

**Autorzy: Maria H. Borawska, Renata Markiewicz-Żukowska,
Sylwia K. Naliwajko, Katarzyna Socha**

SKRYPT DO WYBRANYCH ĆWICZEŃ Z ANALIZY ŻYWNOŚCI

ZAKŁAD BROMATOLOGII

**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ
EUROREGIONALNE CENTRUM FARMACJI
UNIwersytet MEDYCZNY w BIAŁYMSTOKU**

BIAŁYSTOK 2018

SPIS TREŚCI:

1. PRZYGOTOWANIE PRÓB ŻYWNOŚCI DO ANALIZY	5
1.1. Pobieranie prób żywności do analizy	5
1.2. Homogenizacja	8
2. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI I SUCHEJ MASY W ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH	9
2.1. Oznaczenie suchej masy metodą suszarkową.....	11
2.1.1. Oznaczenie zawartości suchej masy metodą suszarkową w temp. 105°C	12
2.1.2. Oznaczenie suchej masy metodą suszarkową w temp. 130°C	13
2.2. Oznaczenie wilgotności metodą destylacji mieszaniny azeotropowej	14
3. OZNACZANIE GĘSTOŚCI CIECZY	16
3.1. Oznaczenie zawartości alkoholu metodą piknometryczną połączoną z destylacją.....	17
3.2. Oznaczenie gęstości cieczy metodą areometryczną	20
4. OCENA BIAŁKA POKARMOWEGO.....	22
4.1. Oznaczenie zawartości białka metodą Kjeldahla.....	22
4.2. Określanie wartości odżywczej białka pokarmowego.....	25
4.2.1. Wyznaczanie CS – chemicznego miernika jakości białka i efektu uzupełniania aminokwasów	26
5. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WĘGLOWODANÓW	29
5.1. Oznaczenie zawartości cukrów redukujących i sacharozy w naturalnych miodach pszczelich i miodach pitnych	29
5.1.1. Oznaczenie zawartości cukrów redukujących przed i po inwersji w miodzie pitnym metodą Lane – Eynona	30
5.1.1.1. Oznaczenie zawartości cukrów redukujących w miodzie pitnym	31
5.1.1.2. Oznaczenie zawartości sacharozy w miodzie pitnym	34
5.1.2. Oznaczenie zawartości cukrów w miodzie metodą HPLC – RID / NH ₂	35
5.2. Oznaczenie zawartości błonnika pokarmowego całkowitego w żywności metodą według AOAC 991.43.....	37
6. OCENA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA TŁUSZCZÓW JADALNYCH.....	42
6.1. Ilościowe oznaczenie tłuszczów	42
6.1.1. Oznaczenie zawartości tłuszczu w mleku metodą Gerbera	42
6.2. Analiza jakościowa tłuszczów	45
6.2.1. Oznaczenie stopnia kwasowości tłuszczu.....	46
6.2.2. Oznaczenie zawartości nadtlenków	47
6.2.3. Próba Kreisa na zawartość aldehydu epihydrynowego	49
6.2.4. Próba z kwasem 2-tiobarbiturowym na obecność aldehydu malonowego	50
6.2.5. Wykrywanie jełczenia ketonowego próbą Taufla i Thaler'a	51

6.2.6. Badanie tłuszczu w świetle ultrafioletowym	51
7. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU ASKORBOWEGO I DEHYDROASKORBOWEGO	52
7.1. Oznaczenie zawartości kwasu askorbowego w przetworach owocowych i warzywnych metodą Tillmansa	52
7.1.1. Oznaczenie zawartości kwasu askorbowego	55
7.1.2. Oznaczenie sumy kwasu askorbowego i dehydroaskorbowego	56
7.2. Oznaczenie zawartości witaminy C w sokach owocowych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC.....	57
7.3. Oznaczenie zawartości witaminy B2 w mleku metodą Emmerie.....	60
7.4. Ocena wysycenia organizmu witaminą C – test językowy.....	61
8. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CHLORKU SODU	62
9. OZNACZANIE SKŁADU MINERALNEGO PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH I ZAWARTOŚCI PIERWIASTKÓW TOKSYCZNYCH METODĄ ATOMOWEJ SPEKTROMETRII ABSORPCYJNEJ (ASA).....	64
9.1. Oznaczenie zawartości cynku i miedzi metodą ASA, techniką płomieniową...	67
9.2. Oznaczenie zawartości ołowiu i kadmu metodą ASA, techniką bezpłomieniową	67
10. WYKRYWANIE I OCENA JAKOŚCIOWA SUBSTANCJI DODATKOWYCH DO ŻYWNOŚCI.....	68
10.1. Wykrywanie obecności ditlenku siarki w winie	68
10.3. Wykrywanie obecności benzoesu sodu w żywności metodą HPLC.....	71
11. METODY OCENY AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ ŻYWNOŚCI.....	73
11.1. Oznaczenie całkowitej zawartości polifenoli w środkach spożywczych.....	74
12. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI AZOTANÓW (III) I AZOTANÓW (V) W WARZYWACH I OWOCACH METODĄ BEZPOŚREDNIEJ REDUKCJI KADMEM.....	76
12.1. Oznaczenie zawartości azotanów (III).....	80
12.2. Oznaczenie zawartości azotanów (V).....	81
13. PODSTAWY MIKROBIOLOGICZNEJ OCENY ŻYWNOŚCI.....	83
13.1. Mikrobiologiczna ocena mleka spożywczego	84
13.1.1. Oznaczenie metodą płytkową w temperaturze 30°C ogólnej liczby drobnoustrojów	85
13.1.2. Oznaczenie liczby <i>Escherichia coli</i> przy użyciu podłoża Coli ID	86
13.2. Oznaczenie liczby drożdży i pleśni w wyrobach ciastkarskich.....	88
14. SUBSTANCJE ANTYODŻYWCZE W ŻYWNOŚCI	90
14.1. Oznaczenie szczawianów w kawie i herbacie	90
14.2. Oznaczenie zawartości tiocyjanków	93
15. OCENA PRZYDATNOŚCI WODY DO PICIA.....	96
16. METODY OCENY JAKOŚCI MIODÓW PSZCZELICH	98
16.1. Analiza pyłkowa	99

16.2. Oznaczanie aktywności diastatycznej miodu	101
16.2.2. Oznaczanie aktywności diastatycznej miodu metodą spektrofotometryczną.....	104
16.3. Oznaczanie zawartości proliny	106
16.4. Oznaczanie zawartości wody metodą refraktometryczną.....	108
16.5. Oznaczanie zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF).....	110
17. OCENA OPAKOWAŃ ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH	113
17.1. Znakowanie środków spożywczych	113
17.1.1. Ocena opakowań w odniesieniu do zasad znakowania środków spożywczych.....	113
17.1.2. Wykonanie projektu informacji żywieniowej.....	113
17.2. Badanie migracji globalnej i specyficznej	114
17.3. Badanie szczelności opakowań metalowych	115
18. ANALIZA SENSORYCZNA ŻYWNOŚCI	117
18.1. Ocena wrażliwości smakowej.....	117
18.1.1. Określenie progu wrażliwości smakowej	118
18.1.2. Próba na daltonizm smakowy	119
19. RAPORT Z BADANIA PRODUKTU ŻYWNOŚCIOWEGO	122

1. PRZYGOTOWANIE PRÓB ŻYWNOŚCI DO ANALIZY

Środki spożywcze, poza nielicznymi wyjątkami stanowią zbiór niejednorodnych substancji chemicznych. Izolacja i oznaczenie poszczególnych składników żywności wymaga zwykle złożonego postępowania analitycznego poprzedzonego odpowiednim przygotowaniem próby.

Na proces przygotowania prób żywności do analizy składa się kilka etapów:

- pobranie prób żywności,
- homogenizacja prób, odpowiednio do wymogów badania,
- fizyczna i/lub chemiczna obróbka testowanej próby przed jej analitycznym oznaczeniem.

Zarówno pobieranie prób, jak i metody analityczne, stosowane do badania jakości żywności w ramach urzędowej kontroli są regulowane odpowiednimi aktami prawnymi.

1.1. Pobieranie prób żywności do analizy

Ogólne zasady pobierania prób żywności do analizy

a) Personel. Próbki powinna pobierać osoba przeszkolona w tym zakresie.

b) Materiał. Partia jest to określona ilość środka spożywczego dostarczona w jednym terminie, o potwierdzonych danych dotyczących w szczególności pochodzenia środka spożywczego, jego rodzaju i sposobu pakowania, ze wskazaniem przedsiębiorcy odpowiedzialnego za umieszczenie produktu w opakowaniach zbiorczych, rodzaju opakowania, oznakowania środka spożywczego, nadawcy; w przypadku ryb i produktów rybnych porównywalne muszą być również wymiary ryb. Z każdej partii podlegającej badaniu należy pobrać odrębne próbki. Optymalne pobieranie próbek powinno odbywać się w punkcie, w którym produkt jest wprowadzany do łańcucha żywieniowego i możliwa jest już identyfikacja poszczególnych partii. Próbki pobiera się w sposób zapewniający uzyskanie próbek charakteryzujących właściwości organoleptyczne, fizykochemiczne oraz mikrobiologiczne danej partii.

c) Środki ostrożności. W trakcie pobierania próbek i przygotowywania próbek laboratoryjnych należy podjąć środki ostrożności zapobiegające wszelkim

zanieczyszczeniom oraz wpływowi środowiska zewnętrznego na pobierany materiał. Próbkę pobiera się czystymi, suchymi, uprzednio wyparzonymi lub wygotowanymi przyrządami i przechowuje w opakowaniach jednorazowych przeznaczonych do tego celu lub w innych czystych, wyparzonych lub wygotowanych naczyniach szklanych, porcelanowych lub emaliowanych, albo w innych pojemnikach, szczelnie zakręcanych, zamykanych lub przykrywanych, odpowiadających wymaganiom dla materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością.

d) Próbka pierwotna to określona ilość materiału pobrana z jednego miejsca partii (lub podpartii - fizycznie rozdzielnej i identyfikowalnej części partii). W miarę możliwości próbki pierwotne powinny być pobierane z różnych miejsc partii. Wielkość próbki pierwotnej nie powinna być mniejsza niż 150 g. Próbki pierwotne powinny mieć zbliżoną masę. Liczba pobranych próbek pierwotnych zależy od wielkości partii, liczby opakowań w partii (Tabela 1.1). W przypadku środków ciekłych, dla których można założyć równomierny rozkład zanieczyszczenia w partii, wystarczy pobrać z danej partii jedną próbkę pierwotną, która stanowi próbkę zbiorczą. Środki spożywcze ciekłe z osadem przed pobraniem należy starannie wymieszać.

Tabela 1.1. Liczba próbek pierwotnych w zależności od wielkości partii.

Masa partii (kg)	Minimalna liczba pobieranych próbek pierwotnych
< 50	3
50-500	5
> 500	10
Liczba opakowań lub jednostek w partii lub podpartii	Liczba pobieranych opakowań lub jednostek losowania
1-25	1 opakowanie lub jednostka
25-100	około 5 %, min. 2
>100	około 5 %, max. 10
Liczba puszek - w partii lub podpartii	Minimalna liczba puszek, które należy pobrać
1-25	1
26-100	5
> 100	10

e) Próbka zbiorcza powstaje przez połączenie i dokładne wymieszanie wszystkich próbek pierwotnych. Masa takiej próbki powinna wynosić co najmniej 1 kg, chyba że

nie jest to uzasadnione ze względów praktycznych, np. gdy próbki pobierano z jednego opakowania.

f) Próbki laboratoryjne są wyodrębniane z ujednorodnionej próbki zbiorczej. Wielkość próbek laboratoryjnych pobranych w celu sprawdzenia zgodności z przepisami musi umożliwiać przynajmniej dwukrotne wykonanie analizy.

g) Pakowanie i transport próbek. Każdą próbkę należy umieścić w czystym pojemniku wykonanym z chemicznie obojętnego materiału, zapewniającym odpowiednią ochronę przed zanieczyszczeniem i uszkodzeniem w czasie transportu. Transport powinien odbywać się w warunkach odpowiednio dobranych do rodzaju próby (np. temperatura chłodnicza dla prób szybko psujących się), aby uniknąć zmian w składzie próbek.

h) Pieczętowanie i etykietowanie próbek. Każdą próbkę przeznaczoną do urzędowej kontroli zamyka się i pieczętuje w miejscu pobrania próbek oraz etykietuje w sposób umożliwiający jej identyfikację. Dla każdej pobranej próbki sporządza się protokół umożliwiający jednoznaczną identyfikację każdej partii, w którym podaje się datę oraz miejsce pobrania, osobę pobierającą próbki wraz ze wszystkimi dodatkowymi informacjami istotnymi dla wykonania analizy. Informacje na etykiecie powinny być zapisane w sposób trwały. Opakowanie próby powinno zawierać następujące informacje: nazwę artykułu, dane identyfikujące partię i jej wielkość, datę i miejsce pobrania próbki, imię i nazwisko osoby pobierającej próby, numer protokołu pobrania.

Zasady pobierania prób żywności przez zakłady żywienia zbiorowego typu zamkniętego

Zakład żywienia zbiorowego typu zamkniętego (kuchnia szpitalna, przedszkolna, w żłobku, itp.) ma obowiązek przechowywać próbki wszystkich potraw wchodzących w skład każdego posiłku. Próba powinna być oznakowana przez umieszczenie trwałego napisu określającego zawartość, datę i godzinę przygotowania potrawy oraz imię, nazwisko i stanowisko służbowe osoby, która pobrała próbkę. Zakład przechowuje próbki, przez co najmniej 3 dni, licząc od chwili, kiedy cała partia została spożyta lub przyjęta do zakładu, w miejscu wydzielonym wyłącznie do tego celu oraz w warunkach zapewniających utrzymanie temperatury 4°C lub niższej, w zależności od przechowywanego produktu. Miejsce przechowywania próbek musi

być tak zabezpieczone, aby dostęp do niego posiadał tylko kierujący zakładem lub osoba przez niego upoważniona.

1.2. Homogenizacja prób obejmuje rozdrobnienie i zmieszanie. W zależności od rodzaju analizowanych parametrów wskazane jest odpowiednie rozdrobnienie badanego środka spożywczego.

Każda czynność związana z przygotowaniem próby do analizy niesie ze sobą ryzyko wystąpienia błędów analitycznych. Stosowanie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP – ang. *Good Laboratory Practice*) na każdym etapie przygotowania i analizy próby pozwala zminimalizować ryzyko tych błędów.

Literatura

1. Borawska M., Witkowska A.: Analiza środków spożywczych. Wydawnictwo Uczelniane, Białystok, 1998.
2. Dyrektywa 2002/63/WE z dnia 11 lipca 2002 r. ustanawiająca wspólnotowe metody pobierania próbek do celów urzędowej kontroli pozostałości pestycydów w produktach pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz na ich powierzchni oraz uchylająca dyrektywę 79/700/EWG (32002L0063).
3. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 kwietnia 2007 r. w sprawie pobierania i przechowywania próbek żywności przez zakłady żywienia zbiorowego typu zamkniętego (Dz. U. 2007, nr 80, poz. 545).
4. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 17 października 2007 r. w sprawie pobierania próbek żywności w celu oznaczania poziomów pozostałości pestycydów (Dz. U. 2007, nr 27, poz. 1502).
5. Ustawa z dnia 26 sierpnia 2006r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz. U. 2006, nr 171, poz.1225, z późn. zm.; tekst jednolity: Obwieszczenie Marszałka Sejmu Rzeczypospolitej Polskiej z dnia 29 czerwca 2010 r. w sprawie ogłoszenia jednolitego tekstu ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia - Dz. U. 2010 nr 136 poz. 914).

2. OZNACZANIE WILGOTNOŚCI I SUCHEJ MASY W ŚRODKACH SPOŻYWCZYCH

W środkach spożywczych woda występuje jako woda wolna oraz związana fizykochemicznie i chemicznie. Woda wolna występująca jako rozpuszczalnik substancji organicznych oraz nieorganicznych, jest słabo związana z podłożem. Woda związana fizykochemicznie jest związana z podłożem osmotycznie (woda występująca w mikroporach) i adsorpcyjnie (siły międzycząsteczkowe Van der Waalsa, orientacja stałych dipoli, indukowanie dipoli, dyspersja). Woda związana chemicznie jest najsilniej związana z produktem, to woda krystaliczna związana koordynacyjnie poprzez grupy polarne koloidów.

Z zawartością wody w produkcie (wilgotnością) ściśle jest związane pojęcie **suchej masy**, które oznacza pozostałość po usunięciu wody z produktu:

$$\text{zawartość suchej masy (\%)} = 100 - \text{zawartość wody (\%)}$$

Oznaczanie suchej masy można przeprowadzić przy użyciu: metody suszarkowej, pod zmniejszonym ciśnieniem, liofilizacji, destylacji w mieszaninie azeotropowej, chemicznej metody Karl-Fischera, chemicznego odwadniania, analizy termogravimetrycznej, chromatografii gazowej, a także refraktometrycznie.

Podczas suszenia środka spożywczego usuwana jest woda wolna i część wody związanej. Suszenie jest metodą powszechnie stosowaną, jednak jest to metoda obciążona licznymi błędami, ponieważ z jednej strony w procesie suszenia zostają usunięte z wodą substancje lotne (alkohole, niektóre kwasy, estry, aldehydy, ketony, olejki eteryczne), a z drugiej woda nie jest usuwana w całości. Ilość wody jaką można odparować zależy od właściwości produktu i warunków suszenia. Natomiast warunki suszenia należy dobrać odpowiednio do właściwości badanego produktu (Tabela 2.1.).

Tabela 2.1. Warunki suszenia różnych produktów spożywczych.

Produkt	Wstępne suszenie	Temperatura suszenia ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	Czas suszenia (h)
Mleko, śmietana	+	100	3,0
Ser żółty	-	105	17,0
Czekolada	-	100	3,0
Jaja	+	130	0,75
Lody	+	100	3,5
Orzechy	-	130	3,0

Dla wielu produktów stosuje się suszenie do stałej masy w temperaturze 100-105°C pod normalnym ciśnieniem. Ponieważ przy tej metodzie przeważnie nie osiąga się absolutnej stałości masy, suszenie uznaje się za zakończone, gdy różnica dwóch kolejnych ważeń nie przekracza 0,004g. Osiągnięta w ten sposób stała masa próbki daje podstawę do obliczenia zawartości wody.

Suszenie w temperaturze 130°C stosuje się w przypadku produktów, które nie zawierają lub zawierają znikome ilości związków wrażliwych na wysoką temperaturę (np. zboża, przetwory zbożowe, orzechy).

W trakcie suszenia produktów ciekłych lub o porowatej konsystencji (sery, przetwory mięsne, dżemy), na powierzchni może tworzyć się błonka lub skorupka utrudniająca odparowywanie wody, lub substancja spieka się tworząc trudną do rozkruszenia masę. Do tego typu produktów należy zastosować suszenie z odpowiednio przygotowanym piaskiem morskim lub kulkami szklanymi, czy też porcelanowymi, co ułatwia rozkruszanie spiekającej się substancji i znacznie zwiększa powierzchnię parowania. Jeżeli produkty tworzą w czasie suszenia lepkie substancje trudno mieszające się z piaskiem należy, przed właściwym suszeniem w suszarce, próbkę z piaskiem rozpuścić w 50% roztworze etanolu i zastosować wstępne suszenie na łaźni wodnej.

W przypadku obecności substancji wrażliwych na temperaturę w produkcie ma zastosowanie metoda suszenia pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 70°C lub niższej, przy ewentualnym użyciu związków pochłaniających wodę (np. chlorek wapnia (II), stężony kwas siarkowy (VI), pentatlenek difosforu, żel krzemionkowy) oraz liofilizacja. Liofilizacja jest często stosowaną metodą w przemyśle spożywczym (np. do produktów instant). Metoda polega na sublimacji zamrożonego rozpuszczalnika dzięki zastosowaniu niskiej temperatury oraz zmniejszonego ciśnienia. Jest przeprowadzana w liofilizatorach. W porównaniu do innych metod, suszenie sublimacyjne pozwala na największe zachowanie właściwości fizycznych, biologicznych i chemicznych surowca, w tym zachowanie zapachu i barwy, a także ograniczenie procesów enzymatycznego i nieenzymatycznego brunatnienia. W trakcie liofilizacji straty witamin oraz związków antocyjanowych są znacznie mniejsze niż w przypadku suszenia konwekcyjnego. Powstały liofilizat jest produktem higroskopijnym, dlatego należy zapewnić właściwe warunki jego przechowywania.

Do oceny suchej masy produktów zawierających substancje wrażliwe na utlenianie należy prowadzić suszenie w strumieniu obojętnego gazu (azotu, argonu lub ditlenku węgla).

2.1. Oznaczenie suchej masy metodą suszarkowa

Aparatura i sprzęt

- Suszarka elektryczna z termoregulacją;
- waga analityczna z dokładnością do 0,001g;
- naczynka wagowe;
- eksykator z substancją pochłaniającą wilgoć;
- mieszadło;
- młynek;
- łaźnia wodna;
- sito o średnicy oczek 0,5 mm.

Odczynniki

- Alkohol etylowy 50%;
- roztwór kwasu chlorowodorowego (1:1);
- piasek.

Piasek morski lub rzeczny przesiał przez sito o średnicy oczek 0,5 mm, zalać roztworem kwasu chlorowodorowego, wymieszać łopatką porcelanową i ogrzewać pod wyciągiem we wrzącej łaźni wodnej przez 3 godziny. Po tym czasie przemyć wodą do zaniku reakcji na chlorki (próba z AgNO_3), przemyć wodą destylowaną, osuszyć. Następnie prażyć w temperaturze 550-600°C w ciągu 60 min. Po ostudzeniu w eksykatorze przechowywać w słoju z doszlifowanym korkiem.

Przygotowanie próby

Wyroby o konsystencji stałej rozdrobnić (zmielić w młynku, utrzeć w moździerzu) na miazki proszek. Wyroby o konsystencji mazistej, płynnej lub galaretowatej dokładnie wymieszać. Próbkę należy przygotować bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia.

2.1.1. Oznaczenie zawartości suchej masy metodą suszarkową w temp. 105°C

Wykonanie oznaczenia

Czyste, suche naczynko wagowe z przykrywką wstawić do suszarki nagrzanej do temperatury $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i suszyć przez około 40 min. do stałej masy. Po tym czasie naczynko zamknąć pokrywką, przenieść do ekcykatora, ostudzić do temperatury laboratoryjnej i zważyć. Do zważonego naczynka wagowego odważyć $20 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ próbki. Zanotować masę naczynka z próbką. Naczynko wstawić do nagrzanej do temperatury $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ suszarki, zdjąć przykrywkę i suszyć przez 3 h. Po 3 h suszenia naczynko zamknąć przykrywką i przenieść do ekcykatora do ostudzenia do temperatury laboratoryjnej (czas studzenia 30–45 min.). Na chwilę uchylić wieczko naczynka z próbką, a następnie zważyć i zanotować wynik. Naczynko wstawić ponownie do suszarki, suszyć przez 30 min. Po tym czasie naczynko z próbką studzić w ekcykatorze i ponownie zważyć. Postępować w ten sposób, dopóki dwa kolejne oznaczenia nie będą się różniły bardziej niż o 0,004 g.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Zawartość suchej masy (X) w % obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{(b - c) \cdot 100}{a - c},$$

w którym:

- a – masa naczynka z badaną próbką przed suszeniem (g);
- b – masa naczynka z badaną próbką po suszeniu (g);
- c – masa pustego naczynka (g).

Za wynik końcowy należy przyjąć średnią arytmetyczną co najmniej dwóch wartości X, różniących się nie więcej niż o 0,2%. Wynik zaokrąglić do 0,1.

2.1.2. Oznaczanie suchej masy metodą suszarkową w temp. 130°C

Wykonanie oznaczenia

Czyste, suche naczynko wagowe z przykrywką wstawić do suszarki nagrzanej do temperatury $130^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ i suszyć przez 15 min. do stałej masy. Jeżeli suszenie dotyczy produktów tworzących kożuszek lub skorupkę w trakcie suszenia, należy do naczynka odważyć 20g piasku i naczynko z piaskiem wysuszyć do stałej masy przez 30 min. w 130°C . Suszarkę należy uprzednio nagrzać do nieco wyższej temperatury, ponieważ w trakcie wkładania naczynka do środka jej temperatura spadnie. Po 15 min. naczynko zamknąć pokrywką, przenieść do ekcykatora, ostudzić do temperatury laboratoryjnej i zważyć. Do zważonego naczynka wagowego odważyć $20 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ próbki. Zanotować masę naczynka z próbką. Naczynko wstawić do nagrzanej do temperatury $130^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ suszarki, zdjąć przykrywkę i suszyć przez 30 min. Po 30 min. suszenia naczynko zamknąć przykrywką i przenieść do ekcykatora do ostudzenia do temperatury laboratoryjnej (czas studzenia 30–45 min.). Na chwilę uchylić wieczko naczynka z próbką, a następnie zważyć i zanotować wynik. Otrzymany wynik ważenia jest ostateczny.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Zawartość suchej masy (X) w % obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{(b - c) \cdot 100}{a - c},$$

W którym:

a – masa naczynka z badaną próbką przed suszeniem (g);

b – masa naczynka z badaną próbką po suszeniu (g);

c – masa pustego naczynka (g).

Za wynik końcowy należy przyjąć średnią arytmetyczną co najmniej dwóch wartości X , różniących się nie więcej niż o 0,2%. Wynik należy zaokrąglić do 0,1.

2.2. Oznaczanie wilgotności metodą destylacji mieszaniny azeotropowej

Zasada metody

Metoda polega na oddestylowaniu wody z badanej próbki żywności, do której dodano ciecz niemieszającą się z wodą, o punkcie wrzenia powyżej 100°C, a następnie zmierzeniu objętości wody. Stosowane w tej metodzie ciecze azeotropujące powinny być praktycznie nierozpuszczalne w wodzie i nie powinny rozpuszczać w sobie wody.

W zależności od konstrukcji aparatu można stosować destylacje z cieciami o gęstości:

- mniejszej od wody (ksylen, toluen) – wtedy oddestylowana woda zbiera się w dolnej części kalibrowanego odbieralnika,
- większej od wody (tetrachloroetan) – oddestylowana woda zbiera się na powierzchni cieczy w górnej części odbieralnika.

Aparatura i sprzęt

- Aparat destylacyjny.

Odczynniki

- Toluen lub ksylen.

Toluen: temp. wrzenia – 111°C, d=0,867; ksylen: temp. wrzenia – 140°C, d=0,862.

Wykonanie oznaczenia

Do kolby destylacyjnej odważyć 2-10g ± 0,001g badanej próby, dodać 100-200 ml toluenu lub ksylenu, dokładnie wytrząsać i poddać destylacji. Destylację prowadzić do czasu, aż w ciągu 30 minut poziom wody w odbieralniku się nie zmieni. Objętość wody zebranej w dolnej części odbieralnika należy odczytać w temperaturze 20°C.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Zawartość wody w próbce (X) (%) obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{0,998 \cdot a \cdot 100}{b},$$

w którym:

a – odczytana objętość wody (ml);

b – odważka produktu (g);

0,998 – ciężar właściwy wody w temperaturze 20°C.

Literatura

1. Borawska M., Witkowska A.: Analiza środków spożywczych. Wydawnictwo Uczelniane, Białystok, 1998.
2. Rząca M., Witrowa-Rajchert D.: Suszenie żywności w niskiej temperaturze. Przemysł Spożywczy, 2007, 4: 30-35.

