



Pracownia studencka
Katedry Analizy Środowiska

Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych

Ćwiczenie nr 5

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI „CUKRÓW OGÓŁEM” W KARMEŁKACH TWARDYCH METODA BERTRANDA

Analiza żywności

Gdańsk, 2008

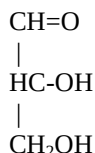
I. Część teoretyczna

1. 1. Budowa i właściwości sacharydów

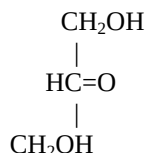
1.1.1. Struktura sacharydów

Sacharydy (inaczej cukry) są to polihydroksyaldehydy i polihydroksyketony oraz niektóre ich pochodne (aminosacharydy, deoksosacharydy, kwasy uronowe). Nazwa sacharydy wywodzi się od sacharozy, sacharydu powszechnie używanego w celach spożywczych i zwanego potocznie cukrem. Tradycyjnym wzorem ogólnym cukrów jest $C_nH_{2n}O_n$, choć wiele sacharydów tego wzoru nie spełnia. W literaturze cukry znane są też pod nazwą węglowodanów, jednak ta nazwa nie jest zalecana, ponieważ wzór sumarycznych nie wszystkich cukrów odpowiada wielokrotności ugrupowania $C(HOH)$.

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

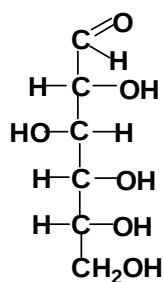
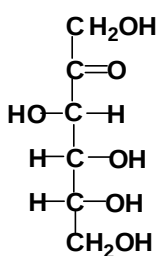
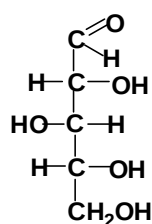


Aldehyd D-glicerynowy



Dihydroksyaceton

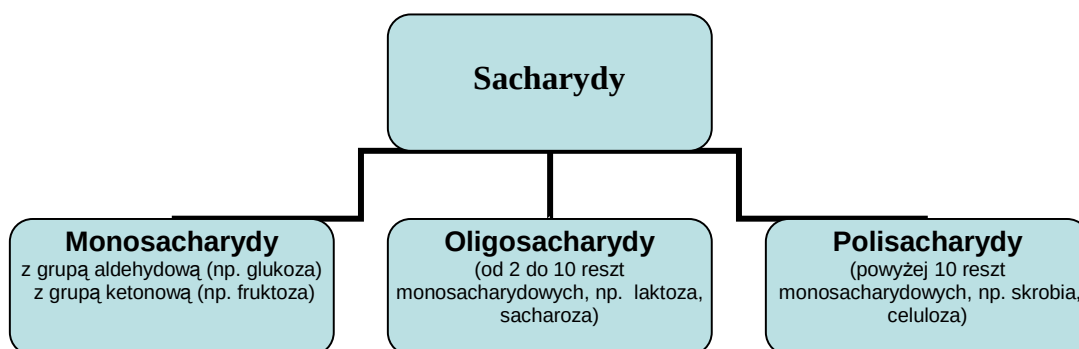
W zależności od liczby atomów węgla w cząsteczce, cukry dzielą się na triozy (3 atomy C), tetrozy (4 atomy C), pentozy (5 atomów C), heksozy (6 atomów C), heptozy (7 atomów C) i oktozy (8 atomów C), np:

D-glukoza
aldoheksozaD-fruktoza
ketoheksozaD-ksyloza
aldopentoza

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

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

Inny podział sacharydów na tzw. cukry proste (monosacharydy) i cukry złożone (oligosacharydy i polisacharydy) związany jest ich zdolnością do kondensacji (polimeryzacji) (Rys. 1).

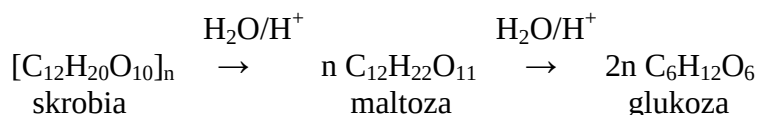


Rys. 1. Podział sacharydów ze względu na ich budowę chemiczną.

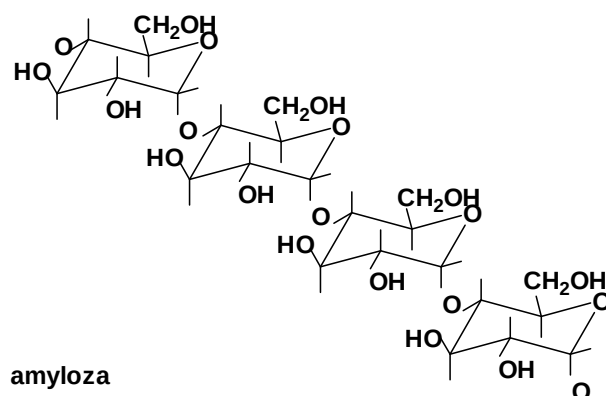
Cukrami prostymi nazywane są sacharydy, które nie ulegają hydrolizie; należy do nich m.in. aldehyd glicerynowy, ryboza, glukoza, oraz wiele innych. Jeżeli cząsteczka cukru składa się z dwóch lub więcej reszt monosacharydów, to zaliczany jest on do **cukrów złożonych**, a ich hydroliza prowadzi do otrzymania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

