

Določanje sladkorjev, škroba in vlaknine

1. Določanje sladkorjev

1.1 Refraktometrično določanje laktoze v mleku

PRIPRAVA SERUMA:

iz mleka odstranimo maščobe in koaguliramo beljakovine, nam ostane bistra tekočina - serum. Serum lahko nastane z naravnim kisanjem mleka ali laboratorijsko z dodajanjem različnih reagentov: npr. CaCl_2 , HgCl_2 ali z raztopino CuSO_4 in $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$.

V serumu lahko med drugim z refrakcijo ugotovimo:

- odstotek mleku dodane vode in
- odstotek laktoze v mleku

Reagenti:

- raztopina CuSO_4 : 309,47 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ raztopimo v 1000 ml
- raztopina $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$: 261,62 g $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ raztopimo ter dopolnimo do 1000 ml vode

Pribor:

- merilni valj
- pipete (2 in 5 ml)
- filtrirni papir
- lij
- erlenmajerica

Izvedba:

40 ml mleka dodamo 2,4 ml raztopine CuSO_4 , stresamo 3 min, nato dodamo 1,6 ml raztopine $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Dobro premešamo, stresamo in pustimo stati 5 min, nato filtriramo v suho erlenmajerico/ ašo. Serum mora biti bister, prve mililitre filtrata zavržemo.

Odstotek mleku dodane vode - določen z refrakcijo

Izvedba:

Bistremu serumu izmerimo lomni količnik pri $17,5^\circ \text{C}$ z imerzijskim refraktometrom. Refrakcija seruma je odvisna od količine laktoze in mineralnih snovi, raztopljenih v mleku. Koncentracija teh je v mleku dokaj konstantna, tako da tudi refrakcija oz. lomni količnik zelo malo niha. Dodatek vode pa zmanjšuje koncentracijo laktoze in soli in s tem tudi refrakcijo oz. lomni količnik.

Ocena:

Lomni količnik polnega mleka - mlečnega seruma - je med 1,34275 in 1,34350 oz. med 40 in 42 refraktometrijskih stopenj. Manjši lomni količnik oz. stopnja refrakcije kaže na dodatek vode v mleku. Od istega lomnega količnika poiščemo v skriptih: Miheli, Filajdi "Analitika živilskih namirnic, 1965" na strani 101 v tabeli 6.25 najprej odgovarjajo o stopnji refrakcije, nato pa v tabeli 6.3 odgovarjajo odstotek vode.

Rezultat:

% mleku dodane vode iz stopnje refrakcije je

Določanje laktoze

Večina del (5/8) refrakcije pripada laktozi, manjši del pa solem. Koncentracija soli je skoraj konstantna, tako da spremembe lomnega količnika oz. stopnje refrakcije pripišemo laktozi.

Ocena:

Stopnja refrakcije, s katero smo določili ali odstotek dodane vode, služi tudi za določitev odstotka laktoze v mleku. V prej omenjenih skriptih poiščemo v tabeli 6.31 odstotek laktoze, ki odgovarja ugotovljeni stopnji refrakcije.

Polno mleko vsebuje 4,7 % (ali 47 g/l) laktoze.

Rezultat:

% laktoze v mleku je

1.2 Polarimetrično določanje saharoze v medu in soku

Princip:

Merjenje kota zasuka bistre raztopine medu pred in po inverziji na polarimetru v območju 175-180 kotnih stopinj.

Reagenti:

- Al-kaša: pripravimo nasičeno vodno raztopino AlCl_3 ali $\text{Al}(\text{SO}_4)_3$, oborimo s c. NH_3 , filtriramo, filtrat spiramo z dest. vodo, dokler reakcija na Cl^- ali SO_4^{2-} ni negativna (AgNO_3 oz. BaCl_2). Al-kašo speremo s filtrirnega papirja v steklenico s toliko dest. vode, da dobimo suspenzijo.
- koncentrirana HCl
- 8 M NaOH

Pribor:

- 50 ml, 25 ml, 5 ml in 3 ml pipeta
- 250 ml merilni valj
- 100 ml merilne bučke
- termostat (67-70° C)
- lakmus papir
- polarimeter

Izvedba:

Pripravimo "osnovno raztopino" medu: 50 g medu raztopimo v 250 ml dest. vode.