3. OZNACZANIE GĘSTOŚCI CIECZY

Gęstość płynnych produktów spożywczych może być wyznaczona metodą piknometryczną lub areometryczną. Metoda areometryczna jest oparta na prawie Archimedesesa. Zaopatrzony w termometr areometr ma stałą masę, natomiast objętość wypieranej cieczy jest zależna od gęstości. Pomiar gęstości polega na zanurzeniu areometru w badanej cieczy i odczytaniu gęstości na wyskalowanej części przyrządu. Różne rodzaje areometrów oraz piknometrów przedstawia zdjęcie 3.1.



Zdj. 3.1. Różne rodzaje areometrów (a) i piknometrów (b).

3.1. Oznaczanie zawartości alkoholu metodą piknometryczną połączoną z destylacją

Zasada metody

Metoda polega na oddestylowaniu etanolu z próby, a następnie oznaczeniu gęstości destylatu metodą piknometryczną i odczycie zawartości etanolu z tabel zamieszczonych w Polskiej Normie PN-A-79093-2. W metodzie piknometrycznej pomiar oparty jest na oznaczeniu gęstości względnej ze stosunku masy wody i masy badanej cieczy w jednakowej objętości i temperaturze. Te warunki zapewnia piknometr (Zdj. 3.1.).

Aparatura i sprzęt

- Piknometr;
- waga analityczna ($\pm 0,0001$ g);
- myjka ultradźwiękowa;
- zestaw destylacyjny;
- kamyczki wrzenne;
- kolba stożkowa o pojemności 100 ml.

Przygotowanie próby

W przypadku produktów gazowanych należy próbę odgazować. 250 ml próby należy umieścić w myjce ultradźwiękowej na 5 min.

Wykonanie oznaczenia

W zlewce odważyć 100 g próby o temperaturze 20°C i przenieść ilościowo do kolby destylacyjnej o pojemności 250 lub 500 ml za pomocą 50 ml wody destylowanej. Włożyć kamyczki wrzenne lub celit. Kolbę stożkową o poj. 100 ml zważyć (zapisać wynik), wlać do niej 5 ml wody destylowanej i ustawić jako odbieralnik. Połączyć elementy zestawu destylacyjnego, odkręcić wodę w chłodnicy, koniec chłodnicy zanurzyć w wodzie odbieralnika. W przypadku destylacji produktów gazowanych początkowo ogrzewać ostrożnie, ponieważ destylowany płyn mocno się pieni, następnie zwiększyć ogrzewanie. Oddestylować około 90 ml próbki. Zawartość odbieralnika uzupełnić wodą destylowaną do 100 g (uwzględniając masę pustej kolby stożkowej). Oznaczyć gęstość cieczy metodą piknometryczną w temperaturze 20°C. Przygotować wodę destylowaną o temperaturze 20 °C. Czysty, wysuszony piknometr należy zważyć z dokładnością $\pm 0,001$ g. Napęlić go wodą destylowaną o temperaturze 20°C, zamknąć

korkiem z termometrem, usunąć nadmiar wody, dokładnie osuszyć, zważyć z dokładnością $\pm 0,001\text{g}$. Pomiar powtórzyć trzykrotnie. Wodę wylać, piknometr przepłukać badanym płynem, nappełnić badanym destylatem o temperaturze 20°C , osuszyć, zważyć. Pomiar powtórzyć trzykrotnie. Obliczyć średnią z 3 wyników.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Ciężar właściwy (d) badanego płynu [g/ml] obliczyć według wzoru:

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0},$$

w którym:

m_0 – masa pustego piknometru (g);

m_1 – masa piknometru z wodą destylowaną (g);

m_2 – masa piknometru z badaną cieczą (g).

Zawartość etanolu odczytać jako % objętościowy z Tabeli 3.1. na podstawie oznaczonej gęstości. Porównać wyniki z deklarowaną przez producenta zawartością.

Tabela 3.1. Zależność między gęstością a zawartością alkoholu etylowego [PN-A-79093-2].

Gęstość [g/ml]	Zawartość alkoholu [v/v]	Zawartość alkoholu [m/m]			
0,99704	2,00	1,59	0,99228	5,40	4,30
0,99689	2,10	1,67	0,99215	5,50	4,38
0,99675	2,20	1,75	0,99201	5,60	4,46
0,99661	2,30	1,82	0,99188	5,70	4,54
0,99646	2,40	1,90	0,99174	5,80	4,62
0,99632	2,50	1,98	0,99161	5,90	4,70
0,99618	2,60	2,06	0,99148	6,00	4,78
0,99603	2,70	2,14	0,99135	6,10	4,87
0,99589	2,80	2,22	0,99122	6,20	4,95
0,99574	2,90	2,30	0,99109	6,30	5,03
0,99560	3,00	2,38	0,99096	6,40	5,11
0,99546	3,10	2,46	0,99083	6,50	5,19
0,99531	3,20	2,54	0,99070	6,60	5,27
0,99517	3,30	2,62	0,99057	6,70	5,35
0,99503	3,40	2,70	0,99045	6,80	5,43
0,99489	3,50	2,78	0,99032	6,90	5,51
0,99475	3,60	2,86	0,99020	7,00	5,59
0,99461	3,70	2,94	0,99007	7,10	5,67
0,99447	3,80	3,02	0,98994	7,20	5,75
0,99433	3,90	3,10	0,98981	7,30	5,83
0,99419	4,00	3,18	0,98969	7,40	5,91
0,99405	4,10	3,26	0,98956	7,50	5,99
0,99391	4,20	3,34	0,98944	7,60	6,07
0,99377	4,30	3,42	0,98931	7,70	6,15
0,99363	4,40	3,50	0,98919	7,80	6,24
0,99349	4,50	3,58	0,98906	7,90	6,32
0,99336	4,60	3,66	0,98893	8,00	6,40
0,99322	4,70	3,74	0,98881	8,10	6,48
0,99308	4,80	3,82	0,98869	8,20	6,56
0,99295	4,90	3,90	0,98857	8,30	6,64
0,99281	5,00	3,98	0,98845	8,40	6,72
0,99268	5,10	4,06	0,98833	8,50	6,80
0,99255	5,20	4,14	0,98820	8,60	6,88
0,99241	5,30	4,22	0,98807	8,70	6,96
			0,98794	8,80	7,04
			0,98782	8,90	7,12
			0,98770	9,00	7,20

3.2. Oznaczanie gęstości cieczy metodą areometryczną

Zasada metody

Metoda polega na oznaczeniu gęstości cieczy poprzez zanurzenie aerometru w badanej próbce i dokonaniu odczytu na wyskalowanej części przyrządu.

Aparatura i sprzęt

- Aerometr;
- cylinder miarowy.

Wykonanie oznaczenia

Badana próbę doprowadzić do temperatury podanej na gęstościomierzu, wlać do cylindra, a następnie zanurzyć aerometr. Dokonać odczytu na wyskalowanej części aerometru uwzględniając menisk dolny w przypadku cieczy przezroczystych lub menisk górny dla cieczy nieprzejrzyстых.

Literatura

1. Rozporządzenie Ministra Gospodarki, Pracy i Polityki Społecznej z dnia 5 lutego 2003 w sprawie liczbowych danych odniesienia dla mieszanin alkoholu etylowego i wody (Dz. U., 2003, nr 38, poz. 331).
2. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 maja 2013 r. w sprawie rodzajów fermentowanych napojów winiarskich oraz szczegółowych wymagań organoleptycznych, fizycznych i chemicznych, jakie powinny spełniać te napoje (Dz. U. 2013 nr 0 poz. 633).
3. Polska Norma Piwo, Oznaczenie zawartości alkoholu, ekstraktu rzeczywistego i ekstraktu brzezki podstawowej metodą destylacyjną oraz metodą refraktometryczną, PN-A-79093-2.

ANALIZA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA ŻYWNOŚCI

Środki spożywcze stanowią źródło substancji niezbędnych dla zachowania zdrowia i życia człowieka. Wśród nich wyróżniamy podstawowe składniki pokarmowe, jak białka, tłuszcze, węglowodany, a także witaminy, sole mineralne oraz wodę. O jakości zdrowotnej żywności świadczy jej wartość odżywcza (czyli ilość i jakość poszczególnych składników pokarmowych), jakość organoleptyczna (zespół cech obejmujących smak, zapach, wygląd, w tym barwę i konsystencję, środków spożywczych, które można wyodrębnić i ocenić przy pomocy zmysłów człowieka) oraz bezpieczeństwo (występowanie zanieczyszczeń, zafałszowań, substancji antyodżywczych).

4. OCENA BIAŁKA POKARMOWEGO

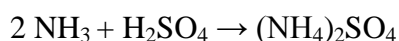
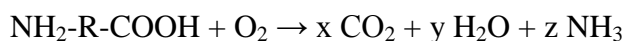
Białka są wielkocząsteczkowymi związkami zbudowanymi wyłącznie lub w dużej mierze z aminokwasów. Zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia w sprawie znakowania żywności wartością odżywczą zawartość białka jest to iloczyn zawartości azotu ogólnego oznaczonego metodą Kjeldahla i współczynnika przeliczeniowego 6,25. Azot w żywności może pochodzić z rozkładu białek, a także substancji niebiałkowych (np. azotanów). Do metod ilościowego oznaczania białka w żywności zaliczamy między innymi: metodę Kjeldahla, biuretową, Lowry'ego.

4.1. Oznaczanie zawartości białka metodą Kjeldahla

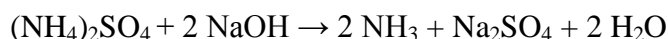
Zasada metody

Metoda składa się z kilku etapów.

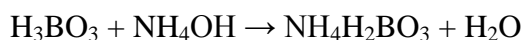
1. Mineralizacja próby w systemie otwartym poprzez spalanie w stężonym kwasie siarkowym (VI) w obecności mieszaniny substancji katalizującej (CuSO_4) oraz podwyższającej temperaturę (K_2SO_4). Azot wydzielą się w postaci amoniaku i tworzy z kwasem siarkowym siarczan (VI) amonu:



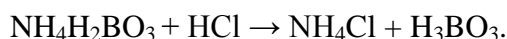
2. Zalkalizowanie roztworu w celu wydzielenia amoniaku:



3. Destylacja amoniaku do roztworu kwasu ortoborowego:



4. Miareczkowanie amoniaku związanego w kwasie, mianowanym roztworem kwasu chlorowodorowego:



Aparatura i sprzęt

- Piec do mineralizacji próbek (Büchi, Szwajcaria);
- destylarka z parą wodną (Büchi, Szwajcaria);
- kolba stożkowa o pojemności 250 ml;
- biureta.

Odczynniki

- Mieszanina substancji katalizujących (topnik):

odważyć 7,5 g siarczanu (VI) dipotasu (K_2SO_4) oraz 0,31 g pentahydratu siarczanu (VI) miedzi (II) ($CuSO_4 \cdot x H_2O$). Mieszaninę utrzyć w moździerzu na jednolity proszek;

- kwas siarkowy (VI), H_2SO_4 ($d = 1,83-1,84$);

- wodorotlenek sodu, NaOH 33%:

500 g wodorotlenku sodu rozpuścić w 1000 ml wody destylowanej;

- kwas ortoborowy, H_3BO_3 :

20–40 g H_3BO_3 rozpuścić w 1000 ml wody destylowanej;

- kwas chlorowodorowy, roztwór mianowany 0,1 mol/l;

- wskaźnik Tashiro:

0,2 g czerwieni metylowej rozpuścić w 50 ml 96% alkoholu etylowego, rozpuścić na łaźni wodnej o temperaturze $65^\circ C$. 0,1 g błękitu metylenowego rozpuścić w 150 ml 50% alkoholu etylowego. Oba roztwory zmieszać, przesączyć do butelki z ciemnego szkła.

Wykonanie oznaczenia

Odważyć 0,5 g próby badanej oraz 5,9 g topnika, przenieść do kolby mineralizacyjnej. Dodać celit (na końcu łyżeczki) i 18 ml stężonego kwasu siarkowego (VI). Próby umieścić w bloku mineralizacyjnym, włączyć pompkę wodną. Próbę zmineralizować przez 15 minut od przejaśnienia, a następnie ostudzić. Ostrożnie dodać 36 ml wody destylowanej (próbka powinna być rozpuszczona w wodzie w stosunku: na jedną porcję kwasu dwie porcje wody destylowanej). Kolbę umieścić w uchwycie destylarki, odkręcić wodę w chłodnicy. Przygotować odbieralnik: do kolby na 250 ml dodać 20 ml 4% kwasu borowego i 4 krople wskaźnika Tashiro, koniec chłodnicy zanurzyć w płynie odbieralnika. Próbę zalkalizować dodając wodorotlenek sodu przez przyciśnięcie przycisku „Reagent” do czasu, aż próba zacznie zmieniać kolor na niebieski lub brunatny (w stosunku: na jedną porcję kwasu – 3 porcje wodorotlenku sodu – 54 ml). Objętość dodawanego wodorotlenku sodu jest mierzona na skali. Ustawić wymagany czas destylacji (ok. 8 min.). Rozpocząć proces destylacji wciskając „Start”. Przeprowadzić destylację. Destylat miareczkować mianowanym 0,1 mol/l kwasem chlorowodorowym do zmiany barwy na fioletową.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Zawartość azotu w próbie (d) (%) obliczyć według wzoru:

$$d = \frac{(a - b) \cdot n \cdot 14}{1000 \cdot m} \times 100,$$

w którym:

- a – objętość mianowanego roztworu kwasu chlorowodorowego zużytego do miareczkowania próby właściwej (ml),
- b – objętość mianowanego roztworu kwasu chlorowodorowego zużytego do miareczkowania próby ślepej (ml),
- n – molowość kwasu chlorowodorowego (z dokładnością 0,0001),
- m – masa badanej próbki (g),
- 14 – ilość azotu, której odpowiada 1 ml 1 mol/l kwasu chlorowodorowego (mg).

Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników co najmniej dwóch równoległych oznaczeń.

Zawartość białka w próbie (B) (g/100g produktu) obliczyć mnożąc uzyskaną zawartość azotu (X) przez odpowiedni współczynnik białkowy (mnożnik białkowy). Mnożnik białkowy określa jaką część wszystkich pierwiastków zawartych w białku stanowi azot. W produktach mięsnych azot w elementarnym składzie białek występuje w prawie stałej ilości, około 16 %, co stanowi 6,25 części wszystkich pierwiastków zawartych w białku, ze specyficznymi odchyleniami dla poszczególnych białek (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Mnożnik białkowy wybranych białek pokarmowych.

Białko	Mnożnik białkowy
białko jaja kurzego	6,67
białko mleka	6,63
białko mięsa	6,25
białko jęczmienia, kukurydzy, fasoli	6,00
białko żyta, pszenicy, owsa, grochu, bobu	5,70
białko orzeszków ziemnych	5,50

4.2. Określanie wartości odżywczej białka pokarmowego

Jakość białka pokarmowego jest determinowana kilkoma czynnikami: zawartością aminokwasów egzogennych i endogennych; wzajemnymi proporcjami aminokwasów egzogennych; wzajemnymi proporcjami podstawowych składników pokarmowych w dostarczaniu energii; strawnością produktów białkowych.

Ze względu na skład aminokwasowy wyróżniamy białka pełnowartościowe i niepełnowartościowe. Białka pełnowartościowe to takie, które zawierają wszystkie aminokwasy egzogenne (niesyntetyzowane w organizmie człowieka) w odpowiednich proporcjach, występują w produktach pochodzenia zwierzęcego, jak jaja, mięso i produkty mięsne, ryby, mleko i przetwory mleczne. Do aminokwasów egzogennych zaliczane są: fenyloalanina, izoleucyna, leucyna, lizyna, metionina, treonina, tryptofan, walina. Wyróżniane są również aminokwasy względnie niezbędne – cysteina (wytwarzana w organizmie z metioniny) i tyrozyna (wytwarzana z fenyloalaniny). Do oceny wartości odżywczej (biologicznej) białka stosuje się metody biologiczne i chemiczne. Metody biologiczne polegają na ocenie przyrostu masy ciała lub bilansu azotowego u zwierząt laboratoryjnych, podczas gdy wskaźniki chemiczne są określane na podstawie porównania składu aminokwasowego białka badanego z białkiem wzorcowym (białko jaja kurzego lub wzorcowe białko FAO/WHO) (Tabela 4.2.). Wskaźniki chemiczne to przede wszystkim Chemiczny Miernik Jakości Białka (CS – ang. *Chemical Score*) oraz Zintegrowany Wskaźnik Aminokwasów Egzogennych (EAA – ang. *Essentials Amino Acids Index*).

Tabela 4.2. Skład aminokwasowy białek wzorcowych (mg/g N).

Aminokwas	Białko jaja	Wzorzec WHO/FAO/UNU 2007
Izoleucyna	415	188
Leucyna	553	331
Lizyna	403	281
Metionina + Cysteina	346	138
Fenyloalanina + Tyrozyna	627	238
Treonina	317	144
Tryptofan	100	38
Walina	454	244
Suma	3215	1602

4.2.1. Wyznaczanie CS – chemicznego miernika jakości białka i efektu uzupełniania aminokwasów

Zasada metody

Metoda ocenia wartość odżywczą białka przez porównanie jego składu aminokwasowego do składu aminokwasowego wzorca. Aminokwas, dla którego wskaźnik CS jest najniższy jest aminokwasem ograniczającym.

Obliczanie wyniku

Na podstawie „Tabel składu i wartości odżywczej produktów spożywczych” wypełnić Tabelę 4.3. (określić aminokwas ograniczający), następnie obliczyć efekt uzupełniania aminokwasów w posiłku składającym się z dwóch produktów (Tabela 4.4.):

- a. mleko 2% (200 ml) + pieczywo słodkie (50g);
- b. chleb baltonowski (50g) + fasola biała (50g);
- c. schab wieprzowy (100g) + ziemniaki (200g);
- d. wołowina (100g) + ryż biały (100g);
- e. makaron (50g) + twaróg półtłusty (50g);
- f. ryż biały (100g) + fasola biała (50g).

Początkowo w Tabeli 4.3. należy obliczyć zawartość białka w odpowiedniej ilości każdego produktu z wybranego zestawu (a-f), następnie obliczyć zawartość azotu w produkcie, dzieląc ilość białka przez mnożnik białkowy (z Tabeli 4.1.) i uzupełnić zawartość poszczególnych aminokwasów. Na taką samą ilość azotu obliczyć zawartość aminokwasów w białku wzorcowym FAO/WHO.

Chemiczny miernik jakości białka (CS) (%) obliczyć według wzoru:

$$CS = \frac{a_p}{a_w} \cdot 100$$

w którym:

a_p - zawartość aminokwasu w badanym białku,

a_w - zawartość aminokwasu w białku wzorcowym.

Literatura

1. Hryniewicki L., Roszkowski W. Białka. Żywnienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu. Gawęcki J. (red.), PWN, Warszawa, 2012.
2. Jarosz M: Normy żywienia dla populacji polskiej - nowelizacja. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2012.
3. Keller J.S.: Tworzywo życia. Białka w organizmie i żywieniu człowieka. OR-KA, Warszawa, 2009.
4. Kunachowicz H., Nadolna I., Przygoda B., Iwanow K.: Tabele składu i wartości odżywczej żywności. PZWL, Warszawa, 2017.
5. Van Camp J., Huyghebaert A.: Proteins in Food. Handbook of food analysis. Vol. 1. Physical characterization and nutrient analysis. Nollet L.M. (red.). Merceel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong, 1996.
6. Ziemiański Ś. Normy żywienia – fizjologiczne podstawy. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2001.

Tabela 4.3. Określanie aminokwasu ograniczającego.

Produkt	Masa [g]	Białko (B) [g]	Azot [g] (B/M_b^*)	Zawartość aminokwasów [mg/g azotu]								Aminokwas Ograniczający
				Izoleucyna	Leucyna	Lizyna	Metionina + Cysteina	Fenylalanina + Tyrozyna	Treonina	Tryptofan	Walina	
(a_{p1})												
Wzorzec (a_{w1})	--	--										--
CS ₁ [%]	--	--	--									--
(a_{p2})												
Wzorzec (a_{w2})	--	--										--
CS ₂ [%]	--	--	--									--

* M_b – mnożnik białkowy

Tabela 4.4. Obliczanie efektu uzupełniania aminokwasów.

Produkt	Masa [g]	Białko (B) [g]	Azot [g] (B/M_b^*)	Zawartość aminokwasów [mg/g azotu]								Aminokwas Ograniczający
				Izoleucyna	Leucyna	Lizyna	Metionina + Cysteina	Fenylalanina + Tyrozyna	Treonina	Tryptofan	Walina	
Razem (a_p)												
Wzorzec (a_w)	--	--										
CS [%]	--	--	--									

* M_b – mnożnik białkowy

5. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WĘGLOWODANÓW

5.1. Oznaczenie zawartości cukrów redukujących i sacharozy w naturalnych miodach pszczelich i miodach pitnych

Głównymi składnikami miodów są cukry: fruktoza, glukoza i sacharoza oraz w mniejszym stopniu maltoza, izomaltoza, melecycyza, maltuloza, turanoza, nigerioza i koibioza. Na skład cukrów w miodzie ma wpływ udział procentowy tych cukrów w nektarze i spadzi. Zawartość (suma) fruktozy i glukozy w naturalnych miodach pszczelich nie powinna być mniejsza niż: 60 g/100 g – w miodach nektarowych oraz 45 g/100 g w miodach spadziowych i spadziowo-nektarowych. Natomiast zawartość sacharozy nie może być większa niż 5 g/100 g. Wyjątek stanowi miód pochodzący z grochodrzewu, lucerny, *Banksja menziensii*, suchodrzewu francuskiego, kauczukowca czerwonego, rzemienicy i *Citrus* spp. (10 g/100 g) oraz z lawendy i ogórecznika (15 g/100 g). Oznaczanie zawartości cukrów w miodach przeprowadza się metodą HPLC (5.1.2.).

Metoda Lane – Eynona pozwala na określenie zawartości cukrów redukujących oraz cukrów redukujących po inwersji w miodach pitnych. Miód pitny powinien zawierać taką ilość cukrów ogółem (g/l), która po zsumowaniu z pomnożoną przez 18 zawartością alkoholu w % objętościowych daje wartość nie mniejszą niż: 240 – czwórniak; 323 – trójniak, 490 – dwójniak, 600 – półtorak.

5.1.1. Oznaczanie zawartości cukrów redukujących przed i po inwersji w miodzie pitnym metodą Lane – Eynona

Odczynniki

- Błękit metylenu, 1% w/w;
- kwas chlorowodorowy, stężony ($d=1,119\text{g/ml}$);
- oranż metylu, 0,1% w/w;
- sacharoza, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$;
- wodorotlenek sodu, 5% w/w; 1 mol/l;
- octan ołowiu (II) $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COOH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. 100 g tlenku ołowiu (II) rozetrzeć w moździerzu z 300 g trójwodnego octanu ołowiu (II). Przenieść do zlewki, dodać 50 ml wody destylowanej i podgrzać na łaźni wodnej do uzyskania białoczerwonej masy. Dodać 950 ml wody destylowanej, dokładnie wymieszać i po odstaniu się zawiesiny zdekantować płyn do kolby stożkowej z korkiem na szlif;
- siarczan sodu, 5% w/w;
- płyn Fehlinga I: 70 g pentahydratu siarczanu (VI) miedzi (II) ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) rozpuścić w wodzie w kolbie miarowej pojemności 1000 ml i dopełnić wodą do kreski; oznaczyć miano roztworu;
- płyn Fehlinga II: 346 g czterowodnego winianu potasu-sodu ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6\text{KNa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) rozpuścić w 650 ml wody o temperaturze 40-50°C oraz 100 g wodorotlenku sodu w 100 ml wody. Oba roztwory przelać do kolby miarowej pojemności 1000 ml, wymieszać i dopełnić wodą do kreski.

Przygotowanie próby

Próbę miodu pitnego rozcieńcza się tak, aby zawartość cukrów w badanym roztworze wynosiła 1,0-4,0 g/l. 25 ml próby przenieść do zlewki o poj. 50 ml i dodać 1 mol/l NaOH, aby uzyskać roztwór o pH ok. 6,0-7,0. W razie potrzeby próbę należy odparować na parownicy umieszczonej na łaźni wodnej do około połowy objętości. Do kolby miarowej o pojemności 100 ml przenieść ilościowo próbę miodu pitnego, używając wodę destylowaną (ok. 50 ml). W celu klarowania próby należy dodać 2,5 ml roztworu octanu ołowiu i kroplami 10 ml siarczanu sodu. Uzupełnić wodą destylowaną do 100 ml i odstawić na 30 min. Zawartość kolby przesączyć przez karbowany sączek. Przesącz jest używany do oznaczenia cukrów redukujących przed oraz po inwersji.

5.1.1.1. Oznaczanie zawartości cukrów redukujących w miodzie pitnym

Zasada metody

Zasada oznaczania cukrów redukujących polega na bezpośrednim miareczkowaniu określonej soli miedziowej badanym roztworem cukru wobec błękitu metylenowego jako wskaźnika końca reakcji, a następnie na wyliczeniu ich procentowej zawartości.

Wykonanie oznaczenia

20 ml przesącza przenieść do kolby miarowej o pojemności 200 ml i uzupełnić wodą do kreski. Biuretę pojemności 25 ml napełnić przygotowanym roztworem. Do trzech kolb stożkowych o pojemności minimum 200 ml wlać oddzielnymi pipetami po 5 ml płynu Fehlinga I i II oraz wrzucić kilka porcelanek lub celit. Do pierwszej kolby dodać pipetą 15 ml badanego roztworu, zmieszać dokładnie z płynami Fehlinga, ogrzewać w płaszczu grzejnym do wrzenia i utrzymując roztwór w stanie łagodnego wrzenia miareczkować roztworem z biurety do zaniku jasnoniebieskiego zabarwienia. Dodać 1-2 krople roztworu błękitu metylenu i w dalszym ciągu ostrożnie miareczkować do całkowitej redukcji jonu miedzi (II) (zanik barwy niebieskiej płynu nad osadem). Oznaczenie w pierwszej kolbie służy do orientacyjnego określenia ilości roztworu miodu użytego do reakcji z płynami Fehlinga (15 ml dodane pipetą + odczyt z biurety). Do drugiej kolby dodać roztwór miodu pitnego pipetą w ilości mniejszej o 2 ml od ilości zużytej do miareczkowania orientacyjnego, szybko ogrzać w płaszczu grzejnym do wrzenia i w ciągu 2 minut utrzymywać roztwór w stanie łagodnego wrzenia, dodać kroplę roztworu błękitu metylenu i w ciągu trzeciej minuty zmiareczkować do zaniku niebieskiego zabarwienia. Na skali biurety odczytać ilość ml zużytego roztworu miodu dodać ilość roztworu dodanego pipetą, zapisać wynik.

Z zawartością trzeciej kolby postępować podobnie jak z zawartością drugiej kolby.

Obliczanie wyników oznaczenia

Obliczyć średnią arytmetyczną ilości roztworu miodu zużytej do odbarwienia płynów Fehlinga z co najmniej dwóch równoległych oznaczeń różniących się nie więcej niż o +/- 0,1 ml. Zawartość cukrów redukujących X [g/l miodu pitnego] obliczyć wg wzoru:

$$X = \frac{C \cdot A}{V},$$

w którym:

- C – odczytana z Tabeli 5.1. masa cukru [mg] zredukowana przez 10 ml roztworu Fehlinga przy użyciu V badanego roztworu,
- A – rozcieńczenie próby,
- V – ilość ml badanego roztworu zużytego do miareczkowania.

Wynik zawartości cukrów redukujących w procentach wagowych odczytać z Tabeli 5.1.

Tabela 5.1. Masa cukrów redukujących [mg].