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

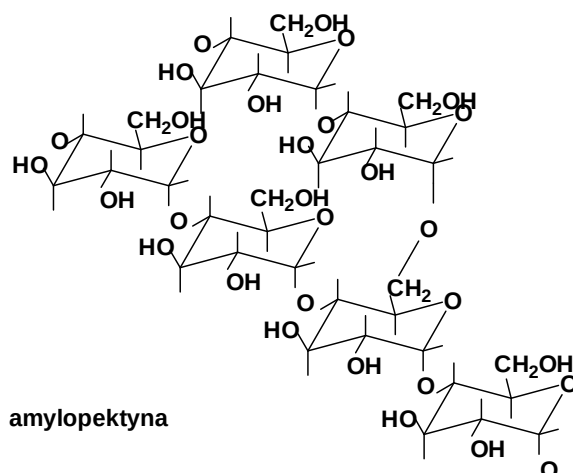
Z uwagi na znaczenie żywieniowe bardziej szczegółowo zostanie opisana budowa skrobi. Składa się ona z jednostek glukozyłowych połączonych wiązaniami 1,4- α -glikozydowymi z tym, że łańcuchy zawierają także pewną liczbę odgałęzień. W wyniku częściowej hydrolizy skrobi powstaje maltoza (disacharyd), hydroliza całkowita prowadzi wyłącznie do D-glukozy:



Skrobię można rozdzielić na dwie frakcje amylozę i amylopektynę. W amylozie, która stanowi ok. 20% skrobi, cząsteczki glukozy (50-300) budują łańcuch prosty (nierozgałęziony), łącząc się wiązaniami 1,4. Długie, proste łańcuchy amylozy są zwinęte spiralnie, przyjmując postać helisy.



Amylopektyna, stanowiąca ok. 80% skrobi jest mocno rozgałęziona. Mimo, że każda cząsteczka może zawierać aż 300-5000 jednostek glukozyłowych, odcinki łańcucha, w którym wyłącznie występują wiązania 1,4 zawierają średnio tylko 25-30 takich jednostek. Łańcuchy te połączone są w punktach rozgałęzień wiązaniami 1,6.



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



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

1.1.2. Właściwości fizykochemiczne sacharydów

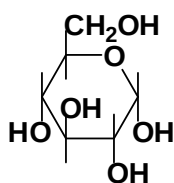
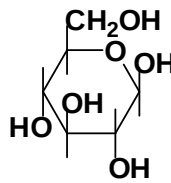
1.1.2.1. Właściwości fizyczne sacharydów

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

1.1.2.2. Właściwości chemiczne sacharydów

Przy omawianiu właściwości chemicznych cukrów należy uwzględniać zarówno ich budowę pierścieniową jak i łańcuchową. Tworzenie pierścieni heterocyklicznych jest wynikiem wewnątrzcząsteczkowej addycji grupy hydroksylowej do grupy aldehydowej lub ketonowej z utworzeniem wiązania półacetalowego (hemiacetalowego). Z powodu płaskiej budowy grupy aldehydowej i ketonowej tworzenie wiązania półacetalowego prowadzi do

powstania dwóch izomerów, nazywanych anomerami α i β . Anomer α (monosacharydu z szeregu konfiguracyjnego D) posiada półacetalową grupę hydroksylową pod powierzchnią pierścienia we wzorze Hawortha, anomer β nad powierzchnią np. dla D-glukozy

anomer α anomer β

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

Reakcje, którym ulegają sacharydy można podzielić na:

o **reakcje zachodzące na grupie karbonylowej i anomerycznym atomie węgla:**

- *mutarotacja* czyli równowagowe przemiany anomeru α w anomer β ;
- *redukcja do alkoholi* np. redukcja D-fruktozy prowadzi do uzyskania D-glukitolu i D-mannitolu);
- *addycja do grupy karbonylowej*, m.in. tworzenie cyklicznych, wewnętrznych hemiacetali. Praktyczne znaczenie w chemii żywności mają reakcje z α -hydroksykwasami, aminokwasami, nukleotydami, białkami i amoniakiem, które prowadzą do otrzymania brunatnych barwników żywności oraz wtórnych aromatów żywności;
- *utlenianie* - znaczenie analityczne ma utlenianie jonami metali w środowisku alkalicznym, przede wszystkim jonami Ag^+ (reakcja Tollensa) i Cu^{+2} (reakcja Fehlinga);
- *polimeryzacja* - w środowisku kwaśnym następuje atak grupy hydroksylowej (O-nukleofil) jednej cząsteczki cukru na anomeryczny atom węgla drugiej; w wyniku reakcji tworzą się struktury zawierające większą liczbę jednostek monosacharydowych.

o **reakcje grup hydroksylowych:**

- *estryfikacja* - estry otrzymuje się zwykle w reakcjach sacharydów (jako alkoholu estryfikującego) z chlorkami aryłowymi lub bezwodnikami kwasów organicznych i mineralnych. Estryfikacja wyższych kwasów tłuszczowych

