa (LK)** – jest miarą zawartości wolnych kwasów tłuszczowych powstałych w efekcie hydrolizy acylogliceroli; wyraża się ją jako ilość miligramów wodorotlenku potasu potrzebną do zobojętnienia kwasów tłuszczowych zawartych w 1 g badanego tłuszczu. Liczba kwasowa nie jest wartością stałą dla danego gatunku tłuszczu.
- **Liczba zmydlenia (LZ)** – parametr ten pozwala na określenie średniej masy

cząsteczkowej kwasów tłuszczowych; jest to liczba miligramów wodorotlenku potasu potrzebna do zobojętnienia wolnych kwasów tłuszczowych i zmydlenia acylogliceroli zawartych w 1 g badanego tłuszczu.

- **Liczba estrowa (LE)** – świadczy o długości łańcuchów kwasów tłuszczowych wchodzących w skład acylogliceroli danego tłuszczu; jest tym wyższa, im łańcuchy są krótsze; wyraża się ją jako ilość miligramów wodorotlenku potasu potrzebną do zmydlenia zestryfikowanych kwasów tłuszczowych zawartych w 1 g badanego tłuszczu. Oblicza się ją z różnicy pomiędzy liczbą zmydlenia (LZ) i liczbą kwasową (LK).
- **Liczba jodowa (LJ)** – charakteryzuje tłuszcz pod względem zawartości w nim nienasyconych kwasów tłuszczowych. Jest to liczba gramów chlorowca w przeliczeniu na jod, która przyłącza się w określonych warunkach do podwójnych wiązań kwasów tłuszczowych znajdujących się w 100 g badanego produktu.



- **Liczba nadtlenkowa (LOO)** – parametr ten służy do określenia zawartości nadtlenków i traktowany jest jako wskaźnik stopnia zjełczenia tłuszczu. Jest to liczba cm<sup>3</sup> mianowanego roztworu tiosiarczanu sodu potrzebna do zmiareczkowania jodu wydzielonego z roztworu jodku potasu w wyniku działania nadtlenków zawartych w 1 g tłuszczu.

## 5.5. Oznaczanie witamin

Ilościowe oznaczanie witamin sprawia wiele trudności, co jest spowodowane występowaniem ich w bardzo małych ilościach oraz wrażliwością na czynniki fizykochemiczne. Duża część witamin występuje w produktach w postaci związanej, co wymaga zastosowania np. hydrolizy kwasowej lub enzymatycznej. Jakościowe i ilościowe oznaczanie witamin i prowitamin wykonuje się różnymi metodami (metody fizykochemiczne, chemiczne). Ostatnio coraz częściej w analizie witamin stosuje się wysokosprawną chromatografię cieczową, najczęściej w odwróconym układzie faz z zastosowaniem kolumny RP-C18. Jako fazy ruchomej używa się mieszaniny wody (z dodatkiem kwasu octowego lub trifluoroctowego) i acetonitrylu, lub wody (z dodatkiem kwasu octowego lub trifluoroctowego) i metanolu. Do wykrywania związków lub ich grup w HPLC stosuje się różne rodzaje detektorów. Najczęściej

stosowanymi detektorami są detektory spektrofotometryczne (UV), spektrofotometryczne z matrycą diod (DAD) oraz spektrometry mas (MS).

### **5.5.1. Oznaczanie witamin rozpuszczalnych w wodzie**

#### **Oznaczanie witamin metodą wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC)**

Witaminę B<sub>12</sub> ekstrahuje się za pomocą 50 mM buforu octanu sodu o pH 4,0 w temperaturze 100 ° C przez 35 min, w obecności cyjanku sodu. Otrzymany ekstrakt oczyszcza się na kolumnie powinowactwa immunologicznego. Wyodrębnioną w taki sposób witaminę B<sub>12</sub> oznaczamy metodą HPLC z detekcją UV przy 361 nm w odwróconym układzie faz. Jako eluent stosuje się mieszaninę wody z dodatkiem kwasu trifluorooctowego (TFA) 0,025% i acetonitrylu.

Do równoczesnego oznaczania nikotynamidu, tiaminy, ryboflawiny, pirydoksyny, pirydoksalu, pirydoksaminy, cyjanokobalaminy i kwasu foliowego w mleku dla niemowląt stosuje się wysokosprawną chromatografię ciekową. Do rozdzielania witamin wykorzystuje się kolumnę C18. Fazę ruchomą stanowi mieszanina metanolu, wody (15:85, v/v), 5 mM kwasu oktanosulfonowego, 0,5% trietyloaminy, pH 3,6. Przygotowanie próbki polega na jej zakwaszeniu, strąceniu białek, odwirowaniu strąconego osadu. Otrzymany supernatant filtruje się przez filtr membranowy i analizuje według opisu przedstawionego powyżej.

Przykładowe warunki chromatograficzne rozdzielania mieszanin witamin rozpuszczalnych w wodzie (B5, B8, B12, B1, C, PP, B6, B9, B2) są następujące: kolumna C18, detektor DAD rejestrujący przy dwóch długościach fali:  $\lambda = 210$  nm dla witamin B5, B8 i B12 oraz  $\lambda = 275$  nm dla witamin B1, C, PP, B6, B9, B2. Jako fazę ruchomą stosuje się układ rozpuszczalników: acetonitryl (faza A), 0,025% wodny roztwór kwasu trifluorooctowego o pH 2,6 (faza B). Rozdział prowadzi się z zastosowaniem elucji gradientowej.

#### **Oznaczanie witaminy C w produktach spożywczych**

Wśród metod oznaczania witaminy C (zwanej też kwasem L-askorbinowym oraz kwasem askorbowym) można wyróżnić metody fizykochemiczne oraz metody chemiczne.

*Wysokosprawna chromatografia ciekowa.* Witamina C jest najbardziej stabilna w środowisku kwaśnym, dlatego do jej ekstrakcji z próbek stałych oraz rozcieńczania używa się rozcieńczonych roztworów kwasów: 2% kwasu szczawiowego, 3% kwasu

metafosforowego (V), 8% kwasu octowego czy 2% kwasu solnego. Zasada metody polega na oznaczeniu łącznej zawartości kwasów: L-askorbinowego i dehydroaskorbinowego. Kwas dehydroaskorbinowy jest redukowany do kwasu L-askorbinowego za pomocą DTT (ditiotreitolu). Witamina C oznaczana jest techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z zastosowaniem kolumny RP-C18 i detektora UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

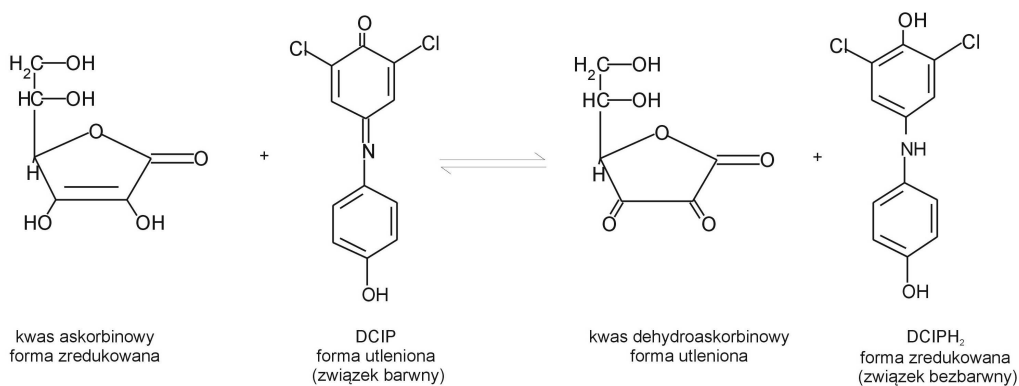
*Metoda fluorymetryczna.* Oznaczenie polega na utlenieniu kwasu L-askorbinowego do L-dehydroaskorbinowego i przeprowadzeniu reakcji z o-fenylendiaminą, w wyniku której powstaje fluoryzujący kompleks. Jego natężenie mierzy się przy długości fali światła wzbudzającego  $\lambda_{\text{Ex}} = 365 \text{ nm}$  oraz długości fali światła emitowanego  $\lambda_{\text{Ex}} = 430 \text{ nm}$ .

*Metoda spektrofotometryczna.* Rozdrobnioną próbkę zawieszają w rozcieńczonym kwasie metafosforowym(V), a następnie ekstrahuje chloroformem. W celu przeprowadzenia kwasu askorbinowego w kwas dehydroaskorbinowy faza wodna jest poddawana działaniu roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu, a następnie roztworu 2,4-dinitrofenylohydrazyny. Utworzony hydrazon jest ekstrahowany mieszaniną octanu etylu, lodowatego kwasu octowego i acetonu (96:2:2, v/v/v). Ekstrakt oczyszcza się metodą chromatografii adsorpcyjnej na kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym, jako fazę ruchomą stosuje się mieszaninę dichlorometanu i lodowatego kwasu octowego w stosunku objętościowym 97:3. Eluat odparowuje się do sucha i pozostałość rozpuszcza się w rozcieńczonym kwasie siarkowym. Absorbancję roztworu mierzy się spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 509 \text{ nm}$ . Pomiary przeprowadza się w odniesieniu do rozcieńczonego kwasu siarkowego.

*Jakościowe oznaczenie zawartości witaminy C metodą chromatografii cienkowarstwowej.* Roztwór kwasu L-askorbinowego (jako wskaźnik) i badaną próbkę nanosi się na płytkę chromatograficzną. Jako układ rozwijający można zastosować octan etylu. Chromatogram TLC należy umieścić pod lampą UV, gdzie na tej samej wysokości widoczne będą plamki pochodzące od wzorca i witaminy C zawartej w owocach. Do analizy jakościowej wykorzystuje się wartość współczynnika  $R_f$ .

*Metody chemiczne – metoda Tillmansa i jej modyfikacje.* Metoda Tillmansa oparta jest na redukcji 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez kwas L-askorbinowy. Przebieg reakcji przedstawiono na Rys. 78.





**Rys. 78.** Przebieg reakcji redukcji 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez kwas L-askorbinowy

Metoda ta sprowadza się do miareczkowania roztworu kwasu L-askorbinowego barwnikiem Tillmansa do momentu pojawienia się jasno różowego zabarwienia. Jest to metoda prosta, ale tylko w przypadku roztworów bezbarwnych i niezawierających innych związków powodujących redukcję odczynnika Tillmansa. W praktyce wiadomo, że większość surowców roślinnych zawiera barwniki antocyjanowe, które nadają ekstraktom witaminy C różowe zabarwienie, a także mają właściwości redukujące. Ponadto w produktach, w których oznaczamy witaminę C, występują inne związki ulegające utlenieniu podczas miareczkowania odczynnikiem Tillmansa. Należą do nich reduktory – związki obdarzone silnymi właściwościami redukującymi, które należy przypisywać obecności ugrupowania endiolowego. W przypadku oznaczania witaminy C w owocach i warzywach oraz ich przetworach mamy do czynienia z reduktonami białkowymi (aminokwasy lub białka zawierające grupy sulfhydrylowe, które są utleniane przez odczynnik Tillmansa do wiązań disulfidowych) oraz cukrowymi (pochodne cukrów, które powstają podczas obróbki termicznej).

W przypadku roztworów silnie zabarwionych stosuje się **modyfikację metody Tillmansa**, tzn. miareczkowanie 2,6-dichlorofenoloindofenolem w obecności rozpuszczalnika organicznego (chloroform, ksylen). Wykorzystuje się tu fakt zróżnicowanej rozpuszczalności. Barwniki antocyjanowe, w odróżnieniu od barwnika Tillmansa, nie rozpuszczają się w rozpuszczalniku organicznym, natomiast barwnik Tillmansa rozpuszcza się. Nadmiarowa kropla 2,6-dichlorofenoloindofenolu przechodzi do warstwy rozpuszczalnika barwiąc go na różowo. Właściwości witaminy C ma również kwas L-dehydroaskorbinowy. W celu oznaczenia całkowitej zawartości witaminy C przeprowadza się redukcję kwasu L-dehydroaskorbinowego do kwasu L-askorbinowego za pomocą siarkowodoru. Nadmiar siarkowodoru usuwa się przy użyciu sublimatu, przy czym strąceniu ulegają również reduktory białkowe. Na wynik miareczkowania

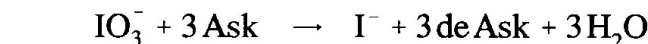
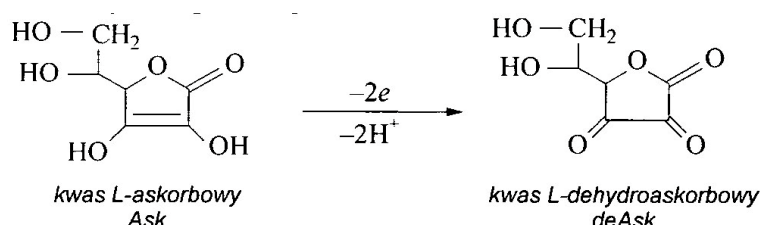
składa się zawartość kwasu L-dehydroaskorbinowego, kwasu L-askorbinowego i reduktonów cukrowych.

W oznaczeniach witaminy C metodą Tillmansa w produktach spożywczych należy wykonać cztery następujące miareczkowania:

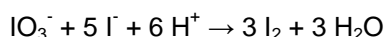
1. bezpośrednio miareczkowanie roztworu witaminy C – na wynik składa się zawartość kwasu L-askorbinowego, reduktonów białkowych i cukrowych,
2. miareczkowanie badanego wyciągu po przeprowadzonej uprzednio redukcji kwasu L-dehydroaskorbinowego do kwasu L-askorbinowego – na wynik składa się zawartość kwasu L-askorbinowego, kwasu L-dehydroaskorbinowego i reduktonów cukrowych,
3. miareczkowanie roztworu po uprzednim strąceniu kwasu L-askorbinowego reduktonów białkowych – wynikowi odpowiada zawartość reduktonów cukrowych,
4. miareczkowanie po strąceniu reduktonów białkowych – na wynik miareczkowania mają wpływ zawartość kwasu L-askorbinowego i reduktonów białkowych.

Wyniki czterech miareczkowań pozwalają na obliczenie całkowitej zawartości witaminy C po wyeliminowaniu wpływu obecności reduktonów białkowych i cukrowych.

*Jodanometryczne oznaczanie kwasu askorbinowego.* Roztwór badanej substancji zakwasza się kwasem chlorowodorowym, następnie dodaje się skrobi i miareczkuje mianowanym roztworem jodanu(V) potasu. Reakcja ta przebiega zgodnie ze schematem przedstawionym na Rys. 79.

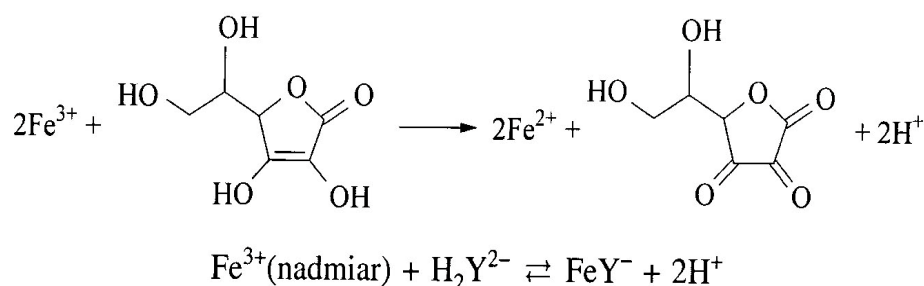


Po odmiareczkowaniu kwasu askorbinowego nadmiar jodu reaguje z kolei z powstałymi jodkami tworząc jod, który w reakcji ze skrobią daje niebiesko granatowe zabarwienie.



*Kompleksometryczne oznaczanie kwasu askorbinowego.* Kwas askorbinowy redukuje jony żelaza(III) do jonów żelaza(II) (Rys. 80). W środowisku kwaśnym żelazo(III) tworzy trwały kompleks z EDTA, natomiast żelazo(II) nie przeszkadza w oznaczeniu tworząc

bardzo słaby kompleks z EDTA. Wprowadzając znane ilości żelaza(III) do próbki zawierającej kwas askorbinowy i wykonując miareczkowanie roztworem EDTA oznaczają się niezredukowany nadmiar żelaza(III). Z różnicy liczby moli żelaza(III) przed redukcją i po redukcji wyznacza się liczbę moli żelaza(III), reagującego z kwasem askorbowym, a tym samym liczbę moli kwasu askorbinowego. W trakcie oznaczania zachodzą następujące reakcje:



Rys. 80. Reakcja redukcji żelaza(III) do żelaza(II) kwasem askorbinowym

### 5.5.2. Oznaczanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Oznaczanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach przeprowadza się z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną lub najlepiej fluorymetryczną. Rozdzielenie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach wykonuje się zarówno w normalnym, jak i odwróconym układzie faz. Przykładowe warunki chromatograficzne rozdzielania mieszanin witamin rozpuszczalnych w tłuszczach przedstawiono w Tabeli 29 i 30.

Tabela 29. Przykłady układów NP-HPLC do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Kolumna	Wymiary [mm]	Faza ruchoma [v:v]	Długość fali [nm]
Polygosil	250 x 8	izooktan/butanol (99:1)	265
LiChrospher	250 x 4	n-heksan:propan-2-ol (99:1)	265
LiChrospher	250 x 4	n-heksan:propan-2-ol (98:2)	265
μPorasil krzemionka	300 x 3,9	n-heksan:tetrahydrofuran: propan-2-ol (98/1:1)	265

Tabela 30. Przykłady układów RP-HPLC do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Kolumna	Wymiary [mm]	Faza ruchoma [v:v]	Długość
---------	--------------	--------------------	---------

			fali [nm]
Hypersil ODS, 5 µm	250 x 4,6	Metanol	265
LiChrospher 100 RP18, 5 µm	250 x 4,0	Metanol:woda (95:5)	265
Vydac 20TP 54	250 x 4,6	Metanol:woda (93:7)	265
Nucleosil C18, 5 µm	250 x 4,0	Acetonitryl:metanol (70:30)	265
Zorbax ODS	250 x 4,6	Acetonitryl:metanol (95:5)	265

W większości przypadków konieczne jest zmydlenie badanego materiału, a następnie wyodrębnienie badanej witaminy za pomocą odpowiedniej ekstrakcji (Tabela 31).

**Tabela 31.** Przykłady odpowiednich warunków ekstrakcji i zmydlenia stosowanych przy oznaczaniu witamin rozpuszczalnych w tłuszczach

Zmydlenie	Ekstrakcja
8 g tłuszczu, 100 cm <sup>3</sup> etanolu, 1 g askorbinianu sodu, 0,04 g siarczku sodu, 12 g KOH, 50 cm <sup>3</sup> wody, 80°C przez 30 min.	n-heksan 3 x 100 cm <sup>3</sup> , przemywanie wodą 4 x 100 cm <sup>3</sup>
12 g tłuszczu, 30 cm <sup>3</sup> etanolu, 30 cm <sup>3</sup> metanolu, 0,1 g kwasu askorbinowego, 30 cm <sup>3</sup> 50% KOH, 100°C przez 30 min.	eter dietylowy 2 x 100 cm <sup>3</sup> , przemywanie wodą 4 x 50 cm <sup>3</sup>
8 g tłuszczu, 100 cm <sup>3</sup> etanolu, 1 g kwasu askorbinowego, 50 cm <sup>3</sup> 50% KOH, 20°C przez 2 h	mieszanina eteru naftowego i dietylowego (1:1), 2 x 200 cm <sup>3</sup> , przemywanie wodą 4 x 50 cm <sup>3</sup>
24 g tłuszczu, 90 cm <sup>3</sup> etanolu, 0,5 g askorbinianu sodu, 30 cm <sup>3</sup> 60% KOH, 100°C przez 45 min pod chłodnicą zwrotną	eter dietylowy 1 x 150 cm <sup>3</sup> , 3 x 75 cm <sup>3</sup> , przemywanie wodą 4 x 200 cm <sup>3</sup>

### Oznaczanie tokoferoli z zastosowaniem metod chromatograficznych

Do próbki oleju słonecznikowego dodaje się kolejno kwas askorbinowy oraz roztwór KOH w etanolu. Zmydlenie prowadzi się w łaźni wodnej o temp. ok. 95°C. Następnie witaminę E ekstrahuje się eterem naftowym. Połączone ekstrakty przemywa się wodą,

Ślady wody usuwa się przez zastosowanie bezwodnego siarczanu sodu. Tak przygotowany ekstrakt eterowy odparowuje się do sucha na odparowywaczu obrotowym. Otrzymaną próbkę rozpuszcza się w fazie ruchomej i poddaje analizie metodą HPLC. Do analiz można użyć zestawu HPLC z detektorem UV ( $\lambda = 292 \text{ nm}$ ), wyposażonego w kolumnę C18 (250 x 4,6 mm). Jako fazę ruchomą stosuje się układ rozpuszczalników: acetonitryl (faza A) i metanol (faza B). Rozdzielenie prowadzi się z zastosowaniem elucji izokratycznej: 80% fazy A i 20% fazy B.

Poszczególne rodzaje tokoferoli oznacza się również metodą chromatografii cienkowarstwowej lub gazowej (w postaci pochodnych trimetylosililowych).

*Chromatografię cienkowarstwową (TLC)* wykonuje się na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym Si 60G oraz na płytkach HPTLC szklanych Si GF 254, w różnych układach chromatograficznych. Najkorzystniejszym układem jest: benzen – octan etylu (102:18 v/v). Chromatogramy wizualizuje się roztworem kwasu fosforowolframowego lub odczynnikiem Liebermanna-Burcharda.

*Chromatografia gazowa.* Do oznaczania tokoferoli w postaci trimetylosililowych pochodnych stosuje się chromatografię gazową z detektorem FID lub MS. Analizę chromatograficzną GC wykonuje się z zastosowaniem programowanej temperatury od 200 do 240°C, 4°C/min.

### **Oznaczanie witaminy A metodą spektrofotometryczną**

Witamina A zawiera w cząsteczce dużą liczbę sprzężonych wiązań nienasyconych, których maksimum absorpcji przypada w obszarze 328 nm. Oznaczanie karotenoidów w produktach naturalnych przeprowadza się najczęściej metodami spektrofotometrycznymi. Identyfikacja oparta jest na pomiarze absorbancji w zakresie światła widzialnego. Poszczególne karotenoidy wykazują charakterystyczne krzywe absorpcji. W Tabeli 32 podano maksima absorpcji  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -karotenów.