Ilość roztworu odmiareczkowanego (ml)	Dziesiętne części mililitra									
	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
15	50,50	50,51	50,52	50,53	50,54	50,54	50,55	50,56	50,57	50,58
16	50,59	50,60	50,61	50,62	50,63	50,64	50,65	50,66	50,67	50,68
17	50,70	50,70	50,71	50,71	50,72	50,72	50,73	50,73	50,74	50,74
18	50,75	50,75	50,76	50,76	50,77	50,77	50,78	50,78	50,79	50,79
19	50,80	50,81	50,82	50,83	50,84	50,84	50,85	50,86	50,87	50,88
20	50,89	50,90	50,91	50,92	50,93	50,94	50,95	50,96	50,97	50,98
21	51,00	51,00	51,01	51,01	51,02	51,02	51,03	51,03	51,04	51,04
22	51,05	51,05	51,06	51,06	51,07	51,07	51,08	51,08	51,09	51,09
23	51,10	51,10	51,11	51,11	51,12	51,12	51,13	51,13	51,14	51,14
24	51,15	51,15	51,16	51,16	51,17	51,17	51,18	51,18	51,19	51,19
25	51,20	51,21	51,22	51,23	51,24	51,24	51,25	51,26	51,27	51,28
26	51,29	51,30	51,31	51,32	51,33	51,34	51,35	51,36	51,37	51,38
27	51,40	51,40	51,41	51,41	51,42	51,42	51,43	51,43	51,44	51,44
28	51,45	51,45	51,46	51,46	51,47	51,47	51,48	51,48	51,49	51,49
29	51,50	51,50	51,51	51,51	51,52	51,52	51,53	51,53	51,54	51,54
30	51,55	51,55	51,56	51,56	51,57	51,57	51,58	51,58	51,59	51,59
31	51,60	51,60	51,61	51,61	51,62	51,62	51,63	51,63	51,64	51,64
32	51,65	51,65	51,66	51,66	51,67	51,67	51,68	51,68	51,69	51,69
33	51,70	51,70	51,71	51,71	51,72	51,72	51,73	51,73	51,74	51,74
34	51,75	51,75	51,76	51,76	51,77	51,77	51,78	51,78	51,79	51,79
35	51,80	51,80	51,81	51,81	51,82	51,82	51,83	51,83	51,84	51,84
36	51,85	51,85	51,86	51,86	51,87	51,87	51,88	51,88	51,89	51,89
37	51,90	51,90	51,91	51,91	51,92	51,92	51,93	51,93	51,94	51,94
38	51,95	51,95	51,96	51,96	51,97	51,97	51,98	51,98	51,99	51,99
39	52,00	52,00	52,01	52,01	52,02	52,02	52,03	52,03	52,04	52,04
40	52,05	52,05	52,06	52,06	52,07	52,07	52,08	52,08	52,09	52,09
41	52,10	52,10	52,11	52,11	52,12	52,12	52,13	52,13	52,14	52,14
42	52,15	52,15	52,16	52,16	52,17	52,17	52,18	52,18	52,19	52,19
43	52,20	52,20	52,21	52,21	52,22	52,22	52,23	52,23	52,24	52,24
44	52,25	52,25	52,26	52,26	52,27	52,27	52,28	52,28	52,29	52,29

5.1.1.2. Oznaczanie zawartości sacharozy w miodzie pitnym

Zasada metody

Oznaczanie polega na:

- oznaczeniu ilości cukrów bezpośrednio redukujących w próbie metodą Lane - Eynona,
- oznaczeniu cukrów redukujących po inwersji metodą Lane - Eynona,
- obliczeniu różnicy w procentowej zawartości cukrów redukujących przed i po inwersji.

Wykonanie oznaczenia

Przeprowadzić hydrolizę kwasową (inwersję) w następujący sposób: do kolby miarowej o poj. 200 ml, w zależności od spodziewanej zawartości cukrów, pobrać 20 ml przesączu, uzupełnić wodą destylowaną do 80 ml i dodać 5 ml kwasu chlorowodorowego stężonego, włożyć termometr do kolby i wstawić ją do łaźni wodnej podgrzanej do temperatury 80-90°C. W ciągu 2-3 minut zawartość kolby doprowadzić do temp. 68-70°C i utrzymywać ją w tym przedziale przez 5 minut. Następnie kolbę szybko schłodzić do 20°C, roztwór zobojętnić wodorotlenkiem sodu wobec oranżu metylu (do barwy żółtej) i dopełnić wodą destylowaną do kreski.

Biuretę o pojemności 25 ml napęlnić roztworem miodu i wykonać oznaczenie tak jak przy oznaczaniu cukrów redukujących.

Obliczanie wyników oznaczenia

Zawartość sacharozy (S) (% w/w) obliczyć według wzoru:

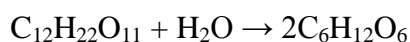
$$S = (a - b) \cdot 0,95$$

w którym:

a – zawartość cukrów redukujących w roztworze miodu poddanego inwersji,

b – zawartość cukrów redukujących w roztworze miodu nieinwertowanego,

0,95 – współczynnik przeliczeniowy na sacharozę wynikający z reakcji:



$$342 + 18 = 360$$

342 części wagowe dwucukru dają 360 części wagowych cukrów prostych

$$(342 / 360 = 0,95)$$

5.1.2. Oznaczanie zawartości cukrów w miodzie metodą HPLC – RID / NH₂

Zasada metody

Po przefiltrowaniu wodnego roztworu miodu, zawartość cukrów oznacza się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem refraktometrycznym (RI) zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz.U. 2009 nr 17 poz. 94 z późn. zm.). Piki identyfikuje się na podstawie ich czasów retencji. Oznaczenie ilościowe przeprowadza się wykorzystując powierzchnię pików zarejestrowanych dla standardu zewnętrznego.

Aparatura i sprzęt

- Chromatograf cieczowy z detektorem refraktometrycznym (RI);
- kolumna chromatograficzna ze stali nierdzewnej, śr. 4,6 mm, dł. 250 mm, z żelalem krzemionkowym modyfikowanym grupami aminowymi, rozmiar cząstek 5–7 µm;
- waga analityczna z dokładnością do 0,0001 g;
- łaźnia ultradźwiękowa;
- filtry strzykawkowe, 0,45 µm;
- kolby miarowe o pojemności 100 ml.

Odczynniki

- Metanol o stopniu czystości do HPLC;
- acetonitryl o stopniu czystości do HPLC;
- wzorce chromatograficzne glukozy, fruktozy i sacharozy.

Przygotowanie próby

Próbkę miodu o masie 5,0 g ± 0,001 g rozpuścić w 40 ml wody w zlewce. Do kolby miarowej o pojemności 100 ml odmierzyć 25 ml metanolu, przenieść ilościowo roztwór miodu i uzupełnić wodą do kreski. Roztwór miodu przesączyć przez filtr strzykawkowy w celu usunięcia wosków i steroli.

Warunki rozdziału chromatograficznego

- Faza ruchoma: acetonitryl:woda 80:20 v/v;
- przepływ fazy ruchomej – 1,3 ml /min.;

- temperatura 30°C lub pokojowa; ciśnienie – ok. 90 atm.

Wzorcowanie

Sporządzić mieszaninę roztworów cukrów: 2,0 g glukozy, 1,5 g fruktozy, 0,25 g sacharozy rozpuścić początkowo w około 40 ml wody w zlewce. Do kolby miarowej o pojemności 100 ml odmierzyć 25 ml metanolu, przenieść ilościowo roztwór cukrów i uzupełnić wodą do kreski. Mieszanina ma trwałość 6 miesięcy w temperaturze -18°C. Roztwór przesączyć przez filtr strzykawkowy. Ustawić stałą prędkość przepływu eluentu (acetonitryl:woda 80:20 v/v) – 1,3 ml/min. Ustabilizować warunki rozdzielania po zapewnieniu wypełnienia kanału odniesienia detektora RI aktualnie stosowanym eluentem (konieczne jest uzyskanie stabilnej linii podstawowej detektora – wahania wskazań na wyświetlaczu mniejsze od 0,2 jednostek względnych).

Po ustaleniu warunków oznaczania, nastrzyknać roztwór wzorcowy cukrów (10 µl). Zarejestrować chromatogramy oraz odczytać powierzchnię piku każdego wzorca.

Wykonanie oznaczenia

Wprowadzić do aparatu 10 µl roztworu miodu przygotowanego zgodnie z procedurą opisaną powyżej. Zarejestrować chromatogramy oraz odczytać powierzchnie wszystkich pików.

Opracowanie wyników

Procentowy udział cukru (W) w próbce obliczyć według wzoru:

$$W = \frac{A_1 \cdot V_1 \cdot m_1}{A_2 \cdot V_2 \cdot m_0} \cdot 100$$

w którym:

A_1 – powierzchnia piku określonego cukru w roztworze próby (mm²),

A_2 – powierzchnia piku określonego cukru w roztworze wzorcowym (mm²),

V_1 – całkowita objętość roztworu próby (ml),

V_2 – całkowita objętość roztworu wzorcowego (ml),

m_1 – naważka wzorca (g),

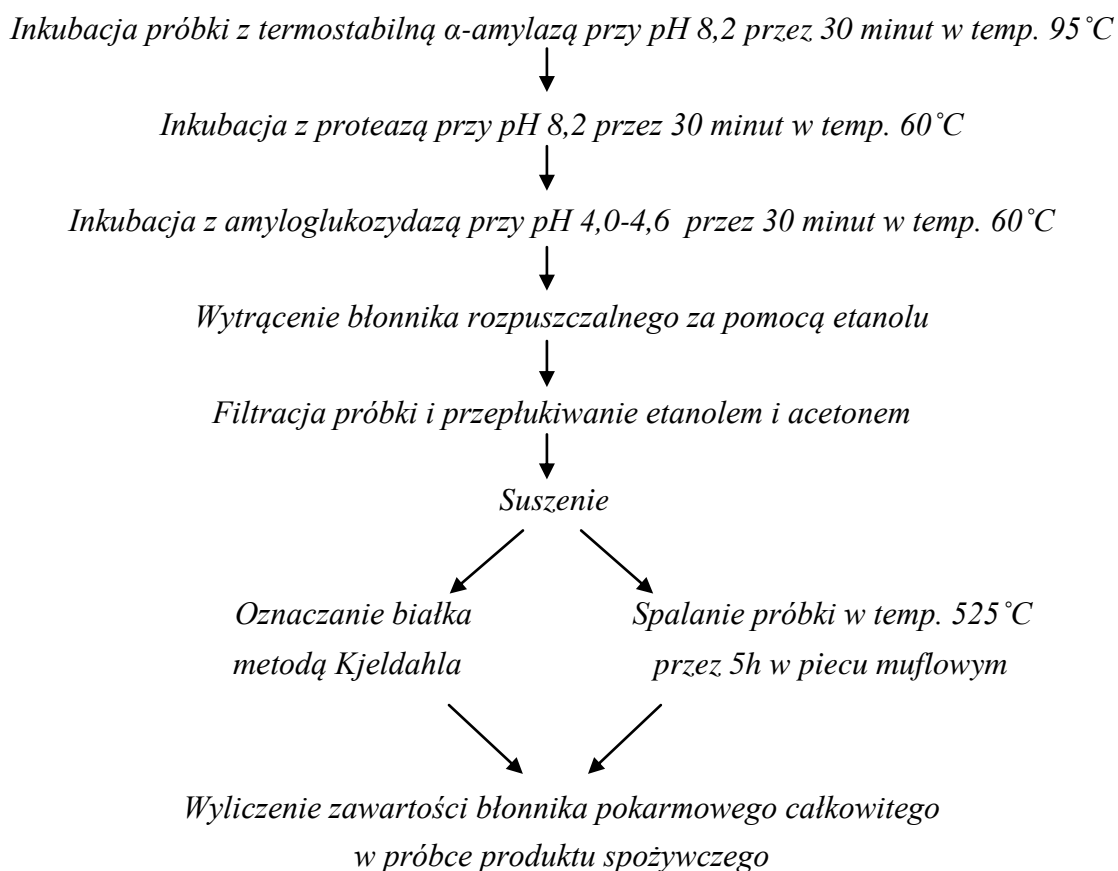
m_0 – naważka miodu (g).

5.2. Oznaczanie zawartości błonnika pokarmowego całkowitego w żywności metodą według AOAC 991.43

Błonnikiem pokarmowym nazywamy zespół substancji ścian komórkowych roślin, które nie są trawione przez enzymy trawienne człowieka. Jest to mieszanina substancji o charakterze polisacharydowym (celuloza, hemicelulozy, pektyny, gumy, śluzu) i niepolisacharydowym (ligniny).

Zasada metody

Metoda polega na enzymatycznym usunięciu białek i skrobi z wysuszonej do stałej masy próbki badanego produktu spożywczego za pomocą termostabilnej α -amylazy, proteazy i amyloglukozydazy oraz na wytrąceniu przy pomocy 95% etanolu rozpuszczalnej frakcji błonnika. Zawartość błonnika pokarmowego całkowitego oznaczana jest jako różnica pomiędzy masą suchej pozostałości po sączeniu, a masami zawartego w niej białka i popiołu.



Ryc. 5.1. Schemat oznaczania błonnika pokarmowego całkowitego w żywności.

Aparatura i sprzęt

- Tygle ze spiekami, P2;
- moduł filtracyjny Fibertec E;
- suszarka laboratoryjna;
- piec muflowy, 525°C;
- łaźnia wodna z wytrząsarką;
- waga analityczna z dokładnością do 0,0001 g;
- pH metr;
- eksykator;
- mieszadło magnetyczne;
- kolby do inkubacji.

Odczynniki

- Eter naftowy cz.d.a.;
- 95% etanol (v/v);
- 78% etanol:

roztwór przygotowany przez dodanie 207 ml wody destylowanej w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml i dopełnienie jej do kreski etanolem 95%;

- aceton cz.d.a.;

- roztwór buforu MES-TRIS:

rozpuścić 9,76 g MES i 6,1 g TRIS w 850 ml wody. Doprowadzić pH do 8,2 (w temp. 24°C) 6 N NaOH (30 g NaOH rozpuścić w 100 ml wody) i dopełnić wodą do 1000 ml. Przechowywać w szczelnej butelce w temp. pokojowej;

- α -amylaza termostabilna;

- proteaza: 50 mg proteazy rozpuścić w 1 ml buforu fosforanowego o pH 6,0;

- amyloglukozydaza;

- kwas chlorowodorowy 0,561 mol/l:

dodać 93,5 ml 6 M HCl do ok. 700 ml wody, dopełnić wodą do 1000 ml. Przechowywać w szczelnym naczyniu w temperaturze pokojowej.

- celit 545.

Przygotowanie próbki

Jeżeli próbka zawiera więcej niż 10% tłuszczu, należy ją odłuścić eterem naftowym. Zanotować straty wagi tłuszczu do korekty końcowej zawartości błonnika pokarmowego.

Jeżeli zachodzi potrzeba to badane próbki zhomogenizować, a następnie suszyć przez 24 godziny w temp. 105°C (70°C w próżni). Próbki ostudzić w eksykatorze i rozdrobnić do 0,3–0,5 mm. Próbki przechowywać w eksykatorze do momentu analizy. Na dno kolby do inkubacji odważyć $1\text{g} \pm 0,001\text{ g}$ próby w dwóch powtórzeniach.

Wykonanie oznaczenia

Tygle porcelanowe ogrzewać przez 3 godziny w temp. 535°C i ostudzić. Następnie przepłukać wodą i suszyć w temp. pokojowej. Na każdy lejek wsypać 0,5g celitu i suszyć w 130°C do stałej masy (1 godzinę lub więcej). Po ostudzeniu w eksykatorze lejki zważyć z dokładnością do 0,0001 g i wartość tą zanotować jako „celit + masa lejka”. Lejki z celitem przechowywać w eksykatorze do momentu użycia.

Do każdej kolby z próbą wlać 40 ml buforu MES-TRIS, pH 8,2. Wymieszać na mieszadle magnetycznym do uzyskania jednorodnej zawiesiny. Dodać 50 µl alfa-amylazy, zakryć folią aluminiową i inkubować w temperaturze 95-100°C w łaźni wodnej przez 30 min. Po wyjęciu z łaźni kolby ostudzić do 60°C. Za pomocą gumowej szpatułki zdrapać fragmenty próbki ze ścianek kolby oraz rozprowadzić osad na dnie kolby, szpatułkę i ścianki kolby opłukać 10 ml wody. Dodać 100 µl proteazy, inkubować 30 min. w 60°C na łaźni z wytrząsarką. Po tym czasie do każdej kolby dodać 5 ml 0,561 M HCl i doprowadzić do pH 4,0–4,6 w 60°C dodając roztwór 1M NaOH lub 1M HCl. Dodać 200 µl amyloglukozydazy ciągle mieszając. Przykryć folią aluminiową i inkubować przez 30 min. w 60°C na łaźni z wytrząsaniem.

Do każdej próby dodać 225 ml 95% etanolu o temperaturze 60°C i pozostawić do wytrącenia błonnika rozpuszczalnego przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej.

Za pomocą 15 ml 78% etanolu z tryskawki zwilżyć i wyrównać warstwę celitu w tyglach na pompce próżniowej w module filtracyjnym Fibertec E. Umieścić tygle oraz kolby inkubacyjne w module filtracyjnym i przefiltrować roztwór przez tygle. Kolby przemywać dwukrotnie 15 ml 78% etanolu i dwukrotnie 15 ml 95% etanolu. Przenieść tygle do górnej części modułu i używając pompki próżniowej przepłukać dwukrotnie 15 ml acetonu. Tygle suszyć przez noc w temperaturze 105°C.

Po wystudzeniu w eksykatorze, próbki zważyć z dokładnością do 0,0001 g i zapisać masę jako: „pozostałość po sączeniu + celit + masa lejka”. Masę pozostałości po sączeniu (R) (mg) obliczyć według wzoru:

$$R = (\text{pozostałość} + \text{celit} + \text{masa lejka}) - (\text{celit} + \text{masa lejka})$$

Następnie w jednej próbce oznaczyć zawartość białka metodą Kjeldahla, a drugą spalać w piecu mufowym o temperaturze 525°C przez 5h. Po ochłodzeniu pieca, próbkę ostudzić w eksykatorze i zważyć z dokładnością do 0,0001 g, a masę zapisać jako: „popiół + celit + masa lejka”. Masę popiołu (P) (mg) obliczyć ze wzoru:

$$P = (\text{popiół} + \text{celit} + \text{masa lejka}) - (\text{celit} + \text{masa lejka})$$

Należy również oznaczyć próby odczynnikowe w sposób ściśle odpowiadający metodzie oznaczania błonnika w próbach badanych.

Obliczenie wyniku:

Zawartość błonnika pokarmowego całkowitego (X) w g/100g w badanym produkcie spożywczym obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{R - A - P - B}{m} \cdot 100$$

w którym:

R - masa pozostałości po sączeniu (mg),

P - masa popiołu w próbce (mg),

A - masa białka w próbce (mg),

B - masa próby odczynnikowej (mg),

m - masa próbki (mg).

Literatura:

1. AOAC Association of Official Analytical Chemists International. Official method 991.43. Total, soluble and insoluble fiber in foods enzymatic – gravimetric method, Mes-Tris Buffer. 2006.
2. Codex Alimentarius Commission. Revised Codex Standard for Honey. Codex Standard 12-1981. FAO and WHO, Rome, 2001.
3. Kamiński M. (red.) praca zbiorowa: Chromatografia cieczowa, CEEM, Gdańsk, 2004.
4. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003 r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu (Dz. U. 2003, nr 181 poz. 1773, z późn. zm.: Dz.U. 2010, nr 165 poz. 1120).
5. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz. U. 2009, nr 17 poz. 94).
6. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 21 maja 2013 r. w sprawie szczegółowego sposobu wyrobu fermentowanych napojów winiarskich oraz metod analiz tych napojów do celów urzędowej kontroli w zakresie jakości handlowej (Dz.U. 2013 nr 0 poz. 624).
7. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 22 maja 2013 r. w sprawie rodzajów fermentowanych napojów winiarskich oraz szczegółowych wymagań organoleptycznych, fizycznych i chemicznych, jakie powinny spełniać te napoje (Dz.U. 2013 nr 0 poz. 633).

6. OCENA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA TŁUSZCZÓW JADALNYCH

6.1. Ilościowe oznaczanie tłuszczów

Do oznaczania całkowitej ilości tłuszczu w produktach spożywczych można zastosować następujące metody:

- ekstrakcyjno-wagowe;
- ekstrakcyjno-refraktometryczne;
- objętościowe (butyrometryczne);
- ekstrakcyjno-densytometryczne (oparte na pomiarze gęstości tłuszczu);
- chromatograficzne: HPLC, GC.

6.1.1. Oznaczanie zawartości tłuszczu w mleku metodą Gerbera

Zasada metody

Oznaczenie polega na wydzieleniu tłuszczu z mleka i zmierzeniu jego objętości. Wynik odczytuje się na skali butyrometru (1 stopień podziałki = 1% tłuszczu).

Mleko jest emulsją o/w, w której tłuszcz występuje w postaci drobnych kuleczek otoczonych ochronną warstwą białka, zabezpieczającą przed połączeniem się tych kuleczek. Wydzielenie i ułatwienie połączenia się kuleczek tłuszczu uzyskuje się za pomocą kwasu siarkowego ($d=1,815 - 1,825$). Kwas siarkowy powoduje wydzielenie się z kazeinianu wapnia kazeinogenu. Następnie wolny kazeinogen przeprowadza się w sól rozpuszczalną. Alkohol amyłowy rozpuszcza wydzielony tłuszcz i ułatwia uwolnienie go od białka wstępując jednocześnie w reakcję z kwasem siarkowym. Rozpuszczony w alkoholu tłuszcz wydziela się w postaci wyraźnej, prześwieczonej.

Metoda ma głównie zastosowanie do oznaczania zawartości tłuszczu w mleku, ale także w mięsie i serach. Zaletą tej metody jest szybkość i prostota wykonania; wadą – mniejsza dokładność (0,3-3,0% błąd oznaczenia). Najczęstsze przyczyny błędów metody to: złe wycechowanie tłuszczomierza, niedostateczne jego odtłuszczenie i korków, stosowanie nieodpowiedniej temperatury odczytu i wirowania.

Aparatura i sprzęt

- Wirówka Gerbera;
- butyrometry różnego typu (w zależności od badanego produktu i zawartości w nim tłuszczu).

Odczynniki

- Alkohol amyłowy cz.d.a.;
- kwas siarkowy (VI) – roztwór o niżej podanym stężeniu dla różnych produktów spożywczych, $d = 1,82 - 1,825$:

do 11 ml wody destylowanej dodać porcjami, ciągle mieszając, 100 g kwasu siarkowego (VI) stęż. o $d = 1,84$.

Tabela 6.1. Parametry oznaczania tłuszczów w produktach spożywczych metodą Gerbera.

Produkt	Ilość próbki	H ₂ SO ₄ (objętość i gęstość)
mleko	11,0 ml	10 ml $d = 1,815 - 1,825$
mleko odtłuszczone	22,0 ml	20 ml $d = 1,815 - 1,825$
mleko w proszku	2,9 g	10 ml $d = 1,815$
śmietana	5,0 ml	10 ml $d = 1,815 - 1,825$
sery i twarogi	3,0 g	15 ml $d = 1,530$ po rozpuszczeniu białka i dodaniu alkoholu amyłowego uzupełnić do górnej kreski skali
masło	5,0 g	kwas w takiej ilości, aby próba była pokryta kwasem $d = 1,525 - 1,530$
mięso, konserwy, wędliny	5,0 g	15 ml $d = 1,830$

Wykonanie oznaczenia

Do butyrometru odmierzyć określoną ilość H₂SO₄ (np. dla mleka 10 ml, $d = 1,815 - 1,825$) i dodać ostrożnie wlewając po ściankach produkt płynny, np. mleko (11 ml) – tak aby produkt nie zmieszał się z kwasem i 1 ml alkoholu amyłowego. Trzymając butyrometr za szyjkę przez ściereczkę należy wkręcać gumowy, osuszony korek. Po zakorkowaniu, butyrometr łagodnie wstrząsać (w rękawicach ochronnych) aż do zupełnego rozpuszczenia sernika i uwolnienia tłuszczu. Gdy to konieczne, dodać proporcjonalnie zmniejszoną ilość odczynników, w celu wypełnienia butyrometru do skali (np. na 1 ml kwasu siarkowego – 0,1 ml alkoholu amyłowego). Jeżeli butyrometry ostygły przed rozpuszczeniem się białka, to należy je podgrzać do temperatury 70°C (przez czas ściśle potrzebny do rozpuszczenia białka). Następnie butyrometry ułożyć po

dwa naprzeciwko siebie w wirówce Gerbera w specjalnej tulejce skalą do osi wirówki. Wirować 5 minut przy 1000 obrotów na minutę. Na skali butyrometru odczytać procentową zawartość tłuszczu w produkcie.

Jeżeli cieczy w tłuszczomierzu jest za mało i cały tłuszcz nie daje się wprowadzić do skalowanej części butyrometru, a regulowanie korkiem nie daje rezultatów, to należy: dodać niewielką ilość roztworu kwasu siarkowego i kilka kropel alkoholu amyłowego, wytrzeć szyjkę butyrometru, zakorkować czystym korkiem, wytrząsać i ponownie odwirować.

Odczytując wynik oznaczenia procentowej zawartości tłuszczu w mleku, produktach mlecznych i wyrobach garmażeryjnych bierzemy pod uwagę menisk dolny warstwy tłuszczowej, ale w mleku odtłuszczonym odczytuje się procent tłuszczu według menisku górnego.

6.2. Analiza jakościowa tłuszczów

Tłuszcze są produktami nietrwałymi, ulegają pod działaniem światła, powietrza, wilgoci, temperatury, drobnoustrojów, enzymów daleko idącym zmianom w składzie chemicznym – określanym jęłczeniem. Zmiany te wpływają na organoleptyczne cechy tłuszczów i obniżenie ich wartości odżywczej – zniszczeniu ulegają NNKT, następują straty witamin A, E.

Najważniejsze procesy chemiczne zachodzące podczas jęłczenia to hydroliza i utlenianie – autooksydacja.

Hydroliza:

Pod wpływem wody, a następnie światła, powietrza oraz lipazy, znajdującej się w tkankach zwierzęcych i roślinnych, następuje hydroliza, czyli rozpad na wolne kwasy tłuszczowe i glicerynę. Tłuszcz w tym okresie jęłczenia charakteryzuje się wysoką kwasowością.

Autooksydacja:

Zachodzi pod wpływem tlenu z powietrza, światła i temperatury, bierze w niej udział lipooksydaza. Utlenianie raz zapoczątkowane przebiega samorzutnie dalej, stąd nazwa – autooksydacja. Jest to reakcja łańcuchowa, którą przyspiesza energia świetlna i cieplna oraz śladowe ilości niektórych metali (np. Cu, Fe).

Podczas utleniania tłuszczów w I etapie powstają nadtlenki i hydronadtlenki, które są nietrwałe – szybko ulegają dalszym przemianom. Przemiany te są wielokierunkowe – powstają aldehydy, ketony, związki epoksydowe, wolne kwasy tłuszczowe krótkołańcuchowe i nadtlenki tych kwasów.

Zależnie od charakteru utworzonych związków rozróżnia się jęłczenie aldehydowe lub ketonowe. Aldehydowemu ulegają kwasy tłuszczowe nienasycone, a ketonowemu – nasycone.

6.2.1. Oznaczenie stopnia kwasowości tłuszczu

Zasada metody

Stopień kwasowości jest to liczba ml 1 mol/l wodorotlenku sodu, potrzebna do zobojętnienia wolnych kwasów tłuszczowych zawartych w 100 g tłuszczu lub oleju.