A) Določanje direktnega sladkorja - pred inverzijo

V 100 ml merilno bučko odpipetiramo 50 ml osnovne raztopine medu oz. soka, dodamo 3 ml Al-kaše, dopolnimo do 100 ml, premešamo in prefiltriramo skozi filtrirni papir - modri trak ter nato polarimetriramo v območju 175-180.

B) Določanje celokupnega sladkorja - po inverziji

V 100 ml merilno bučko odpipetiramo 50 ml osnovne raztopine medu oz. soka, dodamo 25 ml dest. vode ter 5 ml konc. HCl. Postavimo za 5 minut v termostat pri 67-70° C. Hitro ohladimo pod tekočo vodo, nevtraliziramo z 8 M NaOH ob prisotnosti lakmus papirja. Dodamo 3 ml Al-kaše in dopolnimo z dest. vodo do 100 ml. Premešamo, prefiltriramo skozi filtrirni papir - modri trak in polarimetriramo v istem območju.

Raun:

% saharoze = (kot zasuka pred inver. - kot zasuka po inver.) · 5,725

Ocena:

Pravilnik dovoljuje v medu največ 5 % saharoze.

Gozdni med, ist ali mešan s cvetličnim medom, akacijev in sivkin med pa lahko vsebujejo največ 10 % saharoze.

1.3 Določanje sladkorjev z metodo HPLC (med, sok, voda)

Princip:

Priprava raztopine vzorca ter določitev vsebnosti sladkorjev (fruktoze, glukoze in saharoze) z uporabo tekoinske kromatografije visoke ločljivosti.

Reagenti:

- izhodna standardna raztopina fruktoze, glukoze in saharoze: odtehtamo po 1500 mg fruktoze, glukoze in saharoze, raztopimo in razredimo do 100 ml z destilirano vodo. Pripravimo svežo.
- standardne raztopine sladkorjev 5 koncentracij: za vsak sladkor pripravimo štiri (4) 50 ml merilne bučke in odpipetiramo naslednji volumen izhodne standardne raztopine sladkorja:

Št. bučke	Bučka 1	Bučka 2	Bučka 3	Bučka 4	Bučka 5
Volumen izhod. stand. raztop.	2 ml	5 ml	15 ml	25 ml	=izhodna stand. raztop.
koncentracija	0,6 g/l	1,5 g/l	4,5 g/l	7,5 g/l	15 g/l

- razredimo do oznake. Pripravimo sveže.

Kromatografski pogoji:

Gradientna sonda: Maxi Star, Knauer

Kolona: Aminex HPX - 87H, 300 x 7,8 mm; Bio - Rad

Mobilna faza: 0,005 M H₂SO₄

Pretok mobilne faze: 0,6 ml/min

Volumen injiciranja: 10 µl

Detektor: UV - VIS, 245 nm, Knauer

Izvedba:

a) priprava vzorca

- Sok: V 100 ml merilno steklo odmerimo 4 g soka in ga razredimo z dest. vodo do 20 g. Dobro premešamo.

- Med: zatehtamo 5 g medu, raztopimo in ga kvantitativno prenesemo v 200 ml merilno bučko. Dopolnimo do oznake.

b) pripravljeno raztopino vzorca prelijemo v ependorfko in centrifugiramo 15 minut pri 0° C in 4000 obratih. Supernatant nato prefiltriramo skozi Milipore filter (0,45 µm) v vialo. Tako pripravljen vzorec injiciramo v kolono HPLC.

Raun:

Po končanem kromatografskem ločenju dobimo kromatogram. Iz znanih površin kromatografskih vrhov standardnih raztopin sladkorjev, njihovih koncentracij in površin kromatografskih vrhov, ki jih dobimo pri analizi vzorcev, izračunamo koncentracijo analiziranih sladkorjev v vzorcu.

Rezultat:

Analizirani sadni sok vsebuje g fruktoze/l.