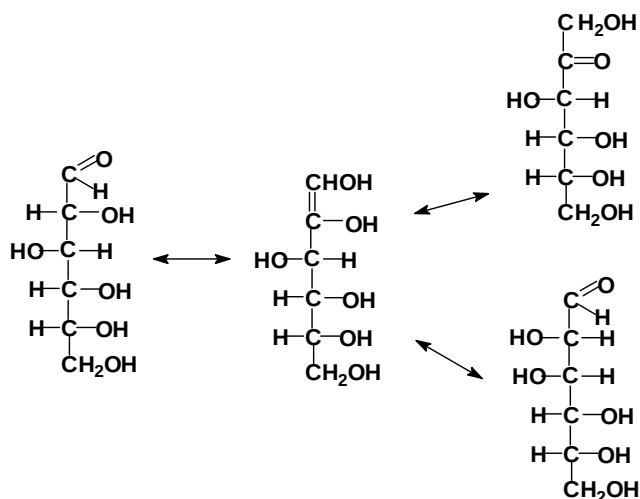
mono-, di- i oligosacharydami lub alkoholami sacharydowymi prowadzi do otrzymania związków powierzchniowo czynnych, istotnych w produkcji żywności;

- *eteryfikacja*;
- *chlorowcowanie*;
- *dehydratacja* – ogrzewanie monosacharydów powyżej temperatury topnienia prowadzi początkowo do odwracalnego wydzielenia cząsteczki wody, a następnie do powstania bardziej odwodnionych produktów: karamelanu ($C_{12}H_{12}O_9$), karamelenu ($C_{36}H_{18}O_{24}$) i karamelinu ($C_{24}H_{26}O_{13}$). Reakcje te rozpoczynają karmelizację sacharydów;
- *redukcja* – prowadząca do otrzymania deoksycukrów;
- *utlenianie*;
- *tworzenie kompleksów* - zdolność tworzenia kompleksów sacharydów z różnymi odczynnikami stanowi podstawę wielu metod wyodrębniania ich z mieszanin i oznaczania jakościowego i ilościowego (np. roztwór jodu w KJ służy do wykrywania skrobi, gdyż tworzy ze skrobią charakterystyczny, ciemnogniatowy kompleks).

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

Przemiany cukrów w środowisku zasadowym.

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



Przemiany cukrów w środowisku stężonych kwasów.

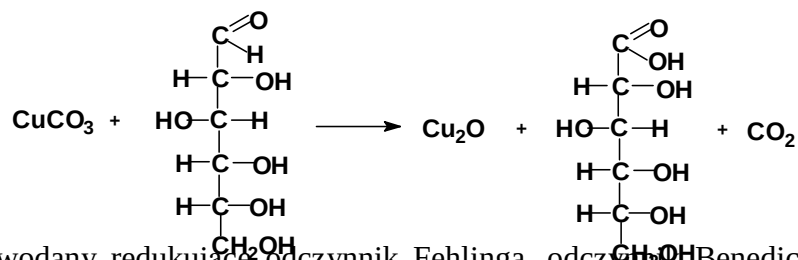
Cukry o liczbie atomów węgla większej od 4 w cząsteczce, ogrzewane z mocnymi kwasami, ulegają odwodnieniu i cyklizacji. Z pentoz powstaje furfural, natomiast z heksoz powstaje 5-hydroksymetylofurfural, który dalej ogrzewany przekształca się w kwas mrówkowy i lewulinowy, którego pochodne dają barwne związki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

Właściwości redukujące cukrów.

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

Próba Benedicta.

Jest 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 Cu_2O . Za pomocą tej próby można wykryć cukier redukujący już przy stężeniu 0,1%.



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

1.3. Właściwości funkcjonalne sacharydów

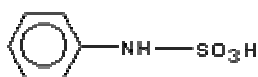
Sacharydy charakteryzują się w większości przypadków słodkim smakiem. Za wzorzec smaku przyjmuje się 10% wodny roztwór sacharozy; jednostka słodkości, tzw. względna słodkość – RS (ang. relative sweetness) takiego roztworu wynosi 1. W Tabeli 1 zamieszczono wartości RS dla innych sacharydów.

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

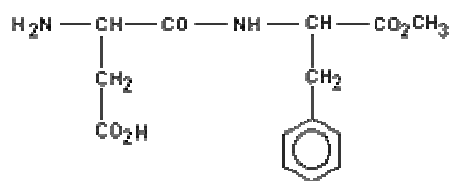
Związek	RS
Sacharoza	1,00
β -D-fruktopiranoza	1,80
Cukier inwertowany	1,30
α -D-glukopiranoza	0,70
β -D-glukopiranoza	0,80
α -D-mannopiranoza	0,30
β -D-mannopiranoza	Gorzka
D-galaktopiranoza	0,32
Maltoza	0,32
α -D-Laktoza	0,20
β -D-Laktoza	0,30
D-Galaktosacharoza	Bez smaku
Rafinoza	0,01
Stachinoza	0,10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

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

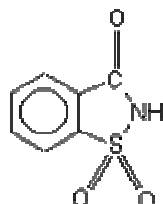
W Polsce w użyciu są następujące naturalne, sacharydowe środki słodzące: D-glukoza, D-fruktoza, laktoza, sacharoza, maltoza, syropy skrobiowe, ekstrakty słodowe, alkohole cukrowe, miód i syrop klonowy. Dostępne są także inne, niesacharydowe środki słodzące, takie jak np.