Liczba kwasowa jest to ilość mg wodorotlenku sodu potrzebna do zobojętnienia wolnych kwasów tłuszczowych w 1 g tłuszczu lub oleju.

W tłuszczach świeżych norma wynosi do 5°, jednak do oceny świeżości i jakości tłuszczów należy wziąć pod uwagę, poza kwasowością, wyniki oznaczenia występowania dalszych produktów przemian związanych z jełczeniem.

Odczynniki

- Wodorotlenek sodu, 0,1 mol/l;
- fenoloftaleina, 1% w alkoholu etylowym 95%;
- mieszanina etanolowo-eterowa (1:1 v/v), zobojętniona wobec fenoloftaleiny.

Wykonanie oznaczenia

5g tłuszczu po uprzednim stopieniu lub oleju, odważonego z dokładnością do 0,01g w kolbie stożkowej, rozpuścić w 25 ml zobojętnionej mieszaniny równych objętości etanolu i eteru (dodawać szklaną pipetą lub cylindrem) i miareczkować 0,1 mol/l wodorotlenkiem sodu/potasu wobec fenoloftaleiny. Liczba ml zużytego wodorotlenku sodu/potasu pomnożona przez 2 daje wynik wyrażony w stopniach kwasowości.

Stopień kwasowości podzielony przez 1,78 daje liczbę kwasową. Liczba kwasowa dzielona przez 0,56 daje stopień kwasowości. Stosunek ten wynika z definicji obu tych wartości.

Kwasowość wyrażoną w procentach podaje się w przeliczeniu na kwas olejowy. W tym celu należy liczbę stopni kwasowości pomnożyć przez 0,2832. Współczynnik ten wynika z masy cząsteczkowej kwasu olejowego wynoszącej 283,2.

6.2.2. Oznaczanie zawartości nadtlenków

W trakcie jęlczenia tłuszczu wytwarzają się nadtlenki kwasów tłuszczowych. Ilościowe określenie zawartości nadtlenków wykorzystywane jest do ustalenia stopnia zepsucia tłuszczów. Miarą zawartości nadtlenków jest liczba Lea. Jest to liczba ml 0,001 mol/l roztworu $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ użytego do zmiareczkowania jodu wydzielonego z KJ w wyniku działania nadtlenków zawartych w 1g tłuszczu lub oleju.

W Polsce przyjęto za normę: dla oliwy 8-12 ml 0,001 mol/l tio(II)siarczanu(VI) sodu na 1g oleju, dla innych olejów i tłuszczów 3-5 ml, a dla smalcu nie więcej niż 3 ml.

Zasada metody

W obecności nadtlenków w kwaśnym środowisku, z jodku potasu uwalnia się wolny jod, w ilości równoważnej do ilości nadtlenków.

Odczynniki

- Chloroform, cz.d.a.;
- kwas octowy lodowaty, cz.d.a.;
- jodek potasu, krystaliczny, cz.d.a.;
- tio(II)siarczan (VI) sodu, 0,01 mol/l;
- skrobia, 1%.

Wykonanie oznaczenia

Odważyć 1 g próbki tłuszczu z dokładnością do 0,001 g, w kolbie stożkowej o pojemności min. 250 ml z doszlifowanym korkiem i rozpuścić w 20 ml mieszaniny złożonej z lodowatego kwasu octowego i chloroformu (3:2 v/v). Jeżeli tłuszcz jest stały – topi się go przed rozpuszczeniem w temperaturze nie wyższej niż 50°C. Następnie dodać z pipety 1 ml roztworu nasyconego, świeżo przygotowanego jodku potasu. Kolbę zamknąć i wytrząsać dokładnie w ciągu 1 minuty. Następnie dodać 30 ml wody destylowanej oraz 5 kropli 1% roztworu skrobi i zmiareczkować niezwłocznie 0,001 mol/l roztworem tio(II)siarczanu(VI) sodu aż do odbarwienia trwającego co najmniej pół minuty.

Równocześnie wykonuje się próbę kontrolną, w której zużycie tio(II)siarczanu(VI) sodu nie może przekraczać 0,5 ml.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Liczbę Lea (X) obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{a - b}{m} \times 10$$

w którym:

a – ilość 0,01 mol/l tio(II)siarczanu(VI) sodu zużyta do miareczkowania próby właściwej (ml),

b – ilość 0,01 mol/l tio(II)siarczanu(VI) sodu zużyta do miareczkowania próby ślepej (ml),

m – masa odważki (g).

6.2.3. Próba Kreisa na zawartość aldehydu epihydrinowego

Zasada metody

Podczas jęlczenia tłuszczów o dużej zawartości nienasyconych kwasów tłuszczowych, np. kwasu olejowego, linolowego, linolenowego, powstają jako produkty rozkładu aldehydy, a zwłaszcza aldehyd epihydrinowy, który w zjęlczalym tłuszczu występuje w postaci acetylowej.

Zasada próby Kreisa polega na przeprowadzeniu aldehydu epihydrinowego z formy acetylowej w stan wolny przy pomocy stężonego kwasu chlorowodorowego. Czysty aldehyd epihydrinowy reaguje z fluoroglucyną (powstaje zabarwienie krwistoczerwone) lub z rezorcyną (zabarcwienie fioletowe).

Odczynniki

- Kwas chlorowodorowy, stężony (d=1,19);
- fluoroglucyna 0,1% w eterze lub rezorcyna 0,15% w benzenie.

Wykonanie oznaczenia

2 ml oleju lub stopionego i przesączonego tłuszczu miesza się w probówce z doszlifowanym korkiem z 2 ml stężonego kwasu chlorowodorowego i silnie wstrząsa w ciągu minuty. Następnie dodaje się 2 ml 0,1% fluoroglucyny w eterze lub 0,15% rezorcyny w benzenie, wstrząsa silnie i pozostawia do rozdzielenia obu warstw. Czerwone zabarcwienie warstwy kwasowej w przypadku fluoroglucyny lub fioletowe w przypadku rezorcyny wskazuje na zepsucie tłuszczu lub oleju.

6.2.4. Próba z kwasem 2-tiobarbiturowym na obecność aldehydu malonowego

Zasada metody

Jednym z produktów powstających podczas jęlczenia tłuszczów jest aldehyd malonowy, który daje reakcję barwną (zabarwienie różowe) z kwasem 2-tiobarbiturowym. W miarę postępującego procesu jęlczenia i pogarszania się właściwości organoleptycznych tłuszczu, podwyższa się absorbancja badanego destylatu.

Reakcja z kwasem 2-tiobarbiturowym jest reakcją niespecyficzną, gdyż cały szereg aminokwasów ulega pod wpływem tzw. zimnej sterylizacji (działanie promieni jonizujących) rozpadowi do aldehydu malonowego, dającego reakcję barwną z kwasem 2-tiobarbiturowym. Z kwasem tym podobnie reaguje sulfoguanidyna.

Aparatura i sprzęt

- Spektrofotometr UV/VIS.

Odczynniki

- Kwas chlorowodorowy, 3 mol/l;
- kwas ortofosforowy (V), stęż. 85%;
- wodorotlenek sodu, 3 mol/l;
- kwas 2-tiobarbiturowy:

0,5g kwasu 2-tiobarbiturowego rozpuścić w 25 ml wody destylowanej o temperaturze 40°C z dodatkiem 1 ml 3 mol/l wodorotlenku sodu. Po ochłodzeniu dodać 0,2 ml 3 mol/l kwasu chlorowodorowego i roztwór dopełnić wodą destylowaną do 50ml.

Wykonanie oznaczenia

5g oleju lub tłuszczu umieścić w kolbie aparatu destylacyjnego, dodać 100 ml wody i 5 ml 3 mol/l kwasu chlorowodorowego. Oddestylować około 25 ml destylatu i do 20 ml destylatu dodać 1 ml roztworu kwasu 2-tiobarbiturowego i 1 ml stężonego kwasu ortofosforowego (V) i umieścić na wrzącej łaźni wodnej na okres 35 minut. Jednocześnie przeprowadzić próbę kontrolną z 20 ml wody destylowanej, do której należy dodać 1 ml roztworu kwasu 2-tiobarbiturowego i 1 ml stężonego kwasu ortofosforowego (V). Po ochłodzeniu próby przeprowadzić pomiar absorbancji powstałego zabarwienia na spektrofotometrze przy długości fali 530 nm. Wyniki podać w jednostkach absorbancji, badając zawsze w warstwie roztworu o tej samej grubości.

6.2.5. Wykrywanie jęlczenia ketonowego próba Taufla i Thalera

W wyniku jęlczenia ketonowego powstają z nasyconych kwasów tłuszczowych metyloketony.

Odczynniki

- Aldehyd salicylowy, t.w. 196 °C;
- kwas siarkowy (VI), d 1,84.

Wykonanie oznaczenia

Do 10 ml stopionego tłuszczu umieszczonego w probówce dodać 4 ml ciepłej wody destylowanej i 0,4 ml aldehydu salicylowego, mocno wstrząsnąć, po czym na środek mieszaniny wlać 2 ml stężonego kwasu siarkowego (VI), uważając aby nie zwilżyć nim ścianek probówki. Nie mieszając zawartości, probówkę umieścić we wrzącej łaźni wodnej. Po 10-15 minutach warstwy rozdzielają się i w obecności metyloketonów barwa górnej warstwy (różowokarminowa) staje się intensywniejsza. Równolegle wykonać próbę kontrolną.

W ocenie masła i margaryny należy zwrócić uwagę na to, czy badany tłuszcz nie zawiera diacetylu. Diacetyl jest związkiem odpowiedzialnym za charakterystyczny zapach masła i powstaje podczas dojrzewania masła pod działaniem szczepów niektórych bakterii powodujących powstanie kwasu mlekowego z obecnego w maśle kwasu cytrynowego. Aldehyd salicylowy daje z diacetylem podobne zabarwienie. W celu usunięcia diacetylu należy badaną próbę nieco podgrzać.

6.2.6. Badanie tłuszczu w świetle ultrafioletowym

Świeżo przekrojony kawałek badanego tłuszczu oglądać w świetle promieni ultrafioletowych lampy kwarcowej. Masło charakteryzuje luminescencja kanarkowożółta, margarynę – białoszarawa, tłuszcz kakaowy – fioletowa.

Zewnętrzne warstwy masła owiniętego w papier pergaminowy mają w świetle lampy kwarcowej odcień fioletowy, pochodzący od śladów parafiny, dlatego miarodajna jest barwa warstw wewnętrznych, nie stykających się z papierem.

7. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI KWASU ASKORBOWEGO I DEHYDROASKORBOWEGO

7.1. Oznaczanie zawartości kwasu askorbowego w przetworach owocowych i warzywnych metodą Tillmansa

Aparatura i sprzęt

- Waga analityczna o dokładności 0,0001 g;
- homogenizator;
- kolby miarowe o pojemności 100 ml, 1000 ml;
- kolby stożkowe z doszlifowanym korkiem o pojemności 100 ml;
- lejki szklane;
- biurety, pipety 1,2,5,10,25 ml;
- sączi bibułowe.

Odczynniki

- Roztwór ekstrakcyjny kwasu szczawiowego ($H_2C_2O_4$) 2% w/v;
- roztwór 2,6-dichloroindofenolu:

210 mg wodorowęglanu sodu ($NaHCO_3$) rozpuścić w kolbie stożkowej w około 600 ml wody destylowanej o temperaturze 50-60°C i następnie dodać 250 mg 2,6-dichloroindofenolu. Po ochłodzeniu roztwór wymieszać, przenieść do kolby miarowej pojemności 1000 ml, uzupełnić do kreski zimną wodą destylowaną. Roztwór pozostawić na 24 h w ciemnym miejscu, następnie wymieszać dokładnie i przesączyć przez karbowany sącze z bibuły do butli z ciemnego szkła z doszlifowanym korkiem (barwnik trudno rozpuszcza się w wodzie i jego część pozostaje na sączku). Roztwór przechowywać w temperaturze około 5°C i oznaczać jego miano co 2 tygodnie;

- wodorowęglan sodu $NaHCO_3$;
- tio(II)siarczan(VI) sodu, 0,1 mol/l;
- jodek potasu, KJ;
- kwas siarkowy (VI), 2 mol/l;
- skrobia rozpuszczalna, 1% w/v;
- kwas L-askorbowy, $C_6H_8O_6$:

roztwór sporządzony przez rozpuszczenie 88,0 mg kwasu L-askorbowego (odważonego z dokładnością 0,0002 g) w 2% w/v roztworze kwasu szczawiowego

w kolbie miarowej pojemności 100 ml i uzupełnienie do kreski roztworem 2% kwasu szczawowego;

- jod, 0,01 mol/l.

Ustalanie miana roztworu jodu

Do kolby stożkowej o pojemności 100 ml odmierzyć 25 ml roztworu jodu, dodać 3 krople skrobi, a następnie miareczkować 0,1 mol/l roztworem tiosiarczanu sodu.

Miano roztworu jodu obliczyć według wzoru:

$$n = \frac{0,1 \cdot b}{25}$$

gdzie:

b – objętość roztworu tiosiarczanu sodu zużytego do miareczkowania (ml).

Ustalanie miana kwasu L-askorbowego

Przed użyciem roztworu kwasu L-askorbowego o stężeniu 88 mg/100 ml, sprawdzić zawartość tego kwasu w przygotowanym roztworze. Odmierzyć pipetą 10 ml roztworu kwasu L-askorbowego i miareczkować 0,01 molowym roztworem jodu wobec skrobi jako wskaźnika. Miareczkowanie powtórzyć co najmniej trzykrotnie.

Zawartość kwasu L-askorbowego (KA) w 1 ml zmiareczkowanego roztworu obliczyć w mg według wzoru:

$$KA = \frac{a \cdot n \cdot 88}{10}$$

w którym:

a – objętość roztworu jodu zużytego do miareczkowania (ml),

n – miano roztworu jodu,

88 – ilość kwasu L-askorbowego odpowiadająca 1 ml 1 mol/l roztworu jodu (mg).

Ustalanie miana barwnika 2,6-dichloroindofenolu

Po ustaleniu zawartości kwasu L-askorbowego w 1 ml roztworu tego kwasu przystąpić do określenia miana barwnika 2,6-dichloroindofenolu. W tym celu odmierzyć 5 ml roztworu kwasu L-askorbowego do kolby miarowej pojemności 100 ml i dopełnić roztworem kwasu szczawowego do kreski, z tak przygotowanego roztworu pobrać 10 ml do kolbki stożkowej pojemności 100 ml i miareczkować roztworem 2,6-dichloroindofenolu do wystąpienia jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się

10 sekund. Miareczkowanie powtórzyć 3-4 razy, przy czym różnica w objętości zużytego barwnika nie powinna przekraczać 0,05 ml.

Miano roztworu 2,6-dichloroindofenolu (m') względem kwasu L-askorbowego, czyli liczbę miligramów kwasu L-askorbowego reagującego z 1 ml barwnika obliczyć według wzoru:

$$m' = \frac{0,5 \cdot KA}{d}$$

w którym:

0,5 – ilość nierozcieńzonego roztworu kwasu L-askorbowego znajdująca się w 10 ml roztworu pobranego do miareczkowania (ml),

KA – zawartość kwasu L-askorbowego w 1 ml (mg),

d – objętość roztworu barwnika zużytego do miareczkowania (ml).

Przygotowanie próbek

Stężenie kwasu askorbowego w roztworze przygotowanym do oznaczeń powinno wynosić 0,1 – 1,0 mg/ml. Metoda bezpośredniego miareczkowania próbki roztworem 2,6-dichloroindofenolu przeznaczona jest dla produktów bezbarwnych lub słabo zabarwionych. Próby barwne należy uprzednio odbarwić węglem aktywnym.

a) *Produkty płynne i przecierowe* dokładnie wymieszać, odważyć 10 g \pm 0,01g, do kolby miarowej o poj. 100 ml i uzupełnić roztworem kwasu szczawiowego do kreski. Wymieszać i pozostawić w ciemnym miejscu w celu odstania się osadu. Liczbę ml roztworu pobieranego do oznaczeń uzależnić od przypuszczalnej zawartości witaminy C:

- w przypadku produktów zawierających 30-40 mg witaminy C w 100 g, do oznaczeń pobrać 5 ml płynu nad osadu;
- w przypadku produktów zawierających poniżej 30 mg witaminy C w 100 g, do oznaczeń pobrać 10 ml płynu nad osadu;
- w przypadku produktów zawierających powyżej 40 mg witaminy C w 100 g, do oznaczeń pobrać 1 - 4 ml płynu nad osadu

b) *Produkty o konsystencji gęstej*. Z wymieszanej próbki produktu odważyć 10 g \pm 0,01g. Przenieść ilościowo do moździerza porcelanowego za pomocą 20 ml roztworu kwasu szczawiowego. Próbkę szybko rozdrobnić przez ucieranie, a następnie popłukując roztworem kwasu szczawiowego przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml. Zawartość kolby uzupełnić do kreski

roztworem kwasu szczawiowego, wymieszać i pozostawić w ciemnym miejscu na 15 minut. Po tym czasie zawartość kolby przesączyć przez karbowany sącdek do kolby stożkowej, odrzucając kilka ml roztworu. Liczbę ml roztworu pobieranego do oznaczania ustalić według pkt. a)

- c) *Produkty mrożone* bez części stałych – nasion, pestek, części zdrewniałych, pokrojone jeżeli to możliwe w kawałki, wrzucać do roztworu 2% w/v kwasu szczawiowego i natychmiast homogenizować. Homogenizat przenieść ilościowo do kolby miarowej pojemności 100 ml za pomocą kwasu szczawiowego i dalej postępować według pkt. b)

7.1.1. Oznaczanie zawartości kwasu askorbowego

Zasada metody

Metoda polega na utlenieniu w środowisku kwaśnym kwasu L-askorbowego do dehydroaskorbowego za pomocą niebieskiego barwnika 2,6-dichloroindofenolu. Barwnik redukuje się do formy leuko (bezbarwnej) i w pH 4,2 barwi się na czerwono – reakcja przebiega ilościowo.

Wykonanie oznaczenia

10 ml rozcieńczonej próby miareczkowanie roztworem 2,6-dichloroindofenolu do wystąpienia jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się 10 sekund. Miareczkowanie powtórzyć trzykrotnie.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Zawartość kwasu L-askorbowego X wyrażoną w mg na 100 g produktu obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{(V_1 - V_0) \cdot m' \cdot 100}{m \cdot V_2}$$

w którym:

V_1 – objętość roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużytego do miareczkowania roztworu badanego (ml),

V_0 - objętość roztworu 2,6-dichloroindofenolu do miareczkowania próby zerowej (ml),

m' - miano 2,6-dichloroindofenolu względem kwasu L-askorbowego,

V_2 – objętość badanego roztworu pobranego do miareczkowania (ml),

m – masa próbki produktu w 1 ml badanego roztworu (g).

7.1.2. Oznaczanie sumy kwasu askorbowego i dehydroaskorbowego

Zasada metody

Metoda polega na redukcji siarkowodorem (jego nadmiar jest strącany chlorkiem rtęci) kwasu dehydroaskorbowego do kwasu L-askorbowego i oznaczeniu ich zawartości w produkcie za pomocą miareczkowania roztworem 2,6-dichloroindofenolu.

Odczynniki

- Chlorek rtęci (II) 1 mol/l:

rozpuścić 27,15 g HgCl_2 w 96% (v/v) alkoholu etylowym, w kolbie miarowej pojemności 100 ml i uzupełnić do kreski 96% (v/v) alkoholem etylowym;

- 2,6-dichloroindofenol przygotowany j/w;

- kwas siarkowy (VI), 2 mol/l;

- siarczek disodu, $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 1 mol/l:

Odważyć 30 g siarczku disodu w zlewce pojemności 150 ml, rozpuścić na gorąco w 70 ml wody destylowanej, roztwór ochłodzić, przenieść do kolby miarowej pojemności 100 ml i uzupełnić wodą do kreski. Oznaczyć miano roztworu za pomocą roztworu kwasu chlorowodorowego 0,5 mol/l wobec oranżu metylowego. Na 1 objętość roztworu siarczku disodu użyć 3,6 objętości 0,5 mol/l roztworu kwasu chlorowodorowego.

Wykonanie oznaczenia

Do kolby stożkowej pojemności 50-100 ml z doszlifowanym korkiem odmierzyć pipetą 10 ml roztworu przygotowanego według punktu a), dodać 3,5 ml kwasu siarkowego (VI) 1 mol/l i po wymieszaniu 1,75 ml 1 mol/l roztworu siarczku disodu. Dokładnie wymieszać i pozostawić na 10 minut. Po tym czasie dodać 2,5 ml roztworu chlorku rtęci (II) 1 mol/l, wymieszać i uzupełnić wodą destylowaną do 40 ml. Zawartość dokładnie wymieszać i przesączyć przez karbowany sączek z bibuły. Roztwór powinien być klarowny. Do oznaczeń pobrać 5 ml przesączu i oznaczyć jak przy ustalaniu miana kwasu L-askorbowego – miareczkowanie roztworem 2,6-dichloroindofenolu do wystąpienia jasnoróżowego zabarwienia utrzymującego się 10 sekund. Powtórzyć 3 krotnie.

Obliczanie wyniku oznaczenia: j/w.

7.2. Oznaczenie zawartości witaminy C w sokach owocowych metoda wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC

Zasada metody

Metoda polega na oznaczeniu łącznej zawartości kwasów L-askorbowego i dehydroaskorbowego techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV. Kwas dehydroaskorbowy jest redukowany do kwasu L-askorbowego za pomocą DTT (ditiotreitolu).

Odczynniki

- 1,4-ditio-DL-treitol (DTT);
- woda ultra pure;
- heksacyjanożelazian (II) potasu, $K_4[Fe(CN)_6] \times 3H_2O$;
- heptahydrat siarczanu (VI) cynku (II), $ZnSO_4 \times 7H_2O$;
- roztwór Carreza I:
odważyć 3,76 g trihydratu heksacyjanożelazianu (II) potasu i rozpuścić w wodzie ultra pure w kolbie miarowej pojemności 100 ml i dopełnić wodą do kreski.
- roztwór Carreza II:
7,2 g heptahydratu siarczanu (VI) cynku (II) rozpuścić w wodzie ultra pure w kolbie miarowej pojemności 100 ml i dopełnić wodą do kreski;
- wzorzec kwasu L-askorbowego;
- fosforan (V) jednopotasowy (KH_2PO_4), roztwór 0,5%.

Aparatura i sprzęt

- szkło laboratoryjne: kolby miarowe o pojemności 10 ml, 25 ml, 100 ml, pipety, cylindry miarowe, kolby Erlenmayera, lejki szklane;
- bibuła filtracyjna;
- filtry strzykawkowe o śr. 0,45 μm ;
- myjka ultradźwiękowa;
- waga analityczna;
- wytrząsarka laboratoryjna;
- mikrostrzykawka Hamilton, pojemności 100 μl ;
- chromatograf cieczowy (Shimadzu) z detektorem UV;
- kolumna RP - C 18.

Warunki rozdziału chromatograficznego

Przepływ fazy ruchomej – 0,5 ml /min.

Temperatura pokojowa.

Długość fali: 254 nm.

Przygotowanie próby

Do kolby miarowej pojemności 25 ml należy odważyć 25 mg DTT, dodać 1 ml soku i całość rozpuścić w 10 ml wody ultra czystej. Próbkę soku o masie 0,5 g rozpuścić w 5 cm³ wody. Zawartość kolby mieszać w łaźni ultradźwiękowej przez 15-20 sek. Do kolby dodać po 0,1 ml roztworów Carreza I i II, wymieszać, uzupełnić wodą do kreski i wymieszać ponownie na łaźni ultradźwiękowej. Próbę przechowywać przez 2 godziny bez dostępu światła, a następnie przesączyć przez bibułę filtracyjną, a następnie przez filtr strzykawkowy.

Wykonanie krzywej wzorcowej

5 mg kwasu askorbowego rozpuścić w wodzie ultra czystej w kolbie miarowej pojemności 100 ml i uzupełnić wodą do kreski. Do trzech kolb miarowych o pojemności 10 ml pobrać kolejno po 1, 2 i 3 ml roztworu wzorca. Do każdej kolby dodać po 10 mg DTT. Zawartość kolb uzupełnić wodą ultra czystą do kreski i mieszać na łaźni ultradźwiękowej. Przechowywać przez 2 godziny bez dostępu światła przed dokonaniem analizy chromatograficznej. Stężenie przygotowanych roztworów wynosi: 0,005; 0,010; 0,015 mg/ml. Nastrzykać kolejno roztwory wzorca, zarejestrować chromatogramy oraz odczytać powierzchnię piku każdego wzorca.

Wykonanie oznaczenia

Wprowadzić do aparatu odpowiednią objętość przygotowanej próby. Zarejestrować chromatogramy oraz odczytać powierzchnie wszystkich pików.

Obliczenie wyników oznaczenia

Zawartość witaminy C (X) (mg/ml) w próbach należy obliczyć korzystając z krzywej wzorcowej, według wzoru:

$$X = \frac{X_1 \cdot P \cdot V}{P_1 \cdot V_0}$$

w którym:

X_1 – stężenie witaminy C w roztworze wzorcowym,

P – powierzchnia piku w próbie badanej,

P_1 – powierzchnia piku w roztworze wzorcowym,

V – końcowa objętość próbki (ml),

V_1 – objętość próbki pobrana do analizy.

Literatura:

1. Czerwiecki L., Wilczyńska G.: Oznaczanie witaminy C w wybranych produktach owocowo-warzywnych. *Roczn. PZH*, 1999, 50: 77–87.
2. Pierzynowska J., Prędką A., Drywień M., Ostrowska K.: Porównanie zawartości witaminy C w wybranych świeżych i fermentowanych sokach warzywnych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2007, 4: 341–344.
3. Odriozola-Serrano I., Hernandez-Jover T., Martín-Belloso O: Comparative evaluation of UV-HPLC methods and reducing agents to determine vitamin C in fruits. *Food Chem.*, 2007, 105: 1151–1158.

7.3. Oznaczanie zawartości witaminy B2 w mleku metoda Emmerie

Odczynniki

- Alkohol metylowy;
- ditlenek diwodoru, roztwór 3%;
- kwas octowy lodowaty;
- nadmanganian potasu, roztwór 4%,
- roztwór wzorcowy ryboflawiny (100µg/1 ml).

Sprzęt

- Wyparka,
- szkło laboratoryjne: zlewki, kolba okrągłodenna o poj. 50 ml.

Wykonanie oznaczenia

Do kolby miarowej pojemności 50 ml dodać 25 ml mleka odtłuszczonego, następnie dodać bez wstrząsania, powoli 25 ml alkoholu metylowego, ogrzać w łaźni wodnej przez 15 minut w temp. 60°C. Następnie oziębnić, dodać 0,05 ml lodowatego kwasu octowego, dopełnić do 50 ml alkoholem metylowym. Zawartość kolby dokładnie wytrząsnąć, pozostawić na 15 min., przesączyć. Odparować 35 ml uzyskanego przesączu, w próżni, do 10 ml, dodać 0,25 ml lodowatego kwasu octowego, 0,5 ml 4% roztworu nadmanganianu potasu. Po 1 min. dodać 0,5 ml wody utlenionej. Uzupełnić do 12,5 ml wodą destylowaną i zmierzyć ekstynkcję w spektrofotometrze przy długości fali 465 nm. Ekstynkcja roztworu, który zawiera 100 µg ryboflawiny w 1 ml w warstwie grubości 1 cm, przy długości fali 465 nm, wynosi 2,89.

Obliczanie wyników

Zawartość witaminy B2 (µg/ml) badanego roztworu (X) należy obliczyć z poniższego wzoru:

$$X = a * E2/E1,$$

w którym:

a – zawartość ryboflawiny we wzorcowym roztworze µg/ml,

E1– wartość ekstynkcji wzorcowego roztworu,

E2 – wartość ekstynkcji badanego roztworu.