Analizirani sadni sok vsebuje g glukoze/l.

Analizirani sadni sok vsebuje g saharoze/l.

Analizirani med vsebuje g fruktoze/100 g.

Analizirani med vsebuje g glukoze/100 g.

Analizirani med vsebuje g saharoze/100 g.

2. Določanje škroba

2.1 Določanje škroba po Ewersu (moka, obrok, konz. zelenjava)

Princip

Škrob kaže visoko optično aktivnost, zato ga lahko določimo tudi polarimetrijsko, ko ga poprej s hidrolizo spremenimo v raztopino s pomočjo kisline.

Pribor

Uporabljamo naslednji pribor:

- analitsko tehtnico
- polarimeter s krožno skalo
- vodno kopel
- merilno bučko, 100 ml
- filtrirni papir – modri trak
- lij
- pipeti, 2 ml in 20 ml
- menzuro
- erlenmajerici, 200 ml in 300 ml

Raztopine

Uporabljamo naslednje raztopine:

- 1,124 % (m/V) klorovodikova kislina
- 25 % klorovodikova kislina
- raztopino Carrez I: odtehtamo 15 g $K_4Fe(CN)_6$ v 100 ml vode
- raztopino Carrez II: odtehtamo 30 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ali 20 g $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ v 100 ml vode.

Postopek

Odtehtamo 5 g vzorca z natančnostjo $\pm 0,01$ g in ga s pomočjo lijke prenesemo v 100 ml merilno bučko, dodamo 25 ml HCl (1,124 %) in dobro premešamo, da se ne naredijo kepice. Nato dodamo 25 ml iste kisline, pri čemer z njo speremo vse delce vzorca, ki so ostali na vratu bučke. Vsebinsko moramo stresemo in kuhamo na vodni kopeli 15 min, pri čemer prve 3 min bučko stresamo. Bučko odstranimo z vodne kopeli in takoj dodamo 10 ml ohlajene destilirane vode, da bi hidrolizo hitro prekinili, nato pa bučko še naprej hladimo pod curkom vodovodne vode. Po hlajenju dodamo 20 ml (25 %) HCl in 2 ml Carrez I, vsebinsko stresemo, dodamo 2 ml Carrez II, ponovno stresemo in bučko do oznake dopolnimo z destilirano vodo, stresemo in filtriramo skozi suh naguban filtrirni papir, pri čemer prve količine filtrata vlijemo nazaj. S popolnoma bistrim filtratom napolnimo cev polarimetra in odčitamo suho kot ravnine polarizirane svetlobe.

Izračun

Količina škroba izražamo v odstotku suhe snovi in izračunamo po naslednji formuli:

$$\text{škrob (\%)} = \frac{100 \cdot 100}{[a]_D^{20} \cdot l \cdot g} \cdot \frac{100}{100 - v}$$

kjer je:

a - odčitana zasuka na polarimetru;

l - dolžina cevi v cm;

$(\)_D^{20}$ - specifična zasuka škroba

v - delež vode v vzorcu;

g - odtehtana količina vzorca.

Specifični zasuk škroba:	oves	181,3
	pšenica	182,7
	rž	184,0
	ječmen	181,5
	koruza	184,6
	riž	185,9.

2.2 Polarimetrično določanje škroba po Baumannu in Grossfeldu (moka, konz. zelenjava)

Princip:

Zu inkovanjem koncentrirane klorovodikove kisline se škrob razgradi v optično aktivne spojine, ki su ejo polarizirano svetlobo.

Metoda temelji na kuhanju vzorca v klorovodikovi kislini, bistrenju in merjenju kota sukanja na polarimetru. Vzoredno se v slepem poskusu po odstranitvi škroba dolo i optična aktivnost preostalih aktivnih snovi in odšteje od kota sukanja pri glavnem poskusu.