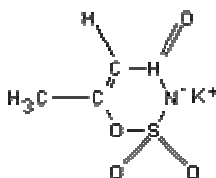
kwasy N-cyloheksyloamino-sulfonowe (30 razy słodszy od sacharozy)



Aspartam (200 razy słodszy od sacharozy)



Sacharyna (300 razy słodsza od sacharozy)



Acesulfam (200 razy słodszy od sacharozy)

Termiczne lub enzymatyczne przekształcenia sacharydów mogą prowadzić do otrzymania związków zapachowych znanych jako wtórne aromaty żywności. Pochodzą one z obróbki zarówno czystych sacharydów (wówczas za zapach odpowiadają pochodne furanu), jak i sacharydów z aminokwasami, czy sacharydów z α -hydroksykwasami.

Sacharydy wykorzystuje się również do produkcji barwników żywności. W wyniku tzw. palenia cukru, w temp. 200-240°C przez kilka godzin, powstaje brunatny produkt zwany karmelem. Karmel, do celów barwiących, otrzymuje się przez palenie cukru w niższej temp. 130-200°C wobec amoniaku (powstaje tzw. karmel amoniakalny lub inaczej brunatny barwnik). Ponieważ zawiera on w sobie niewielkie ilości neurotoksycznego związku - 4(5)-metyloimidazolu – dąży się do wyeliminowania karmelu amoniakalnego z produkcji lub usiłuje się wprowadzić ograniczenia na codzienne spożycie produktów barwionych karmelem. Karmel używany jako dodatek do żywności podlega standaryzacji; dopuszcza się stosowanie 10 typów karmeli, które różnią się sposobem produkcji, przede wszystkim rodzajem zastosowanego katalizatora.

Polisacharydy tworzą hydrokoloidy. Formują one swoją własną makrostrukturę, co widać pod postacią żelowania, gęstnienia, delikatnienia masy, zwiększonej odporności na ogrzewanie i wstrząsy oraz starzenie. Wykorzystuje się to w teksturowaniu żywności. Sacharydy 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. Często czynnikami teksturującymi są skrobie sieciowane. Siarczan skrobi (ester kwasu siarkowego(VI) i skrobi) stosuje się jako zagęszczacz i stabilizator emulsji. Do tego celu można wykorzystać też inne anionowe polisacharydy, takie jak pektyny, kwas alginowy czy karageniny.

Sacharydy występujące w błonniku pokarmowym pełnią rolę substancji balastowych. Błonnik pokarmowy jest mieszaniną substancji o charakterze polisacharydowym (celuloza, hemicelulozy, pektyny, gumy, śluzy) i niepolisacharydowym (ligniny). Duże jego ilości znajdują się w niskoprzetworzonych produktach zbożowych (otrębach zbożowych, kaszach, naturalnych płatkach zbożowych, musli, niełuskany ryż, pieczywie razowym i pełnoziarnistym) oraz warzywach i owocach. Skoncentrowanym źródłem błonnika pokarmowego są suszone owoce: śliwki, figi, morele.

W teksturowaniu żywności wykorzystuje się także mikrokapsułujące właściwości cyklodekstryn. Znalazły one zastosowanie w ochronie utleniających się, nieodpornych na światło i ciepło składników żywności, przy zatrzymywaniu składników lotnych (np. aromatów), służą do usuwania składników szkodliwych i mających nieprzyjemny smak i/lub niemiłą woń. Cyklodekstryny zmniejszają higroskopijność, utrwalają piany i sprzyjają ich powstawaniu. Pewne właściwości mikrokapsułujące w stosunku do różnych substancji wykazuje też glukoza, skleikowana skrobia, skrobia ziemniaczana, a także guma arabska i arabinogalaktan z modrzewia.

Sacharydy, a zwłaszcza sacharoza, są środkami konserwującymi marmolady, soki, konfitury, galaretki, kisiele i budynie.

Związki te wykorzystuje się także do produkcji tworzyw biodegradowalnych oraz produktów o bardzo dużej zdolności wiązania wody, tzw. superabsorbentów. Otrzymuje się je w wyniku połączenia polisacharydu (najczęściej skrobi) z białkiem. Do mieszaniny dodaje się emulgatory (glicerol, laktozę, trimetyloaminoetanolaminę) oraz wypełniacze (syntetyczne polimery, hemicelulozy czy sproszkowaną celulozę). Ze skrobi tworzy się także biodegradowalne tworzywa syntetyczno-skrobiowe, np. biodegradowalne folie polietylenowe zawierają 6-15% skrobi, pianki poliuretanowe – 20% skrobi, a kopolimery etylenu z chlorkiem winylu lub styrenu do 50% skrobi; są to doskonałe środki pochłaniające wilgoć.