Wynik przeliczyć na mg/100 g, uwzględniając rozcieńczenie próby (2x).

7.4. Ocena wysycenia organizmu witaminą C – test językowy

Zasada metody

Niedobór witamin w pożywieniu prowadzi do zmiany wysycenia organizmu tymi związkami, co objawia się w przypadku niektórych witamin zmniejszeniem rezerw tkankowych i zmianą ilości ich wydalania z moczem.

W przeprowadzonym teście językowym wykorzystywane są redukujące właściwości kwasu askorbowego. Kwas askorbowy redukuje niebieski roztwór 2,6-dichloroindofenolu do bezbarwnego leukozwiązku. Czas odbarwienia się roztworu na języku jest odwrotnie proporcjonalny do zawartości witaminy C w tkankach.

Odczynniki

- 2,6-dichloroindofenol, roztwór 0,003 mol/l.

Sprzęt

- Paski bibuły do osuszania języka;
- stoper;
- zakraplacz.

Wykonanie oznaczenia

Na osuszoną grzbietową powierzchnię języka nanieść zakraplaczem kroplę roztworu 2,6-dichloroindofenolu i natychmiast włączyć stoper. Zmierzyć czas od momentu zetknięcia się barwnika z powierzchnią języka do całkowitego odbarwienia się 2,6-dichloroindofenolu. Próbę powtórzyć 3-krotnie i na podstawie średniego wyniku określić stan wysycenia organizmu witaminą C na podstawie Tabeli 7.1.:

Tabela 7.1. Stan wysycenia organizmu witaminą C w zależności od czasu odbarwienia 2,6-dichloroindofenolu.

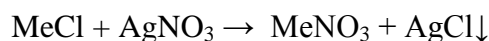
Czas odbarwienia (sek.)	Stan wysycenia organizmu witaminą C
< 30	dobry
30-60	dostateczny
60-120	niski
>120	hipowitaminoza

8. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI CHLORKU SODU

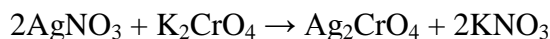
Zdaniem ekspertów Światowej Organizacji Zdrowia nie powinno się przekraczać dawki 5 g soli (ok. 2 g sodu) dziennie. Według najnowszych norm Instytutu Żywności i Żywienia wystarczające spożycie chlorku sodu wynosi 3,8 g/dzień. Z badań naukowych wynika, że pobranie soli z diety w Polsce i na świecie znacznie przekracza zalecenia.

Zasada metody

Metoda oznaczania zawartości NaCl polega na bezpośrednim miareczkowaniu chlorków 0,1 M roztworem azotanu (V) srebra w środowisku obojętnym w obecności chromianu (VI) dipotasu (jako wskaźnika). Przebieg reakcji można zapisać:



Po całkowitym wytrąceniu chlorków, azotan (V) srebra reaguje z chromianem według reakcji:



Powstały chromian (VI) disrebra, powoduje pojawienie się ceglastoczerwonego zabarwienia. Ilość chlorków wyrażoną jako NaCl, oblicza się z ilości azotanu (V) srebra zużytego do ich związania.

Odczynniki

- Azotan (V) srebra, roztwór 0,1 M;
- wodorotlenek sodu, roztwór 0,1 M;
- chromian (VI) dipotasu, nasycony roztwór;
- fenoloftaleina, 1% roztwór etanolowy (w/v);
- woda destylowana.

Przygotowanie próby

Badaną próbę pieczywa wysuszoną do stałej masy zmielić w młynku elektrycznym, a następnie odważyć 10 g z dokładnością do 0,1 g w zlewce o poj. 50 ml. Próbę przenieść przy pomocy lejka, początkowo na sucho, a następnie przy pomocy ok. 100 ml wody destylowanej o temp. 60°C do kolby miarowej pojemności 250 ml. Kolbę zakorkować i wstrząsać na wytrząsarce przez 15 min., po czym wstawić na 15 min. do

łaźni wodnej o temp. 60⁰C i wstrząsać co kilka minut. Próbę ostudzić, dopełnić wodą do kreski i przesączyć przez sączek karbowany.

Wykonanie oznaczenia

Do 3 kolb stożkowych odmierzyć po 25 ml przesączu, dodać po 3 krople fenoloftaleiny do każdej i miareczkować 0,1 M roztworem NaOH do lekko różowego zabarwienia. Następnie do kolb dodać po 0,5 ml nasyconego chromianu (VI) dipotasu i szybko miareczkować 0,1 M roztworem azotanu (V) srebra, aż do osiągnięcia trwałego, ceglastoczerwonego zabarwienia.

Obliczanie wyników

Procentową zawartość NaCl [x] wyliczyć według wzoru:

$$X = \frac{a \cdot 0,005845 \cdot V \cdot 100 \cdot 100\%}{m \cdot b \cdot (100 - w)}$$

w którym:

a – objętość 0,1 M azotanu (V) srebra zużytego do miareczkowania (ml),

b – objętość przesączu pobranego do miareczkowania (ml),

V – objętość roztworu próby badanej (ml),

m – masa próby w przeliczeniu na świeże pieczywo (g),

w – wilgotność badanego pieczywa (%),

0,005845 – ilość NaCl odpowiadająca 1ml 0,1 M azotanu (V) srebra.

Literatura

1. Jarosz M. Normy żywienia dla populacji polskiej - nowelizacja. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2012.
2. WHO: Guideline: Sodium intake for adults and children. World Health Organization (WHO), Geneva 2012.
3. Markiewicz-Żukowska R, Sawicka E, Naliwajko SK, Borawska MH. Sól kuchenna w dietach osób starszych z Białegostoku. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2011, 44 (3): 341-346.
4. Markiewicz-Żukowska R, Mystkowska K, Omeljaniuk WJ, Borawska MH. Wartość odżywcza całodziennych racji pokarmowych młodzieży licealnej z Bursy Szkolnej. *Bromat. Chem. Toksykol.* 2011, 44 (3): 398-403.

5. Pieczywo. Metody badań. Polska Norma PN-A-74108:1996. Polski Komitet Normalizacyjny.

9. OZNACZANIE SKŁADU MINERALNEGO PRODUKTÓW SPOŻYWCZYCH I ZAWARTOŚCI PIERWIASTKÓW TOKSYCZNYCH METODĄ ATOMOWEJ SPEKTROMETRII ABSORPCYJNEJ (ASA)

Zasada metody

Atomy w stanie gazowym mogą absorbować promieniowanie o ściśle określonej częstotliwości. W wyniku absorpcji określonego kwantu promieniowania, atomy są przeprowadzane ze stanu podstawowego w stan wzbudzony, a następnie ta sama ilość energii jest emitowana, gdy atomy wzbudzone powracają do stanu podstawowego.

Przejścia atomów ze stanu podstawowego do wzbudzonego i ich powrót do stanu podstawowego nazywane są przemianami rezonansowymi.

Pomiar intensywności energii emitowanej podczas przemian rezonansowych stanowi podstawę oznaczeń ilościowych metodą ASA.

Źródłem promieniowania w ASA są lampy z katodą wnękową, w których katoda jest zbudowana z tego pierwiastka, który jest oznaczany.

FAAS (płomieniowa)

Pierwiastki zawarte w próbce atomizuje się w wysokiej temperaturze płomienia.

Przez zatomizowaną próbkę przepuszcza się wiązkę światła monochromatycznego, o długości fali odpowiadającej fali emitowanej przez pierwiastek. Ilość światła absorbowanego przez atomy pierwiastka jest proporcjonalna do jego stężenia w próbce.

Próbkę wprowadza się do płomienia palnika (stosuje się mieszaniny gazów: acetylen – powietrze, podtlenek azotu – acetylen).

ETAAS, GFAAS (bezpłomieniowa)

Atomizerem elektrotermicznym jest grafitowa kuweta, do której wprowadzamy badany roztwór (od 5 do 100 μ l, zwykle 20 μ l). Najczęściej używa się kuwet pirolitycznie pokrywanych. Kuwetę przed dostępem tlenu chroni gaz obojętny – np. argon.

Kroki analityczne w kuwecie grafitowej:

1. Suszenie (ok. 110°C) – roztwór musi parować w temp. trochę wyższej od punktu wrzenia, nie może parować zbyt szybko (straty) – ok. 30 sek.

2. Spopielenie – usunięcie substancji organicznych i części składników matrycy. Należy minimalizować straty analitu: temp. 350-1200°C – ok. 45 sek.

3. Atomizacja: 1500-2800°C – przez kilka sek. – analizowany pierwiastek jest atomizowany i mierzona jest absorpcja promieniowania przez pary atomów.

4. Czyszczenie – rurka jest oczyszczana przez ogrzewanie w temp. atomizacji lub wyższej przez krótki czas.

5. Chłodzenie do temp. pokojowej przy użyciu wody i przepływającego gazu obojętnego.

Odczynniki

- Kwas azotowy stęż., spektralnie czysty;
- roztwory wzorcowe pierwiastków (stęż. 1 mg/ml) do wykonania krzywej kalibracyjnej;
- woda dejonizowana.

Aparatura i sprzęt

- Mineralizator mikrofalowy;
- spektrometr absorpcji atomowej z atomizacją techniką płomieniową i bezpłomieniową;
- waga analityczna z dokładnością do 1 mg;
- teflonowe naczynia reakcyjne z pokrywką;
- pipety automatyczne;
- kolby miarowe pojemności 50 ml;
- naczynka scyntylicyjne.

Wykonanie oznaczeń

Mineralizacja mikrofalowa w systemie zamkniętym przy użyciu kwasu azotowego (V)

Odważyć 1 g próby, z dokładnością do 1 mg, w naczyniu teflonowym, dodać 6 ml stęż. kwasu azotowego (V) i 1 ml wody dejonizowanej. Zamknąć naczynie pokrywką, nałożyć membranę zabezpieczającą i umieścić w głowicy mineralizatora. Zakręcić mineralizator, włączyć chłodzenie. Wybrać procedurę mineralizacji i rozpocząć proces. Po zakończeniu mineralizacji próbę 10 min chłodzić. Następnie przenieść próbę ilościowo do naczynka scyntylicyjnego.

Wykonanie roztworów wzorcowych do krzywej kalibracyjnej:

- Przygotować roztwory 1 mg/l, 1,5 mg/l i 2 mg/l cynku z roztworu standardowego o stężeniu 1 mg/ml i rozpuścić w 50 ml 0,1 mol/l kwasu azotowego (V).
- Przygotować roztwory 1 mg/l, 2 mg/l i 5 mg/l miedzi z roztworu standardowego o stężeniu 1 mg/ml i rozpuścić w 50 ml 0,1 mol/l kwasu azotowego (V).
- Przygotować roztwory robocze ołowiu i kadmu o stęż. 1 mg/l z roztworów standardowych o stężeniu 1 mg/ml i rozpuścić w 50 ml 0,1 mol/l stęż. kwasu azotowego (V).

Z roztworów roboczych o stęż. 1 mg/l przygotować roztwory o stężeniach: 40 µg/l (Pb) i 4 µg/l (Cd) w 0,5 mol/l kwasu azotowego (V) do wykonania krzywej kalibracyjnej.

9.1. Oznaczanie zawartości cynku i miedzi metodą ASA, technika płomieniowa

Zaprogramować procedurę oznaczania. Wykonać krzywą kalibracyjną i oznaczyć stężenie cynku i miedzi w mineralizatach. Następnie przeliczyć zawartość pierwiastków na rzeczywiste stężenie w produkcie według wzoru:

$$C = \frac{(C_1 - C_0) \times V}{m}$$

w którym:

C – stężenie pierwiastka w próbce badanej (mg/kg),

C_1 – odczyt z krzywej kalibracyjnej dla próby badanej (mg/l),

C_0 – odczyt z krzywej kalibracyjnej dla próby odczynnikowej (mg/l),

m – masa produktu (g),

V – rozcieńczenie (ml).

9.2. Oznaczanie zawartości ołowiu i kadmu metodą ASA, technika bezpłomieniowa

Zaprogramować procedurę oznaczania. Wykonać krzywą kalibracyjną i oznaczyć stężenie ołowiu i kadmu w mineralizatach. Następnie przeliczyć zawartość pierwiastków na rzeczywiste stężenie w produkcie według wzoru:

$$C = \frac{(C_1 - C_0) \times V}{m}$$

w którym:

C – stężenie pierwiastka w próbce badanej ($\mu\text{g}/\text{kg}$),

C_1 – odczyt z krzywej kalibracyjnej dla próby badanej ($\mu\text{g}/\text{l}$),

C_0 – odczyt z krzywej kalibracyjnej dla próby odczynnikowej ($\mu\text{g}/\text{l}$),

m – masa produktu (g),

V – rozcieńczenie (ml).

10. WYKRYWANIE I OCENA JAKOŚCIOWA SUBSTANCJI DODATKOWYCH DO ŻYWNOŚCI

Wykaz oraz szczegółowe warunki stosowania substancji dodatkowych w środkach spożywczych określa Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych (Dz.U. 2010 nr 232 poz. 1525).

10.1. Wykrywanie obecności ditlenku siarki w winie

Zasada metody

Metoda polega na utlenieniu kwasu siarkowego (IV) jodem w środowisku kwaśnym do kwasu siarkowego (VI). Związki, które zawierają kwas siarkowy (IV) związany należy rozłożyć z użyciem wodorotlenku sodu.

Aparatura i sprzęt

- Kolby stożkowe, pojemności 200 ml;
- biurety;
- pipety.

Odczynniki i roztwory

- Roztwór jodu, 0,01 mol/l;
- wodorotlenek sodu, 1 mol/l;
- kwas siarkowy (VI);
- skrobia, 2% (kleik): 2 g wysuszonej do stałej masy skrobi odważyć do 250 ml zlewki, dodać 90 ml wody destylowanej i wymieszać. Gotować 3 minuty, przenieść do kolby miarowej na 100 ml. Schłodzić do temperatury pokojowej, uzupełnić wodą do kreski, przenieść do ciemnej butelki. Używać w dniu przygotowania.

Wykonanie oznaczenia

Do kolby stożkowej z doszlifowanym korkiem odmierzyć 50 ml wina, dodać 2 ml roztworu skrobi, miareczkować roztworem jodu do szarego zabarwienia utrzymującego się 30 sekund. Do próby dodać 20 ml wodorotlenku sodu, dokładnie wymieszać, odstawić na 15 minut. Po tym czasie dodać 10 ml kwasu siarkowego i miareczkować natychmiast roztworem jodu.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Zawartość wolnego dwutlenku siarki (mg/l) (X) obliczyć według wzoru:

$$X = \frac{V_1 \cdot n \cdot 0,64 \cdot 1000}{V}$$

w którym:

V_1 – objętość roztworu jodu zużyta podczas pierwszego miareczkowania (ml),

n – molowość roztworu jodu,

0,64 – liczba mg SO₂ ściśle odpowiadająca 1 ml mianowanego roztworu jodu,

V – objętość badanej próbki (ml).

Zawartość wolnego oraz związanego dwutlenku siarki (mg/l) (X₁) obliczyć wg wzoru:

$$X = \frac{(V_1 + V_2) n \cdot 0,64 \cdot 1000}{V}$$

w którym:

V_1 – objętość roztworu jodu zużyta podczas pierwszego miareczkowania (ml),

V_2 – objętość roztworu jodu zużyta podczas drugiego miareczkowania (ml),

n – molowość roztworu jodu,

0,64 – liczba mg SO₂ ściśle odpowiadająca 1 ml mianowanego roztworu jodu,

V – objętość badanej próbki (ml).

10.2. Oznaczanie słodkości sztucznego środka słodzącego

Zasada metody

Metoda polega na ocenie organoleptycznej słodkości roztworu sztucznego środka słodzącego w porównaniu do roztworu wzorcowego sacharozy.

Odczynniki

- Sacharoza, roztwór 3%;
- sztuczny środek słodzący;
- woda destylowana.

Szkło laboratoryjne

- Kolby stożkowe o pojemności 100 ml;
- kolby miarowe pojemności 100 ml;
- zlewki o pojemności 50, 100 ml;
- cylindry miarowe o pojemności 50 ml;
- pipeta automatyczna.

Wykonanie oznaczenia

Do trzech kolb stożkowych odmierzyć po 45 ml wody destylowanej. Z przygotowanego roztworu sztucznego środka słodzącego o znanym stężeniu przenieść pipetą 5 ml do pierwszej kolby i dokładnie wymieszać. Z niej pobrać 5 ml i przenieść do drugiej kolby, wymieszać, a następnie z drugiej kolby przenieść 5 ml do trzeciej kolby i również wymieszać. Obliczyć stężenie substancji słodzącej w każdym z trzech roztworów. Porównać organoleptycznie słodkość roztworów z wzorcowym 3% roztworem sacharozy. Roztwór najbliższy wzorcowemu, ale od niego słodszy rozcieńczać małymi porcjami wody destylowanej tak długo, aż jego słodkość obniży się do słodkości wzorca. Zmierzyć końcową objętość badanego roztworu i obliczyć jego rzeczywiste stężenie. Ilości zużyte do oceny organoleptycznej pominąć. Obliczyć, ile razy badany preparat jest słodszy od sacharozy.

10.3. Wykrywanie obecności benzoesu sodu w żywności metodą HPLC

Zasada metody

Metoda polega na oznaczeniu zawartości benzoesu sodu techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV/VIS z zastosowaniem benzoesu sodu jako wzorca zewnętrznego.

Odczynniki i roztwory

- Woda ultra pure;
- benzoesan sodu, wzorzec;
- faza mobilna A:B = 85:15:
A: bufor fosforanowy (NaH_2PO_4 , roztwór 10 mmol/l, pH=2,2), B: acetonitryl.

Aparatura i sprzęt

- Szkło laboratoryjne: kolby miarowe o pojemności 10 ml, 25 ml, 100 ml, pipety, cylindry miarowe, kolby Erlenmayera, lejki szklane;
- bibuła filtracyjna;
- filtry strzykawkowe o śr. 0,45 μm ;
- myjka ultradźwiękowa;
- waga analityczna;
- mikrostrzykawka Hamilton, pojemności 100 μl ;
- chromatograf cieczowy (Shimadzu) z detektorem UV;
- kolumna Nucleosil 100 – 5 C18.

Warunki rozdziału chromatograficznego

Przepływ fazy ruchomej – 1,2 ml/min.

Temperatura pokojowa

Długość fali: 225 nm.

Przygotowanie próby

Rozcieńczyć próbę produktu płynnego z użyciem fazy mobilnej (NaH_2PO_4 :Acetonitryl = 85:15). Przesączyć przez filtr strzykawkowy o średnicy porów 0,45 μm .

Wykonanie krzywej wzorcowej

10 mg benzoesu sodu rozpuścić w wodzie ultra czystej w kolbie miarowej pojemności 20 ml i uzupełnić wodą do kreski. Do pięciu kolb miarowych o pojemności 20 ml pobrać kolejno po 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0 ml roztworu wzorca. Zawartość kolb uzupełnić fazą mobilną do kreski i mieszać na łaźni ultradźwiękowej. Stężenie przygotowanych roztworów wynosi: 0,00025; 0,0005; 0,001; 0,002; 0,005%. Nastrzykać kolejno roztwory wzorca po 50 μ l, zarejestrować chromatogramy oraz odczytać powierzchnię pików każdego wzorca.

Wykonanie oznaczenia

Wprowadzić do aparatu odpowiednią objętość przygotowanej próby. Zarejestrować chromatogramy oraz odczytać powierzchnie wszystkich pików.

Obliczenie wyników oznaczenia

Zawartość benzoesu sodu (X) (mg/ml) w próbach należy obliczyć korzystając z krzywej wzorcowej.

Literatura

1. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2010 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych (Dz.U. 2010 nr 232 poz. 1525).
2. Ene C.P, Diacu E.: High-performance liquid chromatography method for the determination of benzoic acid in beverages. U.P.B. Sci. Bull. B, 2009, 71, 4, 1454-2331.
3. Abe-Onishi Y, Yomota C, Sugimoto N, Kubota H, Tanamoto K.: Determination of benzoyl peroxide and benzoic acid in wheat flour by high-performance liquid chromatography and its identification by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 2004, 25;1040(2): 209-214.

11. METODY OCENY AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ ŻYWNOŚCI

Większość metod opiera się na dwóch podstawowych mechanizmach reakcji: przeniesienia pojedynczego elektronu SET (*single electron transfer*) oraz przeniesienia atomu wodoru HAT (*hydrogen atom transfer*).

Wśród metod SET wyróżnia się: metodę z wykorzystaniem odczynnika ABTS, metodę oznaczania zdolności redukcji jonów żelaza (FRAP) lub miedzi (CRA), metodę z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (FCR), metodę opartą na zastosowaniu odczynnika DPPH.

Do metod HAT należą: metoda oznaczania zdolności absorpcji rodników tlenowych (ORAC), metoda oznaczania całkowitej zdolności wychwytywania wolnych rodników (TRAP), metoda odbarwienia krocyny, metoda oznaczania zdolności inhibicji utleniania lipidów.

Metody oszacowania zdolności przeciwutleniającej są skomplikowane i często pojawiają się problemy wynikające z braku jednorodności próbek, niskiej wydajności ekstrakcji przeciwutleniaczy z matrycy żywnościowej i braku odpowiedniej procedury kontroli jakości wyników.

Wyniki oznaczania całkowitej zdolności antyoksydacyjnej żywności uzyskiwane wymienionymi metodami mogą różnić się między sobą i są niejednoznaczne.

Do najczęściej stosowanych metod w analizie żywności zaliczyć można metody SET:

- ABTS: gryka, sok z buraka ćwikłowego, groch, fasola, sok z kapusty surowej i kiszanej, soja,
- DPPH: fasola czerwona i adzuki, soczewica zielona i czerwona, bób, bobik, wyka, groch, gryka, kasza gryczana, orzechy włoskie i laskowe, migdały, aronia, borówka czernica, czarna porzeczka, sok z aronii, owoce rokitnika, żurawina, musztarda,
- FRAP: kawa, herbata, kakao, sok z czarnej porzeczki, jabłek i pomidorów, kiwi, banany, miód, arbuz, mango, cytryny, truskawki, pomarańcze, wiśnie, śliwki, brzoskwinie.

11.1. Oznaczanie całkowitej zawartości polifenoli w środkach spożywczych

Zasada metody

Związki fenolowe zawarte w żywności są utleniane w obecności wskaźnika Folin-Ciocalteu. Natomiast kwasy: fosfowolframowy oraz fosfomolibdenowy zawarte w tym wskaźniku ulegają redukcji do tlenków wolframu i molibdenu, wykazujących niebieską barwę odczytywaną spektrofotometrycznie. Natężenie barwy jest proporcjonalne do ilości związków fenolowych zawartych w próbce.

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Waga techniczna;
- wirówka;
- probówki wirówkowe, probówki ze szlifem;
- kolby miarowe o pojemności 100 ml;
- pipety szklane.

Odczynniki

- Kwas galusowy, roztwór 2 g/l;
- odczynnik Folin-Ciocalteu, 0,2 N;
- węglan sodu Na_2CO_3 , roztwór 75g/l.

Przygotowanie próby

Odważyć $1 \pm 0,001$ g dobrze wymieszanej próby. Rozpuścić do 10 ml wody destylowanej. Próbkę odwirować przez 5 minut, przy 2000 obr./min.

Wykonanie krzywej wzorcowej

Wykonać krzywą wzorcową. W tym celu należy przygotować roztwór roboczy kwasu galusowego o stężeniu 2g/l w wodzie destylowanej. Do 5 kolb miarowych pojemności 100 ml pobrać kolejno: 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 ml roztworu roboczego kwasu galusowego i uzupełnić wodą do kreski. Z każdego stężenia do probówki pobrać 0,25 ml dodać 1,25 ml 0,2 N odczynnika Folin-Ciocalteu, zakorkować, mieszać przez 5 minut. Następnie dodać 1 ml roztworu Na_2CO_3 , wymieszać i inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Po tym czasie zmierzyć absorbancję wobec blanku – wody przy długości fali 760 nm.

Wykonanie oznaczenia

Z odwirowanej próby pobrać 0,25 ml nadsącza, dodać 1,25 ml 0,2 N odczynnika Folin-Ciocalteu, zmieszać przez 5 minut. Po tym czasie dodać 1 ml roztworu Na₂CO₃, wymieszać i inkubować w temperaturze pokojowej przez 2 godziny. Zmierzyć absorbancję wobec wody (blank) przy długości fali 760 nm. Stężenie w mg kwasu galusowego/100 g produktu odczytać z krzywej wzorcowej.

Literatura

1. Djeridane A., Yousfi M., Nadjemi B., Boutassouna D., Stocker P., Vidal N.: Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, 2006, 97: 654–660.

12. OZNACZANIE ZAWARTOŚCI AZOTANÓW (III) I AZOTANÓW (V) W WARZYWACH I OWOCACH METODĄ BEZPOŚREDNIEJ REDUKCJI KADMEM

Nadmierne stężenia azotanów w żywności wynikają ze stosowania zbyt dużych ilości nawozów mineralnych jak i organicznych, intensywnej hodowli zwierząt, zanieczyszczeń przemysłowych oraz celowego dodatku do żywności w trakcie jej przetwarzania, a także niewłaściwego przechowywania. Mogą one również powstawać w produktach spożywczych w wyniku stosowania niektórych procesów technologicznych, np. wędzenia lub suszenia w wysokich temperaturach.

Stosowanie w uprawie roślin dużych dawek nawozów azotowych powoduje kumulowanie w częściach jadalnych roślin znacznych ilości azotanów. Na proces nagromadzenia azotanów w tkankach roślinnych obok nawożenia, duży wpływ mają nasłonecznienie, wilgotność, temperatura i warunki tlenowe środowiska oraz rodzaj i pH gleby.

Szkodliwość azotanów wynika z możliwości redukcji azotanów (V) do azotanów (III) i wywoływania methemoglobinemii i niedokrwistości, a także tworzenia mutacji i kancerogennych nitrozoamin. Toksyczność tych związków polega również na ograniczaniu wykorzystania niektórych składników pokarmowych m.in. witaminy A, witamin z grupy B, białka, tłuszczów i węglowodanów oraz zmniejszeniu przydatności warzyw do przetwórstwa przemysłowego.

Zasada metody

Metoda polega na wywołaniu reakcji barwnej z odczynnikami Griessa, przy czym azotany (V) należy uprzednio zredukować do azotanów (III) bezpośrednio sproszkowanym kadmem.

Odczynniki

- Heksocyjanożelazian (II) potasu, $K_4Fe(CN)_6$:

w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml rozpuścić w świeżo destylowanej wodzie 106 g $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ i uzupełnić wodą do kreski (*odczynnik odbiałczający*);

- octan (II) cynku, $Zn(CH_3COO)_2$:

w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml rozpuścić w wodzie 220 g $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$, dodać 30 ml kwasu octowego lodowatego i uzupełnić wodą do kreski (*odczynnik odbiałczający*);

- tetraboran disodu, $Na_2B_4O_7$ (boraks):

50 g $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml rozpuścić w wodzie i uzupełnić wodą do kreski.

