

Metody oznaczania zawartości sacharydów

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.

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.

3. Charakterystyka metod oznaczania 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*.

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

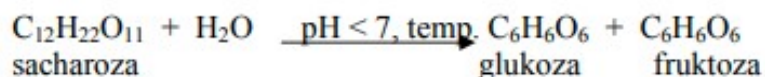
oprócz sacharydów inne składniki rozpuszczalne w wodzie, uzyskany wynik odpowiada ekstraktowi ogólnemu i ma charakter przybliżony.

Metody 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.

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:

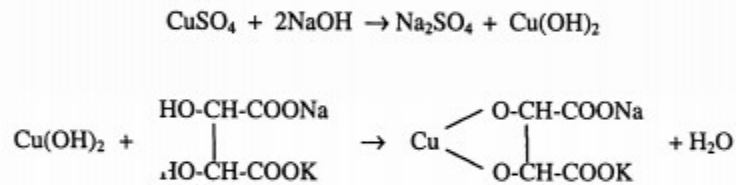


Należy ściśle przestrzegać warunków hydrolizy, gdyż przy zbyt niskim stężeniu kwasu lub przy zbyt niskiej temperaturze może nastąpić niecałkowite rozszczępienie wiązań glikozydowych, podczas gdy zbyt wysokie wartości powyższych parametrów reakcji mogą doprowadzić do rozkładu produktów inwersji.

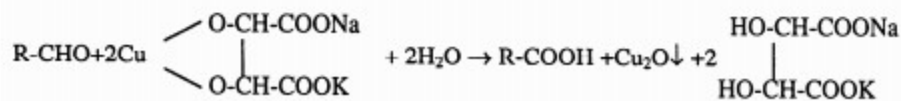
Metody oparte na właściwościach redukcyjnych nie są specyficzne tylko dla sacharydów, gdyż inne substancje obecne w produktach spożywczych (niektóre kwasy organiczne, np. kwas askorbinowy, zasady purynowe, niektóre aldehydy i aminokwasy, np. cysteina, kwas asparaginowy), także wykazują w tych warunkach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

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

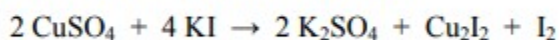
Metoda Fehlinga - polega ona na miareczkowym oznaczaniu ilości redukujących sacharydów w roztworze, odpowiadających całkowitej redukcji miedzi zawartej w roztworze odczynników Fehlinga I ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) i Fehlinga II (winian sodu i potasu: $\text{Na}_2\text{K}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 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

W metodzie Bertranda, nie ma potrzeby dokładnego oznaczania miana odczynnika miedziowego (mieszanki 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 wydzielanie 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 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%.

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.