**Tabela 32.** Maksima absorpcji  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -karotenów

Karotenoid	Maksima absorpcji w eterze naftowym [nm]		
$\alpha$	422	444	473
$\beta$	(425)	451	482
$\gamma$	437	462	494

### **Oznaczanie witamin rozpuszczalnych w tłuszczach metodą kolorymetryczną**

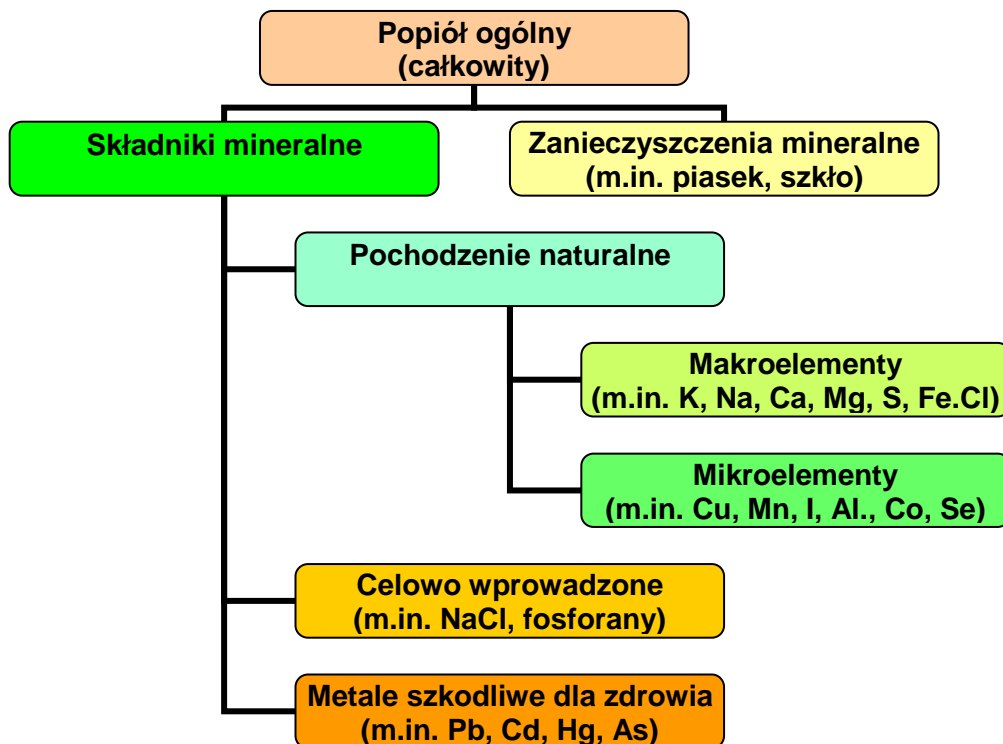
Do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach wykorzystuje się również metodę kolorymetryczną opartą na reakcji barwnej z chlorkiem antymonu(III), (witamina A - barwa niebieska, pomiar przy długości fali 620 nm, witamina D – barwa pomarańczowa, pomiar przy długości fali 500 nm). Oznaczenie tokoferoli wykonuje się w oparciu o metodę Emmeric-Engela. W odpowiednich warunkach tokoferole redukują jony  $Fe^{3+}$  do  $Fe^{2+}$ , które następnie tworzą barwne połączenie z  $\alpha,\alpha'$ -dipirydylem. Nie wszystkie tokoferole reagują w sposób identyczny. Ogólną zawartość tokoferolu wyraża się w przeliczeniu na  $\alpha$ -tokoferol. Przed właściwym oznaczaniem należy wyeliminować z próbki nadtlenki, karotenoidy i inne składniki redukujące. Analiza może być wykonana bezpośrednio lub po wyodrębnieniu substancji niezmydlających.

## 5.6. Oznaczanie składników mineralnych

Składniki mineralne występują w żywności w postaci roztworów soli kwasów nieorganicznych i organicznych oraz rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych związków kompleksowych. Różnorodność tych substancji oraz niski poziom stężeń wielu z nich sprawia, iż znalezienie uniwersalnych metod analitycznych umożliwiających analizę różnorodnych produktów spożywczych jest niezwykle trudne. W celu kontroli jakości produktów spożywczych oznaczanie składników mineralnych powinno być przeprowadzane zgodnie z obowiązującymi normami przedmiotowymi, przestrzegając ściśle zalecanych procedur analitycznych.

### 5.6.1. Popiół ogólny i jego charakterystyka

Miarą ogólnej ilości składników mineralnych w produkcie spożywczym jest zawartość **popiołu ogólnego (całkowitego)**, pozostającego po spaleniu próbki produktu w takich warunkach, w których nie następuje rozkład chlorków i utlenianie się chloru. Skład popiołu całkowitego przedstawiono na Rys. 81.



**Rys. 81.** Skład popiołu ogólnego (całkowitego) (Pacholek B. Oznaczanie zawartości składników mineralnych. W: Małecka M. (red.) *Wybrane metody analizy żywności* Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003, str. 21)

Ilość popiołu ogólnego jest jedynie pewnego rodzaju oszacowaniem zawartości związków mineralnych zawartych w produktach żywnościowych. Oprócz składników mineralnych obejmuje także zanieczyszczenia mineralne, którymi mogą być m.in piasek bądź szkło. Ilość i skład popiołu zależy zarówno od pochodzenia żywności jak i stosowanej metody mineralizacji próbki. Zawartość popiołu większości produktów mleczarskich mieści się w granicach 0,5-1,0%, w świeżych owocach w zakresie 0,2-0,8%, w warzywach i świeżym mięsie około 1%, natomiast w mące w zależności od typu w granicach od 0,45 do 2,0%. Ponieważ część składników mineralnych ma charakter kwasotwórczy (m.in. chlor, siarka, fosfor), inne są zasadowe (np. wapń, sód czy potas) mogą one nadawać popiołowi odczyn kwaśny (zboża i ich przetwory, mięso, ryby, jaja) lub odczyn zasadowy (m.in. mleko, owoce, warzywa i ich przetwory). Charakterystykę popiołu przeprowadza się przez oznaczenie:

- zawartości popiołu ogólnego (całkowitego),
- zawartości popiołu rozpuszczalnego w 10% roztworze kwasu solnego,
- zawartości popiołu rozpuszczalnego w wodzie,
- odczynu popiołu,

- zawartości poszczególnych składników mineralnych.

Aby oznaczyć popiół całkowity należy w wielu przypadkach próbkę zmineralizować. Wykonuje się ją również w celu przeprowadzenia składników mineralnych do roztworu oraz w celu zwiększenia stężenia składników mineralnych. Wykonuje się ją techniką na „sucho” i na „mokro”.

*Mineralizacja na „sucho”* jest podstawową metodą oznaczania popiołu w produktach spożywczych. Polega ona na ustaleniu masy pozostałości po spopieleniu próbki w określonych warunkach. Najczęściej stosowany sposób spopielenia polega na ogrzewaniu próbki w tyglach w nadmiarze tlenu, w ściśle znormalizowanych warunkach. Istotnymi czynnikami wymagającymi kontroli podczas spopielenia są: temperatura, czas, stosowane naczynia.

Spopielenie próbki przebiega w dwóch etapach:

- zwęglenie próbki (utlenienie związków organicznych do tlenków, z których lotne zostaną usunięte w postaci dymów, a sole kwasów organicznych zostaną przeprowadzone w tlenki i węglany),
- prażenie w wysokiej temperaturze (zazwyczaj 550-600°C) do stałej masy. Przekroczenie temp. 800°C powoduje duże straty popiołu wskutek rozkładu chlorków i węglanów, którym częściowo można zapobiec wprowadzając octan magnezu lub związki litowców.

Czas spopielenia wynosi zwykle 16-18 godzin. Warunki zależą przede wszystkim od składu chemicznego próbki, głównie topliwości i lotności występujących w niej soli i temperatury spalania. Trudniej stapiają się substancje kwaśne od zasadowych lub zawierające duże ilości białka. Produkty półpłynne i płynne (np. soki) należy zagęścić na łaźni wodnej. Jeżeli spopielenie zachodzi opornie można zastosować substancje utleniające, np. kwas azotowy(V) lub nadtlenek wodoru.

*Mineralizacja na „mokro”* - próbkę rozkłada się za pomocą mocnych kwasów mineralnych np. kwasu azotowego(V), czy siarkowego(VI). Wykonuje się ją w specjalnych piecach mikrofalowych lub kolbach Kjeldahla. Oprócz kwasów wprowadza się także często inne substancje utleniające. Metoda ta charakteryzuje się znacznie niższą temperaturą (125-350°C). Mineralizacja na „mokro” jest zalecana do oznaczania takich składników jak wapń, fosfor oraz do wykrywania i oznaczania pierwiastków szkodliwych dla zdrowia, np. arsenu i ołowiu.



Dalsza analiza popiołu ogólnego polega na rozpuszczeniu go w 10% roztworze kwasu solnego. Ta część popiołu ogólnego, która jest rozpuszczalna w 10% roztworze kwasu solnego zawiera składniki mineralne. Popiół nierozpuszczalny w 10% roztworze HCl zawiera z kolei zanieczyszczenia mineralne. Oznaczanie tej frakcji jest zalecane przy badaniu zbóż, przetworów zbożowych, herbat, owoców, warzyw.

Kolejnym rodzajem popiołu oznaczanego w próbkach spożywczych jest oznaczanie **popiołu rozpuszczalnego w wodzie**. Określa się go przez ekstrakcję popiołu ogólnego za pomocą gorącej wody i oznaczeniu pozostałości nierozpuszczalnej. Różnica mas popiołów wskazuje na zawartość popiołu rozpuszczalnego. Wśród składników mineralnych rozpuszczalnych w wodzie znajdują się głównie sole sodu, potasu, chlorki i węglany. Zawartość popiołu rozpuszczalnego w wodzie jest wskaźnikiem m.in. zawartości owoców w konserwowanych dżemach i marmoladach.

Kolejnym ważnym wskaźnikiem jakości produktu jest **odczyn popiołu**. Określa się go na podstawie ilości zużytego mianowanego roztworu kwasu lub zasady potrzebnej do zobojętnienia popiołu otrzymanego z próbki badanej, rozpuszczonego w znanej ilości kwasu. Odczyn popiołu ma duże znaczenie w badaniu zafałszowań żywności związkami mineralnymi.

W przypadku niektórych produktów żywnościowych nie ma potrzeby wykonywania mineralizacji. Oznaczenie zawartości składników mineralnych przeprowadza się bezpośrednio na próbce lub stosując odpowiednią ekstrakcję, np. przy oznaczaniu sodu i potasu w produktach owocowych. Często stosuje się metodę konduktometryczną i polega ona na pomiarze przewodnictwa roztworu badanego materiału o ściśle określonym stężeniu, gdyż istnieje zależność pomiędzy ilością soli rozpuszczalnych (popiołu) a przewodnością roztworu. Metoda ta jest szybka, ale niedokładna. Stosowana jest głównie do oznaczania zawartości popiołu w cukrze czy mące.

### **5.6.2. Metody oznaczania poszczególnych składników mineralnych**

Ważnym aspektem analizy składników mineralnych jest oznaczanie poszczególnych pierwiastków (lub jonów) obecnych w produktach żywnościowych. Opracowano wiele metod analitycznych, a do podstawowych należą:

- metody miareczkowe (głównie kompleksometryczne, strąceniowe),

- grawimetryczne,
- spektrofluorymetryczne,
- fluorescencji rentgenowskiej,
- kolorymetryczne,
- polarograficzne,
- z wykorzystaniem elektrod jonoselektywnych,
- emisyjna spektrofotometria atomowa ze wzbudzeniem: w płomieniu palnika (FAES), elektrotermicznym (ET-AES) oraz w plazmie wzbudzonej indukcyjnie ICP-AES),
- metoda absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (AAS) - metoda najczęściej stosowana,
- spektrometria mas z jonizacją w plazmie wzbudzonej indukcyjnie (ICP-MS)
- metody chromatograficzne – np. chromatografia jonowymienna.

Poniżej przedstawione zostaną wybrane praktyczne zastosowania kilku metod.

Szybkie oznaczanie składników mineralnych i zanieczyszczeń żywności umożliwiają elektrody jonoselektywne. Dzięki nim można oznaczyć około 50 różnych kationów i anionów, z tym że poważnym ograniczeniem jest mała powtarzalność wyników i duży wpływ czynników przeszkadzających. Selektowność oznaczeń zwiększono gdy membranę szklaną zastąpiono sprasowaną mieszaniną trudno rozpuszczalnych soli oznaczanego pierwiastka.

Za pomocą emisyjnej spektrofotometrii płomieniowej AES można oznaczyć około 20 pierwiastków. Z kolei absorpcyjna spektrometria atomowa AAS jest najczęściej stosowaną metodą analizy składników mineralnych, umożliwiającą oznaczanie około 60 metali na poziomie śladów, bez konieczności wstępnego przygotowania próbki.

Do oznaczania zawartości chlorków w żywności stosuje się najczęściej miareczkowanie strąceniowe – metodę Mohra i metodę Volharda oraz jonoselektywne elektrody chlorkowe.

Inną metodą stosowaną w oznaczaniu składników mineralnych jest metoda grawimetryczna. Wykorzystana została ona do oznaczania zawartości wapnia w wodzie. Oznaczanie polega na strącaniu jonów wapnia za pomocą szczawianu amonu, a następnie wagowym oznaczeniu wytworzonego w tej reakcji tlenku wapnia.

Przykładem zastosowania metod miareczkowych jest oznaczanie kompleksometryczne jonów wapnia i magnezu w wodzie za pomocą EDTA.

Metoda fluorymetryczna jest stosowana w oznaczaniu selenu. Stosuje się w niej bufor glicynowy i 2,3-diaminonaftalen. Reakcję prowadzi się 1 godzinę w temperaturze 60°C, próbkę ekstrahuje cykloheksanem i do wzbudzenia fluorescencji używa się fali elektromagnetycznej o długości 378 nm, po czym bada natężenie wiązki emitowanej fluorescencji przy 520 nm.

## 6. Metody oznaczania zanieczyszczeń żywności

### 6.1. Oznaczanie dioksyn

Standardowa analiza dioksyn obejmuje następujące etapy:

- dodanie do próbki wewnętrznego standardu znaczonego izotopem  $^{13}\text{C}$ ,
- suszenie próbki,
- ekstrakcję w aparacie Soxhleta,
- oczyszczanie próbki metodą chromatografii cieczowej z kolumnami wypełnionymi np. żelem krzemionkowym lub węglem aktywnym,
- oznaczanie ilościowe poszczególnych kongenerów metodą chromatografii gazowej połączoną z wysokorozdzielczą spektrometrią mas.

Pierwszym etapem analizy zawartości dioksyn jest izolacja ich z badanej próbki. Jest to dość trudne zadanie z tego względu, że dioksyny w produktach żywnościowych występują na poziomie ng/kg. Dodatkowym utrudnieniem jest duża rozpuszczalność dioksyn w tłuszczach. Przygotowanie próbek do analiz polega na ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe w aparatach Soxhleta oraz technikami mikrofalowymi. Z analizowanej żywności należy usunąć wodę, np. poprzez liofilizację. Z mleka należy usunąć białko poprzez strącenie za pomocą szczawianu sodu, a następnie ekstrahować w układzie ciecz-ciecz eterem dietylowym. Mięso powinno zostać zhomogenizowane i suszone bezwodnym siarczanem sodu. Ze względu na straty dioksyn podczas przygotowania próbek do analiz należy określić odzysk. W tym celu stosowane są wzorce znaczone izotopowo  $^{13}\text{C}$ -PCDDs,  $^{13}\text{C}$ -PCDFs i  $^{13}\text{C}$ -PCBs, które wprowadza się do próbek przed analizą.

Końcowe analizy dioksyn wykonuje się techniką chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas z podwójną fragmentacją (GC-MS/MS) lub z wykorzystaniem wysokorozdzielczych spektrometrów mas. Można zastosować również spektrometrię mas w trybie monitorowania wybranego jonu (*SIM - Selected Ion Monitoring*), zapewnia to wysoką selektywność i czułość oznaczenia na poziomie pikogramowym.

Obliczenie toksyczności próbki (TEQ - *Toxic Equivalency*) dokonuje się za pomocą tzw. współczynnika równoważnego toksyczności (TEF) (Tabela 33).

Na podstawie wyników analiz zawartości wszystkich siedemnastu kongenerów PCDDs/PCDFs oblicza się toksyczności próbki (Rys. 82) z poniższego wzoru:

$$TEQ = \sum_{i=1}^{i=17} (m_i \times TEF_i)$$

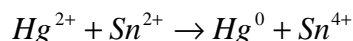
**Rys. 82.** Toksyczności próbki;  $m_i$ - masa pojedynczego kongeneru, w pg lub w ng,  $TEF_i$ - współczynnik równoważny toksyczności dla i-tego kongeneru PCDD/F, w odniesieniu do kongeneru 2,3,7,8-TCDD

**Tabela 33.** Wartości współczynnika równoważnego toksyczności TEF dla PCDDs i PCDFs

Kongener PCDDs	TEF
<b>2,3,7,8-TCDD</b>	1
1,2,3,7,8-P <sub>5</sub> CDD	1
1,2,3,4,7,8-H <sub>6</sub> CDD	0,1
1,2,3,6,7,8- H <sub>6</sub> CDD	0,1
1,2,3,7,8,9- H <sub>6</sub> CDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8- H <sub>7</sub> CDD	0,01
OCDD	0,0001
Kongener PCDFs	TEF
<b>2,3,7,8-TCDF</b>	0,1
2,3,4,7,8- P <sub>5</sub> CDF	0,5
1,2,3,7,8- P <sub>5</sub> CDF	0,05
1,2,3,4,7,8- H <sub>6</sub> CDF	0,1
1,2,3,6,7,8- H <sub>6</sub> CDF	0,1
1,2,3,7,8,9- H <sub>6</sub> CDF	0,1
2,3,4,6,7,8- H <sub>6</sub> CDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8- H <sub>7</sub> CDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9- H <sub>7</sub> CDF	0,01
OCDF	0,0001

## 6.2. Oznaczanie rtęci

Zawartość rtęci ogółem można oznaczać techniką zimnych par bezpłomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (CV-AAS). Metoda CV-AAS polega na pomiarze absorpcji przez pary molekuł rtęci promieniowania o długości fali  $\lambda = 253,7$  nm. W trakcie analizy jony rtęci redukuje się do rtęci elementarnej ( $Hg^0$ ) za pomocą  $SnCl_2$  (Rys. 83):



Rys. 83. Redukcja jonów rtęci

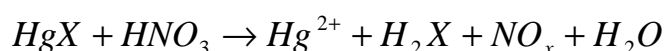
Stężenie rtęci w próbce oblicza się ze wzoru (Rys. 84):

$$X = \frac{A_1 \cdot a \cdot V}{A_2 \cdot b \cdot m} \cdot 1000$$

Rys. 84. Wzór, z którego oblicza się stężenie rtęci;  $X$  – stężenie rtęci w próbce [ng Hg/g],  $A_1$  – powierzchnia sygnału próbki [ $mm^2$ ],  $A_2$  – powierzchnia sygnału wzorca [ $mm^2$ ],  $a$  – ilość dodanego wzorca (0,001 ng),  $b$  – objętość mineralizatu użyta do oznaczenia ( $1\text{ cm}^3$ ),  $m$  – naważka użyta do mineralizacji [g],  $V$  – końcowa objętość mineralizatu [ $cm^3$ ]

**Przygotowanie próbki do analizy.** Przygotowanie próbki polega na mineralizacji na mokro organicznych i nieorganicznych składników preparatu za pomocą stężonego roztworu kwasu azotowego (65%  $HNO_3$ ), posiadającego właściwości utleniające:

a) nieorganiczne związki rtęci



b) organiczne związki rtęci



W wyniku mineralizacji materiału organicznego węgiel zostaje utleniony do ditlenku węgla, wodór do wody, azot substancji organicznej (najczęściej aminowy) przechodzi w wolny azot. Nadmiar utleniacza usuwany jest poprzez dodanie do roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy.

Przygotowanie próbek przebiega w następujących etapach:

- odważenie od 0,1 g do 1 g próbki,
- dodanie  $4\text{ cm}^3$  stężonego kwasu azotowego (65%  $HNO_3$ ) i pozostawienie na 24 godziny,

- ogrzewanie mineralizatu w stanie łagodnego wrzenia przez 1,5 godziny pod chłodnicą zwrotną,
- schłodzenie roztworu,
- przesączenie mineralizatu do cylindrów miarowych i uzupełnienie do objętości 25 cm<sup>3</sup> wodą redestylowaną.

Tak przygotowaną próbkę poddaje się analizie na zawartość rtęci metodą zimnych par bezpłomieniowej absorpcyjnej spektroskopii atomowej (CV-AAS). W celu usunięcia śladów rtęci roztwór redukcyjny dozowany do kuwety reakcyjnej aparatu wcześniej powinien być przedmuchiwany azotem. Z każdą serią 10 mineralizowanych analizowanych próbek, należy analizować 1 próbkę odczynnikową. Granica wykrywalności wynosi, w zależności od nastawionych parametrów pracy aparatu, od < 1 do 1000 pg Hg/cm<sup>3</sup>. Oznaczalność metody wynosi 1 ng/g masy mokrej próbki, a granica wykrywalności wynosi 0,5 pg Hg/cm<sup>3</sup>.

### 6.3. Oznaczanie WWA

Do wydzielenia frakcji wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z wody można zastosować ekstrakcję SPE i oznaczyć te anality techniką GC/FID. Do ekstrakcji WWA z wody stosowane są niepolarne fazy oktadecylowe (C-18) lub fazy oktadecylowe w połączeniu z polarnymi fazami, np. aminopropylową. Ekstrakcja do fazy stacjonarnej przebiega w następujących etapach:

- przemycie kolumnienki rozpuszczalnikami mającymi siłę eluotropową większą niż stosowane eluenty. W ten sposób usuwa się alkanany, alkeny, alkiloftalany, silanole i siloksany,
- kondycjonowanie wypełnionych kolumnienek (złoża sorbentu). Żel krzemionkowy modyfikowany fazą oktadecylową najpierw przemywa się metanolem lub 2-propanolem, a następnie mieszaniną wody i 2-propanolu. W czasie kondycjonowania łańcuchy węglowodorowe ulegają wyprostowaniu oddalając się od powierzchni sorbentu i tworzą znacznie powiększoną powierzchnię aktywną,
- naniesienie na kolumnienkę próbki wody,
- usunięcie (z przestrzeni między cząstkami sorbentu oraz z wnętrza jego porów) substancji niezwiązanych przez przemycie czystym rozpuszczalnikiem, w którym znajdował się analit. W ten sposób usuwa się interferenty pochodzące z matrycy, co zwiększa czystość analizowanej frakcji,

- suszenie pozostałości rozpuszczalnika strumieniem powietrza,
- elucja analitów – w przypadku ekstrakcji WWA z wody z zastosowaniem niepolarnych faz oktadecylowych (C-18) najczęściej stosuje się elucję następującymi rozpuszczalnikami: dichlorometan, pentan, heksan, aceton, octan etylu, acetonitryl lub ich mieszaninami.

Wydzieloną i zatężoną frakcję WWA (np. w strumieniu azotu) można analizować techniką chromatografii gazowej. Przykładowe warunki analizy:

- kolumna kapilarna RTX-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$  )
- początkowa temp. kolumny 80°C, narost 4°C/min do 310°C; 10 min a następnie izotermicznie w 310°C,
- temperatura dozownika 310°C,
- temperatura detektora (FID) 310°C,
- gaz nośny Ar, 90 kPa.

#### **6.4. Oznaczanie mikotoksyn**

Do ilościowej analizy mikotoksyn wykorzystuje się przede wszystkim techniki chromatograficzne: chromatografię cienkowarstwową (TLC), chromatografię gazową (GC) i wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC) oraz metody immunologiczne: radioimmunologiczne i immunoenzymatyczne. Do analiz jakościowych często wykorzystywana jest spektrometria mas i połączenia spektrometrii mas z chromatografią gazową i cieczową.

#### **6.5. Ocena mutagenności i rakotwórczości składników żywności**

Substancje rakotwórcze i mutagenne są składnikami żywności, które wywierają niekorzystny wpływ na zdrowie i życie ludzi i dlatego muszą być w miarę łatwo wykrywane i stale kontrolowane. Do oceny rakotwórczości składników obecnych w żywności służą tanie i szybkie testy. Jako że kancerogenność związków chemicznych bardzo często wiąże się z ich zdolnością do wywołania mutacji, testy te opierają się właśnie na ocenie mutagenności owych substancji. Właściwości mutagenne stosunkowo łatwo i szybko wykrywa się przy użyciu bakterii. Przyjmuje się wówczas założenie, że gdy badany czynnik powoduje uszkodzenie bakteryjnego DNA i wywołuje w nim mutacje, to w podobny sposób może również oddziaływać na DNA organizmów wyższych.



Spośród wielu bakteryjnych testów mutagenności w kontroli żywności najczęściej stosowany jest **test Ames**. Używa się w nim zmieniony genetycznie szczep bakterii *Salmonella typhimurium* niezdolny do syntezy histydyny. Bakterie wysiewa się na pożywkę z dodatkiem takiego stężenia histydyny, który umożliwia zaledwie minimalny wzrost tej bakterii. Zachodzi wówczas samorzutna tzw. powrotna mutacja w zmienionym genie, która przywraca bakteriom zdolność do syntezy histydyny i tym samym umożliwia jej wzrost i tworzenie kolonii. Częstotliwość tych samorzutnych powrotnych mutacji zdecydowanie zwiększa się w obecności mutagenów. Im silniejszy mutagen działa na bakterię tym zwiększa się prawdopodobieństwo, że odzyskają one zdolność do syntezy histydyny.