- azotan (III) sodu, $NaNO_2$;

- cynk w granulkach;

- siarczan (VI) kadmu, $CdSO_4$:

w kolbie miarowej o pojemności 500 ml rozpuścić w wodzie 100 g $CdSO_4 \cdot 8H_2O$ i uzupełnić wodą do kreski;

- kwas chlorowodorowy, HCl , $d=1,19$;

- kwas chlorowodorowy 0,1 mol/l;

- bufor amonowy o pH 9,6- 9,7:

do kolby miarowej o pojemności 1000 ml zawierającej około 500 ml wody dodać 20 ml kwasu chlorowodorowego stężonego, wymieszać i następnie dodać 50 ml azanu (amoniaku) o $d=0,88$ g/ml, uzupełnić wodą do kreski, po czym sprawdzić pH;

- kwas octowy, CH_3COOH $d=1,05$;

- odczynnik Griessa I:

w kolbie miarowej o pojemności 1000 ml rozpuścić 2 g sulfanilamidu ($H_2N-C_6H_4-SO_2NH_2$) w 400 ml roztworu kwasu chlorowodorowego (1+1v/v) i uzupełnić wodą do kreski;

- odczynnik Griessa II:

w kolbie miarowej o pojemności 200 ml rozpuścić 0,2 g dichlorowodoru N-(1-naftylo) etylenodiaminy ($C_{10}H_7NHCH_2CH_2NH \cdot 2HCl$) w 20 ml wody, a następnie uzupełnić wodą do kreski. Roztwór ten należy przechowywać w ciemnej butelce w lodówce, nie dłużej niż jeden tydzień. W razie zmętnienia odczynniki Griessa I i II można przesączyć;

- węgiel aktywny;

- kadm metaliczny: w zlewce zawierającej 500 ml roztworu siarczanu (VI) kadmu umieścić granulki cynkowe. W miarę tworzenia się kadmu na granulkach należy usuwać go do innej zlewki z wodą destylowaną. Zebrany kadm przemyć dwukrotnie wodą destylowaną w ilości 500 ml, a następnie przenieść za pomocą 300 ml roztworu

kwasy chlorowodorowe 0,1 mol/l do homogenizatora i rozdrabniać przez około 10 s. Zawartość homogenizatora przenieść do zlewki i pozostawić w tym roztworze, mieszając od czasu do czasu bagietką szklaną. Przed użyciem do analizy zlać roztwór kwasu chlorowodorowego, a kadm przemyć kilkakrotnie wodą destylowaną do uzyskania odczynu obojętnego (sprawdzić papierkiem wskaźnikowym).

Nie zużytą ilość kadmu przechowywać w naczyniu szklanym, w roztworze kwasu chlorowodorowego 0,1 mol/l. We wszystkich czynnościach związanych z przygotowaniem kadmu należy zwracać uwagę, aby był on całkowicie zanurzony w roztworze.

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Spektrofotometr;
- waga analityczna;
- łaźnia wodna ze wstrząsarką;
- wstrząsarka mechaniczna;
- homogenizator;
- tarka do jarzyn plastikowa;
- kolby miarowe o pojemności 50, 100, 200, 1000 ml;
- kolby stożkowe o pojemności 50 ml z doszlifowanymi korkami;
- kolby stożkowe 200, 250 ml;
- lejki szklane o średnicy 5-15 cm;
- pipety 1, 2, 5, 10 i 20 ml;
- zlewki 50, 100, 800 ml;
- bibuła filtracyjna Filtrak nr 388;
- cylindry miarowe 25, 50, 100 ml.

Przygotowanie wykresu kalibracyjnego

Odważyć $3 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$ azotanu (III) sodu, wysuszonego w temperaturze 110-120 °C do stałej masy i rozpuścić w 50 ml wody świeżo destylowanej. Przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 1000 ml, dokładnie wymieszać, uzupełnić wodą do kreski. 5 ml tego roztworu przenieść do kolby miarowej o pojemności 1000 ml i uzupełnić wodą do kreski. 1 ml tak przygotowanego standardu zawiera 10 µg jonów azotanowych (III) (NO_2^-). Roztwór standardowy azotanu (III) sodu jest nietrwały i przygotowuje się go w dniu użycia.

Do kolb miarowych o pojemności 50 ml przenieść pipetą: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 2,5; 3,0 ml roztworu standardowego azotanu (III) sodu, co odpowiada 0; 5; 10; 20; 25 i 30 μg jonów (NO_2^-). Dodać odpowiednio 30,0; 29,5; 29,0; 28,0; 27,5; 27,0 ml wody, wymieszać, po czym dodać po 5 ml odczynnika Griessa I, wymieszać i pozostawić bez dostępu światła na 5 minut. Następnie dodać 1 ml odczynnika Griessa II, wymieszać i pozostawić na 10 minut bez dostępu światła, uzupełnić wodą do kreski, wymieszać. Po 20 minutach dokonać pomiaru absorbancji roztworów na spektrofotometrze przy długości fali 538 nm wobec próby kontrolnej, odczynnikowej (woda destylowana + odczynniki Griessa). Po wykonaniu pomiaru wykreślić wykres kalibracyjny, odznaczając na osi odciętych masę jonów azotu (III) w roztworze kalibracyjnym w μg , zaś na osi rzędnych odpowiadające im wartości absorbancji. Najmniejsza oznaczalna ilość wynosi 0,5 μg jonów (NO_2^-).

Przygotowanie prób

Pobraną próbkę warzyw lub owoców umyć bieżącą, a następnie świeżo destylowaną wodą, osuszyć czystą bibułą, po czym kroić drobno nożem, zetrzeć na tarce lub homogenizować. Przetwory warzywne i owocowe należy zmiksować, natomiast produkty zamrożone wsypać do zamykanego naczynia i po rozmrożeniu zmiksować. Z tak przygotowanych prób odważyć 10 g z dokładnością 0,01 g w zlewce o pojemności 50 ml. Wielkość odważanej próbki dobiera się w zależności od spodziewanej ilości azotanów (V) i azotanów (III). Następnie przenieść próbę za pomocą około 100 ml wody o temperaturze 70-80⁰C do kolby miarowej o pojemności 200 ml, dodać 5 ml boraksu i mocno kilka razy wstrząsnąć.

Kolbę ogrzewać w łaźni wodnej ze wstrząsarką przez 30 minut w temperaturze 90-100⁰C. Po upływie 30 minut próby ochłodzić i dodawać kolejno 2 ml heksocyjanożelazianu (II) potasu i 2 ml octanu (II) cynku, wstrząsając po dodaniu każdej porcji odczynników.

Następnie próby uzupełnić wodą do kreski (200 ml), wymieszać i filtrować przez bibułę filtracyjną. W razie zmętnienia filtrację powtórzyć. Z klarownego przesączu pobierać odpowiednie ilości do oznaczenia azotanów (V) i azotanów (III).

W przypadku uzyskania barwnego przesączu (np. buraki, czarna porzeczka) analizę należy powtórzyć i dodać 1 g węgla aktywnego na początku analizy, po przeniesieniu próby do kolby miarowej. Próby należy analizować bezpośrednio po rozdrobnieniu.

12.1. Oznaczenie zawartości azotanów (III)

Do kolby miarowej o pojemności 50 ml przenieść pipetą 10, 20, 30 ml przesączu, zależnie od spodziewanej ilości azotanów (III) i rozcieńczyć wodą destylowaną do 30 ml, jeśli to konieczne. Dodać 5 ml roztworu Griessa I, wymieszać, pozostawić bez dostępu światła na 5 minut. Następnie dodać 1 ml odczynnika Griessa II, wymieszać i pozostawić bez dostępu światła na 10 minut. Uzupelnąć wodą destylowaną do kreski, wymieszać. Po 20 minutach wykonać pomiar absorbancji roztworu na spektrofotometrze przy długości fali 538 nm wobec próby kontrolnej, odczynnikowej, przygotowanej tak jak próba właściwa.

Z wykresu kalibracyjnego odczytać masę jonów azotanu (III) wyrażoną w μg odpowiadającą absorbancji badanego roztworu.

Obliczanie wyników oznaczenia

Zawartość azotanu (III) (X) wyrażoną jako jon azotanu (III) (NO_2^-) w mg/kg produktu obliczyć ze wzoru:

$$X = m_1 \cdot \frac{200}{V_1 \cdot m_0}$$

w którym:

m_0 – masa próbki pobrana do oznaczenia (g),

V_1 – objętość przesączu pobrana do oznaczenia spektrofotometrycznego (ml),

m_1 – masa jonów (NO_2^-) zawarta w V_1 objętości przesączu odczytana z wykresu kalibracyjnego (μg),

200 – całkowita objętość przesączu (ml).

Zawartość azotanu (III) w przeliczeniu na azotan (III) sodu (NaNO_2) (X_1) w mg/kg według wzoru:

$$X_1 = 1,5 \cdot X,$$

w którym:

X – zawartość azotanu (III) wyrażona jako jon (NO_2^-), mg/kg .

12.2. Oznaczenie zawartości azotanów (V)

Redukcja azotanów (V) do azotanów (III)

Przenieść za pomocą pipety odpowiednią ilość przesączu do kolby stożkowej ze szlifem o pojemności 50 ml, do której uprzednio dodano 5 ml buforu amonowego oraz 2 g kadmu. Wielkość porcji przesączu powinna być tak dobrana, aby zawierała od 30 do 120 µg jonów azotanu (V) (NO_3^-) – najczęściej 10 ml lub mniej. Kolbę zamknąć korkiem i wstrząsać na wstrząsarce przez 30 minut. Następnie zawartość kolb przesączyć przez bibułę filtracyjną, zbierając przesącz do cylindra miarowego o pojemności 50–100 ml. Przemycać bibułę małymi porcjami wody destylowanej zbierając popłuczyny do cylindra aż do uzyskania 50 ml przesączu. Przesącz wymieszać i pobrać odpowiednie ilości do oznaczania fotometrycznego.

Wykonanie oznaczenia wg pkt. 12.1.

Obliczanie wyników oznaczenia

Zawartość azotanów (X_2) wyrażoną jako jon azotanu (V) (NO_3^-) w mg/kg produktu obliczyć według następującego wzoru:

$$X_2 = 1,348 \cdot [(m_2 \cdot 10000 / V_2 \cdot V_3 \cdot m_0) - X]$$

w którym:

m_0 – masa próbki pobrana do oznaczenia (g),

m_2 – ogólna masa azotanu (III) jako jon (NO_2^-) zawarta w V_3 objętości przesączu i odczytana z wykresu kalibracyjnego (µg),

V_2 – objętość przesączu pobrana do redukcji azotanu (V) (ml),

V_3 – objętość przesączu pobrana do oznaczenia fotometrycznego (ml),

X – zawartość azotanu (III) oznaczana w próbce (mg/kg),

10000 – iloczyn 200•50; gdzie: 200 to całkowita objętość przesączu (ml), 50 to objętość roztworu po redukcji azotanu (V) (ml),

1,348 – stosunek masy cząsteczkowej jonu (NO_3^-) do jonu (NO_2^-).

Zawartość azotanu (V) w przeliczeniu na azotan (V) sodu (NaNO_3) (X_3) w mg/kg, wyliczyć według wzoru:

$$X_3 = 1,37 \cdot X_2$$

X_2 – zawartość azotanu (V) wyrażona jako jon (NO_3^-) (m/kg).

Aktualnie obowiązują normy określone w Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19.12.2006 przedstawione w tabeli 12.1.

Tabela 12.1. Dopuszczalna zawartość azotanów (V) w warzywach.

Lp	Środki spożywcze	Najwyższe dopuszczalne poziomy (mg NO ₃ ⁻ /kg)	
1.	Świeży szpinak (<i>Spinacia oleracea</i>)		3 500
2.	Szpinak konserwowany, głęboko mrożony lub mrożony		2 000
3.	Świeża sałata (<i>Lactuca sativa</i> L.) (szklarniowa i gruntowa) oprócz sałaty wymienionej w pkt. 4	Zbierana od 1 października do 31 marca sałata uprawiana pod przykryciem sałata uprawiana na otwartej przestrzeni	5 000 4 000
		Zbierana od 1 kwietnia do 30 września sałata uprawiana pod przykryciem sałata uprawiana na otwartej przestrzeni	4 000 3 000
4.	Sałata lodowa	Sałata uprawiana pod przykryciem Sałata uprawiana na otwartej przestrzeni	2 500 2 000
5.	Rokietta siewna (<i>Eruca sativa</i> , <i>Diplotaxis</i> sp., <i>Brassica tenuifolia</i> , <i>Sisymbrium tenuifolium</i>)	Zbierana od 1 października do 31 marca Zbierana od 1 kwietnia do 30 września	7 000 6 000
6.	Przetworzona żywność na bazie zbóż oraz żywność dla niemowląt i małych dzieci		200

Literatura

1. Polski Komitet Normalizacyjny: Owoce, warzywa i ich przetwory. Oznaczanie zawartości azotynów i azotanów, PN-92/A-75112.
2. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1881/2006 z dnia 19.12.2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych (Dz. U. L 364 z 20.12.2006, str. 5-24; z późn. zm. dot. azotanów: Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1258/2011 z dnia 2 grudnia 2011 r.).

13. PODSTAWY MIKROBIOLOGICZNEJ OCENY ŻYWNOŚCI

Mikroflora środków spożywczych obejmuje mikroorganizmy celowo wykorzystywane w produkcji żywności oraz niepożądane.

W wielu procesach produkcji żywności wykorzystywane są mikroorganizmy i ich zdolność fermentacji. Fermentacja (od łac. *ferentatio*, *fermentum* – kipienie, moszcz) to energetwórczy proces utleniania przez drobnoustroje substratu węglowego z udziałem enzymów w cyklu przemian katabolicznych z powstaniem energii metabolicznej i produktu ubocznego. Zastosowanie mikroorganizmów w produkcji żywności jest bardzo szerokie, np. produkcja fermentowanych przetworów mlecznych (*Lactobacillus delbruecki*, *Streptococcus thermophilus*), produkcja etanolu w przemyśle gorzelniczym, produkcji piwa, wina (selekcjonowane szczepy drożdży *Saccharomyces*: *S. uvarum*, *S. cerevisiae*, *S. bayanus*); kwaszenie (kiszzenie warzyw (*Lactobacillus* – *L. delbruecki*, *L. leichmani*, *L. lactis*; *Bifidobacterium*). W środkach spożywczych mogą również występować drobnoustroje powodujące psucie żywności i/lub chorobotwórcze. W tym względzie mikrobiologia żywności jest ściśle związana z jej bezpieczeństwem. W związku z tym w środkach spożywczych powinna być prowadzona bieżąca kontrola jakości mikrobiologicznej. Środki spożywcze, które najczęściej są przyczyną zatrucia to jaja; mleko i przetwory mleczne; mięso i przetwory mięsne. W mikrobiologicznej ocenie żywności stosowanych jest wiele metod bezpośrednich i pośrednich ilościowego oznaczania drobnoustrojów:

- metody mikroskopowe (preparaty barwione, oznaczanie za pomocą komory zliczeniowej, np. Thoma);
- oznaczanie liczby drobnoustrojów metodą płytkową (metoda posiewu zalewowego lub powierzchniowego), np. ogólnej liczby drobnoustrojów;
- oznaczanie miana (parametr określający najmniejszą ilość badanego produktu, w której nie stwierdza się obecności drobnoustrojów (np. pałeczek z grupy *coli*);
- oznaczania najbardziej prawdopodobnej liczby (NPL) drobnoustrojów;
- metoda z zastosowaniem sączków membranowych (metoda stosowana do próbek płynnych o niewielkim stopniu zanieczyszczenia drobnoustrojami);
- metody polegające na pomiarze określonych metabolitów (np. ergosterolu wytwarzanego przez pleśnie);

- metody kolorymetryczne (testy zmiany barwy podłoża wzrostowych, w miarę wzrostu drobnoustrojów, w wyniku zmiany pH, potencjału oksydoredukcyjnego, obecności wolnych grup aminowych);
- metody impedymetryczne (oparte na zmianie całkowitego oporu w środowisku, na skutek aktywności metabolicznej drobnoustrojów);
- sprawdzenie szczelności metodą próżniową;
- próba organoleptyczna;
- metody chromatograficzne (np. do określenia zawartości lotnych metabolitów pleśni);
- inne, np. metoda cytometrii przepływowej, mikrokalorymetryczna, ultradźwiękowa, ocena zmiany lepkości produktu.

13.1. Mikrobiologiczna ocena mleka spożywczego

Jakość mikrobiologiczną produktów mleczarskich określona jest w dyrektywie Rady nr 92/46/EWG. Jednym z parametrów oceniających tą jakość jest ogólna liczba drobnoustrojów w 1 ml mleka. Liczba bakterii zawartych w 1 ml surowego mleka krowiego, przeznaczonego do produkcji przetworów mlecznych nie może przekraczać 100 000 (10^5).

Aparatura i sprzęt

- Mieszadło typu Vortex;
- inkubator;
- sterylizator parowy;
- palnik laboratoryjny;
- ezy bakteriologiczne;
- sterylne szkło laboratoryjne (płytki Petriego, probówki, koreczki plastikowe, kolby, cylindry, pipety);
- pipety automatyczne i sterylne końcówki do pipet.

Odczynniki

- Płyn fizjologiczny z peptonem:

pepton - 1g, chlorek sodu - 8,5g, woda destylowana - 1000 ml, składniki rozpuścić, podgrzać, ustalić $\text{pH}=7,0 \pm 0,1$ dodając 0,1 mol/l NaOH lub 0,1 mol/l HCl. Rozlać po 4,5 ml do probówek, sterylizować;

- pożywka Coli ID;

- podłoże PCA z ekstraktem drożdżowym i glukozą:

pepton-trypton - 5g, ekstrakt drożdżowy - 2,5g, glukoza - 1g, odtłuszczone mleko w proszku bez substancji hamujących - 1g, agar - 10-15g, woda destylowana - 1000 ml.

Podłoża przygotować zgodnie z instrukcją producenta.

- rozcieńczalnik:

płyn Ringera z wodą 1:3 lub 0,9% NaCl.

Przygotowanie próbek

Wykonać dziesiętne rozcieńczenia mleka z 10 ml próbki. Pierwsze rozcieńczenie wykonać w kolbie o pojemności 250 ml: do 90 ml rozcieńczalnika dodać 10 ml próby, dokładnie wymieszać (rozcieńczenie 1:10); z tego rozcieńczenia pobrać 0,5 ml i przenieść do 4,5 ml rozcieńczalnika (rozcieńczenie 1:100), postępować w ten sam sposób do uzyskania rozcieńczenia 1:100000 (10^{-5}). Rozcieńczenia należy wykonywać przy płomieniu palnika, poprzez przenoszenie 0,5 ml każdego kolejnego rozcieńczenia do 4,5 ml płynu rozcieńczającego, używając każdorazowo oddzielnej pipety lub końcówki do pipety automatycznej, każdorazowo mieszając zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.

13.1.1. Oznaczanie metodą płytkową w temperaturze 30°C ogólnej liczby drobnoustrojów

Zasada metody

Metoda polega na posiewie określonej ilości próbki i jej dziesiętnych rozcieńczeń do 2 równoległych płytek Petriego, inkubacji z pożywką agarową PCA w warunkach tlenowych, a następnie zliczeniu kolonii. Ilość kolonii przeliczana jest na 1 ml lub 1 mg próbki.

Wykonanie oznaczenia

Z kolejnych rozcieńczeń należy wykonać 2 posiewy równoległe na płytce Petriego po 1 ml próby (posiew wgłębny). Zalać płytki po 15 ml podłoża agarowego o temperaturze 45°C. Delikatnym ruchem (trzykrotnie w prawo, w lewo, w górę i dół) należy przesuwać płytkę, aby podłoże równomiernie pokryło jej dno. Płytki pozostawić do

zastygnięcia pożywki, następnie odwrócić dnem i inkubować w cieplarni w temp. 30°C przez 72 h.

W celu dokonania posiewu powierzchniowego należy 10 µl lub 100 µl każdego rozcieńczenia rozprowadzić głaszczką (zanurzoną w denaturacie i opaloną nad płomieniem palnika) po powierzchni uprzednio przygotowanej płytki z podłożem agarowym. Płytki inkubować w cieplarni w temp. 30°C przez 72 h.

Po tym czasie należy zliczyć kolonie wyrosłe na płytkach. Do badania zastosować próby kontrolne pożywki i rozcieńczalnika.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Do obliczeń należy wybrać płytki, na których liczba wyrosłych kolonii bakterii zawiera się w przedziale 10-300, natomiast grzybów <150. Bierze się pod uwagę dwa sąsiadujące ze sobą rozcieńczenia. Liczbę drobnoustrojów w 1 ml próbki (L) obliczyć według wzoru:

$$L = C/[V(N_1 + 0,1 N_2) d],$$

w którym:

C – suma kolonii na wszystkich płytkach wybranych do liczenia,

V – objętość posiewanego materiału (ml),

*N*₁ – liczba płytek z pierwszego liczonego rozcieńczenia,

*N*₂ – liczba płytek z drugiego liczonego rozcieńczenia,

d – wskaźnik rozcieńczenia odpowiadający najniższemu liczonemu rozcieńczeniu (np. 10⁻³ = 1/10³)

13.1.2. Oznaczanie liczby *Escherichia coli* przy użyciu podłoża Coli ID

Zasada metody

Metoda polega na posiewie określonej ilości próbki i jej dziesiętnych rozcieńczeń do płytek Petriego, inkubacji z pożywką Coli ID w warunkach tlenowych, a następnie zliczeniu różowoczerwonych kolonii *Escherichia coli*. Ilość kolonii przeliczana jest na 1 ml lub 1 mg próbki.

Wykonanie oznaczenia

Z kolejnych rozcieńczeń należy wykonać posiewy na płytki Petriego po 1 ml próby. Zalać płytki po 15 ml podłoża Coli ID o temperaturze 45°C. Rozprowadzić pożywkę równomiernie. Płytki inkubować w cieplarni w temp. 30°C przez 72 h.

W celu dokonania posiewu powierzchniowego należy 10 µl lub 100 µl każdego rozcieńczenia rozprowadzić gładką (zanurzoną w denaturacji i opaloną nad płomieniem palnika) po powierzchni uprzednio przygotowanej płytki z podłożem agarowym. Płytki inkubować w cieplarni w temp. 30°C przez 72 h.

Po tym czasie należy zliczyć kolonie wyrosłe na płytkach. Do badania zastosować próby kontrolne pożywki i rozcieńczalnika.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Do obliczeń należy wybrać płytki, na których liczba wyrosłych kolonii bakterii zawiera się w przedziale 10-300, natomiast grzybów <150. Bierze się pod uwagę dwa sąsiadujące ze sobą rozcieńczenia. Liczbę drobnoustrojów w 1 ml próbki (L) obliczyć według wzoru – j.w.

13.2. Oznaczenie liczby drożdży i pleśni w wyrobach ciastkarskich

Zasada metody

Metoda polega na posiewie, w odpowiednich rozcieńczeniach środka spożywczego do płytek Petriego i zastosowaniu odpowiedniej pożywki selektywnej, inkubacji posiewów w temperaturze 25°C przez 3 do 5 dni, obliczeniu typowych kolonii i podaniu liczby drożdży i pleśni w 1 g próbki.

Aparatura i sprzęt

- Mieszadło typu Vortex;
- inkubator;
- sterylizator parowy;
- palnik laboratoryjny;
- ezy bakteriologiczne;
- sterylne szkło laboratoryjne (płytki Petriego, probówki, koreczki plastikowe, kolby, cylindry, pipety);
- pipety automatyczne i sterylne końcówki do pipet.

Odczynniki

- Rozcieńczalnik – płyn fizjologiczny z peptonem;
- pożywka agarowa Sabouraud

pepton - 10g, glukoza - 40g, agar - 10-15g, woda destylowana - 1000 ml. Podłoże przygotować zgodnie z instrukcją producenta.

Przygotowanie próbek

Odważyć 10 g próby, dodać 90 ml rozcieńczalnika i homogenizować w sterylnych warunkach. Wykonać dziesiętne rozcieńczenia homogenatu. Pierwsze rozcieńczenie wykonać w kolbie o pojemności 250 ml: do 90 ml rozcieńczalnika dodać 10 ml próby, dokładnie wymieszać (rozcieńczenie 1:10). Rozcieńczenia (do otrzymania 1:1000) należy wykonywać przy płomieniu palnika, poprzez przenoszenie 0,5 ml każdego kolejnego rozcieńczenia do 4,5 ml płynu rozcieńczającego, używając każdorazowo oddzielnej pipety lub końcówki do pipety automatycznej, za każdym razem mieszając zawartość probówki na mieszadle typu Vortex.

Wykonanie oznaczenia

Z kolejnych rozcieńczeń przenieść po 1 ml na co najmniej 2 równoległe płytki Petriego i zalać około 15 ml schłodzonej do 45°C pożywki. Rozprowadzić pożywkę równomiernie. Płytki inkubować w cieplarni w temp. 25°C przez 3-5 dni.

Pierwszą obserwację wzrostu należy przeprowadzić po 3 dniach. Po tym czasie należy zliczyć kolonie wyrosłe na płytkach, wybierając płytki, w których wyrosło od 15 do 150 kolonii. Kolonie drożdży i pleśni należy zliczać oddzielnie. Do badania zastosować próby kontrolne pożywki i rozcieńczalnika.

Drożdże rosną w postaci różnobarwnych błyszczących kolonii, pleśnie natomiast tworzą różnobarwne kolonie o wyglądzie meszku. W przypadkach wątpliwych należy wykonać badania mikroskopowe.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Do obliczeń należy wybrać płytki, na których liczba wyrosłych kolonii grzybów zawiera się w przedziale 15-150. Bierze się pod uwagę dwa sąsiadujące ze sobą rozcieńczenia. Liczbę pleśni lub drożdży w 1 g próbki (N) obliczyć według wzoru j.w.

Wynik przedstawić jako liczbę w przedziale $1,0-9,9 \times 10^n$.

Literatura

1. Dyrektywa Rady 92/46/EWG z dnia 16 czerwca 1992 r. Ustanawiająca przepisy zdrowotne dla produkcji i wprowadzania do obrotu surowego mleka, mleka poddanego obróbce termicznej i produktów na bazie mleka. (Dz. U. L. 31992L0046)
2. Steinka I., Przybyłowski P.: Podstawy mikrobiologicznej analizy żywności. Wyższa Szkoła Morska w Gdyni, 2001.

14. SUBSTANCJE ANTYODŻYWCZE W ŻYWNOSCI

Należą do nich substancje utrudniające optymalne wykorzystanie składników odżywczych pożywienia. Dzieli się je na grupy w zależności od składników odżywczych w stosunku do których wykazują antyodżywcze działanie, tj. utrudniające wykorzystanie białka, węglowodanów, witamin, składników mineralnych.

Substancje utrudniające wykorzystanie białek i węglowodanów mają charakter inhibitorów enzymów trawiennych, takich jak tripsyna, chymotrypsyna, amylazy.

Substancje zmniejszające optymalne wykorzystanie witamin to enzymy (akorbinaza, tiaminaza) powodujące rozkład witamin do związków nieaktywnych lub związki tworzące z nimi nieprzyswajalne z przewodu pokarmowego połączenia (awidyna w stosunku do biotyny). Inny mechanizm działania wykazują substancje o budowie podobnej do określonej witaminy, które wchodząc w przemiany metaboliczne zamiast witaminy nie mogą spełniać jej funkcji (dikumarol w stosunku do witaminy K).

Do substancji antyodżywczych utrudniających wykorzystanie składników mineralnych zalicza się przede wszystkim te, które tworzą z nimi trudno rozpuszczalne połączenia (kwas szczawiowy, fityniany, taniny, wielofosforany, polifenole) oraz konkurujące z nimi w procesach wchłaniania lub wychwytywania przez tkanki docelowe (siarkocyjanki) a także wpływające na gospodarkę tymi pierwiastkami (siarkocyjanki, karbaminiany).

Substancje antyodżywcze występują w produktach spożywczych naturalnie, mogą być celowo do nich dodawane (np. fosforany) lub występować jako zanieczyszczenia.