1.4. Sacharydy występujące w żywności

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

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

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

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

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

1.5. Funkcje sacharydów

Sacharydy spełniają w organizmie wiele ważnych funkcji:

- o są głównym, najtańszym i najłatwiej dostępnym źródłem energii, służącej przede wszystkim do utrzymywania stałej ciepłoty ciała, pracy narządów wewnętrznych oraz do wykonywania pracy fizycznej (z 1 g węglowodanów wyzwala się 4 kcal energii); glukoza jest prawie wyłącznym źródłem energii dla mózgu;
- o są materiałem budulcowym elementów strukturalnych komórek lub substancji biologicznie czynnych, np. rybozy; biorą udział w budowie błon komórkowych;
- o pozwalają na oszczędną gospodarkę białkami i lipidami;
- o odgrywają znaczną rolę w gospodarce wodnej i mineralnej, zmniejszając wydalanie tych składników;
- o 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. Dzienny poziom zalecanego spożycia węglowodanów dla różnych grup ludności podano w Tabeli 3.

Tabela 3. Dzienny poziom zalecanego spożycia węglowodanów dla różnych grup ludności
(Szczygieł A. i inni: *Normy żywienia IŻŻ*, zaktualizowane w 1980 r. *Żyw. Człow. i Metab.*, 10, 2, 143, 1983.)

Grupy ludności	Węglowodany	
	Ogółem [g]	[%] energii z sacharydów
Dzieci 1-3 lat	165	51
Dzieci 4-6 lat	235	55
Dzieci 7-9 lat	290	55
Chłopcy 10-12 lat	370	57
Dziewczeta 10-12 lat	320	56
Młodzież męska 13-15 lat	420-470	56-57
Młodzież męska 16-20 lat	450-545	56-59
Młodzież żeńska 13-15 lat	365-400	56-57
Młodzież żeńska 16-20 lat	355-390	57-58
Mężczyźni 21-64 lat praca lekka	345-385	58-59
Mężczyźni 21-64 lat praca umiarkowana	400-480	57-60
Mężczyźni 21-64 lat praca ciężka	500-600	57-60

Mężczyźni 21-64 lat praca bardzo ciężka	575-605	57-60
Kobiety 21-59 lat praca lekka	300-335	57-58
Kobiety 21-59 lat praca umiarkowana	330-405	55-58
Kobiety 21-59 lat praca ciężka	400-460	55-57
Kobiety ciężarne (II połowa ciąży)	400	57
Kobiety karmiące	490	58
Mężczyźni 65-75 lat	335	58
Mężczyźni powyżej 75 lat	315	60
Kobiety 60-75 lat	320	58
Kobiety powyżej 75 lat	300	60

1.6. Metody oznaczania zawartości sacharydów

1.6.1. Wprowadzenie

Jak już wspomniano, sacharydy tworzą zróżnicowaną grupę związków, dlatego też istnieje wiele metod ich oznaczania w produktach spożywczych. Najczęściej wykorzystują one następujące właściwości cukrów: zachowanie wobec silnych kwasów mineralnych, zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego, zdolność tworzenia przez większość sacharydów jednorodnych roztworów wodnych, właściwości redukcyjne oraz zdolność do ulegania fermentacji.

Czasami zawartość sacharydów ogółem oblicza się w sposób uproszczony i podaje jako:

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

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

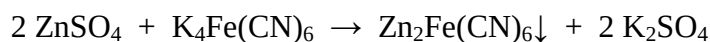
Wyznaczenie udziału frakcji błonnika pokarmowego (w tym tzw. skrobi odpornej) wymaga zastosowania odmiennych metod oznaczania, gdyż charakteryzuje się on innymi właściwościami fizyko-chemicznymi w porównaniu z sacharydami przyswajalnymi.

1.6.2. Przygotowanie prób do oznaczania sacharydów

Sposoby przygotowania prób 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. 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.

1.6.3. Charakterystyka metod oznaczania sacharydów przyswajalnych

Metody oznaczania sacharydów przyswajalnych można podzielić na:

- o *metody fizyczne*: densymetryczne, refraktometryczne, polarymetryczne;
- o *metody chemiczne*: metoda Fehlinga, metoda Lane-Eynona, metoda Bertranda, metoda Luffa- Schoorla;
- o *metody fizykochemiczne*: metoda antronowa, metoda rezorcynowa, metoda heksacyjanożelazianowa;
- o *metody chromatograficzne*: chromatografia cienkowarstwowa lub bibułowa, chromatografia kolumnowa, chromatografia gazowa, wysokosprawna chromatografia cieczowa;
- o *metody enzymatyczne*.

1.6.3.1. 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 pikometru i odczytaniu z odpowiednich tablic odpowiadających im zawartości sacharydów w próbce. W przypadku pomiarów w roztworach zawierających

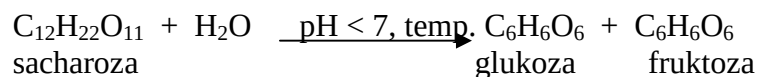
oprócz sacharydów inne składniki rozpuszczalne w wodzie, uzyskany wynik odpowiada ekstraktowi ogólnemu i ma charakter przybliżony.

Metody rafraktometryczne – 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.