Zdolność danej substancji do wywoływania nowotworów (tzw. badania rakotwórczości) prowadzi się z kolei najczęściej na myszach i szczurach. Zwierzętom podaje się badaną substancję w różnych dawkach, a następnie obserwuje się zachodzące zmiany zarówno w ich wyglądzie i zachowaniu. Największe stężenie zaaplikowanej substancji, które nie powoduje ubytku masy zwierzęcia ani innych oznak zagrożenia jego życia, odpowiada maksymalnej dawce tolerancji. W badaniach tych ustala się także dawkę, przy której możliwe jest jeszcze zaobserwowanie szkodliwych skutków podania substancji rakotwórczej. Mniejsza dawka uważana jest już za taką, która nie ma żadnego efektu biologicznego (ang. *no-effect level*). Jeżeli tę wartość podzieli się z kolei przez 100 lub 1000 otrzymuje się wówczas tzw. dopuszczalną dawkę dzienną substancji rakotwórczych dla człowieka.

Przedstawione tu testy oceny mutagenności i rakotwórczości nie są idealne i budzą wiele zastrzeżeń. Przykładowo test Ames nie jest w stanie jednoznacznie określić, czy związki mutagenne są jednocześnie kancerogenami. W dodatku pojawia się też pytanie na ile rakotwórczość obserwowana u zwierząt może być ekstrapolowana na człowieka. Z całą pewnością można powiedzieć, że badania te nie odzwierciedlają w pełni zagrożenia jakie niosą różne składniki żywności na zdrowie konsumenta. Ważne jest jednak to, że umożliwiają identyfikację tych szkodliwych substancji w żywności.

## 7. Metody oznaczania dodatków do żywności

### 7.1. Metody oznaczania konserwantów

Do oznaczenia substancji konserwujących w produktach spożywczych stosuje się metody chromatograficzne, kolorymetryczne, spektrofotometryczne i miareczkowe. Dobór odpowiednich warunków analiz jest ściśle związany z rodzajem i właściwościami fizykochemicznymi badanych substancji. Metody wykorzystywane do analizy konserwantów omówione zostaną na przykładzie kwasu benzoowego i kwasu sorbowego.

**Metoda spektrofotometryczna.** Przed oznaczeniem kwasu benzoowego metodą spektrofotometryczną, należy wykonać ekstrakcję przy użyciu eteru etylowego, reekstrakcję alkaliczną, a następnie ekstrakt oczyszcza się zakwaszonym roztworem dichromianu potasu. Kwas benzoowy w tak przygotowanej próbce oznacza się przy długości fali 272 nm. Metodę tę stosuje się również do oznaczania kwasu sorbowego. Kwas sorbowy oddestylowuje się z parą wodną, a następnie jego zawartość w destylacie oznacza się przy długości fali 256 nm.

**Metoda kolorymetryczna.** Do kolorymetrycznego oznaczania substancji konserwujących w żywności wykorzystuje się barwne kompleksy konserwantów z odpowiednimi związkami, np. kwasu benzoowego z hydroksyloaminą, kwasu sorbowego z kwasem 2-tiobarbiturowym. Zawartość kwasu benzoowego można oznaczyć również metodą miareczkową. Polega ona na ekstrakcji kwasu benzoowego chloroformem, odparowaniu rozpuszczalnika, rozpuszczeniu pozostałości w alkoholu etylowym i miareczkowaniu otrzymanej próbki roztworem wodorotlenku sodu w obecności fenoloftaleiny.

**Metody chromatograficzne: GC i HPLC.** Obecnie w analizie substancji konserwujących coraz częściej wykorzystuje się metody chromatograficzne. Do jakościowej i ilościowej analizy kwasu benzoowego w produktach spożywczych stosuje się chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz. Jako fazy ruchome można zastosować następujące mieszaniny: woda/metanol/kwas octowy (69:28:3, v/v/v); metanol/bufor octanu amonu pH 4,6 (50:50, v/v).

### **Oznaczanie kwasu benzooesowego i sorbowego w produktach spożywczych metodą HPLC**

Przed przystąpieniem do analizy właściwej, w celu usunięcia białek i tłuszczu, do próbki dzemu dodaje się metanolu. Po strąceniu, osad usuwa się przez odwirowanie, a otrzymany supernatant analizuje techniką HPLC. Rozdzielanie chromatograficzne wykonuje się w warunkach izokratycznych z zastosowaniem kolumny C18 i mieszaniny buforu octanowego (pH 4,4) - metanolu (65:35, v/v) jako fazy ruchomej. Eluat jest monitorowany przy 235 nm.

Około 10 g dokładnie rozdrobnionej próbki mięsa ekstrahuje się 70 cm<sup>3</sup> etanolu. Po przefiltrowaniu ekstrakt jest analizowany metodą chromatografii cieczowej z detektorem UV (254 lub 280 nm). Jako fazę stacjonarną wykorzystuje się złożę C18, a jako fazę ruchomą mieszaninę buforu octanu amonu (faza A) i metanolu (faza B). Do rozdzielania kwasu benzooesowego i sorbowego stosuje się elucję gradientową: od 10 % fazy B do 70 % fazy B w ciągu 25 min.

### **Oznaczanie kwasu benzooesowego i sorbowego w produktach spożywczych metodą GC**

Do około 15 g próbki produktu spożywczego dodaje się 50 cm<sup>3</sup> wody i miesza szklaną bagietką. Następnie do próbki wprowadza się 5 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20%) i 75 ml eteru i wstrząsa się przez 5 minut. Próbkę odwirowuje się, po czym warstwę eteru przenosi do kolby i ekstrahuje dwukrotnie 50 ml 0,5 M NaOH i 30 cm<sup>3</sup> nasyconego NaCl. Następnie ekstrakty zakwasza się roztworem HCl do pH < 1, dodaje dichlorometanu i bezwodnego Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a następnie odparowuje do sucha w temp. 40°C. Tak przygotowaną próbkę poddaje się reakcji derywatyzacji (metylowanie przy użyciu diazometanu, silylowanie z zastosowaniem MSTFA (*N*-metylo-*N*-trimetylosilyltryfluoroacetamid). Reakcję derywatyzacji wykonuje się w podwyższonej temperaturze, po czym próbkę poddaje się analizie metodą GC-FID. Przykładowe warunki analizy GC: kolumna RTX-5, gaz nośny – hel, program temperaturowy 80°C przez 5 min, od 80°C do 230°C, 2°C/min., a następnie izoterma w 230°C przez 10 min. Temperatura dozownika 250°C, detektora FID - 280°C.

## **7.2. Metody oznaczania przeciwutleniaczy**

Do analizy przeciwutleniaczy w produktach spożywczych wykorzystuje się metody kolorymetryczne i chromatograficzne (TLC, GC, HPLC). W przypadku HPLC rozdzielanie przeciwutleniaczy wykonuje się w odwróconym układzie faz (kolumna wypełniona złożem C18) z zastosowaniem mieszaniny metanolu i wody (70:30, v/v) lub acetonitrylu i wody (68:32, v/v) jako fazy ruchomej.

### Oznaczanie przeciwutleniaczy z zastosowaniem HPLC

Do oznaczenia wybranych przeciwutleniaczy (PG - galusan propylu, THBP - 2,4,5-trihydroksybutyrofenon, BHA – butylohydroksyanizol, BHT - butylohydroksytoluen, AKP - palmitynian askorbylu) w gumie do żucia stosuje się metodę HPLC. Przygotowanie próbki w dużej mierze zależy od matrycy. W przypadku próbki o niskiej zawartości tłuszczu stosuje się ekstrakcję cieczą w łaźni ultradźwiękowej. Dla próbek o bardziej złożonych matrycach, konieczne jest zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej, ekstrakcji ciecz/ciecz lub destylacji z parą wodną. Przed analizą właściwą próbkę ekstrahuje się acetonitrylem z zastosowaniem ultradźwięków. Otrzymany ekstrakt zatęża się i analizuje techniką HPLC z detektorem DAD. Do analizy wykorzystuje się kolumnę C18 (100 x 4 mm, 3 µm). Jako fazę ruchomą stosuje się: wodę z dodatkiem kwasu siarkowego (pH 2,5) – faza A oraz acetonitryl – faza B, przepływ fazy ruchomej 0,5 ml/min. Rozdzielenie wykonuje się w programie elucji gradientowej:

Czas [min]	Rozpuszczalnik A	Rozpuszczalnik B
0	90	10
3	40	60
7	20	80
11	10	90

Do rozdzielania 9 przeciwutleniaczy fenolowych (galusan propylu, galusan oktylu, galusan dodecyłu, 3-*tert*-butylo-4-hydroksyanizol, *tert*-butylohydrochinon, 3,5-di-*tert*-butylo-4-hydroksytoluen, 2,6-di-*tert*-butylo-4-hydroksymetylo-fenol, 2,4,5-trihydroksybutyrofenon i 4,4'-(2,3-dimetylobutano-1,4-diyl)dibenzeno-1,2-diol, jak również α- i δ-tokoferol, α-tokoferol β- i γ-tokoferol, stosuje się chromatografię cieczową z detekcją UV. Przed analizą właściwą próbkę oleju rozcieńcza się mieszaniną izopropanolu heksanu (4:1, v/v). Analizę wykonuje się w odwróconym układzie faz z wykorzystaniem kolumny C18 (125 x 4 mm, 5 µm) oraz mieszaniny

wody/acetonitrylu/metanolu/izopropanolu jako fazy ruchomej. Rozdzielenie związków prowadzi się z zastosowaniem elucji gradientowej:

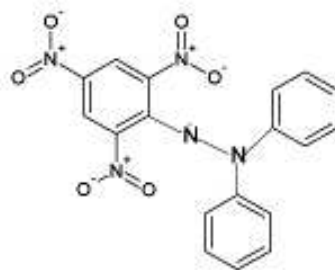
Czas [min.]	Rozpuszczalnik A (woda i kwas fosforowy, pH 3)	Rozpuszczalnik B (acetonitryl metanol, 7:5, v/v)	Rozpuszczalnik C (izopropanol)
0	70	30	0
25	0	100	0
30	0	100	0
45	0	40	60
63	0	40	60
64	0	100	0
70	70	30	0

### **Oznaczanie wybranych przeciwutleniaczy syntetycznych metodą GC**

Do ilościowego oznaczania przeciwutleniaczy fenolowych (BHA, BHT i TBHQ) w żywności opracowano prostą, szybką i dokładną metodę z wykorzystaniem zestawu GC-FID. Około 30-60 mg próbek handlowych, w tym oleju, masła, margaryny, sera, majonezu rozpuszcza się w 1 ml eteru dietylowego. Do tak przygotowanych próbek dodaje się wzorca wewnętrznego (8-chinolinol), a następnie próbki analizuje metodą GC-FID.

### **Oznaczanie wybranych przeciwutleniaczy syntetycznych metodą spektrofotometryczną**

Do wykrywania, identyfikacji oraz ilościowego oznaczania przeciwutleniaczy można zastosować metodę polegającą na ich ekstrakcji, rozdzieleniu za pomocą chromatografii cienkowsarstwowej oraz na oznaczeniu spektrofotometrycznym po reakcji z 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylem DPPH. Związek DPPH<sup>•</sup>, (Rys. 85) jest związkiem azowym posiadającym ustabilizowany wolny elektron co czyni go wolnym rodnikiem.



Rys. 85. Wzór DPPH

Do oznaczeń stosuje się go najczęściej w roztworze alkoholowym. Roztwory DPPH w alkoholu etylowym mają barwę purpurową do ciemnofioletowej i wykazują maksimum absorpcji przy długości fali 515 nm (w metanolu - 517 nm). DPPH ulega redukcji pod wpływem przeciwutleniaczy (wychwytyjących elektrony) i zmienia barwę roztworu na żółtą. Intensywność zabarwienia roztworu (więc wartość absorbancji) maleje proporcjonalnie do stężenia przeciwutleniaczy.

### 7.3. Metody stosowane do oznaczania barwników

Zawartość barwników w produktach spożywczych można oznaczyć różnymi metodami. Do identyfikacji i badania składu barwników wykorzystywana jest technika magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Metoda ta jest wykorzystywana do określania struktury nowych, syntetycznych barwników oraz do wykrywania zanieczyszczeń w barwnikach.

Do analizy stosuje się również metody chromatograficzne: chromatografię cienkowarstwową (TLC) i wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC). W metodzie TLC barwniki rozdziela się na celulozie lub na żelu krzemionkowym, a do identyfikacji wykorzystuje się wartości współczynnika  $R_f$  lub/i charakterystyczne, barwne reakcje. W przypadku zastosowania celulozy dobre rozdzielanie można uzyskać z zastosowaniem układu rozdzielającego o składzie: 2,5% cytrynian sodu/25% amoniak/alkohol metylowy (80:20:12, v/v/v). Gdy fazą stacjonarną jest żel krzemionkowy stosuje się układ: octan etylu/alkohol etylowy/dietyloamina/woda (55:20:10:10, v/v/v/v).

Optymalne warunki rozdzielania barwników metodą HPLC uzyskano w odwróconym układzie faz z wykorzystaniem złoża C18 jako fazy stacjonarnej oraz mieszaniny izopropanolu i wody jako fazy ruchomej (15:85, v/v). Do analizy barwników

zawierających w cząsteczce grupy funkcyjne np.: sulfonowe, karboksylowe wykorzystuje się chromatografię par jonowych. Po dodaniu odpowiedniego związku, np. chlorku tetrametyloamoniowego, w roztworze tworzy się para jonowa, co ułatwia rozdzielenie barwników w chromatografii bibułowej, cienkowarstwowej, jak i w wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

### **Oznaczanie wybranych barwników metodą HPLC**

Do oznaczenia barwników, m.in.: błękitu brylantowego, indygotyny, żółcieni pomarańczowej, tartrazyny, czerwieni Allura AC i erytrozyny napojach spożywczych i żelatynie stosuje się metodę HPLC w odwróconym układzie faz. Napoje gazowane umieszcza się w łaźni ultradźwiękowej na 5 min w celu odgazowania, a następnie rozcieńcza się wodą (1:2, v/v) i przesącza przez filtr 0,45 mikrometrów. W przypadku żelatyny, do około 0,5 g należy dodaje się 7 cm<sup>3</sup> wody, umieszcza w łaźni wodnej i ogrzewa do całkowitego rozpuszczenia. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej, próbkę rozcieńcza się do 10 cm<sup>3</sup> wodą i analizuje techniką HPLC. Warunki chromatograficzne: kolumna C18 Acclaim PA2, 3 × 75 m 3 μm, temp kolumna. 30°C; faza ruchoma 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,8 (faza A), 50% 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 8,8 w acetonitrylu (faza B), przepływ fazy ruchomej - 0,7 cm<sup>3</sup>/min.; elucja gradientowa: 12% B do 100% B w ciągu 3.5 min, następnie 100% B przez 1,0 min; detekcja UV przy długości fali 254 nm.

## **7.4. Metody oznaczania dodatków smakowo-zapachowych**

### **Oznaczanie syntetycznych substancji słodzących metodą HPLC**

Technika HPLC jest najczęściej stosowana do oznaczania syntetycznych substancji słodzących. Za jej pomocą można oznaczyć kilka substancji podczas jednej analizy. Rozdzielenie wykonuje się w układzie faz odwróconych z detekcją spektrofotometryczną (długość fali 220 nm). Przed wykonaniem analizy właściwej próbkę należy odpowiednio przygotować.

W przypadku produktów klarownych (Tonic) badaną próbkę odgazowuje się w łaźni ultradźwiękowej i rozcieńcza 10-krotnie wodą dejonizowaną. Uzyskany roztwór przesącza się przez filtr membranowy o wielkości porów 0,45 μm i poddaje analizie metodą HPLC.

Gdy badany napój zawiera barwniki, czy też substancje smakowo-zapachowe, próbkę po odgazowaniu w łaźni ultradźwiękowej oczyszcza się metodą ekstrakcji do fazy stałej. Kolumnkę ze złożem C18, przemywa się metanolem, a następnie buforem octan sodu/kwas octowy (pH 4,5). Na tak przygotowaną kolumnkę wprowadza się około 10 ml próbki. Po usunięciu zanieczyszczeń syntetyczne substancje słodzące eluuje się metanolem. Eluat odparowuje się do sucha, a następnie rozpuszcza w fazie ruchomej. Przed analizą próbkę przesącza się przez filtr membranowy i analizuje metodą HPLC.

W przypadku produktu, który zawiera naturalne wyciągi owocowe i warzywne, oczyszczanie wykonuje się za pomocą roztworów Carreza I ( $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3 H_2O$ ) i Carreza II ( $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ ). Następnie napój sączy się dwukrotnie: przez sączek bibułowy i sączek membranowy (wielkość porów 0,45  $\mu m$ ).

*Warunki analizy HPLC.* Do analiz wykorzystuje się zestaw HPLC-UV ( $\lambda = 220$  nm) wyposażony w kolumnę C18 (150 x 4,6 mm). Jako fazę ruchomą stosuje się układ rozpuszczalników: acetonitryl (faza A) i bufor octan sodu/kwas octowy (faza B). Rozdzielenie prowadzi się z zastosowaniem elucji gradientowej, przepływ fazy ruchomej - 0,8  $cm^3/min$ . Do rozdzielania syntetycznych substancji słodzących można zastosować również kolumnę typu RP i mieszaninę buforu fosforanowego (0,0125  $mol/dm^3$ , pH 3,5) i acetonitrylu w stosunku 90:10 (v/v).

### **Oznaczanie syntetycznych substancji słodzących metodą spektrofotometryczną**

*Oznaczanie aspartamu w słodzikach metodą spektrofotometryczną z kwasem chloranilowym.* Preparat słodzący (170 mg) rozpuszcza się w 50  $cm^3$  mieszaniny metanolu z chloroformem (1:1, v/v). Następnie do odpowiedniej objętości roztworów badanych dodaje się kwas chloranilowy (0,1%) oraz dimetyloformamid, po czym uzupełnia całość 1,4-dioksanem do objętości 10  $cm^3$ . Absorbancję roztworów mierzy się przy długości fali 520 nm.

### **Oznaczanie syntetycznych substancji słodzących metodą miareczkową**

*Metoda miareczkowa z N-bromoimidem kwasu bursztynowego (NBS).* Metoda ta polega na miareczkowaniu mieszaniny badanych roztworów (170 mg/50  $cm^3$ ), NBS (0,02  $mol/dm^3$ ) i jodku potasu (15%) mianowanym roztworem tiosiarczanu sodu (0,04  $mol/dm^3$ ) w obecności skrobi jako wskaźnika. Mieszaninę doprowadza się do pH 2,6 za pomocą roztworu kwasu solnego (0,2  $mol/dm^3$ ).



*Metoda miareczkowa z kwasem nadchlorowym.* Odpowiednie naważki preparatów słodzących (1,4 g) rozpuszcza się w 100 cm<sup>3</sup> lodowego kwasu octowego. Do kolb stożkowych przenosi się po 5 cm<sup>3</sup> badanych roztworów, następnie dodaje lodowy kwas octowy i resazurynę (0,1%). Tak przygotowaną mieszaninę miareczkuje się kwasem nadchlorowym (0,05 mol/dm<sup>3</sup>) do momentu zmiany barwy z różowej na pomarańczowoczerwoną.

### **Metody stosowane do oznaczania aromatów naturalnych i syntetycznych**

Do oznaczenia związków lotnych w żywności niezbędne są: izolacja z matrycy produktu oraz zatężanie. Do analizy jakościowej i ilościowej stosuje się głównie technikę chromatografii gazowej oraz chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Do wyodrębnienia i koncentracji związków lotnych stosuje się ekstrakcję (chlorkiem metylenu), ekstrakcję połączoną z destylacją, a ostatnio coraz częściej mikroekstrakcję do fazy stacjonarnej (SPME). W przypadku metody SPME próbkę produktu zamyka się w szklanym naczyniu i umieszcza w termostacie (temp. 20 – 50°C, po czym do próbki wprowadza się włókno (typu PDMS lub DVB/CAR/PDMS (diwinylobenzen/karboksen/polidimetylosiloksan)). Związki z włókna desorbują się w dozowniku chromatografu gazowego. Analizy jakościowej dokonuje się na podstawie widm mas lub/i indeksów Kovàts'a, natomiast do analizy ilościowej stosuje się metodę wzorca wewnętrznego.

### **Oznaczanie glutaminianu sodu w produktach spożywczych**

Do oznaczenia glutaminianu sodu w produktach spożywczych można zastosować metody spektrofotometryczne, chromatograficzne (HPLC, GC, TLC) i potencjometryczne.

Przed przystąpieniem do analizy właściwej próbkę produktu rozpuszcza się w wodzie i umieszcza w łaźni ultradźwiękowej. Po przefiltrowaniu otrzymany supernatant można poddać analizie metodą TLC. Analizy wykonuje się na płytkach z żelazem krzemionkowym jako fazą stacjonarną, jako fazę ruchomą stosuje się mieszaninę metanolu/chloroformu/kwasu mrówkowego (5/5/1, v/v/v). Układem wywołującym jest 1% roztwór ninhydryny w acetonie. Po wysuszeniu, glutaminian sodu identyfikuje się na podstawie wartości współczynnika R<sub>f</sub>.

Analizę jakościową i ilościową glutaminianu sodu w próbce można również wykonać z zastosowaniem HPLC. Próbkę przed analizą należy przygotować

w następujący sposób: do ok. 20 g próbki dodaje się wodę dejonizowaną i homogenizuje. Otrzymany homogenat filtruje się, a następnie oczyszcza poprzez ekstrakcję 1,1,2-trichloroetylenem. Po odwirowaniu warstwę organiczną usuwa się. pH warstwy wodnej należy doprowadzić do pH 7,5 – 8,0. Przed analizą właściwą kwas glutaminowy przeprowadza w pochodną. Do reakcji derywatywacji stosuje się następujące odczynniki: dinitrofenol, chlorek dansylu, aldehyd(*orto*)ftalowy. Otrzymaną pochodną analizuje się w odwróconym układzie faz z wykorzystaniem kolumny C18 i detektora UV (długość fali 254 nm). Jako fazę ruchomą stosuje się mieszaniny metanol/woda z dodatkiem kwasu octowego lub acetonitrylu/ woda z dodatkiem kwasu octowego.

## **7.5. Metody oznaczania dodatków kształujących cechy fizyczne żywności**

### **Metody oznaczania emulgatorów**

*Oznaczenie lecytyny.* Do wyodrębnienia lecytyny stosuje się ekstrakcję Folcha (chloroform:metanol, 2:1, v/v). Otrzymany ekstrakt odwirowuje się, a następnie oczyszcza się metodą SPE z wykorzystaniem kolumny wypełnionej żelem krzemionkowym. Kolumnę SPE kondycjonuje się eterem nafowym, a do elucji lecytyny stosuje się metanol. Przygotowaną w ten sposób próbkę analizuje się metodą HPLC w odwróconym układzie faz z użyciem detektora refraktometrycznego lub/i spektrofotometrycznego ( $\lambda = 210$  nm). Analizę wykonuje się w warunkach izokratycznych z zastosowaniem mieszaniny acetonitrylu/metanolu/wody (65:21:14, v/v/v) jako fazy ruchomej.

Ekstrakt otrzymany metodą Folcha może być analizowany metodą TLC na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Jako układ rozwijający stosuje się mieszaninę chloroform/metanol/kwas octowy/woda (25:15:4:2, v/v/v/v), płytki wywołuje się w atmosferze jodu.

### **Oznaczenie substancji zagęszczających i żelujących**

Celuloza, hemicelulozy, pektyny i gumy nie rozpuszczają się podczas ogrzewania z kwasami. Do ich oznaczania stosuje się metody wagowe, enzymatyczne i chemiczne. Najczęściej stosuje się zmodyfikowaną metodę Kürschnera-Hanaka, która polega na tym, że nierozpuszczoną po ogrzewaniu w roztworze kwasów (kwas azotowy(V), kwas octowy

i trichlorooctowy) pozostałość przemywa się wodą i alkoholem, suszy, a następnie oznacza wagowo.

Dodatki skrobiowe można oznaczyć po rozpuszczeniu ich w gorącym, rozcieńczonym kwasie solnym i po sklarowaniu roztworu mierzy się skręcenie płaszczyzny światła spolaryzowanego. W próbkach zawierających inne substancje optycznie czynne wprowadza się poprawkę na skręcenie płaszczyzny światła spolaryzowanego przez te substancje.