14.1. Oznaczanie szczawianów w kawie i herbacie

Kwas szczawiowy należy do substancji naturalnie obecnych w żywności i może wykazywać antyodżywcze działanie w stosunku do składników mineralnych, tworząc nierozpuszczalne sole z metalami dwu- i trójwartościowymi powodując obniżenie ich wykorzystania z pożywienia.

Kwas szczawiowy jest to kwas dikarboksylowy $(\text{COOH})_2$ z dwoma atomami węgla w cząsteczce. Jest rozpuszczalny w wodzie, jego sole sodowe i potasowe są również rozpuszczalne w wodzie, natomiast sole wapniowe, magnezowe i sole metali ciężkich są bardzo trudno rozpuszczalne w wodzie. Szczawian wapnia jest praktycznie

rozpuszczalny tylko w stężonych kwasach. Znaczne ilości kwasu szczawiowego zawierają produkty pochodzenia roślinnego.

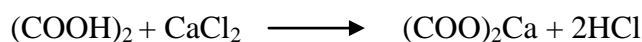
Biorąc pod uwagę stosunek kwasu szczawiowego do wapnia (dla uproszczenia pomija się inne pierwiastki), produkty spożywcze można podzielić na 3 grupy:

1. Produkty, w których zawartość kwasu szczawiowego wielokrotnie przekracza zawartość wapnia: szpinak, szczaw, rabarbar, botwina, burak, herbata, kawa, kakao. Wapń występujący w tych produktach jest praktycznie niedostępny, a ponadto nadmiar kwasu może wiązać wapń z innych produktów spożywanych jednocześnie lub jony szczawianowe mogą być wchłaniane do krwi. Wtedy można spodziewać się toksycznego działania kwasu szczawiowego.
2. Produkty takie jak: ziemniaki, owoce jagodowe, w których kwas szczawowy i wapń występują w prawie równoważnych ilościach, więc wapń jest praktycznie w formie nierozpuszczalnej, lecz spożywanie tych produktów nie ogranicza biodostępności wapnia z innych produktów spożywanych jednocześnie.
3. Produkty spożywcze, które mimo występowania w nich kwasu szczawiowego zawierają dużo wapnia i stanowią jego źródło. Należą do nich rośliny strączkowe, sałata, kapusta, kalafior.

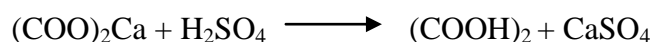
Zasada metody

Szczawiany rozpuszczalne wmywane są z produktu wodą na gorąco, a szczawiany ogółem – roztworem kwasu siarkowego. Oznaczenie polega na:

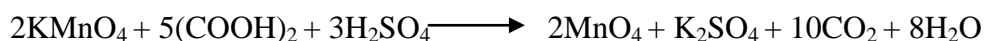
- wytrąceniu nierozpuszczalnego szczawianu wapnia (osadu) buforowym 5-procentowym roztworem CaCl_2 (aceton i niska temperatura przyspieszają proces)



- rozpuszczeniu na gorąco szczawianu wapnia w 10-procentowym roztworze kwasu siarkowego (VI)



- miareczkowaniu na gorąco 0,1 M KMnO_4 :



Aparatura i sprzęt

- Waga techniczna;
- wirówka;
- łaźnia wodna;
- szkło laboratoryjne (probówki wirówkowe, biureta o pojemności 25 cm³, zlewki, pipety, kolby stożkowe pojemności 100 cm³, bagietki szklane, lejki, sączki bibułowe).

Odczynniki

- Chlorek wapnia (CaCl₂), 5%;
- aceton;
- kwas siarkowy (VI) (H₂SO₄), 10%;
- manganian (VII) potasu (KMnO₄) 0,1 mol/l.

Wykonanie oznaczenia

Odważyć na wadze technicznej łyżeczkę (3g) kawy lub herbaty, zalać 100 cm³ wrzącej wody destylowanej, odczekać 5 minut. Z przyrządzonego naparu przenieść (po ewentualnym przesączeniu) 10 cm³ do probówki wirówkowej. Dodać 5 cm³ 5-procentowego roztworu CaCl₂ i 5 cm³ acetonu. Wstawić do lodówki na 30 minut. Powstały osad szczawianu wapnia odwirować przez 10 minut przy 3000 obr./min. Płyn nad osadu wylać. Osad przenieść ilościowo do kolbki stożkowej na 100 cm³ za pomocą 5 cm³ 10-procentowego kwasu siarkowego (VI) i rozpuścić na gorąco w łaźni wodnej. Miareczkować natychmiast 0,1 M roztworem KMnO₄ do uzyskania barwy różowej utrzymującej się około 1 minuty.

- Obliczyć ilość rozpuszczalnego kwasu szczawowego w 100 g produktu, przyjmując, że 1 cm³ 0,1 M KMnO₄ odpowiada 0,9 mg (COOH)₂
- Podać, jaka ilość wapnia jest wiązana przez rozpuszczalny kwas szczawowy, zawarty w naparze przygotowanym z 3g kawy lub herbaty, wiedząc, że 90 mg kwasu szczawowego wiąże 40 mg wapnia
- Podać ile mleka należy dodać do naparu sporządzonego z 3g kawy lub herbaty, aby wapń zawarty w mleku związał rozpuszczalny kwas szczawowy z naparą (w 100 g mleka jest 100 mg wapnia).

14.2. Oznaczanie zawartości tiocyjanków

Goitrogeny, czyli substancje wolotwórcze, są to różne związki organiczne oraz jony nieorganiczne, które mogą zaburzać metabolizm jodu w organizmie. Konsekwencją ich działania jest spadek syntezy tyroksyny oraz przerost tarczycy. Do naturalnych substancji wolotwórczych należą tioglikozydy, glikozydy cyjanogenne, polifenole oraz hemaglutyniny.

Tioglikozydy występują głównie w roślinach krzyżowych, takich jak: kapusta biała, kapusta włoska, jarmuż, rzeżucha, brokuły, kalafior, rzepa, rzodkiewka. Do organizmu człowieka trafiają przez bezpośrednie spożywanie wyżej wymienionych warzyw lub dostają się wraz z mlekiem pochodzącym od krów, karmionych paszą zawierającą dużą ilość roślin krzyżowych. Znanych jest obecnie około stu tioglikozydów.

Pod wpływem tioglikozydazy tioglikozydy ulegają hydrolizie i powstają z nich tiocyjaniany, izotiocyjaniany, związki indolowe, nitryle oraz tiooksazolidyny.

Enzymatyczny rozkład tioglikozydów ma miejsce w czasie żucia w jamie ustnej, a także przy rozdrabnianiu warzyw podczas przygotowywania potraw. Ekstrakcja wodą oraz gotowanie uwalnia większość aktywnych tioglikozydów. W czasie gotowania niektóre glikozydy ulegają destrukcji pod wpływem temperatury z wytworzeniem nitryli. Większość tiocyjanków jest lotna i podczas gotowania warzyw w otwartym naczyniu ulatnia się z parą wodną.

Glikozydy, które nie ulegną hydrolizie podczas jedzenia czy przygotowywania potraw w przewodzie pokarmowym ulegają hydrolizie pod wpływem tioglikozydazy bakteryjnej.

Zasada metody

Metoda polega na wyekstrahowaniu tiocyjanków z badanej próby kwasem trichlorooctowym i przeprowadzeniu reakcji z jonami żelazowymi. W środowisku kwaśnym powstaje krwistoczerwone zabarwienie na skutek tworzenia się kompleksów od $\text{Fe}(\text{SCN})^{+2}$ do $\text{Fe}(\text{SCN})_6^{3-}$

Odczynniki

- Kwas trichlorooctowy, roztwór 5 %;
- azotan (V) żelaza (III)

80 g $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \times 9 \text{H}_2\text{O}$ rozpuścić w 250 ml 2 N kwasu azotowego, uzupełnić do 500ml.

Aparatura i szkło laboratoryjne

- Spektrofotometr;
- wirówka;
- sprzęt do rozdrabniania warzyw (deska, nóż, tarka);
- waga;
- płaszcze grzejne;
- wytrząsarka;
- zlewki pojemności 100 ml;
- moździerz porcelanowy z pistlem pojemności 100 ml;
- cylindry miarowe pojemności 50 ml;
- probówki wirówkowe pojemności 25 ml;
- lejki średnie;
- kolby stożkowe z doszlifowanym korkiem pojemności 100 ml;
- probówki;
- pipety;
- bibuła filtracyjna.

Sporządzenie krzywej wzorcowej:

Przygotować roztwór podstawowy jonów SCN^- , rozpuszczając 16,7 mg rodunku potasowego (m. cz. 97,18) w 1000 ml 5 % kwasu trichlorooctowego (roztwór A), następnie 10 ml tego roztworu rozcieńczyć tym samym kwasem do 100 ml, uzyskując w ten sposób roztwór wzorcowy B, którego 1 ml zawiera 10 μg jonów SCN^- . Z tego roztworu przygotowuje się krzywą wzorcową według schematu podanego poniżej, pobierając do kolejnych probówek 0-5 ml wzorca i uzupełniając do 5 ml TCA.

roztwór B	5 % TCA	azotan żelaza	stężenie
ml	ml	ml	$\mu\text{g/ml}$
0	5	5	0 (ślepa)
1	4	5	2
2	3	5	4
3	2	5	6
4	1	5	8
5	0	5	10

Dodać azotan żelaza. Zmierzyć absorbancję wobec próby ślepej przy dł. fali 470 nm.

Wykonanie oznaczenia

Z jednorodnej rozdrobnionej próby badanego materiału przygotować dwie naważki po 5 g. Jedną z nich przenieść do zlewki na 100 ml, dodać 50 ml wody i ogrzewać, utrzymując w lekkim wrzeniu przez 10 min.

Surowy i gotowany (po odlaniu wody) materiał rozetrzeć dokładnie w porcelanowym moździerzu, przenieść ilościowo do kolby stożkowej z doszlifowanym korkiem używając 45 ml 5 % roztworu kwasu trichlorooctowego (TCA) i wytrząsać przez 10 min. Następnie próbki odwirować przy 3000 obr./min. przez 10 min. i sączyć przez twardy sączek.

Z każdego przesączu (po dokładnym wymieszaniu) pobrać po 2 ml do dwóch probówek. Do jednej probówki dodać 2 ml wody (ślepa próba), a do drugiej 2 ml roztworu azotanu żelaza (od tej chwili przetrzymywać próby bez dostępu światła). Przygotować próbę ślepa odczynnikową, biorąc 2 ml wody i 2 ml azotanu żelaza.

Zmierzyć absorbancję prób właściwych i ślepych wobec wody przy długości fali 470 nm w czasie nie dłuższym niż 5 min od dodania azotanu żelaza. Stężenie siarkocyjanków w badanej próbce odczytać z krzywej wzorcowej pomniejszając uzyskaną absorbancję o wartości odpowiednich prób ślepych (ślepej próby i ślepej odczynnikowej). Wynik przeliczyć na naważkę i na 100 g produktu.

15. OCENA PRZYDATNOŚCI WODY DO PICIA

Zawartość wody w organizmie dorosłego człowieka powinna być stała – bilans zerowy. Wyjątek stanowi okres wzrostu i ciąża, gdzie obserwowany jest dodatni bilans wody. Zapotrzebowanie dobowe dla dorosłego człowieka, zgodnie z najnowszymi zaleceniami wynosi dla kobiet 2000 ml, a dla mężczyzn 2500 ml.

Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 29 marca 2007 w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz. U. 2007, nr 61, poz. 417, z późn. zm. Dz. U. 2010, nr 72, poz. 466) określa wymagania mikrobiologiczne, chemiczne, organoleptyczne, fizykochemiczne oraz radiologiczne, jakim powinna odpowiadać woda przeznaczona do spożycia, w tym woda pochodząca z sieci dystrybucyjnej.

Parametry opisujące przydatność wody do picia:

I. Wymagania fizyczne i organoleptyczne:

1. Barwa, smak, zapach – akceptowalne przez konsumentów i bez nieprawidłowych zmian
2. Mętność – max. 1 NTU (*ang. Nephelometric Turbidity Unit* – nefelometryczna jednostka mętności)
3. pH – 6,5 – 9,5
4. Przewodność – 2500 uS/cm (w temp. 25 st. C)
5. Utlenialność z KMnO₄ – max. 5 mg/l
6. Twardość – 60-500 mg/l (w przeliczeniu na węglan wapnia). Wartość zalecana ze względów zdrowotnych, ale nie nakłada obowiązku uzupełniania minimalnej zawartości.

II. Parametry mikrobiologiczne:

Escherichia coli – 0jtk./100 ml;

enterokoki – 0jtk./100 ml;

Clostridium perfringens łącznie ze sporami – 0jtk./100 ml.

III. Parametry chemiczne, najwyższe dopuszczalne stężenia:

- | | |
|-----------------------------------|---|
| 1. Jon amonowy 0,50 mg/l | 18. Glin 0,2 mg/l |
| 2. Akryloamid 0,10 µg/l | 19. Kadm 0,005 mg/l |
| 3. Antymon 0,005 mg/l | 20. Mangan 0,05 mg/l |
| 4. Arsen 0,010 mg/l | 21. Miedź 2,0 mg/l |
| 5. Azotany (V) 50 mg/l | 22. Nikiel 0,020 mg/l |
| 6. Azotany (III) 0,50 mg/l | 23. Ołów 0,0107 mg/l |
| 7. Benzen 1,0 µg/l | 24. Pestycydy 0,10 µg/l |
| 8. Benzo(a)piren 0,010 µg/l | 25. Suma Pestycydów 0,50 µg/l |
| 9. Bor 1,0 mg/l | 26. Rtęć 0,001 mg/l |
| 10. Bromiany 0,010 mg/l | 27. Selen 0,010 mg/l |
| 11. Chlorki 250 mg/l | 28. Siarczany 250 mg/l |
| 12. Chlorek winylu 0,50 µg/l | 29. Sód 200 mg/l |
| 13. Chrom 0,050 mg/l | 30. Suma Trichloroetenu
i Tetrachloroetenu 10 µg/l |
| 14. Cyjanki 0,050 mg/l | 31. Suma WWA 0,10 µg/l |
| 15. 1,2 – Dichloroetan 3,0 µg/l | 32. Suma THM 100 µg/l |
| 16. Epichlorohydryna 0,10 µg/l | 33. Żelazo 0,20 mg/l |
| 17. Fluorki 1,5 mg/l | |

Literatura

1. Jarosz M. Normy żywienia dla populacji polskiej - nowelizacja. Instytut Żywności i Żywienia, Warszawa 2012.
2. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dn. 29 marca 2007 w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz. U. 2007, nr 61, poz. 417, z późn. zm. Dz. U. 2010, nr 72, poz. 466)
3. Ustawa z dnia 7 czerwca 2001 r. o zbiorowym zaopatrzeniu w wodę i zbiorowym odprowadzaniu ścieków (Dz. U. 2001 nr 72 poz. 747, tekst jednolity: Dz. U. 2006 nr 123 poz. 858)

16. METODY OCENY JAKOŚCI MIODÓW PSZCZELICH

Miód - to naturalny słodki produkt wytwarzany przez pszczoły *Apis mellifera* przez łączenie z własnymi specyficznymi substancjami nektaru roślin lub wydzielin żywych części roślin, lub wydalin owadów ssących soki żywych części roślin, składowany, odparowywany i pozostawiony do dojrzewania w plastrach.

W zależności od pochodzenia rozróżnia się następujące **rodzaje miodu**:

- a) miód nektarowy (N) - będący miodem wytwarzanym przez pszczoły z nektaru roślin, wydzielanego z nektarników kwiatowych lub pozakwiatowych,
- b) miód spadziowy (S) - będący miodem wytwarzanym przez pszczoły głównie z wydalin owadów ssących soki żywych części roślin lub wydzielin żywych części roślin,
- c) miód nektarowo-spadziowy (NS) - będący miodem wytwarzanym przez pszczoły z nektaru roślin i z wydalin owadów ssących soki żywych części roślin lub wydzielin żywych części roślin.

Rozróżnia się następujące **odmiany miodu**:

1) nektarowego:

a) pochodzący z określonej rośliny, określane nazwą tej rośliny (rzepakowy, akacjowy, lipowy, gryczany, wrzosowy),

b) wielokwiatowy - pochodzący z wielu roślin;

2) spadziowego:

a) ze spadzi liściastej,

b) ze spadzi iglastej.

O jakości miodów decyduje zawartość cukrów redukujących i sacharozy (patrz rozdz. 5.1.2.), obecność enzymów, proliny, składników mineralnych (patrz rozdz. 9.1.) i wody oraz ilość hydroksymetylofurfuralu i pierwiastków toksycznych (patrz rozdz. 9.2.).

16.1. Analiza pyłkowa

Zasada metody

Oznaczenie polega na określeniu procentowego udziału pyłków poszczególnych gatunków roślin w osadzie miodowym. Pyłek, który występuje w znacznej przewadze w porównaniu do innych pyłków określa się jako przewodni, a miód z tej rośliny uznawany jest za odmianowy.

Aparatura i szkło laboratoryjne:

- Waga;
- wirówka (3000 obr./min.) z probówkami na 20 ml;
- mikroskop;
- szkiełka podstawowe i nakrywkowe.

Przygotowanie próby

Odważyć 10 g miodu do próbki wirówkowej o pojemności 20 ml i uzupełnić do 20 ml wodą destylowaną podgrzaną do temp 50 st. C. Miód rozpuścić mieszając bagietką. Probówkę wstawić do wirówki i wirować przez 5 min. z prędkością 3000 obr./min.

Wykonanie oznaczenia

Nadsącz delikatnie odpipetować pipetą automatyczną, aby nie zmacić osadu. Jeśli osadu jest mało (ok. 0,1 ml) pozostawić nad nim warstwę 0,5 cm, a jeżeli dużo (0,3 ml) – 1 cm warstwę wody. Osad zmieszać i rozprowadzić równomiernie na szkiełku przedmiotowym, na którym od spodu zaznaczono granice 1 cm². Otrzymany preparat lekko posuszyć i obserwować pod mikroskopem w 100-krotnym powiększeniu. Na obserwowanej powierzchni można umieścić kroplę glicerożelatyny i przykryć szkiełkiem nakrywkowym. Na powierzchni 1 cm² przeliczyć 300 kolejnych ziaren pyłku identyfikując ich rodzaj (Ryc. 16.1) i zestawiając ich ilość w tabeli. Gatunki nie określone zapisać jako „inne”. Oddzielnie wyodrębnić ziarna pyłku roślin wiatropylnych i nie nektarujących.

Obliczanie wyników oznaczenia

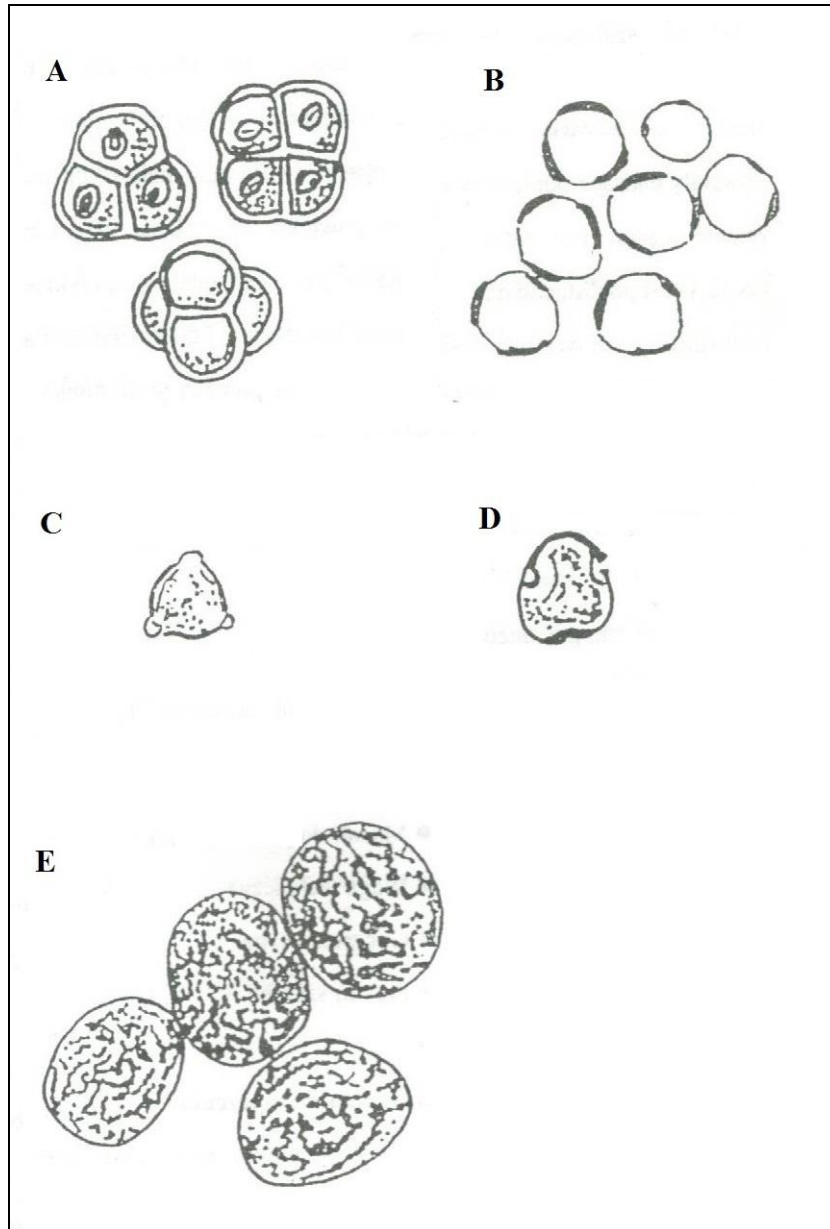
Od policzonych 300 ziaren pyłku odjąć wszystkie ziarna pyłku roślin wiatropylnych i nie nektarujących. Udział pyłku przewodniego (X) obliczyć w procentach wg wzoru:

$$X = (p \times 100) / z$$

w którym:

p – liczba ziaren pyłku przewodniego;

z – liczba ziaren pyłku roślin nektarujących



Ryc. 16.1. Różne rodzaje pyłków: A – wrzosowy, B – rzepakowy, C – akacjowy, D – lipowy, E – gryczany.

16.2. Oznaczanie aktywności diastatycznej miodu

Cennymi składnikami miodu pod względem ich właściwości leczniczych są enzymy. Pochodzą one głównie z wydzieliny gruczołów ślinowych pszczół, a także z ziaren pyłku kwiatowego oraz ze spadzi. Do najważniejszych należy zaliczyć:

- inwertazę, która powoduje rozpad sacharozy do glukozy i fruktozy, czyli wywołuje tak zwaną inwersję,
- amylazy: alfa-amylaza prowadzi przemianę skrobi do dekstryn, natomiast beta-amylaza ich dalszy rozpad do maltozy (enzymy te zwane też są diastazami),
- oksydazę glukozy - enzym powodujący utlenianie glukozy do kwasu glukonowego (w reakcji tej powstaje także ditlenek diwodoru - związek o silnych właściwościach przeciwdrobnoustrojowych).

W miodzie stwierdzono również występowanie kilkunastu innych enzymów, w tym lizozymu.

Liczba diastazowa w naturalnych miodach pszczelich nie powinna być mniejsza niż 8 (według skali Schade), z wyjątkiem miodu piekarniczego (przemysłowego), z tym że nie mniej niż 3 – w miodzie z naturalnie niską aktywnością enzymów oraz zawartością HMF nie więcej niż 15 mg/kg.

16.2.1. Oznaczanie liczby diastazowej miodu wg PN-88/A-77626

Zasada metody

Aktywność diastatyczną miodu określa się na podstawie rozkładu roztworu skrobi następującego pod wpływem znajdującego się w miodzie enzymu α -amylazy.

Odczynniki i roztwory

- Alkohol etylowy, 96 % (v/v);
- chlorek sodu, 0,1 mol/l;
- eter etylowy;
- fenoloftaleina, 1 % w/w w alkoholu etylowym 95 %;
- jod 0,05 mol/l;
- kwas octowy 0,02 mol/l;
- kwas chlorowodorowy 2mol/l;

- roztwór skrobi: 20 g skrobi ziemniaczanej gotować w kolbie stożkowej pojemności 500 ml w mieszaninie złożonej ze 100 ml 96 % (v/v) alkoholu etylowego i 7 ml 2 mol/l roztworu kwasu chlorowodorowego. Gotować przez 1 h w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną. Podczas gotowania kolba powinna być zanurzona w kąpeli wodnej. Po ostudzeniu odsączyć skrobię na lejku sitowym Buchnera, przemyć 96 % (v/v) alkoholem etylowym do zaniku reakcji na jon chlorkowy (próba z azotanem srebra), następnie przemyć dwukrotnie eterem etylowym i suszyć w temp 35 °C. Tak przygotowaną skrobię przechowywać w ciemnym, szczelnie zamkniętym naczyniu nie dłużej niż pół roku;

- skrobia rozpuszczalna, 1 %: w kolbie stożkowej ogrzewać 75 ml wody do temperatury wrzenia. Do wrzątku wlać zawiesinę 1 g skrobi w zimnej wodzie, a naczynie popłukać trzykrotnie, aby całość skrobi dostała się do wrzątku. Ciągłe mieszanie roztwór powinien wrzeć około 10 minut, a następnie po schłodzeniu należy przelać go do kolby miarowej pojemności 100 ml i uzupełnić wodą do kreski. Prawidłowo przygotowany roztwór powinien być przezroczysty i wykazywać lekką opalescencję.

- toluen;

- wodorotlenek sodu, NaOH, 0,05 mol/l.

Aparatura i sprzęt laboratoryjny

- Łaźnia wodna;

- zlewki o pojemności 50 ml;

- kolby miarowe o pojemności 100 ml;

- probówki z doszlifowanym korkiem;

- biureta;

- pipety; bagietki szklane.

Wykonanie oznaczenia

10 g miodu zważonego z dokładnością do 0,001 g rozpuścić w 25 ml zimnej wody destylowanej wysyconej toluenem. Do roztworu dodać 1-2 krople fenoloftaleiny i zmiareczkować 0,05 mol/l roztworem wodorotlenku sodu do słabo różowego zabarwienia. Roztwór przenieść do kolby miarowej na 100 ml i dopełnić wodą do kreski.

Do 12 probówek, oznaczonych od 1 do 12 umieszczonych w statywie dodawać kolejno: roztwór miodu, wodę, kwas octowy, chlorek sodu i 1 % roztwór skrobi w ilościach według tabeli 16.1.

Tabela 16.1. Wielkość liczby diastazowej.

Nr probówki	Roztwór miodu	Woda	Kwas octowy	Chlorek sodu	Roztwór skrobi	Razem	LD
1	10,0	4,0	0,5	0,5	1,0	16	1,0
2	10,0	2,5	0,5	0,5	2,5	16	2,5
3	10,0	0,0	0,5	0,5	5,0	16	5,0
4	7,7	2,3	0,5	0,5	5,0	16	6,5
5	6,0	4,0	0,5	0,5	5,0	16	8,3
6	4,6	5,4	0,5	0,5	5,0	16	10,9
7	3,6	6,4	0,5	0,5	5,0	16	13,9
8	2,8	7,2	0,5	0,5	5,0	16	17,9
9	2,1	7,9	0,5	0,5	5,0	16	23,8
10	1,7	8,3	0,5	0,5	5,0	16	29,4
11	1,3	8,7	0,5	0,5	5,0	16	38,5
12	1,0	9,0	0,5	0,5	5,0	16	50,0

Napełnione probówki po wymieszaniu umieścić w łaźni wodnej o temperaturze 45-50°C i inkubować przez godzinę. Następnie probówki schłodzić i wstawić do statywu. Do każdej probówki dodać po 1 kropli 0,05 ml/l roztworu jodu, wstrząsnąć i obserwować powstałe zabarwienie. Zabarwienie niebieskie do fioletowego wskazuje na niecałkowitą hydrolizę skrobi. Za podstawę określenia liczby diastazowej należy przyjąć probówkę o zabarwieniu purpurowym, świadczącym o całkowitym rozłożeniu skrobi. Według jej numeru odczytać z tabeli 16.1. wartość liczby diastazowej.