1.6.3.2. Metody chemiczne

W metodach chemicznych wykorzystuje się redukcyjne właściwości sacharydów, związane z obecnością w cząsteczce wolnej grupy karbonylowej (aldehydowej 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:

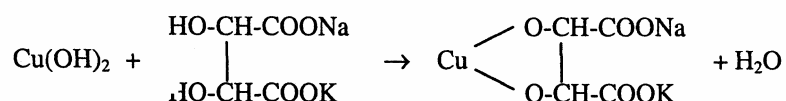
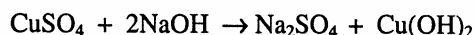


Należy ściśle przestrzegać warunków hydrolizy, gdyż przy zbyt niskim stężeniu kwasu lub przy zbyt niskiej temperaturze może nastąpić niecałkowite rozszczepienie wiązań glikozydowych, podczas gdy zbyt wysokie wartości powyższych parametrów reakcji mogą doprowadzić do rozkładu produktów inwersji.

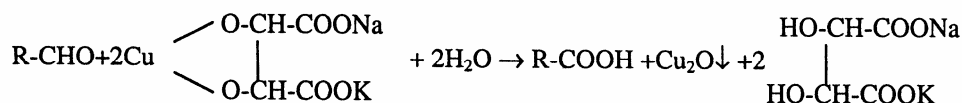
Metody oparte na właściwościach redukcyjnych nie są specyficzne tylko dla sacharydów, gdyż inne substancje obecne w produktach spożywczych (niektóre kwasy organiczne, np. kwas askorbinowy, zasady purynowe, niektóre aldehydy i aminokwasy, np. cysteina, kwas asparaginowy), także wykazują w tych warunkach właściwości redukcyjne.

Aby uniknąć podwyższenia wyników oznaczania, usuwa się je w procesie odbiałczania i/lub klarowania, jak opisano w rozdziale 1.6.2.

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 Cu^{+2} do jonów Cu^{+1} , które łącząc się z jonami wodorotlenkowymi, dają czerwony osad tlenku miedzi(I):



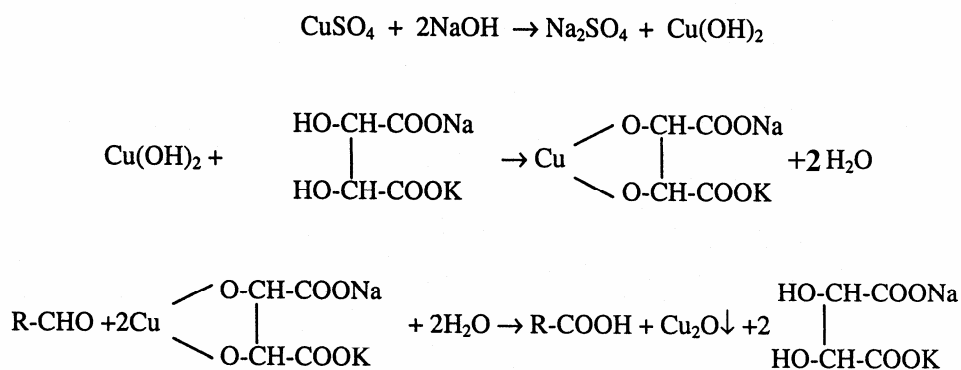
W metodzie tej bardzo ważne jest ściśle przestrzeganie warunków oznaczania, m.in. utrzymywanie stanu wrzenia, gdyż zabezpiecza się wtedy próbkę przed dostępem powietrza, które może ponownie utlenić zredukowaną miedź i barwnik. Wśród metod miareczkowych najczęściej stosowane są:

Metoda Fehlinga - polega ona na miareczkowym oznaczaniu ilości redukujących 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 ml). Winian sodu i potasu tworzy z jonami Cu^{+2} ciemnoniebieski, rozpuszczalny w wodzie kompleks; koniec miareczkowania rozpoznaje się po zaniku barwy niebieskiej, świadczącej o braku jonów Cu^{+2} .

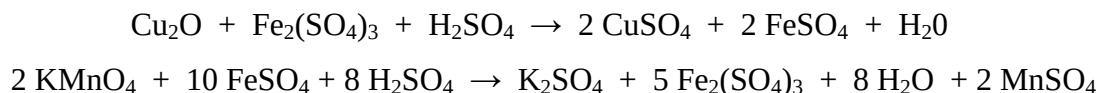
Metoda Lane – Eynona – jest rozwinięciem metody Fehlinga i może być stosowana do oznaczania sacharydów w roztworach bezbarwnych. Oznaczanie polega na bezpośrednim miareczkowaniu wrzącej mieszaniny roztworów Fehlinga I i II odpowiednio rozcieńczonym roztworem sacharydu (0,1 – 0,4%) w obecności błękitu metylenowego jako wskaźnika końca

miareczkowania. Obecność soli Seignette’a (winianu potasu sodu) zapobiega wytrącaniu 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 ml). Modyfikacją metody Lane–Eynona jest *metoda Munsona i Walkera*, w której roztwór sacharydów ogrzewa się w standardowych warunkach z odczynnikami Fehlinga, wytrącony osad Cu_2O 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^{+2} odpowiadających stechiometrycznie ilości sacharydów redukujących zawartych w badanym roztworze. W metodzie tej stosuje się trzy płyny Bertranda (I – siarczan(VI) miedzi(II); II – winian potasu i sodu oraz wodorotlenek sodu; III – siarczan(VI) żelaza(III) w stężonym kwasie siarkowym(VI)). Oznaczenie polega na ilościowej redukcji jonów Cu^{+2} do Cu^{+1} przez sacharydy zawierające w cząsteczce wolne grupy redukujące, które zachodzi w środowisku silnie alkalicznym (pH ok. 12) i w temp. wrzenia roztworu. Schemat reakcji podany jest poniżej:



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

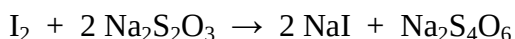


Na podstawie zużycia ilości manganianu(VII) potasu oblicza się ilość miedzi zredukowanej przez sacharyd obecny w badanej próbce, a zawartość poszczególnych sacharydów odczytuje się z odpowiednich tablic.

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

Metoda Luffa – Schoorla – zasada oznaczenia opiera się na reakcji redukcji jonów 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) odmiareczkowuje się tiosiarczanem(VI) sodu ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$):



Wykonuje się ślepą próbę, 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%.

1.6.3.3. 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 $\lambda = 620 \text{ nm}$.

Metoda rezorcynowa – pozwala oznaczyć ketosacharydy, a także wyznaczyć zawartość ketopentoz i ketoheksos 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 ketoheksos, 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 heksacyjanożelazianu(II) tworzy z jonami Fe^{+3} błękit pruski; pomiar intensywności powstałego zabarwienia wykonuje się przy długości fali $\lambda = 690$ nm.

1.6.3.4. 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. Jako fazę stacjonarną stosuje się najczęściej żel krzemionkowy.

Chromatografia kolumnowa (LC) – odpowiednio dobrane warunki rozdziału pozwalają nie tylko dokonać analizy jakościowej (identyfikacja sacharydów), ale także oznaczyć je ilościowo za pomocą omówionych metod, np. metod chemicznych, fizykochemicznych czy enzymatycznych.

Chromatografia gazowa (GC) – sacharydy są nielotne, stąd aby można było analizować je metodą chromatografii gazowej, muszą zostać przekształcone w bardziej lotne pochodne, np. trimetylosililowe. Po rozdziale 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 wielkości pików chromatograficznych, które są proporcjonalne do ilości sacharydów w próbce.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) – w analizie sacharydów najczęściej stosowanym detektorem jest detektor refraktometryczny, który mierzy współczynnik

załamania światła eluatu. Identyfikację sacharydów, jak i ich analizę ilościową, wykonuje się analogicznie jak podano wyżej.

Metody chromatograficzne GC i HPLC charakteryzują się dużą precyzją oraz łatwością i szybkością wykonania w porównaniu z metodami chemicznymi.

1.6.3.5. 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 β -D-glukozy do D-glukono- δ -laktonu. Jednocześnie następuje redukcja koenzymu FAD do FADH_2 i ponowne utlenienie do FAD, któremu towarzyszy przeniesienie atomów wodoru na tlen cząsteczkowy i powstanie nadtlenu wodoru (H_2O_2). Powstały H_2O_2 , 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^+ , 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 we krwi oraz innych płynach ustrojowych, a także w miodzie.

1.6.3. Oznaczanie zawartości skrobi i błonnika pokarmowego

Jak już wspomniano, oznaczenie zawartości skrobi i błonnika pokarmowego (w tym tzw. skrobi odpornej) wymaga zastosowania odmiennych metod oznaczania, gdyż charakteryzują się one innymi właściwościami fizyko-chemicznymi w porównaniu z sacharydami przyswajalnymi.

1.6.3.1. Metody oznaczania zawartości skrobi

Do oznaczeń zawartości skrobi stosuje się :

Metody wagowe – w których skrobię oznacza się wagowo po rozpuszczeniu jej i wytrąceniu 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 Glc 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°.

1.6.3.2. Metody oznaczania zawartości błonnika pokarmowego

W skład błonnika wchodzi składniki o charakterze polisacharydowym i niepolisacharydowym. Związki te nie rozpuszczają się podczas gotowania z kwasami. Ze względu na niejednorodność fizyko-chemiczną, 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 (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. 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.

Czasami do celów technicznych stosuje się *metodę Scharrera-Kürschnera*, która 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).

II. Część doświadczalna

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości cukrów ogółem w karmelkach twardych metodą Bertranda.

2.1. Wykonanie ćwiczenia

2.1.1. Przygotowanie roztworu podstawowego karmelków twardych

Karmelki (2-4 sztuki) rozetrzeć w suchym moździerzu, następnie na wadze technicznej odważyć około 4 g roztartych cukierków z dokładnością $\pm 0,01$ g. Przenieść do zlewki (poj. 250 ml) i rozpuścić w około 100 ml wody destylowanej. Całość zobojętnić 0,1 molowym roztworem NaOH wobec fenoloftaleiny do słabo różowego zabarwienia, przenieść ilościowo do kolby miarowej (poj. 250 ml) i dopełnić wodą destylowaną do kreski.