## 8. Oznaczanie zafałszowań żywności

Do oceny zafałszowań żywności wykorzystuje się metody chromatograficzne, izotopowe, enzymatyczne, izotachoforezę kapilarną, atomową spektrofotometrię emisyjną, wstrzykową analizę przepływową, metody genetyczne oraz metody chemometryczne do analizowania i interpretacji danych uzyskanych wymienionymi technikami analitycznymi.

Wykrywanie zafałszowań żywności polega przede wszystkim na:

- wykryciu obecności substancji „obcych”,
- stwierdzeniu braku charakterystycznego (jednocześnie drogiego i nietypowego) składnika danego produktu,
- analizie składu (tzw. profilu) produktu spożywczego (pełny skład jakościowy i ilościowy).

### 8.1. Przykłady wykrywania zafałszowania wybranych produktów żywnościowych

W celu wykrycia niewłaściwego składu soków owocowych porównuje się ich skład chemiczny z wartościami standardowymi, takimi jak:

- ekstrakt ogólny,
- glukoza, fruktoza i sacharoza,
- kwas cytrynowy, kwas D-izocytrynowy, kwas D- i L-jabłkowy,
- składniki mineralne lub popiół ogółem,
- indeks formolowy,
- wolne aminokwasy,
- kwas fumarowy, kwas mlekowy i kwas winowy,
- sorbitol,
- hydroksymetylofurfural.

W celu wykrycia dodatku cukru i kwasów organicznych w sokach owocowych stosuje się metody izotopowe, dzięki którym określa się stosunki izotopowe węgla  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ , tlenu  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  i wodoru  $^2\text{H}/^1\text{H}$ . Tą metodą można wykryć dodatek cukru trzcinowego i kukurydzianego.

Elektroforeza kapilarna (CZE – *Capillary Zone Electrophoresis*) i elektroforeza żelowa (GE – *Gel Electrophoresis*) są stosowane do oznaczania enancjomerów cukrów i na tej podstawie określa się autentyczność soków.

Kolejną techniką analityczną stosowaną do analiz zawartości kwasów organicznych jest izotachoforeza kapilarna, dzięki której można oznaczyć kwas D-izocytrynowy, którego obecność świadczy o zafałszowaniu.

Lotne związki organiczne soków owocowych oznaczane są za pomocą chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym, a także chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas. Chromatografia gazowa w połączeniu z analizą fazy nadpowierzchniowej (headspace) lub mikroekstrakcją do fazy stacjonarnej (SPME) są stosowane do odróżniania aromatów naturalnych od identycznych z naturalnymi.

Analiza pierwiastków śladowych z wykorzystaniem atomowej spektrofotometrii emisyjnej pozwala na wykrycie dodatku soków z wybranych gatunków owoców.

Ze względu na to, że soki z części owoców zawierają większe ilości pektyn, identyfikację zafałszowań można przeprowadzić techniką pirolizy. Powstające produkty w wyniku zwęglania, analizowane są za pomocą spektrometrii mas.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa stosowana jest do oznaczania zawartości poszczególnych cukrów i stosunku zawartości fruktozy do glukozy oraz związków fenolowych w sokach i koncentratach owocowych. Do związków, na podstawie których identyfikowane są sok pomarańczowy, grejpfrutowy i jabłkowy należy zaliczyć kolejno: naryrutynę i hesperydynę, narynginę i neohesperydynę oraz florydzynę.

Wysokosprawna chromatografia jonowa w połączeniu z amperometrycznym detektorem pulsacyjnym wykorzystywana jest w analizie oligosacharydów w sokach owocowych i miodzie.

Zafałszowania win polegają na dodawaniu cukru trzcinowego i buraczanego oraz owoców o dużej zawartości antocjanów, które barwią wina. Związki te analizuje się za pomocą HPLC. Przykładowo, stwierdzenie obecności cyjanidyno-3-sambubiozydo-5-glukozydu świadczy o obecności ekstraktu bzu czarnego. HPLC jest również używane do analizy związków fenolowych takich jak: 3-acyloglukozydów i 3-*p*-kumaryloglukozydów malwidyny i peonidyny, epikatechiny, katechiny i mirycetyny. Identyfikacja tych związków pozwala na określenie odmiany winogron użytych

do produkcji i kraju pochodzenia win. Lotne związki, a szczególnie monoterpény mogą być wykorzystane do rozróżnienia odmiany winogron. Skład jakościowy i ilościowy terpenów jest charakterystyczny dla odmiany i miejsca pochodzenia winogron, z których produkuje się wina. Analizę terpenów przeprowadza się najczęściej z wykorzystaniem chromatografii gazowej i chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas. Identyfikację tych związków przeprowadza się na podstawie indeksów Kovats'a i widm mas.

Przyspieszanie dojrzewania win przeprowadza się poprzez dodanie *Lactobacillus*. Powoduje to zwiększenie zawartości kwasu D-mlekowego, który można wykryć za pomocą chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas. Lotne związki powstające podczas fermentacji alkoholowej wyrobów spirytusowych również można analizować z wykorzystaniem chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas. Najczęściej są to alkohole, estry, wyższe kwasy tłuszczowe, aldehydy i laktony.

HPLC z detektorem spektrofotometrycznym jest wykorzystywane od analizy nielotnych związków ekstrahowanych z beczek dębowych do whisky. W czasie leżakowania napojów alkoholowych z beczek dębowych ekstrahowany jest  $\beta$ -metylo- $\gamma$ -oktalakton. Obecność czterech izomerów tego związku świadczy o dodatku syntetycznego laktonu, a w napojach alkoholowych naturalnie występują tylko dwa izomery. Identyfikację tych związków przeprowadza się techniką chromatografii gazowej połączoną ze spektrometrią mas.

Dodatek cukru trzcinowego i buraczanego do win można wykryć, tak jak w przypadku zafałszowań soków, metodami izotopowymi.

Dodatek tłuszczu zwierzęcego do olejów roślinnych określa się techniką chromatografii gazowej lub chromatografii gazowej połączonej ze spektrometrią mas. W tym przypadku analizuje się zawartość estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Identyfikację tych związków można przeprowadzić na podstawie czasów retencji lub charakterystycznych widm mas, gdzie obecne są jony o  $m/z$  74 i 87 oraz jon molekularny. Również zafałszowania tańszymi olejami roślinnymi można wykryć na podstawie analizy estrów metylowych kwasów tłuszczowych. Do tego celu można zastosować chromatografię gazową lub spektroskopię w podczerwieni.

Technikami wykorzystywanymi do wykrywania dodatku mleka krowiego do mleka koziego lub owczego stosuje się elektroforezę kapilarną, analizy immunologiczne

i HPLC z detektorem spektrofotometrycznym, a analizie podlegają specyficzne białka mleka. Elektroforezę stosuje się do badania obecności mleka w proszku. W tym przypadku określa się stosunek  $\beta$ -kazeiny do  $\alpha$ -albuminy.

Mięso kontrolowane jest pod kątem analizy białek za pomocą metod immunologicznych, a szczególnie testów ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Metoda ta nie może być stosowana do wykrywania zafałszowań produktów mięsnych, ze względu na obróbkę termiczną, która powoduje denaturację białek. Zafałszowania mięsem wieprzowym, tańszą odmianą tuńczyka i niedeklarowanymi podrobami można wykryć metodami genetycznymi opartymi na identyfikacji charakterystycznych fragmentów DNA.

## 9. Opracowanie, ocena statystyczna i interpretacja wyników analiz

Codzienna praktyka laboratoryjna składa się z opracowania, oceny statystycznej i interpretacji wyników analiz w ramach tzw. wewnętrznej kontroli jakości analiz. Działania te mają na celu ciągłą, krytyczną ocenę własnych metod analitycznych i zdobycie dowodu jakości uzyskiwanych wyników. Zestawienie wyników jedynie w tabeli nie pozwala określić charakteru zmienności wyników pomiarów.

W celu uzyskania miarodajnych wyników, niezbędne jest stosowanie atestowanych metod analitycznych (walidacja metod), profesjonalne prowadzenie analiz (akredytowane laboratoria) i stosowanie systematycznej kontroli jakości analiz. We wszystkich elementach zapewniania jakości wyników ważną rolę odgrywają materiały odniesienia, a zwłaszcza certyfikowane materiały odniesienia. Certyfikowany materiał odniesienia jest to materiał, dla którego każdej wartości przypisana jest niepewność na określonym poziomie ufności. Dany materiał odniesienia może zawierać składniki, których zawartość jest certyfikowana oraz takie, których zawartość jest znana, ale nie została poddana certyfikacji.

### 9.1. Wewnętrzna kontrola jakości analiz w chemicznym laboratorium analitycznym

Głównym celem analityka jest uzyskanie w laboratorium wyniku pomiaru zgodnego z wartością rzeczywistą (oczekiwaną), czyli dokładnego. Dokładność określa poprawność i precyzja przeprowadzonych analiz, dlatego wewnętrzna kontrola jakości analiz obejmuje ocenę prawdziwości i rozrzutu wyników uzyskiwanych daną metodą analityczną. Innym sposobem oceny wyników analiz jest ich graficzna prezentacja, np. za pomocą histogramu lub kart kontrolnych z granicami kontrolnymi.

W celu sprawdzenia, czy w danym zbiorze wyników nie ma wyniku obarczonego błędem grubym, należy zastosować test Q-Dixona (Rys. 86a i 86b). Test ten stosujemy gdy liczność wyników wynosi od 3 do 10. Sposób postępowania jest następujący:

a) Porządkujemy wyniki w kolejności rosnącej:

$$x_1 < x_2 < x_3 < \dots < x_{n-1} < x_n$$

b) gdy punktem odbiegającym jest  $x_1$ , statystykę Q obliczamy ze wzoru:

$$Q = \frac{x_2 - x_1}{x_n - x_1}$$

Rys. 86a. Test Q-Dixona; gdy punktem odbiegającym jest  $x_1$



c) gdy punktem odbiegającym jest  $x_n$ , statystykę  $Q$  obliczamy ze wzoru:

$$Q = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_1}$$

**Rys. 86b.** Test Q-Dixona, gdy punktem odbiegającym jest  $x_n$

d) Uzyskaną wartość statystyki  $Q$  porównujemy z tablicami ( $Q_{kr}$ ) na odpowiednim poziomie ufności  $\alpha$  (Tabela 34). Jeżeli  $Q \geq Q_{kr}$  to punkt odbiegający nie należy do tej samej populacji co pozostałe i należy odrzucić jako obciążony błędem grubym.

**Tabela 34.** Wartości krytyczne parametru  $Q_{kr}$  testu Q-Dixona dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$

n	3	4	5	6	7	8	9	10
$Q_{kr}$	0,941	0,765	0,642	0,560	0,507	0,468	0,437	0,412

## 9.2. Ocena prawdziwości wyników (poprawność)

Poprawność jest to stopień zgodności między wartością średnią z serii wyników, otrzymanych daną metodą, a znaną lub przyjętą wartością odniesienia (wartością prawdziwą, rzeczywistą). Miarą dokładności wyniku jest różnica między otrzymaną wartością pojedynczego wyniku, a przyjętą wartością odniesienia.

Praktycznie w laboratorium poprawność wyznacza się po przeprowadzeniu analizy próbek wzorców o minimum dwóch różnych stężeniach. Z uzyskanych wyników oblicza się stężenie średnie dla każdej serii pomiarowej i porównuje z przyjętą wartością odniesienia wzorca, a następnie oblicza się kolejno:

a) błąd bezwzględny ( $B$ ) (Rys. 87):

$$B = |\bar{x} - c|$$

**Rys. 87.** Błąd bezwzględny;  $c$  - przyjęta wartość odniesienia wzorca,  $\bar{x}$  - wartość zmierzona (średnia)

b) błąd względny  $B_w$  (Rys. 88):

$$B_w = \frac{B}{c} \times 100\%$$

**Rys. 88.** Błąd względny

Po obliczeniu błędów względnych dla każdej serii pomiarowej oblicza się średni błąd względny, który wskazuje na poprawność metody.

W laboratorium popełniane błędy systematyczne najczęściej związane są z niepełnym odzyskiem analitu z danej matrycy. Im jest on mniejszy tym mniejsza jest poprawność analizy. Praktycznie odzysk określa się po przeprowadzeniu serii analiz próbek rzeczywistych i następnie analiz tych samych próbek rzeczywistych z dodatkiem wzorca. Wyznacza się procentowy odzysk wzorca dodanego do próbki rzeczywistej.

Współczynnik odzysku (WO) oblicza się ze wzoru (Rys. 89):

$$WO(\%) = \frac{C_M - C_Z}{C_D} \times 100\%$$

**Rys. 89.** Współczynnik odzysku;  $C_M$  – średnie stężenie/powierzchnia piku oznaczanego analitu w próbce rzeczywistej z dodatkiem wzorca,  $C_D$  – zastosowany dodatek wzorca, średnie stężenie/powierzchnia piku wzorca,  $C_Z$  – średnie stężenie/powierzchnia piku oznaczanego analitu w próbce rzeczywistej bez dodatku wzorca

Rejestruje się wartość sygnału dla próbki bez dodatku analitu oraz wartość sygnału dla próbki z dodatkiem analitu. Sumaryczne stężenie powinno być dwukrotnie wyższe niż w próbce rzeczywistej i mieścić się w zakresie roboczym metody.

W praktyce laboratoryjnej poprawność metody określa się wyznaczając współczynniki odzysku badanego składnika z matrycy, na co najmniej dwóch poziomach stężeń z zakresu krzywej wzorcowej. Jeżeli współczynniki odzysku nie różnią się statystycznie wyznaczamy średni współczynnik odzysku metody badawczej. W praktyce można wówczas zalecić oznaczenie współczynnika odzysku dla jednego wybranego stężenia z zakresu roboczego metody (np. środkowego stężenia). Jeżeli różnice są istotne należy zawęzić zakres roboczy lub wyznaczyć współczynnik odzysku dla każdego stężenia.

Wyznaczony średni współczynnik odzysku należy uwzględnić w obliczeniach, jeżeli jego wartość jest poniżej 90%. Przyjęta akceptowalna wartość współczynnika odzysku wynosi 90 – 110 %, chyba że metoda badawcza podaje inny zakres.

### 9.3. Ocena rozrzutu wyników (precyzja) – powtarzalność, odtwarzalność i niepewność (wewnętrzna kontrola jakości pracy w laboratorium)

Wartość *powtarzalności, odtwarzalności i niepewności* wyznaczana jest na podstawie obliczonego odchylenia standardowego (S), względnego odchylenia standardowego (RSD) lub współczynnika zmienności (CV), które są miarami precyzji.

Odchylenie standardowe (s) (Rys. 90) jest miarą rozrzutu poszczególnych wartości oznaczeń wokół wartości średniej:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - m)^2}{n - 1}}$$

**Rys. 90.** Odchylenie standardowe;  $n$  - liczba obserwacji,  $m$  - wartość średnia,  $x_i$  - wartość pojedynczego wyniku pomiaru

Względne odchylenie standardowe (RSD) (Rys. 91) jest to stosunek wartości odchylenia standardowego do wartości średniej:

$$RSD = \frac{s}{m}$$

**Rys. 91.** Względne odchylenie standardowe

Współczynnik zmienności (Rys. 92) jest to wartość względnego odchylenia standardowego wyrażona w %:

$$CV = RSD \times 100\%$$

**Rys. 92.** Współczynnik zmienności

Miano odchylenia standardowego (s) jest wyrażone w tych samych jednostkach co miano wartości wyników w próbie, jest to wielkość zawsze dodatnia, jedynie w przypadku gdy wszystkie wyniki powtórzeń są identyczne, równa zero. Względne odchylenie standardowe (RSD) jest wielkością niemianowaną.

### Powtarzalność

*Powtarzalność* jest to stopień zgodności wyników kolejnych pomiarów tej samej wartości mierzonej wykonywanych w tych samych warunkach pomiarowych. Próbkę analizuje kilkakrotnie ta sama osoba w danym laboratorium, za pomocą tego samego przyrządu, przy zastosowaniu tej samej procedury analitycznej (założenie: niezmiennosc warunków analizy w krótkim odstępie czasu).

### **Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna i międzylaboratoryjna**

*Odtwarzalność* jest to stopień zgodności wyników pomiarów wartości mierzonej wykonywanych w różnych warunkach pomiarowych. Próbka analizowana jest przy zastosowaniu tej samej procedury analitycznej w zmiennych warunkach pomiarowych: przez różnych analityków i/lub w różnym czasie, w danym laboratorium (odtworzalność wewnątrzlaboratoryjna) lub różnych laboratoriach (odtworzalność międzylaboratoryjna).

Najczęściej powtarzalność/odtworzalność wyznacza się po przeprowadzeniu analizy próbek wzorców o minimum 2 różnych stężeniach. Z uzyskanych wyników oblicza się odchylenie standardowe dla każdej serii pomiarowej, a następnie względne odchylenie standardowe lub współczynnik zmienności.

### **Niepewność**

Niepewność to jedna z cech charakterystycznych metody. Jest to parametr związany z wynikiem pomiaru, charakteryzujący rozrzut wartości, które można w uzasadniony sposób przypisać wielkości mierzonej. Niepewność wyraża się jako odchylenie standardowe  $s$  lub jego wielokrotność  $2s$  lub  $3s$ , albo jako szerokość przedziału ufności na określonym poziomie prawdopodobieństwa (najczęściej  $P = 95\%$ ).

*Sposoby szacowania niepewności:*

- niepewność wyniku pomiaru  $u(x_i)$  (Rys. 93) jest to niepewność standardowa pomiaru wyrażona jako odchylenie standardowe. Określa zmienność wyników w serii pomiarów.

$$u(x_i) = s_r$$

**Rys. 93.** Niepewność wyniku pomiaru

Niepewność całkowita  $u_c(y)$  (Rys. 94) jest to standardowa niepewność wyniku pomiaru, której wartość jest obliczona na podstawie niepewności parametrów wpływających na wartość wyniku analizy i równa jest pierwiastkowi kwadratowemu sumy wyrazów, będących variancjami tych wielkości:

$$u_c(y) = \sqrt{\sum (x_1)^2 + u(x_2)^2 + \dots + u(x_n)^2}$$

**Rys. 94.** Niepewność całkowita

- niepewność rozszerzona U (Rys. 95) jest to wartość określająca przedział wokół wyniku pomiaru, w którym można, na odpowiednim przyjętym poziomie istotności, spodziewać się wartości oczekiwanej. Uwzględnia wszystkie możliwe źródła niepewności. Źródłami tymi mogą być: sposób pobierania próbek, warunki transportu i przechowywania, przygotowanie próbek, próbka i jej matryca, warunki pomiaru, aparatura pomiarowa, odczynniki i wzorce, próbka ślepa, przyjęty model reakcji, obliczenia i obróbka danych, analityk oraz efekty losowe. Obliczenie niepewności rozszerzonej jest końcowym etapem szacowania niepewności (niepewność metody). Jest to niepewność podawana dla określonego poziomu ufności (1-α) i uzyskiwana jest jako iloczyn niepewności złożonej i współczynnika rozszerzenia (k):

$$U = k \times u_c(y)$$

**Rys. 95.** Niepewność rozszerzona

Dla rozkładu normalnego i typowo stosowanych poziomów ufności (1-α) współczynnik k przyjmuje wartości: k = 1 (0,683), k = 2 (0,950), k = 3 (0,997). W większości przypadków zaleca się stosowanie współczynnika k= 2.

Wynik analizy X podawany jest w następujący sposób: (X ± U) (jednostki).

#### 9.4. Graficzna prezentacja wyników analiz

Innym sposobem oceny wyników analiz jest ich graficzna prezentacja, np. za pomocą histogramu (diagramu kolumnowego) lub kart kontrolnych z granicami kontrolnymi.

**Histogram** – tworząc histogram wyniki kontrolne pogrupowane są wg określonych zakresów stężeń, a każdą grupę przedstawia kolumna, której wysokość jest miarą liczby wyników w tej grupie, wyrażonej często jako procent całkowitej liczby wyników (kształt otrzymanej krzywej rozkładu normalnego zależy od rozrzutu wyników analiz, np. od odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej). W celu sporządzenia histogramu należy podzielić wszystkie zdarzenia elementarne na przedziały o jednakowej szerokości, przy czym ich liczba  $k \leq n/4$ :

dla n = kilkanaście, liczba przedziałów powinna wynosić k = 4-5

dla n = kilkaset, liczba przedziałów powinna wynosić k = 8-10

dla  $n =$  kilka tys., liczba przedziałów powinna wynosić  $k =$  ok. 12

W przypadku parzystej liczby przedziałów średnia powinna leżeć w środkowym przedziale, w przypadku nieparzystej liczby – w pobliżu granicy pomiędzy dwoma środkowymi przedziałami. Skrajne wyniki powinny leżeć możliwie w środku skrajnych przedziałów.

**Karty kontrolne** – stosowane są do oceny stabilności wyników analiz otrzymywanych w danym laboratorium w ramach wewnętrznej kontroli analiz chemicznych w laboratorium. Metodę kart kontrolnych wykorzystuje się najczęściej do monitorowania stabilności precyzji metody w czasie, obserwacji trendów uzyskiwanej precyzji lub do oceny stabilności precyzji poszczególnych analityków. Jest to najefektywniejsza metoda kontroli jakości analiz wykonywanych w danym laboratorium. Pomaga oszacować czy stosowana w laboratorium metoda jako proces analityczny jest statystycznie uregulowana (stabilna) i jego zmienność wynika jedynie z przyczyn losowych. Przykładowe typy kart kontrolnych:

*Karta X* – karta kontrolna typu X (karta wartości średniej  $\bar{x}$  (Rys. 96)), sporządzana jest na podstawie rozkładu wartości kontrolnych wokół wartości prawdziwej lub oczekiwanej i posiada linię centralną, górną i dolną granicę ostrzegawczą oraz górną i dolną granicę działania.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$$

**Rys. 96.** Wartość średnia z serii pojedynczych wyników  $x_i$

*Karta R lub R %* – karta rozstępu ( $R_x$  (Rys. 97)), posiada linię centralną, górną granicę ostrzegawczą i granicę działania:

$$R_x = x_{\max} - x_{\min}$$

$$R[\%] = \frac{C_1 - C_2}{C_2} \times 100\%$$

**Rys. 97.** Rozstęp; R [%] - rozstęp dla prób powtórzonych,  $C_1$  - stężenie analitu w pierwszej próbce powtórzonych,  $C_2$  - stężenie analitu w drugiej próbce powtórzonych, przy obliczeniach powinna być zachowana następująca kolejność  $C_1 > C_2$

*Konstrukcja kart kontrolnych.* Typowa karta kontrolna ma dwie, określone statystycznie granice kontrolne, po każdej stronie linii centralnej, zwane górną i dolną granicą kontrolną. W celu wyznaczenia karty kontrolnej należy wykonać do 20 analiz próbek  $x_i$ . Z otrzymanych wyników należy obliczyć średnią arytmetyczną ( $\bar{X}$ ) i odchylenie standardowe ( $S$ ) lub rozstęp dla prób powtórzonych ( $R$  w %), a dla analiz odzysku dodatkowo odzysk ( $C$ ). W praktyce do sprawdzania precyzji w laboratorium najczęściej stosuje się kartę kontrolną wartości średniej. Parametry statystyczne:  $\bar{x}$ ,  $S$ ,  $R$  [%],  $C$  liczy się po odrzuceniu testem

Dixona wartości odbiegających w serii. Wyniki analiz próbek w różnych seriach pomiarowych zestawia się w tabeli i wykreśla się wartości normatywne (granice kontrolne). Linia centralna odpowiada wartości odniesienia, np. średnia z serii wyników, średni rozstęp, średnie odchylenie standardowe (w zależności od rodzaju monitorowanego parametru). Linie kontrolne ustalone są na takim poziomie ograniczeń, że prawdopodobieństwo ich przekroczenia wynosi 99,7% i są to tzw. zewnętrzne, krytyczne granice kontrolne ( $\pm 3 s$ ) lub wynosi 95% i są to tzw. wewnętrzne, ostrzegawcze granice kontrolne ( $\pm 2 s$ ).