Pribor:

- polarimeter
- merilne bučke (50 ml)
- lija
- vodna kopel
- magnetno mešalo
- filtrirni papir – modri trak

Reagenti:

- 0,31 M HCl
- raztopina po Carrezu I: 15 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ raztopimo v vodi in dopolnimo do 100 ml
- raztopina po Carrezu II: 30 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ raztopimo v vodi in dopolnimo do 100 ml

Postopek:

1. GLAVNI POSKUS

V 50 ml merilno bučko odmerimo 15 ml 0,31 M HCl, nato s pomočjo lijaka in ob stalnem mešanju vsujemo 2,5 g vzorca. Ko je vzorec popolnoma homogeniziran, speremo lijak in grlo bučke z 10 ml 0,31 M HCl. Bučko postavimo v vrelo vodno kopel in 3 min, mešamo (vsebuje bučka se mora segreti do 95° C). Bučko pustimo v vodni kopeli še 15 minut, nakar jo hitreje med stalnim mešanjem ohladimo pod tekočo vodo na 20° C. Dodamo 0,5 ml (10 kapljic) Carrez I, premešamo ter dodamo 0,5 ml Carrez II, ponovno premešamo, dopolnimo do oznake, dobro premešamo in filtriramo. Prve ml filtrata zavržemo. Preostali bistri filtrat (vsaj 25 ml) pa polarimetriramo pri 20° C v 200 mm cevi polarimetra.

2. SLEPI POSKUS

(za živila, ki ne vsebujejo zaklejenega škroba)

5 g vzorca prenesemo s pomočjo lijaka v 50 ml merilno bučko, v kateri je že ca 30 ml dest. vode. Ljak speremo z 10 ml vode in s pomočjo magnetnega mešala mešamo 1 uro. Teko ino zbistriamo: z dodatkom 1 ml Carreza I, premešamo in dodamo 1 ml Carreza II, premešamo, dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo.

25 ml bistrega filtrata (kar odgovarja 2,5 g vzorca), v katerem ni škroba, odmerimo v 50 ml merilno bučko, dodamo 1 ml 25 % HCl ter segrevamo v vreli vodni kopeli najprej 3 min ob

stalnem mešanju, nato še 15 min. hitreje ohladimo do 20° C, dopolnimo do oznake, premešamo in polarimetriramo pri 20° C v 200 mm cevi polarimetra.

Raun:

$$\text{škrob g/100 g} = (a - b) \cdot F$$

a = kot sukanja v glavnem poskusu

b = kot sukanja v slepem poskusu

F = faktor za ustrezno vrsto škroba

F za pšeni ni škrob = 5,635

F za krompirjev škrob = 5,501

F za koruzni škrob = 5,635

F za žitarice v povprečju = 5,64

F za rižev škrob = 5,661

3. Določanje vlaknine

3.1 Scharrer-Kürschnerjeva metoda (moka, obrok, konz. zelenjava)

Princip:

Kuhanje vzorca v mešanici za razklop, filtriranje skozi filtrirni lonček, sušenje in tehtanje.

Reagenti:

- S-K-reagent: 75 ml 70 % očetne kisline
+ 5 ml konc. HNO_3
+ 2 g trikloroacetne kisline
- etanol
- eter

Pribor:

- 100 ml erlenmajerica z brušenim zamaškom
- filtrirni lonček št. 3
- filtrirni papir – rni trak
- presesalna buča
- 25 ml merilni valj

Izvedba:

V 100 ml erlenmajerico odtehtamo 1 g vzorca na 0,001 g natančno, dodamo 25 ml S-K-reagenta in kuhamo pod povratnim hladilnikom 30 minut. Vmes večkrat premešamo. Medtem posušimo filtrirni lonček, obložen s filtrirnim papirjem, ohladimo in stehtamo. Še vrelo raztopino po kuhanju kvantitativno prefiltriramo skozi filtrirni lonček s pomočjo vakuumske pialke. Izpiramo z (vročim reagentom), vročo destilirano vodo, nato z alkoholom in končno še z etrom. Sušimo v sušilniku pri 105°C do konstantne teže, ohladimo in stehtamo.

Račun:

$$\% \text{ surove vlaknine} = \frac{b}{a} \cdot 100$$

a = odtehta vzorca (g)

b = povečanje mase gusa (g)