2.1.2. Przeprowadzenie inwersji badanego produktu w celu oznaczenia zawartości cukrów ogółem

2.1.2.1. Odczynniki, sprzęt, aparatura

Odczynniki:

- o fenoloftaleina, 1% roztwór w EtOH,
- o kwas siarkowy(VI) (H_2SO_4), stężony,
- o wodorotlenek sodu (NaOH), 10% roztwór wodny.

Sprzęt:

- | | |
|-------------------------------|---------|
| o kolba stożkowa poj. 250 ml | 1 szt., |
| o kolba miarowa poj. 250 ml | 1 szt., |
| o pipeta poj. 5 ml | 2 szt., |
| o cylinder miarowy poj. 50 ml | 1 szt., |
| o cylinder miarowy poj. 25 ml | 1 szt., |
| o lejek | 1 szt., |
| o bagietka | 1 szt., |
| o termometr | 1 szt., |
| o łaźnia wodna | 1 szt. |

2.1.2.2. Przeprowadzenie hydrolizy (inwersji) badanego produktu

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.

2.1.3. Oznaczenie zawartości cukrów ogółem w karmelkach twardych metodą Bertranda

2.1.3.1. 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 (szczegółowy opis zachodzących reakcji podano w rozdziale 1.6.1.3). Badany roztwór cukrów musi być wcześniej poddany hydrolizie kwasowej, zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 2.1.2.

2.1.3.2. Odczynniki, sprzęt i aparatura

Odczynniki:

- o manganian(VII) potasu, 0,005 M roztwór wodny,
- o roztwór Bertranda I: 40 g siarczanu(VI) miedzi(II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) rozpuścić w wodzie destylowanej i dopełnić do objętości 1000 ml,
- o 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 ml wody destylowanej w kolbie miarowej poj. 1000 ml, dodać 150 g wodorotlenku sodu (NaOH) uprzednio rozpuszczonego w 250 ml wody destylowanej; po wymieszaniu uzupełnić wodą destylowaną do kreski,
- o roztwór Bertranda III: 50 g bezwodnego siarczanu(VI) żelaza(III) ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) rozpuścić w 500 ml gorącej wody destylowanej i po ochłodzeniu ostrożnie dodać 200 ml stężonego kwasu siarkowego(VI) ($d = 1,84 \text{ g/ml}$); całość uzupełnić wodą destylowaną do objętości 1000 ml. Należy sprawdzić, czy roztwór nie redukuje

roztworu manganianu(VII) potasu, jeśli tak - dodać taką ilość roztworu KMnO_4 , aby uzyskać lekko różowe zabarwienie, które samo zniknie.

Sprzęt:

o	czasza grzejna	1 szt.,
o	kolba stożkowa poj. 250 ml	1 szt.,
o	lejek Scotta 3G4	1 szt.,
o	papierki lakmusowe	1 opak.,
o	pipeta poj. 5 ml	1 szt.,
o	pipeta poj. 20 ml	3 szt.,
o	cylinder miarowy poj. 25 ml	1 szt.

2.1.3.3. Wykonanie oznaczenia

Do kolby stożkowej poj. 250 ml wprowadzić 20 ml badanego roztworu (tj. 5 ml roztworu po inwersji i 15 ml wody destylowanej), a następnie pipetami 20 ml roztworu Bertranda I i 20 ml 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 wytrącony osad tlenu miedzi(I) cały czas był przykryty roztworem.

Ciecz nad 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 nad osadu - ostrożnie po bagietce - dekantować na lejek Scotta tak, aby nie dopuścić do odsłonięcia powierzchni osadu Cu_2O , 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 ml 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 sączek przemyć kilkakrotnie gorącą wodą do zaniku odczynu kwaśnego.

Przesącz w kolbie miareczkować 0,005 M roztworem manganianu(VII) potasu do wystąpienia jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się przez 30 sekund. Zmiana barwy z zielonkawej na różową następuje bardzo wyraźnie od jednej kropli roztworu manganianu(VII) potasu dodanego w nadmiarze.

2.1.4. Opracowanie wyników

Obliczyć miano miedziowe roztworu KMnO_4 ($T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}}$)

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

gdzie: c_m – stężenie molowe roztworu KMnO_4 [mol/dm^3],

M_{Cu} – masa molowa miedzi (63,57).

Korzystając z wyznaczonego miana miedziowego, obliczyć liczbę mg miedzi odpowiadającą zużytej do miareczkowania objętości KMnO_4 , a następnie zamienić ją - korzystając z zamieszczonej poniżej tabeli (Tabela 4) - na równoważną jej ilość mg sacharydu inwertowanego zawartego w 20 ml próbki pobranej do oznaczenia. Obliczyć procentową zawartość „cukrów ogółem” w karmelkach twardych, uwzględniając zastosowane rozcieńczenia, wynik zaokrąglić do pierwszego miejsca po przecinku.

Tabela 4. Ilość miedzi zredukowanej i odpowiadające jej ilości sacharydu inwertowanego w metodzie Bertranda (Małecka Maria, *Wybrane metody analizy żywności*, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Poznań, 2003).

Ilość zredukowanej miedzi przez sacharydy, [mg]	Ilość sacharydu inwertowanego, [mg]	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

Literatura

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