*Analiza karty kontrolnej.* Jeżeli wynik analizy próbki kontrolnej w danej serii pomiarowej leży poza granicami kontrolnymi, to wykonuje się ponowną analizę tej próbki. Dopuszcza się występowanie wartości pomiędzy linią ostrzegawczą i kontrolną, jednak nie więcej niż 2 wyniki na 20 oznaczeń. Jeżeli wyniki analiz próbek kontrolnych przekraczają granice ostrzegawcze może to świadczyć o pogorszeniu się precyzji oznaczeń w laboratorium spowodowane, np. uszkodzeniem przyrządu pomiarowego, zmianą warunków analizy (analitka, odczynnika chemicznego). Obserwowane trendy wskazują na błędy systematyczne metody, a błędy przypadkowe identyfikujemy, gdy wartość statystyki obliczonej na podstawie próbki przekracza granice ostrzegawcze lub kontrolne karty.

## 10. Ocena jakości surowców i produktów spożywczych

Wyróżniamy następujące kryteria oceny jakości żywności

- jakość zewnętrzna (wygląd, kształt, wielkość, barwa, smak, brak wad),
- wartość użytkowa lub technologiczna (np. zawartość skrobi w ziemniakach lub cukru w burakach cukrowych),
- wartość odżywcza (biologiczna) - zawartość składników pożytecznych dla zdrowia (np. białek, witamin, cukrów) oraz bezpiecznie niski poziom substancji szkodliwych (np. pestycydów, azotanów, metali ciężkich),
- stopień szkodliwości produkcji dla środowiska.

W celu minimalizacji zagrożenia zdrowia konsumentów w wielu krajach ustanowiono dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń chemicznych (endo i egzogennych) w artykułach spożywczych poszczególnych grup. W ustaleniach tych brano pod uwagę dawki poszczególnych związków chemicznych, przy których obserwuje się ich niekorzystne działania u zwierząt doświadczalnych, jak również udział poszczególnych produktów w tradycyjnej dziennej racji pokarmowej. Dla wielu substancji chemicznych mogących występować w żywności wprowadzono wartości limitowane w postaci najwyższej dopuszczalnej pozostałości (ang. *maximum residue limit*, MRL) wyrażonej w mg/kg (ppm) lub  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) produktu żywnościowego a nawet jak w przypadku dioksyn i furanów nanogramy na kilogram (ppt). Akceptowane dzienne pobranie to taka ilość substancji, która przyjmowana wraz z żywnością przez człowieka w ciągu całego życia nie wywoła szkodliwego działania. Do końcowych obliczeń ADI wybiera się najbardziej wrażliwy układ doświadczalny, wyznaczając poziom, przy którym nie stwierdza się objawów szkodliwego działania badanej substancji (ang. *no observe effect level*, NOEL). Dodatkowo stosuje się współczynnik bezpieczeństwa, który uwzględnia toksyczność związku, różnice międzygatunkowe, trudności przy przenoszeniu wyników badań ze zwierząt na człowieka. Najczęściej używany jest współczynnik bezpieczeństwa wynoszący 100, który stosowany jest do ustanowienia najniższych dopuszczalnych pozostałości w żywności.

W Polsce dopuszczalne poziomy większości zanieczyszczeń chemicznych w artykułach rolno-spożywczych regulują Rozporządzenia Ministra Zdrowia RP. Dopuszczalne poziomy innych kontaminantów chemicznych nie ujętych w rozporządzeniach można znaleźć w dokumentach FAO/WHO, dyrektywach Unii Europejskiej, WTO i innych organizacji międzynarodowych (Połączony Komitet



Ekspertów FAO/WHO ds. Dodatków do Żywności (ang. *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive*, JECFA) i Połączona Grupa ds. Pozostałości Pestycydów (ang. *Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues*, JMPR) – Tabela 35.

**Tabela 35.** Zakres i tematyka rozporządzenia 466/2001 i rozporządzeń następczych uzupełniających

Zanieczyszczenia	Odnosnik prawa (Reg. 466/2001 i/lub inne uzupełnienia)	Metod badań I pobieranie prób
Azotany	Rozp. (EC) 563/2002 i poprawki Rozp (EC) 655/2004	Dyrektywa 79/700/EEC
Aflatoksyny	Rozp. (EC) 2174/2003 i uzupełniona Rozp. (EC) 683/2004 (products for infants and young children)	Dyrektywa 98/53/EC, poprawiona Dyrektywą 2004/43/EC
Ochratoksyna A	Rozp. (EC) 472/2002	Dyrektywa 2002/26/EC poprawiona Dyrektywą 2004/43/EC
Patulina	Rozp. (EC) 1425/2003, Rozp. (EC) 455/2004	Dyrektywa 2003/78/EC
Ołów	Rozp. (EC) 466/2001	Dyrektywa 2001/22/EC
Kadm	Rozp. (EC) 466/2001, Rozp. (EC) 221/2002	Dyrektywa 2001/22/EC
Rtęć	Rozp. (EC) 466/2001, Rozp. (EC) 221/2002	Dyrektywa 2001/22/EC
3-monochloro-propano-1,2- diol (3-MCPD)	Rozp. (EC) 466/2001	Dyrektywa 2001/22/EC
Dioksyny, furany (PCDDs, PCDFs)	Rozp. (EC) 2375/2001 i Rozp. (EC) 684/2004.	Dyrektywa 2002/69/EC poprawiona Dyrektywą 2004/44/EC
Nieorganiczna Cyna	Rozp (EC) 242/2004	Dyrektywa 2004/16/EC

### Ocena jakości mięsa

Jakość mięsa jest sumą jakości:

- technologicznej,
- jadalnej,
- pokarmowej,
- higienicznej.

*Jakość technologiczna.* Na jakość tę składa się zespół cech ważnych dla przerobu technologicznego mięsa: wodochłonność, kwasowość (pH), zawartość białka, zawartość i charakterystyka tłuszczu czy wielkość wyrębów/kawałków. Wodochłonność określa zdolność świeżego mięsa do utrzymania pewnej ilości dodanej wody. Czynnikiem pomiaru wodochłonności może być krąg wilgoci wyciśnięty ze świeżego mięsa na bibule lub jego przewodność elektryczna. Niezwykle ważną cechą mięsa jest jego pH, mierzone po 45 minutach i 24 godzinach od uboju. Mięso w procesie dojrzewania zakwasza się, obniżając wartość pH, zaś najkorzystniejsze dla przerobu i konsumpcji jest pH 5,6-5,8. Ważną cechą mięsa jest zawartość w nim białka oraz tłuszczu. Istotne jest, aby w procesach technologicznych przerobu mięsa białko tkanki nie ulegało termicznej denaturacji, co zmniejszyłoby strawność i wartość odżywczą produktów pochodzenia mięsnego. Z punktu widzenia jakości technologicznej niepożądane jest mięso o wysokiej zawartości kwasów nienasyconych w tłuszczu, szczególnie do produkcji wędlin. Produkty takie stają się tlenowo niestabilne, co może przyspieszać proces jełczenia, zmniejszać trwałość i obniżać walory smakowe. Ważnym czynnikiem utrzymania stabilności tlenowej wyrobów z mięsa jest odpowiednia zawartość witaminy E ( tokoferolu). Ze względu na pH, barwę i konsystencję mięsa wyróżnia się 6 klas jakości:

- RFN (*red, firm, non exudative*), mięso o barwie czerwonej, mocnej i zwartej konsystencji, niewodniste, jest mięsem najbardziej pożądanym,
- PFN (*pale, firm, non exudative*), mięso o jasnej, bladej barwie, mocnej i zwartej, konsystencji, niewodniste,
- PSE (*pale, soft, exudative*), mięso o jasnej, bladej barwie, miękkie i wodniste,
- RSE (*red, soft, exudative*), mięso o barwie czerwonej, miękkiej i wiotkiej konsystencji, wodniste,
- DFD (*dark, firm, dry*), mięso o ciemnej barwie, suchej i twardej konsystencji,
- AM (*acid meat*), mięso kwaśne, ulegające po uboju silnemu zakwaszeniu.

Spośród wymienionych cech charakteryzujących jakość technologiczną mięsa najbardziej przydatny do zastosowania w selekcji jest pH mięsa mierzone 45 minut po uboju.

*Jakość jadalna.* Wpływa na nią wygląd mięsa, kruchość, soczystość, wielkość porcji i cena. *Wygląd mięsa* jest ważnym czynnikiem decyzji o jego nabyciu; decyduje o nim kolor, zawartość tłuszczu i soczystość mięsa. *Zapach mięsa* określany jako korzystny uzależniony jest głównie od zawartości tłuszczu, peptydów, glikogenu oraz zawartości witamin, a także od temperatury przetwarzania produktu. Nieprzyjemny zapach mięsa wieprzowego może być powodowany błędami w chowie zwierząt np. ubojem w zbyt późnym wieku i wadze lub podawaniem zwierzętom pasz nadających niemiły zapach (mączka rybna). Inną przyczyną złego zapachu mięsa może być oksydacja tłuszczu, zwana jełczeniem. Występować może przy nadmiernej zawartości kwasów nienasyconych w tłuszczu, a także w czasie długotrwałego zamrożenia lub ogrzewania mięsa. *Kruchość mięsa* jest również ważnym czynnikiem decydującym o jego zakupie. Kruszenie mięsa jest procesem zachodzącym w mięśniach po okresie tzw. stężenia pośmiertnego (*rigor mortis*). W mięśniach następują wówczas procesy proteolizy enzymatycznej włókien mięśniowych, zwiększających kruchość mięśni. *Soczystość mięsa* związana jest z ilością wody/wilgoci w gotowanym lub pieczonym mięsie i ilością tłuszczu śródmięśniowego.

*Jakość pokarmowa.* Decyduje o niej zawartość w mięsie białka, tłuszczu, składników mineralnych i witamin. W produktach mięsnych poddawanych obróbce cieplnej może mieć również znaczenie strawność masy organicznej mięsa. Zawartość białka w mięsie jest wyrównana i w niewielkim stopniu zależy od cech rasowych. W większym stopniu wpływa na nią wiek ubijanych zwierząt, a zwłaszcza poziomu żywienia białkowego. Badania szynek wykazały np., że zawartość białka waha się od 17,0 do 20,5%, przy średniej zawartości 18,5%. Włókna mięśniowe otoczone są tkanką łączną zawierającą tzw. tłuszcz śródmięśniowy. Zawartość tłuszczu śródmięśniowego w mięsie jest umiarkowana i zależy od cech rasowych, składu dawki pokarmowej i mięsności tusz. Mięso jest niezwykle bogate w składniki mineralne, w tym wapń, fosfor, sód, potas, żelazo i mikroelementy. Niezwykle ważne jest, aby mięso nie zostało zanieczyszczone metalami ciężkimi, w tym rtęcią, ołowiem, kadmem i arsenem.

*Jakość higieniczna.* Ten rodzaj jakości mięsa określony jest przez obecność w mięsie patogenów i pozostałości leków oraz dodatków paszowych. Obserwacje zatruc

pokarmowych u ludzi w Europie dotyczą w szczególności występowania w produktach mięsnych bakterii *Salmonella* np. *Salmonella* Typhimurium DT104. Poziom bakterii w mięsie może być znacznie obniżony poprzez prowadzenie programu kontroli higieny wytwórni pasz. Wprowadzenie granulacji mieszanek paszowych powyżej 81°C skutecznie redukuje przypadki skażenia *Salmonella* u zwierząt i w mięsie. Wprowadzenie zasady dobrej praktyki produkcyjnej (GMP) eliminuje zanieczyszczenia tusz ubijanych zwierząt kałem w czasie ich patroszenia, szybkie schładzanie tusz, kontrola higieniczna pasz i dobre zarządzanie produkcją, są efektywnym sposobem poprawy jakości higienicznej wieprzowiny.

Obecność antybiotyków stosowanych terapeutycznie, może powodować krzyżową odporność na nie u ludzi, co spowodowało wyeliminowanie części antybiotyków paszowych z praktyki produkcyjnej. W miejsce antybiotyków paszowych zastosowano preparaty probiotyczne zawierające bakterie kwasu mlekowego oraz zioła. Preparaty te stabilizują florę bakteryjną przewodu pokarmowego zwierząt, eliminując bakterie chorobotwórcze z rodzaju *Clostridium* sp. i *Escherichia coli*. W krajach UE wprowadza się przepisy zobowiązujące do znakowania zwierząt od urodzenia do uboju oraz zobowiązujące służby weterynaryjne do stałego monitorowania chowu zwierząt, transportu, uboju, obróbki i przetwórstwa mięsa. Program kontroli obejmuje analizę pasz oraz kontrolę jakości mięsa. W rzeźniach i zakładach mięsnych obowiązują normy ISO 9000 oraz szereg procedur zapewniających dobrą jakość higieniczną mięsa i przetworów mięsnych.

### **Ocena jakości zboża konsumpcyjnego**

Badanie jakości zboża przeprowadza się przed jego zważeniem i przyjęciem do magazynu. Badanie to, nazywane wstępną oceną jakościową ziarna, może być dokonane metodą organoleptyczną (sensoryczną) lub laboratoryjną. W badaniu zboża zwraca się uwagę na jednolitość, barwę, zapach, czystość, wilgotność, występowanie szkodników itp. zboże zdrowe ma swoisty, naturalny zapach. Ziarno może mieć zapach stęchlizny, zapach kwaśny, fermentacyjny, zapach rozkruszka (miodowy) lub śnieci (śledziowy). Zapach stęchlizny lub mocny zapach kwaśny, fermentacyjny czy chemiczny (np. nafty, smoły, azotniaku) dyskwalifikuje zboże.

*Nadmierną wilgotność ziarna* wykrywa się dotykiem — przez włożenie ręki głęboko do worka ze zbożem. Ziarno suche nie stawia oporu, jest gładkie i sypkie, natomiast mokre stawia duży opór. Przy ściskaniu w dłoni ziarno suche wymyka się

między palcami, a wilgotne wykazuje pewną przyczepność i elastyczność. Sypane na podłogę ziarno suche układa się w niższy stożek i szybko się obsuwa, a ziarno wilgotne – przeciwnie. Ziarno suche spada z charakterystycznym szelestem, wilgotne spada głucho.

*Czystość zboża* można ocenić organoleptycznie tylko w przybliżeniu. Umieszcza się próbkę ziarna na ciemnym papierze w celu stwierdzenia, czy nie zawiera ona ziaren obcych zbóż, słomy, piasku lub nasion chwastów i czy nie widać w niej śladów obecności szkodników (np. wołka zbożowego).

*Ocena ziarna* dla potrzeb przemysłu piekarniczego opiera się na badaniu jego przydatności do produkcji dobrego pieczywa, czyli na badaniu tzw. wartości wypiekowej. Podstawową analizą badania wartości wypiekowej ziarna jest oznaczenie ilości i jakości glutenu lub białka oraz wskaźnika sedymentacji (wskaźnik sedymentacyjny Zeleny'ego). Właściwości fizykochemiczne glutenu umożliwiają zatrzymanie w cieście tworzących się podczas fermentacji gazów. Ilość zatrzymanych gazów i sposób ich rozmieszczenia są różne, w zależności od jakości glutenu. W dobrym cieście gazy powinny być rozmieszczone w jego całej masie w postaci drobnych, równych pęcherzyków, rozdzielonych między sobą cienkimi błonami. Zła jakość glutenu obniża zdolność zatrzymywania gazów przez ciasto lub powoduje ich nierównomierne rozmieszczenie. Dlatego ważne jest oznaczanie nie tylko ilości, ale też jakości glutenu. Metoda oznaczania polega na wymywaniu glutenu mokrego z ciasta, przygotowanego z mąki (śruty). Stosuje się metodę ręcznego i mechanicznego wymywania glutenu. Oprócz ilości glutenu oznacza się też jego jakość – Indeks Glutenu, tj. wskaźnik, którego wartość waha się w granicach od 1 do 100. Pszenice wysokojakościowe charakteryzują się najlepszą jakością glutenu – Indeks Glutenu 61–100. Średnią jakość mają pszenice chlebowe – Indeks Glutenu 41–60. Natomiast pszenice paszowe o najgorszej wartości wypiekowej cechuje Indeks Glutenu od 1–40. Wskaźnik sedymentacyjny Zeleny'ego wyraża grubość strąconego osadu (w  $\text{cm}^3$ ) i informuje o udziale agregatów wielkocząsteczkowych białka, które mają związek z wartością wypiekową ziarna. Ziarno, dla którego wskaźnik ten ma wartość ponad  $30 \text{ cm}^3$ , jest surowcem o dobrej wartości wypiekowej. Bardzo dobrą wartością wypiekową odznacza się ziarno pszenicy o zawartości ponad 14% białka i wskaźniku sedymentacyjnym  $40 \text{ cm}^3$ .

## Ocena jakości mleka

Poprawnie przeprowadzona ocena jakości mleka musi być przeprowadzona szybko i sprawnie. Ponowne wykonanie oceny po upływie kilku godzin może dać zupełnie inne wyniki. Na wygląd mleka podczas badania mają wpływ: higiena doju, warunki przechowywania mleka, transportu mleka, żywienie krów, zanieczyszczenia mechaniczne i chemiczne, zaburzenia fizjologiczne itp. Podczas oceny uwzględnia się następujące cechy mleka:

- barwa i konsystencja - mleko dostarczone do oceny powinno cechować się jednolitym kolorem. Powinien być to biały kolor z kremowym odcieniem. Każdy inny kolor sprawia, że mleko nie nadaje się do spożycia. Konsystencja mleka powinna być płynna bez śladów ciągliwości. W nim nie powinny znajdować się żadne zanieczyszczenia mechaniczne widoczne gołym okiem. W dobrym mleku nie powinien też stracać się osad widoczny gołym okiem.
- zapach - ocena zapachu jest dokonywana zaraz po otwarciu pojemnika z próbką. Mleko zdrowe powinno mieć zapach świeży i naturalny. Dla mleka niższej kategorii dopuszczalny jest zapach lekko oborowy. Nie dopuszczalne jest aby mleko posiadało zapach silnie oborowy, kwaśny, lekko gnilny, zapach lekarstw i gumy. Nie może to być także zapach silnie paszowy i chemiczny,
- smak - mleko powinno mieć swój naturalny słodkawy smak bez występowania żadnych posmaków,
- drobnoustroje - szybki rozwój drobnoustrojów w mleku powoduje zmiany we wszystkich cechach sprawdzanego mleka od barwy, przez konsystencje po smak. Dla rzeczoznawcy sygnałem zmian bakteryjnych jest zapach lekko oborowy. W takim mleku bardzo często rozwinęły się bakterie *E. coli* mające umiejętność rozkładu laktozy do kwasów (mlekowego czy mrówkowego),
- skład chemiczny mleka może być określony przy zastosowaniu badania laboratoryjnego. Skład typowego mleka przedstawia się następująco: woda - 87,7%, sucha pozostałość - 12,3%, tłuszcz - 3,6%, kazeina - 2,5%, inne białka - 0,4%, laktoza - 4,7%, popiół - 0,7%, inne związki organiczne - 0,2%,
- kwasowość mleka mówiąca o czasie przechowywania i temperaturze jego magazynowania,
- temperatura.

## Ocena jakości jaj spożywczych

Ocena jakości jaj spożywczych sprzedawanych w Polsce obejmuje wyłącznie świeże jaja kurze w skorupkach przeznaczone do bezpośredniego spożycia lub przetwórstwa spożywczego, pozyskane z produkcji fermowej i poddane odpowiednim czynnościom przygotowawczym. Fermy niosek, z których pochodzą jaja powinny pozostawać pod nadzorem weterynaryjnym. Wyróżnia się trzy klasy jakości jaj kurzych:

- klasa A (lub jaja świeże),
- klasa B (jaja drugiej klasy jakości albo jaja utrwalone),
- klasa C (jaja nie sortowane, przeznaczone do uprawnionych zakładów produkujących przetwory jajowe).

Podstawowym kryterium różnicującym poszczególne klasy jakości jest wysokość komory powietrznej. Obserwację i pomiar wielkości komory powietrznej wykonuje się po umieszczeniu jaja w wiązce światła białego pochodzącego od żarówki. W klasie A komora powietrzna nie powinna być wyższa niż 6 mm, a okresowo w ciągu 7 dni od daty pakowania albo 9 dni od daty zniesienia nie może przekraczać 4 mm i wtedy można jaja oznakować jako "ekstra". Do jaj spożywczych klasy B zalicza się jaja świeże o obniżonych parametrach jakościowych (np. komora powietrzna wyższa niż 6 mm, ale nie przekraczająca 9 mm), jak również jaja spożywcze utrwalone, które nadal mają cechy jaj surowych. Utrwalanie jaj może następować w procesie chłodzenia (jaja chłodnicze) lub np. za pomocą wody wapiennej albo w mieszaninie gazów różniącej się od powietrza atmosferycznego. Graniczną temperaturą, której działanie powoduje uznanie jaj za chłodnicze, jest +5°C. Jaja klasy "A" powinny być sortowane według 4 klas wagowych:

<b>XL</b>	73 g i powyżej (jaja bardzo duże)
<b>L</b>	od 63 do 73 g (jaja duże)
<b>M</b>	od 53 do 63 g (jaja średnie)
<b>S</b>	poniżej 53 g (jaja małe)

W ocenie jaj świeżych uwzględnia się ponadto kształt i czystość skorupy, przejrzystość i gęstość białka, widoczność żółtka podczas prześwietlania oraz zapach.

## 10.1 Zasady GHP/GMP oraz system HACCP jako narzędzia zapewnienia bezpieczeństwa żywności

Członkostwo Polski w Unii Europejskiej wymaga wielu działań dostosowawczych, w tym również upowszechniania zasad GMP (Dobra Praktyka w Produkcji Żywności) i wdrażania **systemu HACCP (System Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontroli, Hazard Analysis and Critical Control Point)** w przetwórstwie spożywczym (Dyrektywa Unii Europejskiej 93/43/EEC w sprawie higieny środków spożywczych). Prawo polskie narzuca konieczność wdrożenia systemu HACCP dla wszystkich tych organizacji, które uczestniczą w procesie wytwarzania i dostarczania żywności (Rozporządzenie 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 24 kwietnia 2004 w sprawie higieny środków spożywczych oraz Rozporządzenie nr 853/2004 z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiającym szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego). System HACCP jest najskuteczniejszym i najbardziej efektywnym narzędziem dla zapewnienia wysokiego standardu higienicznego warunków produkcji i przetwarzania żywności. Jest on wynikiem systemowego postępowania polegającego na identyfikacji zagrożeń jakości żywności oraz ryzyka ich wystąpienia, podczas wszystkich etapów procesu produkcji i dystrybucji. Jest to system, który kontroluje wszystkie zagrożenia istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa konsumenta i ochrony jego zdrowia.

Z wdrożeniem systemu HACCP nierozdzielnie związane są:

- Dobra Praktyka Higieniczna,
- Dobra Praktyka Produkcyjna.

Działania **dobrej praktyki higienicznej** dotyczą:

- stanu technicznego budynków zakładu i jego infrastruktury oraz czystości i porządku otoczenia zakładu;
- funkcjonalności i prawidłowości wykorzystania pomieszczeń zakładu oraz ich wyposażenia, w tym pomieszczeń produkcyjnych, magazynowych i socjalnych, ze szczególnym uwzględnieniem podziału zakładu na strefy z punktu widzenia występowania zagrożeń bezpieczeństwa produktu końcowego;
- stanu technicznego i sanitarnego maszyn, urządzeń i sprzętu pod względem zapewnienia bezpieczeństwa żywności;
- prawidłowości funkcjonowania urządzeń kontrolno-pomiarowych, ich wzorcowania i kalibracji;



- prawidłowości i skuteczności prowadzonych procesów czyszczenia, ze szczególnym uwzględnieniem procesów mycia i dezynfekcji oraz stosowanych środków myjących i dezynfekujących;
- jakości zdrowotnej wody stosowanej w zakładzie do celów technologicznych;
- prawidłowości usuwania ścieków oraz gromadzenia i usuwania odpadów stałych, w tym odpadów niebezpiecznych oraz odpadków pokonsumpcyjnych w zakładach żywienia zbiorowego;
- aktualnych orzeczeń lekarskich do celów sanitarno-epidemiologicznych określonych w przepisach o chorobach zakaźnych i zakażeniach osób biorących udział w procesie produkcji lub w obrocie żywnością;
- kwalifikacji pracowników w zakresie przestrzegania zasad higieny odpowiednich do wykonywanej pracy oraz sposobu ich postępowania na stanowiskach pracy;
- skuteczności zabezpieczenia zakładu przed szkodnikami.

Działania **dobrej praktyki produkcyjnej** dotyczą:

- bieżącej lub okresowej oceny jakości zdrowotnej wszystkich surowców, półproduktów, dozwolonych substancji dodatkowych oraz materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością stosowanych w procesie produkcji, w tym identyfikację dostawców;
- oceny poprawności i zgodności stosowanych procesów technologicznych z przyjętymi założeniami;
- kontroli przestrzegania parametrów procesów mających wpływ na bezpieczeństwo żywności;
- kontroli sposobu identyfikacji i zasady identyfikowalności wyrobów gotowych;
- okresowej oceny jakości zdrowotnej wyrobów gotowych.

Od **2004** r. wszystkie podmioty które produkują i wprowadzają żywność do obrotu mają obowiązek stosowania zasad systemu HACCP. Obowiązek posiadania wdrożonego systemu HACCP reguluje Rozporządzenie 853 i 854 Unii Europejskiej. System HACCP opracowano w celu rozpoznania i kontroli zagrożeń, które mogą pojawić się w jakimkolwiek momencie procesu produkcyjnego i składowania żywności. Wyróżniono trzy rodzaje zagrożeń: biologiczne (bakterie, wirusy), fizyczne, np.: szkło, piasek, chemiczne, np.: środki ochrony roślin, detergenty. Zagrożenia rozpoznawane są poprzez obserwację każdego etapu procesu produkowania żywności co pozwala ustalić krytyczne punkty kontroli.

### **Główne zasady systemu HACCP:**

**Zasada 1** Przeprowadzić analizę zagrożeń - rozpoznać możliwe zagrożenia i środki dla ich kontroli

**Zasada 2** Określić krytyczne punkty kontrolne (CCP) - tam muszą być zachowane szczególne środki ostrożności

**Zasada 3** Ustalić granice krytyczne - muszą być one przestrzegane, aby CCP znajdowały się pod kontrolą

**Zasada 4** Ustalić system monitorowania CCP - działania naprawcze, które podejmuje się w przypadku utraty kontroli nad CCP

**Zasada 5** Ustalić działania korygujące, które muszą być podjęte, gdy monitorowanie wykáže, iż CCP nie jest pod kontrolą

**Zasada 6** Ustalić procedury weryfikacji w celu potwierdzenia, iż system HACCP funkcjonuje efektywnie

**Zasada 7** Ustalić dokumentację odnośnie wszystkich procedur i zapisów stosownych do ww. zasad i ich zastosowania

Do innych systemów zarządzania jakością o wyższym stopniu złożoności i zaawansowania należą:

- **System Punktów Kontrolnych dla Zapewnienia Jakości - QACP** (*Quality Assurance Control Point System*). Zasady tego systemu są niemal identyczne jak w systemie HACCP. Jednakże HACCP odnosi się do zapewnienia bezpieczeństwa produktu spożywczego dla zdrowia konsumentów, natomiast działania systemu QACP dotyczą zagwarantowania jakości ze szczególnym uwzględnieniem jakości handlowej, odżywczej lub organoleptycznej.
- **Normy ISO serii 22000** - "System zarządzania bezpieczeństwem żywności - Wymagania dla organizacji w całym łańcuchu żywnościowym" (ang. Food safety management systems - Requirements for organizations throughout the food chain). Norma ta jest dokumentem zawierającym wymagania dotyczące wdrażania, funkcjonowania i doskonalenia systemu zarządzania ukierunkowanego na dostarczanie do klienta bezpiecznej żywności. Jest także standardem mogącym stanowić podstawę do auditowania i jako taki jest używany dla celów oceny i certyfikacji systemów przez niezależne jednostki certyfikacyjne. Nowy międzynarodowy standard ISO 22000 łączy wymagania systemu HACCP oraz Dobrych Praktyk (Produkcyjnych, Higienicznych, Cateringowych, Dystrybucyjnych

itp.). System ten został opracowany dla wszystkich organizacji uczestniczących w łańcuchu żywnościowym:

- producenci żywności i pasz,
- transport i przechowywanie żywności i pasz,
- firmy dystrybucyjne (magazyny, hurtownie, itp.),
- producentów dodatków do żywności,
- producentów wyposażenia maszyn i urządzeń,
- opakowań do kontaktu z żywnością,
- środków czystości (GHP i HACCP),
- usługodawców (obsługa higieniczna, DDD),
- producentów pierwotnych (rolników).

ISO 22000 składa się z czterech kluczowych elementów, które zapewniają bezpieczeństwo, na przestrzeni całego łańcucha żywnościowego. Do tych elementów zaliczamy:

- wzajemną komunikację (wewnętrzną i zewnętrzną),
- zarządzanie systemem,
- PRP - programy podstawowe (np. **Good Manufacturing Practice (GMP)** *dobra praktyka wytwarzania*),
- zasady HACCP.

ISO 22000 zawiera 8 rozdziałów takich jak:

- Zakres
- Norma powołana
- Terminy i definicje
- System zarządzania bezpieczeństwem żywności
- Odpowiedzialność kierownictwa
- Zarządzanie zasobami
- Planowanie i realizacja bezpiecznych produktów
- Walidacja, weryfikacja, ciągłe doskonalenie systemu zarządzania bezpieczeństwem żywności.

ISO 22000 tworzy grupę norm, do których zaliczamy:

- **ISO 22000:2005**, Systemy zarządzania bezpieczeństwem żywności - Wymagania dla wszystkich organizacji w łańcuchu żywnościowym

- **ISO/TS 22004:2005**, System Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności - Przewodnik do zastosowania ISO 22000:2005 (norma stanowi istotną pomoc dla małych i średnich przedsiębiorstw na całym świecie)
- **ISO/TS 22003:2007**, System Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności - Wymagania dla jednostek auditujących i certyfikujących (norma ujedynolici sposób akredytacji i zdefiniuje zakres auditu)
- **ISO 22005:2007**, Identyfikowalność w łańcuchu żywnościowym - Ogólne wymagania i przewodnik do zaprojektowania systemu identyfikowalności.
- **Systemy bezpieczeństwa żywności BRC (Global Standard for Food Safety to standard Brytyjskiego Konsorcjum Detalistów - British Retail Consortium)** – jest to zestaw branżowych norm technicznych, które określają wymagania stawiane firmie w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności w procesie produkcji, pakowania, przechowywania i dystrybucji. Pierwotnie opracowana przez British Retail Consortium, norma użytkowana jest na całym świecie wśród sprzedawców detalicznych i markowych producentów w UE, Ameryce Północnej. W lipcu 2011 r. wprowadzono wydanie 6, które obowiązywać będzie od stycznia 2012. BRC podobnie jak normy serii ISO 9000 skupia uwagę na potrzebach i oczekiwaniach klienta, wymaga regularnych przeglądów i auditów wewnętrznych w obszarach mających krytyczny wpływ na bezpieczeństwo. Nakłada obowiązek nadzorowania zakupów, akceptacji monitorowania dostawców, opracowania procedur wykazujących zgodność systemu z wytycznymi BRC oraz nadzorowania dokumentacji. Wymaga ponadto sporządzenia specyfikacji surowców i wyrobów gotowych, opracowania systemu identyfikowalności (od źródła surowców po wyrób gotowy) czy zarządzania reklamacjami. BRC precyzuje również wymagania dotyczące:
  - środowiska zakładu zarówno zewnętrznego (lokalizacja i otoczenie) jak i wewnętrznego (zasady postępowania, wyposażenie, stan powierzchni typu ściany, sufity, okna itp.),
  - pomieszczeń,
  - postępowania z odpadami,
  - kontroli szkodników,
  - transportu,
  - wyrobu, uwzględniając jego projektowanie i rozwój,

- kontroli alergenów, metali, opakowania,
  - prowadzenia analiz krytycznych dla bezpieczeństwa wyrobu,
  - zwalniania wyrobu oraz identyfikację wyrobów niezgodnych.
- **Międzynarodowy Standard Żywności – IFS (International Food Standard)** - jest to system opracowany przez detalistów niemieckich zrzeszonych w HDE (Hauptverband des Deutschen Einzelhandels E.V. Germany - Niemiecka Federacja Sprzedawców detalicznych) oraz detalistów francuskich zrzeszonych w FCD (Federation des Entreprises du Commerce et de la Distribution - Francuska Federacja Sprzedawców Detalicznych i Hurtowych). System IFS food skierowany jest przede wszystkim do producentów żywności (wyłączając produkcję pierwotną) i firm pakujących produkty spożywcze, którzy eksportują swoje produkty do krajów UE, współpracują lub chcieliby podjąć współpracę z sieciami handlowymi m.in z Niemiec, Francji, Szwajcarii czy Włoch.

## 11. Procedury ćwiczeń

### 11.1. Oznaczanie wody w mące

#### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest praktyczne zaznajomienie się z metodyką oznaczania zawartości wody i suchej substancji w wybranym produkcie spożywczym (w mące).

#### *Zasada metody*

Metoda polega na odparowaniu wody z próbki produktu w procesie suszenia i wagowym określeniu pozostałości (suchej masy).

#### *Odczynniki, sprzęt i aparatura*

- suszarka o temperaturze 130°C	1 szt.,
- waga techniczna z dokładnością ważenia do 0,01 g	1 szt.,
- naczynko wagowe	1 szt.,
- łopatką	1 szt.,
- eksykator ze środkiem suszącym P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1 szt.,
- szczypce metalowe	1 szt.

#### *Wykonanie oznaczenia*

Naczynko wagowe zważyć na wadze technicznej z dokładnością do 0,01 g. Przenieść do niego około 10 g próbki mąki, zważyć ponownie, a następnie umieścić w suszarce o temp. 130°C na 1 godz. Próbką ostudzić w eksykatorze (1 godz.), po czym zważyć z dokładnością do 0,01 g.

#### *Opracowanie wyników*

Obliczyć procentową zawartość suchej substancji i wody w badanej mące.

#### *Interpretacja wyników*

Uzyskany wynik odnieść do norm. Górna granica wilgotności dla wszystkich typów mąki wynosi 15%; wyjątek stanowi mąka krupczatka, która może zawierać do 15,3% wody.

### 11.2. Wybrane elementy analizy sensorycznej

#### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie czterech zadań sprawdzających wrażliwość sensoryczną testowanych osób, w ramach których Studenci poznają podstawowe zasady trzech testów sensorycznych.

#### *Wykonanie ćwiczenia*

Studenci wykonują ćwiczenia w parach: pierwsza osoba w parze podaje drugiej osobie (testowanej) próbki do ocen według zasad podanych w metodach, a następnie po ocenie odkodowuje próbki i sprawdza wyniki (kody i losowa prezentacja znana jest tylko osobie podającej próbki do oceny). Wzory karty ocen dla metod wykorzystywanych w ramach ćwiczeń zawarte są w opisie poszczególnych zadań.

### 11.2.1. Określenie zdolności rozpoznawania trzech z czterech podstawowych smaków

#### Zasada metody

Polega na ocenie zdolności rozpoznawania i definiowania trzech z czterech podstawowych smaków (słodkiego, słonego, kwaśnego i gorzkiego) przygotowanych odpowiednio z sacharozy, chlorku sodu i kwasu cytrynowego zgodnie z instrukcją przedstawioną w Tabeli 36, występujących w niewielkich, ponadprogowych stężeniach.

**Tabela 36.** Stężenia substancji smakowych [g/100 cm<sup>3</sup>] (wg Kostyra E. Wprowadzenie do analizy sensorycznej. W: Klepacka M.(red.) *Analiza żywności* Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa, 2005, str. 19)

Rodzaj smaku	Substancja bodźcowa	Stężenie roztworu [g/100 cm <sup>3</sup> ]
Słodki	sacharoza	0,8
Słony	chlorek sodu	0,25
Kwaśny	kwas cytrynowy	0,03

#### Zestaw odczynników i sprzętu laboratoryjnego

Roztwór wodny sacharozy (0,8 g/100 cm<sup>3</sup>),

Roztwór wodny chlorku sodu (0,25 g/100 cm<sup>3</sup>),

Roztwór wodny kwasu cytrynowego (0,03 g/100 cm<sup>3</sup>),

Pojemniki jednorazowe poj. 40 cm<sup>3</sup>.

#### Wykonanie ćwiczenia

Przygotować trzy zakodowane pojemniczki jednorazowe poj. 40 cm<sup>3</sup> i wlać do nich po około 20 cm<sup>3</sup> odpowiedniego rodzaju smaku (może to być jeden, dwa lub trzy rodzaje smaków). Osoba testowana otrzymuje zestaw trzech zakodowanych pojemniczków, podanych w losowej kolejności, identyfikuje rodzaj wyczuwanego smaku i wypełnia kartę oceny (Tabela 37). W celu neutralizacji smaku próbek korzysta z wody.

Tabela 37. Karta oceny do zadania 11.2.1

Karta oceny: Zdolność rozpoznawania podstawowych smaków			
Nazwisko i imię osoby testowanej	Kod próbki	Rodzaj smaku	Poprawność typowania [tak/nie]

### *Interpretacja wyników*

Prawidłowe zidentyfikowanie wszystkich smaków jest wypełnieniem minimum sensorycznego w zakresie próby na daltonizm smakowy. Porównać wyniki uzyskane przez wszystkie osoby w grupie.

### **11.2.2. Ocena smaku słodkiego wodnych roztworów sacharozy i kwasu cytrynowego metodą parzystą**

#### *Zasada metody*

Porównanie próbek w parach (jedna lub kilka par próbek) w celu określenia różnicy w jakości sensorycznej zdefiniowanej cechy.

#### *Zestaw odczynników i sprzętu laboratoryjnego*

Dwuskładnikowy roztwór wodny zawierający sacharozę (1,0 g/100 cm<sup>3</sup>) i kwas cytrynowy (0,04 g/100 cm<sup>3</sup>)

Dwuskładnikowy roztwór wodny zawierający sacharozę (0,6 g/100 cm<sup>3</sup>) i kwas cytrynowy (0,04 g/100 cm<sup>3</sup>)

Pojemniki jednorazowe poj. 40 cm<sup>3</sup>.

#### *Wykonanie ćwiczenia*

Przygotować cztery zakodowane pojemniczki jednorazowe poj. 40 cm<sup>3</sup>, wlać do nich po około 20 cm<sup>3</sup> powyższych roztworów. Osoba testowana otrzymuje zestaw dwóch par zakodowanych pojemniczków, podanych w losowej kolejności, wskazuje w każdej parze próbkę o intensywniejszym smaku słodkim i wypełnia kartę oceny (Tabela 38). W celu neutralizacji smaku próbek korzysta z wody.



Tabela 38. Karta oceny do zadania 11.2.2

Karta oceny: Ocena smaku słodkiego roztworów wodnych metodą parzystą				
Nazwisko i imię osoby testowanej	Numer pary	Kod próbki	Intensywność smaku słodkiego 1- słabsza; 2- intensywniejsza	Poprawność typowania [tak/nie]

### Interpretacja wyników

Zsumować wyniki testu każdej pary zakodowanych próbek na próbkę bardziej intensywną w smaku słodkim. Ocenić czy osoba testowana prawidłowo różnicowała próbki. Posumować wyniki uzyskane przez pozostałych członków grupy i podać wynik całego zespołu.

### 11.2.3. Ocena intensywności smaku słonego wodnych roztworów chlorku sodu metodą szeregowania

#### Zasada metody

Polega na uszeregowaniu kilku próbek pod względem intensywności określonej cechy jakościowej.

#### Zestaw odczynników i sprzętu laboratoryjnego

Roztwory wodne chlorku sodu o stężeniu odpowiednio: 0,20 g/100 cm<sup>3</sup>, 0,35 g/100 cm<sup>3</sup>, 0,50 g/100 cm<sup>3</sup>, 0,70 g/100 cm<sup>3</sup>,

Pojemniki jednorazowe poj. 40 cm<sup>3</sup>.

#### Wykonanie ćwiczenia

Przygotować pięć zakodowanych pojemniczków jednorazowych poj. 40 cm<sup>3</sup>, wlać do nich po około 20 cm<sup>3</sup> odpowiedniego roztworu chlorku sodu (przy czym do dwóch zakodowanych pojemniczków wlać roztwór NaCl o stężeniu 0,35 g/100 cm<sup>3</sup>). Osoba testowana otrzymuje pięć zakodowanych pojemniczków, podanych w losowej kolejności. Zadaniem osoby testowanej jest uszeregowanie próbek od największej do najmniejszej intensywności smaku słonego i wypełnienie karty oceny (Tabela 39). W celu neutralizacji smaku próbek korzysta z wody.

Tabela 39. Karta oceny do zadania 11.2.3

Karta oceny: Ocena smaku słonego wodnych roztworów chlorku sodu metodą skalowania						
Nazwisko i imię osoby testowanej	Kod próbki	Kod próbki	Kod próbki	Kod próbki	Kod próbki	Poprawność skalowania [tak/nie]
	<i>Największa intensywność smaku słonego</i>				<i>Najmniejsza intensywność smaku słonego</i>	

#### *Interpretacja wyników*

Zsumować wyniki testu dla każdej osoby i całego zespołu.

#### **11.2.4. Ocena intensywności smaku słodkiego modyfikowanego roztworu pomarańczowego metodą skalowania**

##### *Zasada metody*

Zasada metody polega na ocenie intensywności analizowanej cechy (cech) jakościowej na skali ustrukturowanej.

##### *Zestaw odczynników i sprzętu laboratoryjnego*

Handlowy napój pomarańczowy,


Handlowy napój pomarańczowy z dodatkiem sacharozy do stężenia odpowiednio: 0,5 g/100 cm<sup>3</sup>, 1,0 g/100 cm<sup>3</sup>, 2,0 g/100 cm<sup>3</sup>, 3,0 g/100 cm<sup>3</sup>,

Pojemniki jednorazowe poj. 40 cm<sup>3</sup>.

##### *Wykonanie ćwiczenia*

Przygotować pięć zakodowanych pojemniczków jednorazowych poj. 40 cm<sup>3</sup>, wlać do nich po około 20 cm<sup>3</sup> przygotowanych próbek napoju (bez i z dodatkiem sacharozy). Osoba testowana otrzymuje pięć zakodowanych pojemniczków, podanych w losowej kolejności. Zadaniem osoby testowanej jest ocena intensywności smaku słodkiego próbek napoju pomarańczowego i zaznaczenie odbieranego wrażenia w odpowiedniej klatce skali karty ocen (Tabela 40); każda zakodowana próbka musi być zaznaczona na osobnej skali). W celu neutralizacji smaku próbek można skorzystać z wody.

Tabela 40. Karta oceny do zadania 11.2.4

Karta oceny: Ocena smaku słodkiego modyfikowanego napoju pomarańczowego metodą skalowania													
Nazwisko i imię osoby testowanej	Kod próbki	Skala strukturovana	Poprawność skalowania [tak/nie]										
		 <i>Najmniejsza intensywność smaku słodkiego</i> <span style="margin-left: 200px;"><i>Największa intensywność smaku słodkiego</i></span>											
		<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>											
		<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>											
		<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>											
		<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>											
		<table border="1" style="width: 100%; height: 20px;"> <tr> <td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td> </tr> </table>											

### Interpretacja wyników

Zsumować wyniki testu dla każdej osoby, a następnie całego zespołu. Na podstawie uzyskanych danych obliczyć średnią wyników ocen słodkości napoju pomarańczowego dla każdej próbki. Wyniki omówić.

### Opracowanie wyników

Sprawozdanie powinno zawierać opis części eksperymentalnej oraz zestawienie wyników uzyskanych w poszczególnych zadaniach wraz z ich opracowaniem i dyskusją zgodną z zaleceniami podanymi powyżej.

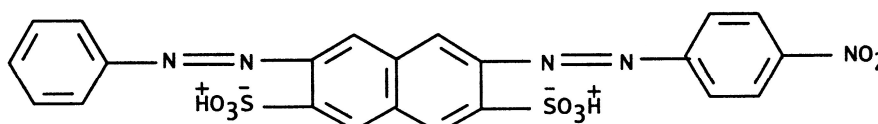
### 11.3. Oznaczanie białka w mleku metodą spektrofotometryczną

#### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości białka w mleku metodą spektrofotometryczną.

#### *Zasada metody*

Metoda wykorzystuje zdolność czerni amidowej 10B do wbudowywania się w strukturę białka i tworzenia nierozpuszczalnego kompleksu. Czerni amidowa 10B (Rys. 98) jest barwnikiem diazowym, pochodną kwasu 8-amino-1-naftolo-3,6-disulfonowego, *p*-nitroaniliny i aniliny. Posiada dwie grupy sulfonowe, które w środowisku o pH niższym od punktu izoelektrycznego białek są zdysocjowane (aniony) i wiążą się z grupami kationowymi białek.



Rys. 98. Czerni amidowa 10B

Kompleks ten można usunąć przez odwirowanie lub sączenie. Ilość strąconego związku jest proporcjonalna do zawartości białka. Nadmiar czerni amidowej pozostaje w roztworze i zabarwia go, a intensywność tego zabarwienia jest odwrotnie proporcjonalna do ilości białka w analizowanym produkcie. Czerni amidowa 10B nie wiąże się z niebiałkowymi związkami azotowymi.

#### *Odczynniki, sprzęt i aparatura*

- Podstawowy roztwór czerni amidowej 10B: w kolbie miarowej poj. 1000 cm<sup>3</sup>, zawierającej około 300 cm<sup>3</sup> wody destylowanej, rozpuścić 3,17 g kwasu cytrynowego, 0,4156 g fosforanu disodowego (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O) i 0,088 g czerni amidowej 10B. Całość starannie wymieszać i rozpuścić, po czym uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Roztwór powinien wykazywać pH 2,35.

- Kazeina.
- Bibuła filtracyjna 6 szt.,
- Lejek 6 szt.,
- Pipeta poj. 0,5 cm<sup>3</sup> 6 szt.,
- Pipeta poj. 10 cm<sup>3</sup> 1 szt.,
- Zlewka 1 szt.,

- Probówki wirówkowe poj. 10 cm <sup>3</sup> z korkami	6 szt.,
- Kolba miarowa poj. 1000 cm <sup>3</sup>	1 szt.,
- Kolba miarowa poj. 10 cm <sup>3</sup>	5 szt.,
- Wirówka laboratoryjna	1 szt.,
- Spektrofotometr UV/Vis	1 szt.,
- Waga analityczna	1 szt.

### *Wykonanie oznaczenia*

*Analiza próbki mleka.* Do grubościennej probówki wirówkowej odmierzyć 2,0 cm<sup>3</sup> mleka i dodać 8 cm<sup>3</sup> podstawowego roztworu czerni amidowej 10B. Probówkę zatkać korkiem, wstrząsać 5 minut, po czym odkorkować i wyważyć wobec drugiej probówki wirówkowej zawierającej wodę. Odwirować przez 10 min. przy prędkości 4000 obr./min. Roztwór przesączyć przez bibułę filtracyjną. Zmierzyć absorbancję przy długości fali  $\lambda = 590$  nm w odniesieniu do wody destylowanej.

*Sporządzenie i analiza roztworów wzorcowych kazein.* Do pięciu probówek wirówkowych odważyć na wadze analitycznej z dokładnością 0,1 mg odpowiednio: 7 mg, 10 mg, 13 mg, 16 mg i 19 mg kazeiny. Do każdej z nich wprowadzić 2 cm<sup>3</sup> wody destylowanej i 8 cm<sup>3</sup> roztworu podstawowego czerni amidowej 10B. Probówki zatkać korkiem, wstrząsać 5 minut, po czym odkorkować i wyważyć wobec probówek wirówkowych zawierających wodę. Odwirować przez 10 min. przy prędkości 4000 obr./min. Roztwory przesączyć przez bibułę filtracyjną. Analizę roztworów wzorcowych kazeiny wykonać identycznie jak dla próbki badanej.

### *Opracowanie wyników*

Sprawozdanie powinno zawierać część teoretyczną i praktyczną. W części praktycznej przedstawić procedurę sporządzania roztworów kalibracyjnych oraz dokładnie opisać dalsze postępowanie analityczne.

Ze zmierzonych wartości absorbancji roztworów wzorcowych wyznaczyć wartości średnie. Na papierze milimetrowym wykreślić zależność  $A = f(c)$ ; wyznaczyć równanie krzywej kalibracyjnej metodą najmniejszych kwadratów.

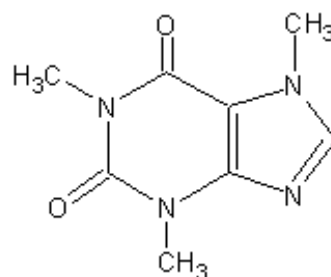
Zmierzyć wartość absorbancji próbki mleka 5-krotnie. Nanieść wartości absorbancji na wykres krzywej kalibracyjnej i odczytać odpowiadające im stężenia; stężenie białka w mleku wyznaczyć także z równania krzywej kalibracyjnej.

Wyznaczyć średnią zawartość białka w badanej próbce; przeprowadzić statystyczną ocenę wyników za pomocą testu t-Studenta na poziomie ufności 0,95.

Skomentować uzyskane wyniki.

## 11.4. Oznaczanie kofeiny

*Budowa oraz właściwości fizyczne kofeiny*



Rys. 99. Budowa chemiczna kofeiny

Kofeina (3,7-dihydro-1,3,7-trimetylo-1H-puryno-2,6-dion) znana również pod nazwą 1,3,7-trimetyloksantyna jest związkiem chemicznym o masie molowej 194,19 g/mol. W stanie czystym tworzy białe, długie, giętkie kryształy o temperaturze topnienia 237°C i o gęstości 1,2 g/cm<sup>3</sup>. Rozpuszcza się w gorącej wodzie, chloroformie i benzenie. Jest gorzka w smaku. W budowie jest zbliżona do dwóch innych alkaloidów purynowych: teobrominy i teofiliny.

Kofeina zbudowana jest z dwóch pierścieni: pierwszym sześciowęglowym, drugim natomiast pięciowęglowym, w których po dwa atomy węgla zastąpione zostały atomami azotu. Każdy atom azotu w pierścieniu sześciowęglowym połączony jest wiązaniem pojedynczym z grupą metylową –CH<sub>3</sub>, pozostałe wolne atomy węgla połączone są wiązaniem podwójnym z atomem tlenu. W drugim pierścieniu natomiast tylko jeden z atomów azotu połączony jest wiązaniem pojedynczym z grupą metylową –CH<sub>3</sub>.

Kofeina jest alkaloidem czyli związkiem organicznym pochodzenia roślinnego, zawierającym układ cykliczny z atomami azotu w pierścieniu. Alkaloidy wykazują silne działanie fizjologiczne na organizm człowieka, niejednokrotnie toksyczne. Do alkaloidów zaliczamy również związki takie jak morfina, kodeina czy chinina.

Ze względu na układ pierścieni oraz ilość atomów azotu w każdym w nich kofeinę zaliczamy do pochodnych puryny, heterocyklicznego, aromatycznego związku

organicznego, który składa się z fragmentów pirydyny i imidazolu. Związek ten w czystej postaci nie jest szeroko rozpowszechniony w przyrodzie, lecz pełni bardzo istotną rolę w każdym żywym organizmie, gdyż stanowi podstawę adeniny i guaniny, dwóch zasad azotowych wchodzących w skład kwasów nukleinowych (DNA i RNA).

#### *Źródła kofeiny*

Kofeina jest głównym alkaloidem nasion krzewu kawowego *Coffea arabica*. Występuje także w innych roślinach z rodzin *Theace* i *Sterculiaceae*. Kofeina znajduje się również w liściach herbaty (teina). Źródłami kofeiny są rośliny z rodziny Marzanowatych (*Rubiaceae*), między innymi przedstawiciel flory polskiej przytulia (*Galium*) czy chinowiec (*Cinchona*), oraz rodziny *Theace* i *Sterculiaceae*. Znaczne ilości kofeiny znaleźć możemy również w guaranie (*Pasta Guarana*), liściach mate (*Herba mate*) oraz w nasionach kawowca (*Theobroma cacao* L.).

#### *Działanie kofeiny*

Kofeina do krwi dostaje się z przewodu pokarmowego. Jest wchłaniana już po około 30 - 45 minutach po jej spożyciu. Czas utrzymywania się jej we krwi to w przybliżeniu 4 godziny. W zależności od organizmu może się on wahać od 2 do 10 godzin. Kofeina jest stymulatorem centralnego układu nerwowego, łatwo przenika z krwi do mózgu, a tam ze względu na swoje znaczne podobieństwo w budowie do adenozyiny wiąże się z receptorami adenozyinowymi i blokuje je. Adenozyina jest substancją naturalnie występującą w organizmie człowieka, która pośredniczy w aktywności mózgu, wpływając na stan snu i czuwania. W konsekwencji podnosi się aktywność dopaminy. Dopamina jest to neuroprzekaźnik, który odpowiada za większość efektów kawy takich jak poprawę koncentracji, zmniejszenie uczucia senności. Blokowanie receptorów adenozyinowych może również wpłynąć na kurczenie się naczyń krwionośnych, co oddziałuje na napięcie naczyń znajdujących się w mózgu, a tym samym zmniejszyć objawy migreny oraz bólów głowy innego pochodzenia. Te właściwości kofeiny wykorzystane zostały przez producentów leków, którzy stosują ją jako istotny składnik leków przeciwbólowych.

Spożywanie kofeiny może spowodować ogólne polepszenie koordynacji organizmu oraz poprawienie koncentracji. Jednakże zbyt duża dawka kofeiny może mieć negatywny wpływ na funkcjonowanie organizmu powodując uczucie zmęczenia lub zaburzenia koordynacji ruchowej. Dawki powyżej 2000 mg mogą również powodować bezsenność, drżenie mięśni lub przyśpieszenie oddechu. Częste picie

napojów, których składnikiem jest kofeina może także przyczynić się do podniesienia się ciśnienia tętniczego krwi, a tym samym przyspieszenia bicia serca, gdyż powoduje ona uwalnianie się kortyzolu i adrenaliny, które są odpowiedzialne za występowanie takich efektów. Kofeina również posiada właściwości moczopędne, powoduje zwiększenie wydzielania kwasu żołądkowego oraz prowadzi do przyspieszenia metabolizmu.

### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest wyodrębnienie i oznaczenie kofeiny z próbki kawy lub czerwonej herbaty z wykorzystaniem metody HPLC z detektorem UV.

### *Odczynniki, sprzęt i aparatura*

- zlewki 250 cm<sup>3</sup>,
- kolby 250 cm<sup>3</sup>,
- zestaw HPLC,
- waga,
- pipety,
- buteleczki zakręcane 2 cm<sup>3</sup>,
- strzykawka do HPLC,
- kolumna SPE.

### *Wykonanie oznaczenia zawartości kofeiny w kawie metodą HPLC*

#### *1. Przygotowanie roztworów*

- woda amoniakalna (0,3 mol/ dm<sup>3</sup>) / metanol , 90+10 mieszanina objętościowa 11 cm<sup>3</sup> (2 cm<sup>3</sup> 25%NH<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O + 8 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O + 1 cm<sup>3</sup>MeOH),
- rozpuszczalnik wymywający do kolumny oczyszczającej metanol/woda/kwas octowy 75:25:1 v/v, 10,1 cm<sup>3</sup> (7,5 cm<sup>3</sup> MeOH + 2,5 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O +0,1 cm<sup>3</sup> CH<sub>3</sub>COOH),
- faza ruchoma metanol/woda 30:70, v/v,
- etanol/woda 1:4, v/v – do sporządzenia roztworów wzorcowych.

#### *2. Sporządzanie roztworów wzorcowych*

- odważyć 1 mg kofeiny i rozpuścić w 20 cm<sup>3</sup> mieszaniny etanol/woda (w proporcjach 1:4 (4 cm<sup>3</sup> MeOH +16 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O). Uzyskuje się 20 cm<sup>3</sup> roztworu podstawowego o stężeniu kofeiny 0,05 g/dm<sup>3</sup>,



- roztwór podstawowy o stężeniu kofeiny  $0,05 \text{ g kofeiny/dm}^3$  – używany do produktów standardowych (nieodkofeinowanych)
- roztwór podstawowy rozcieńczyć 10-krotnie wodą destylowaną, by uzyskać stężenie roztworu wzorcowego równe  $0,005 \text{ g kofeiny/dm}^3$ .

### 3. Przygotowanie kawy do analizy

- odważyć 1g herbaty z dokładnością do  $0,0001\text{g}$  oraz 4g MgO ( $\pm 0,5\text{g}$ ),
- umieścić próbkę i MgO w kolbie o pojemności  $250 \text{ cm}^3$  i dodać  $100 \text{ cm}^3$  wody destylowanej,
- zawartość kolby zamieszać, zabezpieczyć korkiem i ogrzewać w łaźni wodnej w temperaturze  $90^\circ\text{C}$  przez 20 min stale mieszając, pozostawić roztwór do odstania się osadu,
- przesączyć roztwór przez sączonego bibułowy.

### 4. Oczyszczanie ekstraktu kofeiny za pomocą SPE

#### *Przygotowanie kolumny do ekstrakcji techniką SPE*

- przemyć kolumnę  $5 \text{ cm}^3$  MeOH, nie pozwalając, aby złożo wyschło,
- następnie czynność przemywania powtórzyć, używając  $5 \text{ cm}^3 \text{ H}_2\text{O}$ , również nie dopuszczając do wyschnięcia złoża.

#### *Naniesienie próbki z kofeiną*

- pobrać  $2 \text{ cm}^3$  przesączonego roztworu kofeiny i wprowadzić na kolumnę,
- zamknąć kolumnę, gdy powierzchnia roztworu opadnie tuż poniżej poziomu krzemionki.

#### *Usuwanie niepożądanych związków chemicznych*

- odmierzyć  $2,5 \text{ cm}^3$  mieszaniny woda amoniakalna/metanol i przepuścić przez kolumnę do poziomu tuż poniżej poziomu krzemionki,
- powtórzyć czynność, używając ponownie  $2,5 \text{ cm}^3$  roztworu,
- przedmuchać kolumnę  $20 \text{ cm}^3$  powietrza.

#### *Wymywanie kofeiny*

- pod kolumną umieścić kolbę pomiarową o objętości  $10 \text{ cm}^3$ ,
- dodać  $7,5 \text{ cm}^3$  mieszaniny wymywającej (woda/metanol/kwas octowy), poczekać aż rozpuszczalnik całkowicie spłynie z kolumny do kolby (*zbieranie głównej frakcji*),

- dopełnić kolbę do 10 cm<sup>3</sup> wodą destylowaną.

#### *Regeneracja kolumny*

Kolumnę zregenerować metanolem i wodą, przepuszczając kolejno:

- 5 cm<sup>3</sup> MeOH,
- 5 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O.

#### *5. Analiza HPLC oczyszczonego ekstraktu*

Wykonać analizę HPLC otrzymanych próbek oraz roztworów wzorcowych.

*Warunki pracy HPLC:*

- kolumna HPLC C18,
- przepływ fazy ruchomej 1 cm<sup>3</sup>/min,
- długość fali  $\lambda = 272$  nm,
- faza ruchoma metanol/woda 30:70, mieszanina objętościowa.

#### *Opracowanie wyników*

Obliczyć zawartość kofeiny w próbce, wyrażoną w gramach na 100 g suchej masy:

#### *Interpretacja wyników*

Wyciągnąć wnioski dotyczące:

- procedury wyodrębniania kofeiny,
- analizy HPLC,
- zawartości kofeiny.

### **11.5. Analiza kwasów tłuszczowych w smalcu metodą GC**

#### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest przeprowadzenie triacylogliceroli obecnych w próbce smalcu w estry metylowe kwasów tłuszczowych metodą przeestryfikowania (zgodnie z normą europejską EN ISO 5509) a w dalszej kolejności dokonanie analizy ilościowej tych estrów techniką chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym GC-FID z zastosowaniem metody normalizacji wewnętrznej.

#### *Odczynniki i aparatura*

- wodorotlenek potasu – roztwór metanolowy 2 mol/dm<sup>3</sup>
- roztwór izooktanu
- kwaśny siarczan(VI) sodu

- roztwór smalcu w izooktanie
- probówki miarowe z korkiem (10 cm<sup>3</sup>) 1 szt.,
- pipety poj. 0,2 cm<sup>3</sup> oraz 5 cm<sup>3</sup> 2 szt.,
- pipetka Pasteura 2 szt.,
- wialka z nakrętką poj. 2 cm<sup>3</sup> 1 szt.,
- chromatograf gazowy
- rejestrator

### *Przygotowanie próbki do analiz*

Do probówki z podziałką (10 cm<sup>3</sup>) wprowadzić przy użyciu pipetki Pasteura 1 cm<sup>3</sup> próbki smalcu, następnie dodać pipetą 3 cm<sup>3</sup> izooktanu i wstrząsać. Wprowadzić przy użyciu strzykawki 200 µl metanolowego roztworu wodorotlenku potasu (ostrożnie otworzyć zatopioną ampułkę z odczynnikiem). Całość energicznie wstrząsać przez 30 sekund. Po początkowym zmętnieniu nastąpi wydzielenie się glicerolu, a mieszanina reakcyjna stanie się klarowna. Następnie celem zneutralizowania wodorotlenku potasu dodać do roztworu ok. 1 g kwaśnego siarczanu(VI) sodu – energicznie wstrząsać. Po opadnięciu soli zebrać pipetką Pasteura górną warstwę zawierającą estry metylowe i przenieść do czystej fiolki. Przygotowaną w ten sposób próbkę analizować techniką chromatografii gazowej.

### *Analiza właściwa estrów metylowych kwasów tłuszczowych*

Wydzieloną frakcję estrów metylowych analizować techniką chromatografii gazowej.

*Warunki rozdzielania przy pomocy techniki GC:*

- chromatograf gazowy Perkin Elmer
- kolumna kapilarna RTX 1; 20 m; 0,18 mm średnica wewnętrzna; 0,2 µm grubość filmu fazy ciekłej;
- początkowa temp. kolumny 120°C, narost 2°C/min do 220°C; 10 min izotermicznie w 220°C
- temperatura dozownika 300°C;
- temperatura detektora 300°C;
- gaz nośny Ar, 90 kPa.

### *Obsługa chromatografu gazowego*

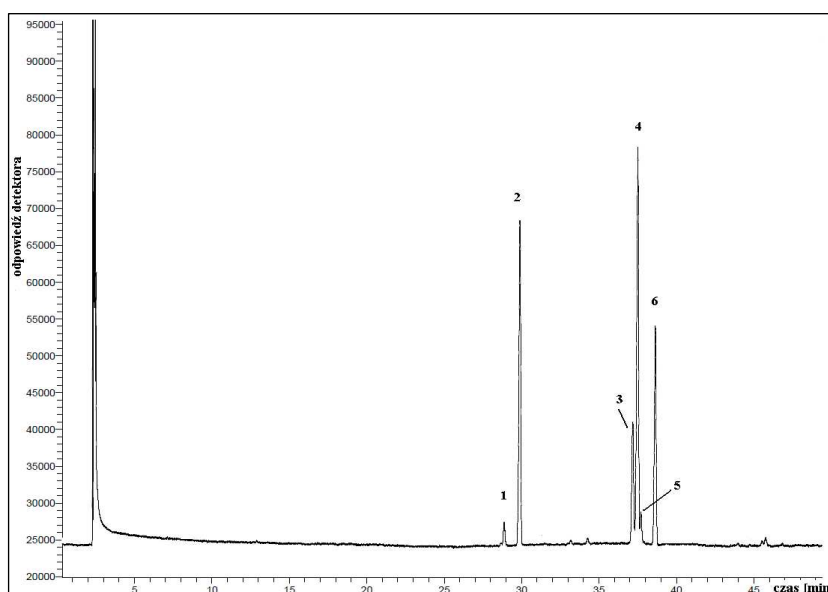
1. Włączyć przepływ gazów (argonu, powietrza, wodoru) poprzez odkręcenie zaworów na butlach znajdujących się w wiacie na zewnątrz
2. Włączyć zasilanie chromatografu i przełączyć przycisk na pozycję „ON”
3. Wprowadzić do komputera podane wyżej parametry rozdzielania i poczekać na ustabilizowanie się warunków.

*Punkty 1 - 3 wykonać przy ścisłej kontroli prowadzącego*

4. Wykonać pierwszą analizę. W tym celu należy nabrać do strzykawki o pojemności 10  $\mu\text{l}$  określoną przez prowadzącego objętość badanej próbki (ok. 3  $\mu\text{l}$ ) i wprowadzić ją do dozownika. Analizować tę samą próbkę 3 razy.
5. Po skończonych analizach należy schłodzić dozownik i detektor do temperatury pokojowej (0.5-1 h) i dopiero wtedy można wyłączyć przepływ wszystkich gazów poprzez zakręcenie zaworu na butlach.
6. Wyłączyć zasilanie chromatografu i rejestratora.

### Opracowanie wyników

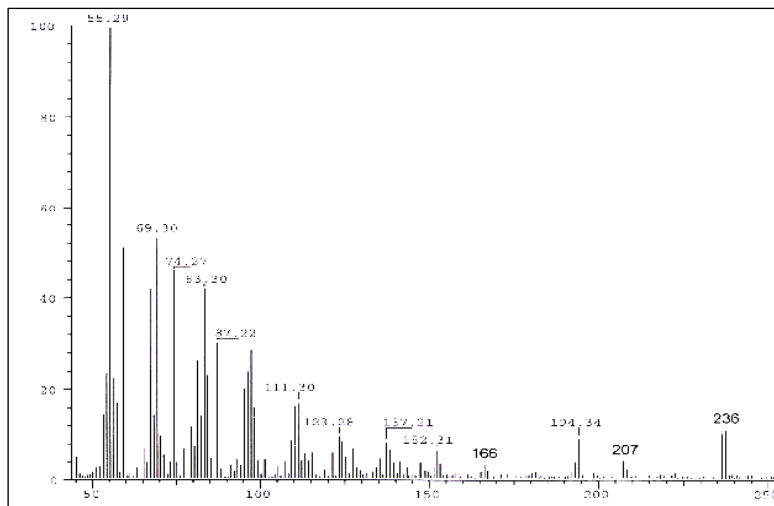
W wyniku przeprowadzanych analiz otrzymujemy następujący obraz:



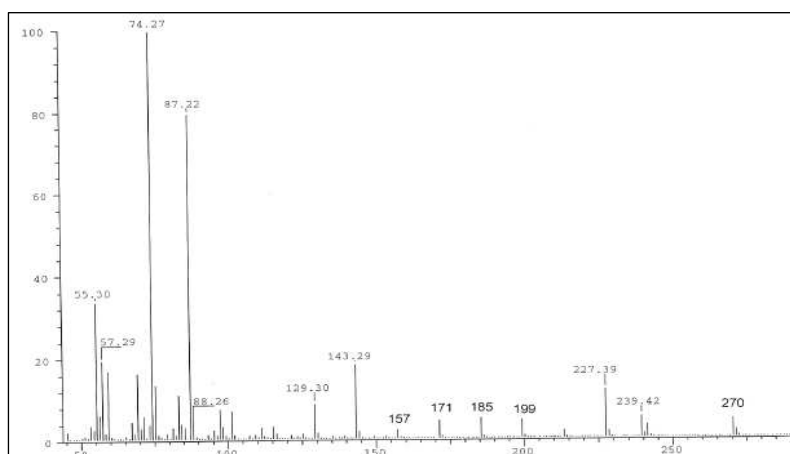
Na przedstawionym powyżej chromatogramie cyframi 1, 2, 3, 4, 5, 6, oznaczono estry metylowe następujących kwasów tłuszczowych:

- 16:1
- 16:0
- 18:1
- 18:1 } wiązanie podwójne usytuowane przy różnych at. C
- 18:1
- 18:0

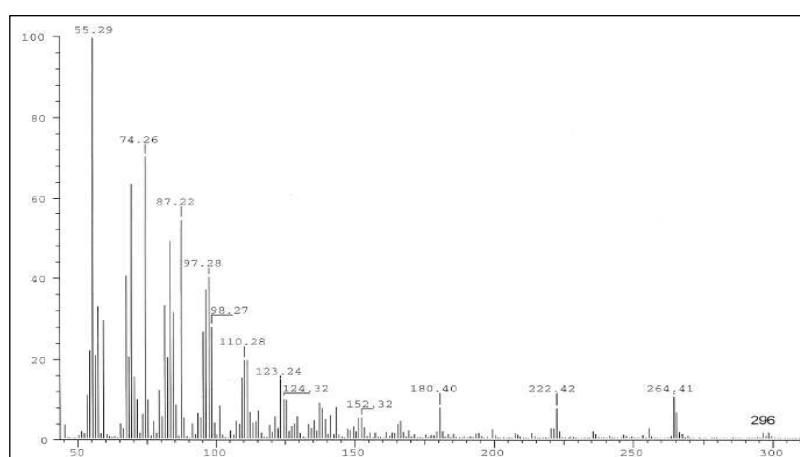
Identyfikacji dokonano metodą GC-MS, porównując otrzymane eksperymentalnie widma mas z widmami literaturowymi ([www.lipidlibrary.co.uk](http://www.lipidlibrary.co.uk)). Poprawność identyfikacji udokumentowano poprzez załączenie widm mas uzyskanych w wyniku jonizacji substancji wiązką elektronów o energii 70 eV (EI).



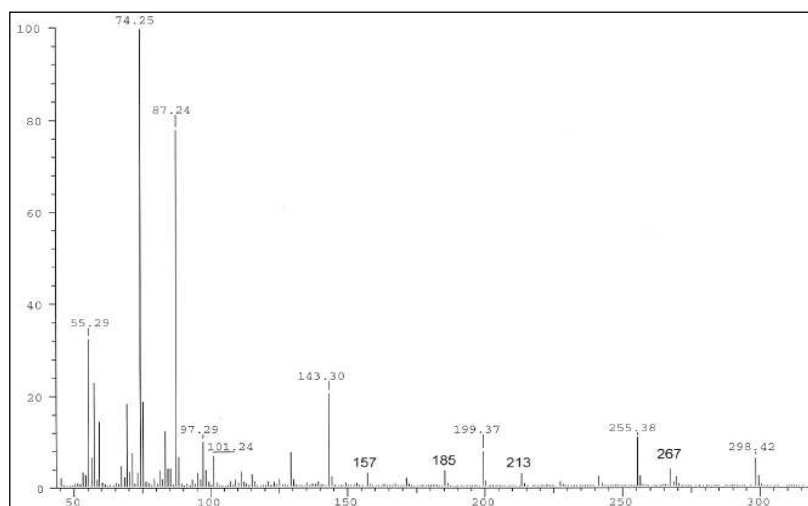
Widmo mas EI estru metylowego kwasu 1-heksadekenowego (16:1)



Widmo mas EI estru metylowego kwasu heksadekanowego (16:0)



Widmo mas EI estru metylowego kwasu 1-oktadekenowego (18:1)



Widmo mas EI estru metylowego kwasu oktadekanowego (18:0)

Na podstawie chromatogramów uzyskanych z analizy próbek smalcu należy określić metodą normalizacji wewnętrznej procentowy udział wszystkich składników (wynik podać jako wartość średnią z trzech prób). Z racji tego, iż nie dysponujemy odpowiednimi wzorcami estrów metylowych kwasów tłuszczowych, w obliczeniach nie należy uwzględniać współczynników korekcyjnych. W opracowaniu należy podać wszystkie obliczenia oraz dołączyć opracowane chromatogramy.

## 11.6. Oznaczanie "cukrów ogółem" w karmelkach metodą Bertranda

### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest zapoznanie Studentów z metodami oznaczania sacharydów i eksperymentalne wykonanie oznaczenia cukrów ogółem w karmelkach twardych metodą Bertranda.

### *Zasada metody*

Oznaczenie cukrów ogółem przeprowadza się metodą pośrednią na podstawie objętości manganianu(VII) potasu zużytego na miareczkowanie jonów  $Fe^{+2}$ , odpowiadających ilości miedzi zredukowanej przez sacharydy redukujące zawarte w badanym roztworze. Badany roztwór cukrów musi być wcześniej poddany hydrolizie kwasowej.

## Wykonanie ćwiczenia

### 1. Przygotowanie roztworu podstawowego karmelków twardych

#### Odczynniki:

- fenoloftaleina, 1% roztwór w EtOH,
- wodorotlenek sodu (NaOH), 0,1 molowy roztwór wodny.

#### Sprzęt:

- moździerz 1 szt,
- zlewka 250 cm<sup>3</sup> 1 szt,
- kolba miarowa 250 cm<sup>3</sup>l 1 szt,
- waga techniczna 1 szt
- pipeta poj. 5 cm<sup>3</sup> 1 szt.

## Wykonanie

Karmelki (2 - 4 sztuki) rozetrzeć w suchym moździerzu, następnie na wadze technicznej odważyć około 4 g rozartych cukierków z dokładnością  $\pm 0,01$  g. Przenieść do zlewki (poj. 250 cm<sup>3</sup>) i rozpuścić w około 100 cm<sup>3</sup> wody destylowanej. Całość zobojętnić 0,1 molowym roztworem NaOH wobec fenoloftaleiny do słabo różowego zabarwienia, przenieść ilościowo do kolby miarowej (poj. 250 cm<sup>3</sup>) i dopełnić wodą destylowaną do kreski.

### 2. Przeprowadzenie inwersji badanego produktu w celu oznaczenia zawartości cukrów ogółem

#### Odczynniki:

- fenoloftaleina, 1% roztwór w EtOH,
- kwas siarkowy(VI) (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), stężony,
- wodorotlenek sodu (NaOH), 10% roztwór wodny.

#### Sprzęt:

- kolba stożkowa poj. 250 cm<sup>3</sup> 1 szt.,
- kolba miarowa poj. 250 cm<sup>3</sup> 1 szt.,
- pipeta poj. 5 cm<sup>3</sup> 2 szt.,
- cylinder miarowy poj. 50 ml 1 szt.,
- cylinder miarowy poj. 25 ml 1 szt.,
- lejek 1 szt.,
- bagietka 1 szt.,
- termometr 1 szt.,
- łaźnia wodna 1 szt.

## Wykonanie

Przygotować łaźnię wodną o temperaturze wody 80°C. Do kolby stożkowej poj. 250 ml wprowadzić 50 ml roztworu podstawowego karmelków, a następnie pipetą 5 ml stężonego kwasu siarkowego(VI) (ostrożnie), starannie wymieszać. Kolbę wstawić do łaźni wodnej o temp. 80°C, doprowadzić w ciągu 2-3 minut temperaturę roztworu w kolbie do temp. 68-71°C i utrzymywać przez kolejne 5 min. Kolbę schłodzić, po czym roztwór zobojętnić 10% roztworem NaOH wobec oranżu metylowego. Zawartość kolby stożkowej przenieść ilościowo do kolby miarowej poj. 250 ml i uzupełnić wodą destylowaną 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.

Do oznaczenia zawartości sacharydów ogółem metodą Bertranda należy pobrać 5 ml roztworu po inwersji i 15 ml wody.

### 3. Oznaczenie zawartości cukrów ogółem w karmelkach twardych metodą Bertranda

#### Odczynniki, sprzęt i aparatura

- manganian(VII) potasu, 0,005 M roztwór wodny,
- roztwór Bertranda I: 40 g siarczynu(VI) miedzi(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić do objętości 1000 cm<sup>3</sup>,
- roztwór Bertranda II: 200 g winianu sodu i potasu ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ) rozpuścić w około 500 cm<sup>3</sup> wody destylowanej w kolbie miarowej poj. 1000 cm<sup>3</sup>, dodać 150 g wodorotlenku sodu (NaOH) uprzednio rozpuszczonego w 250 cm<sup>3</sup> wody destylowanej; po wymieszaniu uzupełnić wodą destylowaną do kreski,
- roztwór Bertranda III: 50 g bezwodnego siarczynu(VI) żelaza(III) ( $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ) rozpuścić w 500 cm<sup>3</sup> gorącej wody destylowanej i po ochłodzeniu ostrożnie dodać 200 cm<sup>3</sup> stężonego kwasu siarkowego(VI) ( $d = 1,84 \text{ g/cm}^3$ ); całość uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1000 cm<sup>3</sup>. Należy sprawdzić, czy roztwór nie redukuje roztworu manganianu(VII) potasu, jeśli tak - dodać taką ilość roztworu  $\text{KMnO}_4$ , aby uzyskać lekko różowe zabarwienie, które samo zniknie.
- czasza grzejna 1 szt.,
- kolba stożkowa poj. 250 cm<sup>3</sup> 1 szt.,
- lejek Scotta 3G4 1 szt.,
- papierki lakmusowe 1 opak.,
- pipeta poj. 5 cm<sup>3</sup> 1 szt.,
- pipeta poj. 20 cm<sup>3</sup> 3 szt.,



- cylinder miarowy poj. 25 cm<sup>3</sup>

1 szt.

### Wykonanie

Do kolby stożkowej poj. 250 cm<sup>3</sup> wprowadzić 20 cm<sup>3</sup> badanego roztworu (tj. 5 cm<sup>3</sup> roztworu po inwersji i 15 cm<sup>3</sup> wody destylowanej), a następnie pipetami 20 cm<sup>3</sup> roztworu Bertranda I i 20 cm<sup>3</sup> roztworu Bertranda II. Zawartość kolby starannie wymieszać, po czym kolbę umieścić na czaszy grzejnej. Doprowadzić roztwór do wrzenia i utrzymać w tej temperaturze przez 3 minuty, a następnie odstawić do ostygnięcia. Kolbę postawić w położeniu ukośnym tak, aby strącony osad tlenku miedzi(I) cały czas był przykryty roztworem.

Ciecz znad osadu 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 roztwór badany należy rozcieńczyć i oznaczenie powtórzyć.

Płyn znad osadu - ostrożnie po bagietce - dekantować na lejek Scotta tak, aby nie dopuścić do odsłonięcia powierzchni osadu Cu<sub>2</sub>O, zarówno w kolbie, jak i na lejku. W tym celu nad osadem należy utrzymywać stale warstwę roztworu. Następnie osad z kolby przenieść ilościowo za pomocą gorącej wody na lejek Scotta, a następnie opłukać ścianki kolby gorącą wodą i przenieść roztwór na lejek (czynność powtórzyć kilkakrotnie). Osad na lejku przemywać tak długo gorącą wodą, aż zniknie niebieskie zabarwienie przesączu. Sączenie i przemywanie należy wykonywać możliwie szybko, aby nie nastąpiło utlenienie części osadu.

Lejek Scotta z osadem tlenku miedzi(I) przenieść i umieścić w czystej kolbie. Osad rozpuścić w 20 cm<sup>3</sup> roztworu Bertranda III i przesączyć do kolby. Należy przy tym uważać, aby cały osad będący na lejku został całkowicie rozpuszczony. Zazwyczaj stosuje się kilka (2-3) mniejszych porcji odczynnika Bertranda III. Jeżeli osad nie ulegnie całkowitemu rozpuszczeniu, należy dodać niewielką porcję roztworu Bertranda III. Na koniec sączone przemyć kilkakrotnie gorącą wodą do zaniku odczynu kwaśnego.

Przesącz w kolbie miareczkować 0,005 M roztworem manganianu(VII) potasu do wystąpienia jasnorożowego 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.

### Opracowanie wyników

Obliczyć miano miedziowe roztworu  $\text{KMnO}_4$  ( $T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}}$ )

$$T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}} = 5 \cdot c_m \cdot M_{\text{Cu}} \text{ [mg Cu / cm}^3 \text{ KMnO}_4\text{]}$$

gdzie:  $c_m$  – stężenie molowe roztworu  $\text{KMnO}_4$  [ $\text{mol/dm}^3$ ],

$M_{\text{Cu}}$  – masa molowa miedzi (63,57).

Korzystając z wyznaczonego miana miedziowego, obliczyć liczbę mg miedzi odpowiadającą zużytej do miareczkowania objętości  $\text{KMnO}_4$ , a następnie zamienić ją - korzystając z zamieszczonej poniżej tabeli (Tabela 41) - na równoważną jej ilość mg sacharydu inwertowanego zawartego w  $20 \text{ cm}^3$  próbki pobranej do oznaczenia. Obliczyć procentową zawartość „cukrów ogółem” w karmelkach twardych, uwzględniając zastosowane rozcieńczenia, wynik zaokrąglić do pierwszego miejsca po przecinku.

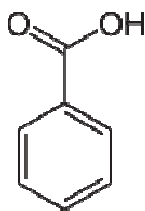
**Tabela 41.** Ilość miedzi zredukowanej i odpowiadające jej ilości sacharydu inwertowanego w metodzie Bertranda (wg Pacholek B. Oznaczenie zawartości sacharydów. W: Małecka M. (red.) *Wybrane metody analizy żywności* Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003, str. 67)

Ilość zredukowanej miedzi przez sacharydy [mg]	Ilość sacharydu inwertowanego [mg]	Ilość zredukowanej miedzi przez sacharydy [mg]	Ilość sacharydu inwertowanego, [mg]
20	9,70	45	22,42
21	10,20	46	22,94
22	10,70	47	23,47
23	11,20	48	24,00
24	11,70	49	24,53
25	12,20	50	25,06
26	12,71	51	25,59
27	13,22	52	26,12
28	13,72	53	26,66
29	14,23	54	27,19
30	14,73	55	27,72
31	15,24	56	28,25
32	15,75	57	28,78
33	16,25	58	29,31
34	16,76	59	29,84
35	17,27	60	30,38
36	17,77	61	30,92
37	18,28	62	31,46
38	18,78	63	32,01
39	19,30	64	32,55
40	19,80	65	33,09
41	20,32	66	33,63
42	20,84	67	34,17
43	21,37	68	34,72
44	21,89	69	35,26

## 11.7. Oznaczenie kwasu benzoowego w napoju bezalkoholowym metodą miareczkowania

### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest: zapoznanie się z obowiązującym rozporządzeniem Ministra Zdrowia w zakresie stosowania środków konserwujących, z metodami wykrywania i oznaczania dodatków do żywności oraz wykrywanie i oznaczenie zawartości kwasu benzoowego (Rys. 100) w napoju bezalkoholowym.



**Rys. 100.** Budowa chemiczna kwasu benzoowego

### *Zasada metody*

Metoda polega na ekstrakcji chloroformem kwasu benzoowego zawartego w próbce, odparowaniu rozpuszczalnika, rozpuszczeniu pozostałości w alkoholu etylowym i miareczkowaniu alkoholowego roztworu kwasu benzoowego 0,05 M roztworem NaOH w obecności fenoloftaleiny jako wskaźnika.

### *Odczynniki, sprzęt i aparatura*

- |   |         |
|---|---------|
| - wyparka rotacyjna                                 | 1 szt., |
| - biureta o pojemności 25 cm <sup>3</sup>           | 1 szt., |
| - rozdzielacz o pojemności 250 cm <sup>3</sup>      | 1 szt., |
| - cylinder miarowy o pojemności 100 cm <sup>3</sup> | 2 szt., |
| - kolba "sercówka" o pojemności 250 cm <sup>3</sup> | 1 szt., |
| - kolba stożkowa o pojemności 250 cm <sup>3</sup>   | 1 szt., |
| - kolba miarowa o pojemności 250 cm <sup>3</sup>    | 1 szt., |
| - kolba stożkowa o pojemności 50 cm <sup>3</sup>    | 3 szt., |
| - pipeta o pojemności 25 cm <sup>3</sup>            | 1 szt., |
| - pipeta o pojemności 10 cm <sup>3</sup>            | 1 szt., |
| - pipeta Pasteura                                   | 3 szt., |
| - lejek   | 2 szt.  |
| - alkohol etylowy, roztwór 95%,                     |         |
| - chlorek sodu NaCl, krystaliczny,                  |         |
| - chlorek sodu, roztwór nasycony,                   |         |
| - chloroform,                                       |         |
| - fenoloftaleina, roztwór 1%,                       |         |
| - kwas solny HCl, roztwór 10%,                      |         |
| - wodorotlenek sodu, roztwór 0,005 M,               |         |
| - wodorotlenek sodu, roztwór 10%.                   |         |

### *Wykonanie oznaczenia*

Pobrać pipetą 25 cm<sup>3</sup> próbki napoju i przenieść do kolby miarowej o pojemności 250 cm<sup>3</sup>, dodać 30 g krystalicznego chlorku sodu i po wymieszaniu lekko zalkalizować roztwór 10% roztworem NaOH, uzupełnić do kreski nasyconym roztworem chlorku

sodu, wymieszać i odstawić na 45 minut, mieszając od czasu do czasu. Następnie zawartość kolby przesączyć przez karbowany sącdek do kolby stożkowej o pojemności 250 cm<sup>3</sup>. 150 cm<sup>3</sup> przesącza przenieść do rozdzielacza, zubożyć 10% roztworem kwasu solnego wobec papierka lakmusowego, a następnie dodać jeszcze 5 cm<sup>3</sup> 10% roztworu kwasu solnego. Do zakwaszonego roztworu w rozdzielaczu dodać 30 cm<sup>3</sup> chloroformu i wstrząsać. Klarowną, dokładnie oddzieloną warstwę chloroformową przenieść do kolby "sercówki". Procedurę ekstrakcji wykonać jeszcze dwukrotnie, używając każdorazowo po 30 cm<sup>3</sup> chloroformu. Z połączonych ekstraktów chloroformowych oddestylować chloroform na wyparce rotacyjnej w temperaturze łaźni wodnej 40 °C. Suchą pozostałość rozpuścić w 15 cm<sup>3</sup> etanolu, dodać 15 cm<sup>3</sup> wody dejonizowanej i dobrze wymieszać. Do 3 kolbek stożkowych o pojemności 50 cm<sup>3</sup> przenieść pipetą po 10 cm<sup>3</sup> etanolowego roztworu kwasu benzoowego, dodać po 2 krople fenoloftaleiny i miareczkować 0,005 M roztworem NaOH do pojawienia się różowego zabarwienia, utrzymującego się co najmniej 30 s.

#### *Opracowanie wyników*

Na podstawie ilości wodorotlenku sodu zużytego do miareczkowania kwasu zawartego w próbie obliczyć zawartość kwasu benzoowego w mg na 1 dm<sup>3</sup> napoju bezalkoholowego. Za wynik końcowy oznaczenia przyjąć średnią arytmetyczną z trzech równoległych oznaczeń, jeżeli różnica między nimi nie przekracza 5 %.

#### *Interpretacja wyników*

Uzyskany wynik odnieść do norm.

### **11.8. Oznaczanie witaminy C w soku z kiszonej kapusty i soku z cytryny metodą miareczkową**

#### *Cel ćwiczenia*

Celem ćwiczenia jest: praktyczne zaznajomienie się z metodyką oznaczania zawartości witaminy C (bezpośrednia redukcyjność) w wybranym produkcie spożywczym (w soku z kiszonej kapusty, soku z cytryny).

#### *Zasada metody*

Oznaczenie polega na redukcji barwnego roztworu 2,6-dichlorofenolindofenolu do bezbarwnego leukozwiązku przez kwaśny roztwór kwasu askorbinowego.

#### *Odczynniki, sprzęt i aparatura*

- waga techniczna z dokładnością ważenia do 0,01 g                      1 szt,

- naczynko wagowe	1 szt.,
- łopatka	1 szt.,
- cylinder miarowy o pojemności 50 cm <sup>3</sup>	2 szt.,
- kolba miarowa o pojemności 50 cm <sup>3</sup>	2 szt.,
- biureta o pojemności 25 cm <sup>3</sup>	2 szt.,
- kolba stożkowa o pojemności 50 cm <sup>3</sup>	6 szt.,
- pipeta o pojemności 10 cm <sup>3</sup>	4 szt.,
- lejek	2 szt.,
- pipeta Pasteura	1 szt.,
- jodek potasu,	
- tiosiarczan sodu (0,001 mol/dm <sup>3</sup> ),	
- kwas siarkowy (1 mol/dm <sup>3</sup> ),	
- roztwór 2,6-dichlorofenoloindofenolu (barwnik Tillmansa),	
- roztwór skrobi,	
- 2% roztwór kwasu solnego HCl,	

### Wykonanie oznaczenia

1. *Oznaczenie miana 2,6-dichlorofenoloindofenolu przez miareczkowanie roztworem tiosiarczanu sodu.* W kolbie stożkowej z doszlifowanym korkiem o pojemności 50 cm<sup>3</sup> rozpuścić 100 mg jodku potasu w 5 cm<sup>3</sup> kwasu siarkowego (VI) o stężeniu 1 mol/dm<sup>3</sup>, dodać szybko 10 cm<sup>3</sup> roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu, kolbę zamknąć i pozostawić na 10 min w ciemnym miejscu. Wydzielony jod odmiareczkować roztworem tiosiarczanu sodu (0,001 mol/dm<sup>3</sup>), dodając 1 cm<sup>3</sup> roztworu skrobi. Miareczkowanie powtórzyć 3 razy. Wykonać próbę ślepą, w której zamiast roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu wprowadzić taką samą objętość wody destylowanej.

2. *Oznaczanie witaminy C w soku z kiszonej kapusty i soku z cytryny.* 20 cm<sup>3</sup> soku z kapusty oraz 20 cm<sup>3</sup> soku z cytryny umieścić w probówkach wirówkowych i odwirować (8000 obr./min, 10 min). 10 cm<sup>3</sup> odwirowanego soku z cytryny rozcieńczyć 2% HCl w kolbie miarowej o pojemności 50 cm<sup>3</sup>. Do trzech kolb stożkowych o pojemności 25 cm<sup>3</sup> pobrać po 10 cm<sup>3</sup> rozcieńczonego soku z cytryny i miareczkować barwnikiem Tillmansa do barwy lekko różowej utrzymującej się 10 s. Opisaną procedurę przeprowadzić dla odwirowanego soku z kiszonej kapusty. Wykonać ślepą próbę, w której zamiast rozcieńczonego soku pobrać wodę destylowaną. Do obliczeń przyjąć ilość zużytego roztworu barwnika pomniejszoną o ilość cm<sup>3</sup> barwnika zużytą w próbie ślepej.

### Opracowanie wyników

1. Obliczyć miano roztworu 2,6-dichlorofenoloindofenolu. Za miano roztworu tego barwnika przyjmuje się ilość mg kwasu askorbinowego utlenianego przez 1 cm<sup>3</sup> tego roztworu. Aby obliczyć miano barwnika, w pierwszym etapie należy obliczyć jego stężenie molowe (C<sub>M</sub>) na podstawie reakcji z tiosiarczanem sodu, w której na 1 mol barwnika przypadają 2 mole tiosiarczanu:

$$C_M = \frac{(V_W - V_Z)C_T}{2V_b}$$

V<sub>W</sub> – objętość tiosiarczanu sodu zużytego do zmiareczkowania roztworu barwnika [cm<sup>3</sup>],

V<sub>Z</sub> – objętość tiosiarczanu sodu zużytego do miareczkowania w próbie zerowej [cm<sup>3</sup>],

C<sub>T</sub> – stężenie roztworu tiosiarczanu sodu [mol/dm<sup>3</sup>],

V<sub>b</sub> – objętość roztworu barwnika [cm<sup>3</sup>].

Z równania reakcji między kwasem askorbinowym i 2,6-dichlorofenoloindofenolem wynika, że z 1 molem kwasu reaguje 1 mol barwnika, masa molowa kwasu askorbinowego wynosi 176 g/mol.

2. Na podstawie ilości barwnika zużytego do miareczkowania rozcieńczonego soku z kapusty, obliczyć zawartość witaminy C (bezpośrednia redukcyjność) w soku z kiszanej kapusty i soku z cytryny.

*Interpretacja wyników*

Uzyskany wynik odnieść do norm.

## Literatura

### Literatura podstawowa:

1. Nollet Leo M.L. *Handbook of Food Analysis*, Tom 1-3, Marcel Dekker, Inc. New York – Basel, 2004.
2. Praca zbiorowa pod redakcją Sikorski Z.E. *Chemia Żywności*, Wyd. 5, WNT, Warszawa, 2007.
3. Praca zbiorowa pod redakcją Klepacka M. *Analiza żywności*, Fundacja Rozwój SGGW, Warszawa 2005.
4. Praca zbiorowa pod redakcją Małecka M. *Wybrane metody analizy żywności*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003.
5. Budślawski J., Drabant Z. *Metody analizy żywności*, WNT, Warszawa 1972.

### Literatura uzupełniająca:

1. Gawęcki J., Mossor-Pietraszewska T. *Kompendium wiedzy o żywności, żywieniu i zdrowiu*, PWN, Warszawa, 2004.
2. Kołożyn-Krajewska D., Sikora T. *HACCP – koncepcja i system zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności*, SIT SPOŻ, Warszawa, 1999.
3. Ignatowicz S., Olejarski P. HACCP – system zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego produktom spożywczym. *Postępy w Ochronie Roślin*, **49**(4), 2065-2070, 2009.
4. Bernat E. Wybrane problemy przemysłu mięsnego – uwarunkowania jakości produktu w przemyśle mięsnym. Dostępne pod adresem: [www.rsi.podkarpackie.pl/praktyki/publikacje/.../016%20bernat.pdf](http://www.rsi.podkarpackie.pl/praktyki/publikacje/.../016%20bernat.pdf)
5. Szczepaniak W. *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 1996.
6. Minczewski J., Marczewski Z. *Chemia analityczna*, Tom 3, PWN, Warszawa, 1986.
7. Ewing G.W. *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa, 1980.
8. Witkiewicz Z. *Podstawy chromatografii*, WNT, Warszawa, 2005.
9. Praca zbiorowa pod redakcją Kocjan R. *Chemia analityczna. Podręcznik dla studentów*, Tom 2, PZWL, Warszawa, 2000.
10. Krełowska-Kułas M. *Badanie jakości produktów spożywczych*, PWE, Warszawa, 1993.
11. Hart H., Racine L.E., Hart D.J. *Chemia Organiczna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1999.
12. Praca zbiorowa pod redakcją Kłyszajko-Stefanowicz L. *Ćwiczenia z Biochemii*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
13. Cygański A. *Metody spektroskopowe w chemii analitycznej*, WNT, Warszawa, 1993.
14. Cygański A. *Chemiczne metody analizy ilościowej* Wyd. 4, WNT, Warszawa, 1994.
15. Praca zbiorowa Szczygieł A. *Normy żywienia i wyżywienia*, zaktualizowane w 1980 r. *Żyw. Człow. Metab.*, 10, 2, 143, 1983.
16. 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).
17. McMurry J. *Chemia organiczna*, Tom 2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2000.
18. Praca zbiorowa pod redakcją Namieśnik J. *Pobieranie próbek środowiskowych do analizy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1995.
19. Rozporządzenia Komisji (WE) Nr 333/2007 z dnia 28 marca 2007 roku, zawierającego wytyczne w zakresie pobierania i analizy próbek żywności do celów urzędowej kontroli poziomów ołowiu, kadmu, rtęci, 3-MCPD (3-monochloropropano-1,2-diolu) oraz benzo[a]pirenu w środkach spożywczych.



20. Kabata-Pendias A., Pendias H. *Biogeochemia pierwiastków śladowych*, PWN, Warszawa, 1999.
21. Brzońska F. Jakość mięsa wieprzowego, *Trzoda chlewna*, 39(8-9), 112-116 2001.
22. Turlejska H. Zasady GHP/GMP oraz system HACCP jako narzędzia zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności. *Poradnik dla przedsiębiorcy*, Fundacja Programów Pomocy dla Rolnictwa, Warszawa, 2003.
23. Praca zbiorowa pod redakcją Konieczka P., Namieśnik J. *Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych*, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk, 2004.
24. Targoński Z., Stój A. Zafałszowania żywności i metody ich wykrywania, *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4, 30– 40, 2005.
25. Juszczak L. Chemiczne zanieczyszczenia żywności. *Laboratorium przemysłowe*. 3, 38-42, 2008.
26. Pośniak M., Makhniashvili I., Kozieł E., Kowalska J. Spaliny silników Diesla - zagrożenie dla zdrowia pracowników. *Bezpieczeństwo Pracy* 9/2001
27. Łozowicka B. Zanieczyszczenia chemiczne pochodzenia roślinnego. *Postępy w ochronie roślin*, 49, 2072-2079, 2009.
28. Polskie Normy: PN-A-04019:1998, PN-EN 12821:2009.