16.2.2. Oznaczanie aktywności diastatycznej miodu metoda spektrofotometryczna

Zasada metody

Aktywność diastatyczną miodu określa się metodą fotometryczną (zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu), w której jako substrat stosowana jest nierozpuszczalna skrobia skoniugowana z błękitnym barwnikiem. Amylaza hydrolizuje skrobię do rozpuszczalnych w wodzie fragmentów tworzących z barwnikiem niebieskie połączenia, których absorbancja mierzona jest spektrofotometrycznie przy długości fali 620 nm.

Aparatura i sprzęt

- Łaźnia wodna z termostatem ($40,0 \pm 0,2$ °C);
- wagi analityczne ($\pm 0,0001$ g)
- kuwety spektrofotometryczne 1 cm;
- spektrofotometr;
- mieszadło;
- stoper;
- bibuła filtracyjna;
- pipety o poj. 1 i 5 ml.

Odczynniki

- Test do oznaczania aktywności α -amylazy – skrobia koniugowana z błękitnym barwnikiem);
- wodorotlenek sodu, 0,5 mol/l
- bufor octanowy, 0,1 mol/l pH=5,2: rozpuścić 13,6 g trójwodnego octanu sodu w wodzie. Doprowadzić do pH=5,2 za pomocą lodowatego kwasu octowego (1-2 ml) i rozcieńczyć do 1 l wodą;

Przygotowanie próbek

W zlewce odważyć $1 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ dobrze wymieszanego miodu i przenieść ilościowo za pomocą buforu octanowego do kolby miarowej o poj. 100 ml. Dopelnąć do kreski buforem octanowym.

Wykonanie oznaczenia

5 ml roztworu próby przenieść do probówki i umieścić w łaźni wodnej o temp. 40°C. Jednocześnie w takich samych warunkach ogrzewać próbę ślełą (5 ml buforu octanowego w probówce). Po upływie 15 min do obu roztworów dodać po 1 tabletkę testu. Włączyć stoper. Mieszać roztwory na mieszadle do momentu rozpuszczenia tabletek (ok. 10 sek.) a następnie umieścić z powrotem w łaźni. Po upływie dokładnie 15 min. dodać 1 ml roztworu wodorotlenku sodu (przerwanie reakcji enzymatycznej). Ponownie wymieszać roztwory na mieszadle przez 5 sek., przefiltrować przez bibułę i mierzyć absorbancję przy dł. fali 620 nm wobec wody jako próby referencyjnej. Absorbancję próby ślepej należy odjąć od absorbancji próby badanej. W przypadku absorbancji większej od 1 rozcieńczyć roztwór próbki wodą i uwzględnić rozcieńczenie podczas obliczania wyników.

Obliczanie wyniku oznaczenia

Liczbę diastazową (LD)

- w przedziale LD = 8-40 obliczyć według wzoru:

$$LD = 28,2 \cdot \Delta A + 2,64,$$

- w przedziale LD = 0-8 obliczyć według wzoru:

$$LD = 35,2 \cdot \Delta A - 0,46,$$

w których:

ΔA – różnica absorbancji badanego roztworu miodu i próbki ślepej,

28,2; 2,64 oraz 35,2; 0,46; – stałe uwzględniające zależność między aktywnością diastatyczną miodu.

16.3. Oznaczanie zawartości proliny

Prolina – kwas L-pirolidyno-2-karboksyłowy, jeden z endogennych aminokwasów występujących w białku. Miody zawierają przeciętnie ok. 0,04% białek. W naturalnych miodach pszczelich wyizolowano 18 aminokwasów: prolinę (30-70% ogólnej zawartości wszystkich aminokwasów), lizynę, kwas asparaginowy i glutaminowy, fenyloalaninę, glicynę, alaninę, leucynę, walinę, izoleucynę, treoninę, serynę, metioninę, hydroksyprolinę, histydynę, argininę, tryptofan, tyrozynę. W 100 g miodów nektarowych zawartość wolnych aminokwasów wynosi od 37 mg do 875 mg (śr. 175 mg), a w spadziowych – od 54 mg do 269 mg/100 g (śr. 178 mg/100 g). Prolina jest specyficznym aminokwasem występującym w ilościach przynajmniej 10-krotnie wyższych w odniesieniu do innych aminokwasów w miodach. Według Polskiej Normy PN-88/A-77626 w 100 g naturalnego miodu pszczelego nie powinno być mniej niż 25 mg proliny (niezależnie od typu miodu). Zawartość proliny w miodach pszczelich służy do oceny stopnia zafałszowania miodu zinwertowaną sacharozą.

Zasada metody

Metoda polega na wyodrębnieniu proliny z innych aminokwasów miodu za pomocą izopropanolu i pomiarach kolorymetrycznych jej barwnego kompleksu z ninhydriną.

Odczynniki i roztwory

- Stężony kwas mrówkowy;
- roztwór ninhydriny w dimetoksyetanolu 3% (m/m):
 - odważyć 3 g ninhydriny i uzupełnić do 100 g eterem. Uwaga! Farbuje;
- roztwór wodny izopropanolu 1:1 (v/v);
- prolina (wzorzec).

Aparatura i sprzęt

- Spektrofotometr;
- waga;
- łaźnia wodna;
- termometr;
- zlewki na 50 ml;
- kolby miarowe o pojemności 50 ml;
- probówki z korkami.

Sporządzenie krzywej wzorcowej

Odważyć 40 mg proliny (z dokładnością do 0,0001 g) i rozpuścić w 1000 ml wody destylowanej. Następnie pobrać 10, 25, 50 i 75 ml przygotowanego roztworu podstawowego i przenieść do kolb o pojemności 100 ml. Uzupełnić wodą destylowaną do kreski. Z otrzymanych roztworów oraz z roztworu wyjściowego pobrać po 0,5 ml i przenieść do dwóch probówek z korkami tak, aby były po dwie probówki każdego rozcieńczenia i roztworu podstawowego. Następnie do każdej probówki dodać po 0,25 ml stężonego kwasu mrówkowego i po 1 ml 3% roztworu ninhydriny. Przygotować ślepią próbę: do probówki wlać 1,75 ml wody destylowanej. Wszystkie probówki wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 15 min. Następnie schłodzić do temp. 22°C w ciągu 5 min. Po ostudzeniu dodać po 5 ml wodnego roztworu izopropanolu. Wymieszać i zmierzyć ekstynkcję przy długości fali 520 nm. Krzywą wzorcową wykreślić w układzie: absorbancja – zawartość proliny w $\mu\text{g}/0,5$ ml roztworu.

Przygotowanie próby

Odważyć 2,5 g miodu z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku i przenieść ilościowo do kolby miarowej na 50 ml, uzupełnić wodą do kreski.

Wykonanie oznaczenia

Do trzech probówek odpipetować po 0,5 ml roztworu miodu (1 probówka to blanc, a dwie do badania). Do dwóch probówek dodać po 0,25 ml kwasu mrówkowego i po 1 ml 3% roztworu ninhydriny. Do trzeciej probówki dodać 1,25 ml wody destylowanej. Zamknąć, wymieszać i umieścić na 15 min. we wrzącej łaźni wodnej. Następnie oziębnić do temp. 22°C w ciągu 5 min. i dodać 5 ml wodnego roztworu izopropanolu. Wymieszać i zmierzyć ekstynkcję przy dł. fali 520 nm wobec próby zerowej. Zawartość proliny odczytać z krzywej wzorcowej, pamiętając, że jest to zawartość proliny w $\mu\text{g}/0,5$ ml roztworu miodu.

Obliczanie wyników oznaczenia

Zawartość proliny (P) w mg/100 g miodu wyliczyć ze wzoru:

$$P = A \times 4,$$

w którym:

A – ilość proliny w $\mu\text{g}/0,5$ ml roztworu (odczyt z wykresu);

4 – współczynnik rozcieńczeń.

16.4. Oznaczanie zawartości wody metodą refraktometryczną

Zawartość wody w naturalnych miodach pszczelich nie powinna być większa niż 20%, z tym że nie więcej niż: 23% - w miodzie wrzosowym i w miodzie piekarniczym, 25% - w miodzie piekarniczym wrzosowym.

Zasada metody

Metoda polega na określeniu współczynnika załamania światła (refrakcji) w refraktometrze a następnie odczycie zawartości wody (%w/w) i ekstraktu (% w/w) z tabeli zależności między tymi wielkościami.

Aparatura

- Refraktometr;
- łaźnia wodna.

Przygotowanie próby

Z miodów, które uległy krystalizacji należy pobrać około 5 g, umieścić w probówce, zamknąć korkiem. Doprowadzić do stanu płynnego przez podgrzanie w łaźni wodnej o temp. 35-45 °C.

Wykonanie oznaczenia

Na suchym dolnym przyzmacie refraktometru umieścić pręcikiem szklanym kilka kropli miodu, rozprowadzić bagietką po całej powierzchni i przykryć suchym pryzmatem matowym. Wykonać pomiar i odczytać na podziałce współczynnik załamania światła (refrakcji) z dokładnością do czwartego znaku. W przypadku wykonania pomiaru w temp. różnej od 20°C, na każdy stopień podwyższenia temperatury należy zwiększyć zmierzony współczynnik refrakcji o 0,00023, a na, na każdy stopień poniżej 20°C obniżyć współczynnik o tę samą wielkość. Z tabeli 16.3. odczytać odpowiadającą współczynnikowi zawartość wody w procentach wagowych. Za wynik należy przyjąć średnią arytmetyczną wyników z co najmniej dwóch równoległych oznaczeń nie różniących się więcej niż o 0,2%.

Tabela 16.3. Zależność współczynnika załamania światła (refrakcji) (n), zawartości wody (% w/w) i ekstraktu (% w/w).

n	H2O	Ekstrakt	n	H2O	Ekstrakt	n	H2O	Ekstrakt	n	H2O	Ekstrakt
1,5018	14,0	84,4	1,4932	17,3	81,2	1,4850	20,6	78,0	1,4762	23,9	74,7
1,5015	14,1	84,3	1,4930	17,4	81,1	1,4847	20,7	77,9	1,4765	24,0	74,6
1,5012	14,2	84,2	1,4927	17,5	81,0	1,4845	20,8	77,8	1,4762	24,1	74,5
1,5009	14,3	84,1	1,4925	17,6	80,9	1,4842	20,9	77,7	1,4760	24,2	74,4
1,5007	14,4	84,0	1,4922	17,7	80,8	1,4840	21,0	77,6	1,4757	24,3	74,3
1,5004	14,5	83,9	1,4920	17,8	80,7	1,4837	21,1	77,5	1,4755	24,4	74,2
1,5002	14,6	83,8	1,4917	17,9	80,6	1,4835	21,2	77,4	1,4752	24,5	74,1
1,4999	14,7	83,7	1,4915	18,0	80,5	1,4832	21,3	77,3	1,4750	24,6	74,0
1,4997	14,8	83,6	1,4912	18,1	80,4	1,4830	21,4	77,2	1,4747	24,7	73,9
1,4994	14,9	83,5	1,4910	18,2	80,3	1,4827	21,5	77,1	1,4745	24,8	73,8
1,4992	15,0	83,4	1,4907	18,3	80,2	1,4825	21,6	77,0	1,4742	24,9	73,7
1,4989	15,1	83,3	1,4905	18,4	80,1	1,4822	21,7	76,9	1,4740	25,0	73,6
1,4987	15,2	83,2	1,4902	18,5	80,0	1,4820	21,8	76,8	1,4737	25,1	73,5
1,4984	15,3	83,1	1,4900	18,6	79,9	1,4817	21,9	76,7	1,4735	25,2	73,4
1,4982	15,4	83,0	1,4897	18,7	79,8	1,4815	22,0	76,6	1,4732	25,3	73,3
1,4979	15,5	82,9	1,4895	18,8	79,7	1,4812	22,1	76,5	1,4730	25,4	73,2
1,4976	15,6	82,8	1,4892	18,9	79,6	1,4810	22,2	76,4	1,4727	25,5	73,1
1,4973	15,7	82,7	1,4890	19,0	79,5	1,4807	22,3	76,3	1,4725	25,6	73,0
1,4971	15,8	82,6	1,4887	19,1	79,4	1,4805	22,4	76,2	1,4722	25,7	72,9
1,4968	15,9	82,5	1,4885	19,2	79,3	1,4802	22,5	76,1	1,4720	25,8	72,8
1,4966	16,0	82,4	1,4882	19,3	79,2	1,4800	22,6	76,0	1,4717	25,9	72,7
1,4963	16,1	82,3	1,4880	19,4	79,1	1,4797	22,7	75,9	1,4715	26,0	72,6
1,4961	16,2	82,2	1,4877	19,5	79,0	1,4795	22,8	75,8	1,4712	26,1	72,5
1,4958	16,3	82,1	1,4875	19,6	78,9	1,4792	22,9	75,7	1,4710	26,2	72,4
1,4955	16,4	82,0	1,4872	19,7	78,8	1,4790	23,0	75,6	1,4707	26,3	72,3
1,4953	16,5	81,9	1,4870	19,8	78,7	1,4787	23,1	75,5	1,4705	26,4	72,2
1,4951	16,6	81,8	1,4867	19,9	78,6	1,4785	23,2	75,4	1,4702	26,5	72,1
1,4948	16,7	81,7	1,4865	20,0	78,5	1,4782	23,3	75,3	1,4700	26,6	72,0
1,4946	16,8	81,6	1,4862	20,1	78,4	1,4780	23,4	75,2	1,4697	26,7	71,9
1,4943	16,9	81,5	1,4860	20,2	78,3	1,4777	23,5	75,1	1,4695	26,8	71,8
1,4940	17,0	81,4	1,4857	20,3	78,2	1,4775	23,6	75,0	1,4692	26,9	71,7
1,4937	17,1	81,3	1,4855	20,4	78,1	1,4772	23,7	74,9	1,4690	27,0	71,6
1,4935	17,2	81,2	1,4852	20,5	78,0	1,4770	23,8	74,8			

16.5. Oznaczanie zawartości 5-hydroksymetylofurfuralu (HMF)

5-hydroksymetylofurfural (HMF) – to aktywny aldehyd powstający przez odłączenie z glukozy trzech cząsteczek wody. Powstaje on podczas produkcji miodu sztucznego, w trakcie inwersji sacharozy do cukrów prostych. Reakcja ta zachodzi w środowisku kwaśnym; katalizują ją fosforany, kwasy karboksylowe, a zwłaszcza wysoka temperatura. Na wzrost zawartości HMF w miodach mają także wpływ: czas i warunki przechowywania, źle przeprowadzona dekrystalizacja (przegrzanie miodu), klimat, w jakim miód był zbierany oraz rodzaj pożytków pszczelich.

Zawartość HMF w miodach świeżych wynosi 0,06 – 1 mg/100g. Miód dopuszczony do obrotu nie może zawierać więcej niż 4 mg/100g, z wyjątkiem miodu piekarniczego przemysłowego i z krajów tropikalnych, z tym, że nie więcej niż 8 mg/100g. Zawartość HMF w naturalnych miodach pszczelich można oznaczyć metodą spektrofotometryczną lub, zgodnie z *Rozporządzeniem MRiRW z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu - metodą HPLC*.

Odczynniki i roztwory

- Roztwór p-toluidyny:

10 g p-toluidyny odważyć z dokładnością do 0,001 g i rozpuścić w 50 ml alkoholu izopropylowego w kolbie miarowej o pojemności 100 ml. Zawartość kolby lekko ogrzać na łaźni wodnej, dodać 10 ml lodowatego kwasu octowego, a następnie po ochłodzeniu uzupełnić do kreski alkoholem izopropylowym. Roztwór można przechowywać w ciemnej butelce przez 4 dni.

- roztworu kwasu barbiturowego:

0,5 g kwasu wysuszonego do stałej masy w temp. 105°C rozpuścić w kolbie miarowej o pojemności 100 ml w wodzie destylowanej.

Aparatura i sprzęt

- Spektrofotometr;
- waga analityczna;
- zlewki 50 ml;
- kolby miarowe o pojemności 50 ml;
- probówki z doszlifowanym korkiem;
- bagietki szklane.

Przygotowanie próby

Odważyć 10 g dobrze wymieszanego miodu z dokładnością do 0,1 g. Rozpuścić go w 15 ml wody i przenieść ilościowo do kolby miarowej na 50 ml. Uzupełnić wodą do kreski, wymieszać.

Wykonanie oznaczenia

Do 2 probówek wlać po 1 ml roztworu miodu i po 2,5 ml roztworu p-toluidyny. Do jednej probówki (porównawcza) dodać 0,5 ml wody destylowanej, a do drugiej 0,5 ml roztworu kwasu barbiturowego. Obie probówki dokładnie wymieszać. Po 3-4 min. zmierzyć ekstynkcję przy długości fali 550 nm. W ciągu 1 min. wykonać kilka pomiarów i obliczyć z nich średnią arytmetyczną.

Obliczanie wyników

Zawartość HMF (G) wyrażoną w mg na 100 g miodu wyliczyć ze wzoru:

$$G = 19,2 \times E/d$$

w którym:

E – średnia arytmetyczna z wyników pomiarów ekstynkcji,

d – grubość warstwy płynu w kuwecie (cm),

19,2 – współczynnik przeliczeniowy.

Literatura

1. Polska Norma PN-88/A-77626. Miód pszczeli.
2. Prabucki J. (red.): Pszczelnictwo, Wyd. Albatros, Szczecin 1998.
3. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 3 października 2003r. w sprawie szczegółowych wymagań w zakresie jakości handlowej miodu (Dz. U. 2003, nr 181, poz. 1773, z późn. zm.).
4. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 14 stycznia 2009 r. w sprawie metod analiz związanych z dokonywaniem oceny miodu (Dz. U. 2009 nr 17 poz. 94).
5. Rybak-Chmielewska H., Szczęsna T.: Aminokwasy w miodzie pszczelim, In: Uzupełniające zagadnienia jakości miodu, ISK Oddział Pszczelnictwa, Puławy 1997, 10-13.
6. Rybak-Chmielewska H., Szczęsna T.: Skład chemiczny miodu pszczelego, In: Podstawowe zagadnienia jakości miodu, ISK Oddział Pszczelnictwa, Puławy 1996, 10-15.
7. Rybak-Chmielewska H., Szczęsna T.: Zafałszowania miodu i możliwości ich wykrywania na drodze analiz fizyko-chemicznych, In: Podstawowe zagadnienia jakości miodu, ISK Oddział Pszczelnictwa, Puławy 1996, 32-36.
8. Wilde J. Encyklopedia pszczelarska PWRL, Warszawa 2013.

17. OCENA OPAKOWAŃ ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

17.1. Znakowanie środków spożywczych

Znakowanie żywności oznacza umieszczanie informacji dotyczącej środka spożywczego na jego opakowaniu, etykiecie, obwolucie. Zagadnienia dotyczące znakowania żywności są przedmiotem wielu aktów prawnych. Celem znakowania żywności jest udzielenie pełnej i rzetelnej informacji dla klienta, ułatwienie dokonania wyboru, zachowanie bezpieczeństwa i jakości żywności. Na opakowaniu środka spożywczego nie mogą znajdować się: informacje wprowadzające w błąd; określenia: „zdrowy”, „bezpieczny” itp.; informacje o szczególnych właściwościach środka spożywczego jeżeli dany produkt ich nie posiada lub właściwości te dotyczą całej grupy podobnych środków spożywczych. Informacje, które muszą znaleźć się na opakowaniu żywności to: nazwa produktu, skład, termin przydatności do spożycia (lub data minimalnej trwałości), sposób przygotowania (jeżeli jest to konieczne ze względu na specyfikę produktu), dane identyfikujące producenta, kraj produkcji, zawartość netto, warunki przechowywania (jeżeli jakość środka od nich zależy), oznaczenie partii produkcyjnej i klasy jakości, kod kreskowy, informacja dotycząca wartości odżywczej oraz ewentualnych alergenów. Ponadto oznakowanie środka spożywczego musi odpowiadać specyficznym regulacjom dotyczącym określonego rodzaju żywności (np. na konserwach mięsnych powinna znaleźć się informacja dotycząca procentowej zawartości mięsa).

17.1.1. Ocena opakowań w odniesieniu do zasad znakowania środków spożywczych

Wykonanie ćwiczenia

Należy wykonać ocenę dostępnych informacji z opakowania odnośnie poprawności ich zakresu, formy i prezentacji, oraz określić funkcje technologiczne poszczególnych składników środka spożywczego.

17.1.2. Wykonanie projektu informacji żywieniowej

Wykonanie ćwiczenia

Zgodnie z obowiązującymi normami prawnymi w zakresie znakowania żywności należy wykonać projekt opakowania wybranego środka spożywczego.

17.2. Badanie migracji globalnej i specyficznej

Jedną z metod oceny jakości opakowań jest badanie migracji, polegającej na przenikaniu substancji z materiałów i wyrobów do żywności w ilościach stanowiących zagrożenie dla zdrowia lub życia człowieka.

Migracja globalna to suma masy niskocząsteczkowych substancji migrujących w ściśle określonych warunkach czasu i temperatury, z materiału lub wyrobu do płynów modelowych imitujących ekstrakcyjne działanie określonych grup środków spożywczych.

Migracja specyficzna oznacza masę określonej substancji niskocząsteczkowej migrującej w danych warunkach czasu i temperatury z materiału lub wyrobu do płynu modelowego imitującego działanie określonej grupy środków spożywczych.

Zasady badania migracji

1. Dobór płynu modelowego imitującego żywność zależy od rodzaju żywności, do której opakowanie jest przeznaczone (tabela 17.1.)

Tabela 17.1. Skład płynów modelowych.

Oznaczenie płynu	Skład	Rodzaj imitowanej żywności
A	woda destylowana	uwodniona o pH>4,5
B	3% kwas octowy	uwodniona o pH<4,5
C	≥15% etanol	zawierająca etanol
D	oliwa z oliwek, olej słonecznikowy, mieszanka triacylogliceroli	zawierająca tłuszcz

Do badania materiałów do wszystkich rodzajów żywności analizę przeprowadza się stosując płyny: B, C i D.

2. Warunki.

Czas i temperatura powinny być dobrane tak, aby odpowiadały najgorszym przewidywanym warunkom kontaktu badanego materiału z żywnością. Jeżeli materiał ma być przeznaczony do użycia w kuchenkach mikrofalowych badanie musi być przeprowadzone w takich warunkach.

3. Metoda analityczna musi być odpowiednio dobrana do rodzaju badanych analitów. Najczęściej są stosowane chromatografia GC oraz HPLC.

17.3. Badanie szczelności opakowań metalowych

Zasada metody

W celu stwierdzenia szczelności konserw hermetycznie zamkniętych należy przeprowadzić trzystopniowe badanie obejmujące oględziny, badanie na podstawie wycieku oraz na podstawie wydobywania się gazu. Poprawne wyniki tych analiz świadczą o szczelności opakowania.

Aparatura i sprzęt

- Bibuła;
- łaźnia wodna;
- eksykator próżniowy.

Wykonanie oznaczenia

1. Oględziny: Należy określić, czy na opakowaniu znajdują się ślady wgnieceń, korozji, pęknięć oraz czy wieko jest wklęsłe.
2. Badanie na podstawie wycieku – badanie polega na upłynnieniu zawartości opakowania w temperaturze 70°C: w wodzie przez 5 min. lub w suszarce przez 10 min. Puskę osuszyć, miejsca złączy owinąć suchą bibułą. Wstawić do eksykatora próżniowego, wypompować powietrze do 135 hPa, pozostawić 3 min. Następnie wyjąć i sprawdzić, czy nastąpił wyciek zawartości, o czym będą świadczyć plamy na bibule.
3. Badanie na podstawie wydobywania się gazu – zanurzyć badaną konserwę w naczyniu z wodą o temperaturze 90°C i obserwować przez 10 min., zwracając uwagę, czy nie wydobywają się pęcherzyki gazu.

Literatura

1. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 października 2013 r. w sprawie wykazu substancji, których stosowanie jest dozwolone w procesie wytwarzania lub przetwarzania materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych, a także sposobu sprawdzania zgodności tych materiałów i wyrobów z ustalonymi limitami (Dz. U. 2013 nr 0 poz. 1343)
2. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 15 stycznia 2008 r. w sprawie wykazu substancji, których stosowanie jest dozwolone w procesie wytwarzania lub przetwarzania materiałów i wyrobów z innych tworzyw niż tworzywa sztuczne przeznaczonych do kontaktu z żywnością (Dz. U. 2008 nr 17 poz. 113);
3. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 25 lipca 2007 r. w sprawie znakowania żywności wartością odżywczą (Dz. U. 2007 nr 137 poz. 967);
4. Rozporządzenie Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 10 lipca 2007 r. w sprawie znakowania środków spożywczych (Dz. U. 2007 nr 137 poz. 966).
5. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 9 października 2007 r. w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety (Dz. U. 2007 nr 196 poz. 1425, z późn. zm. Dz. U. 2013 nr 0 poz. 138).

18. ANALIZA SENSORYCZNA ŻYWNOŚCI

Jakość żywności jest określana jako ogół cech i kryteriów, przy pomocy których charakteryzuje się żywność pod względem wartości odżywczej, bezpieczeństwa dla zdrowia konsumenta oraz jakości organoleptycznej. Jakość organoleptyczna jest określana przez zespół cech, obejmujących smak, zapach, wygląd, w tym barwę i konsystencję, środków spożywczych, które można wyodrębnić i ocenić przy pomocy zmysłów człowieka.

Analiza sensoryczna żywności powinna być przeprowadzana przez zespół osób odpowiednio przeszkolonych, o przebadanej, wysokiej wrażliwości sensorycznej. W celu oceny wrażliwości stosuje się między innymi próbę na daltonizm smakowy oraz ocenę progu wrażliwości smakowej. Stanowiska do oceny sensorycznej powinny znajdować się w pracowni o stałej temperaturze (18-20°C), właściwej wentylacji, pozbawionej obcych zapachów oraz czynników rozprasających. Oświetlenie powinno maskować różnice w wyglądzie próbek. Zestaw badań przeprowadzanych w zakresie analizy sensorycznej żywności określają odpowiednie normy. Można wyróżnić trzy grupy testów: wykazujące występowanie lub brak różnic między próbkami; oceniające jakość (przynależność do klas, kategorii); identyfikujące specyficzne cechy próbki.

18.1. Ocena wrażliwości smakowej

Odczynniki

- Woda świeżo destylowana;
- kwas cytrynowy jednowodny, roztwór 1,2 g/l;
- kofeina, roztwór 0,54 g/l;
- chlorek sodu, roztwór 4,0 g/l;
- sacharoza, roztwór 24,0 g/l;
- glutaminian jednosodowy, roztwór 2,0 g/l.
- siarczan (VI) żelaza (II) x 7 H₂O, roztwór 0,016 g/l;

Sprzęt i szkło laboratoryjne

- Kolby miarowe, pojemności 100 ml
- pipety,
- zlewki, pojemności 50 ml.

18.1.1. Określenie progu wrażliwości smakowej

Zasada metody

Metoda polega na smakowej ocenie kolejnych rosnących stężeń roztworów substancji odpowiedzialnych za wywołanie wrażenia poszczególnych smaków.

Wykonanie oceny

Osoba przygotowująca ocenę powinna wykonać kolejne rozcieńczenia podstawowych stężeń substancji bodźcowych w 1 l wody destylowanej według tabeli 18.1. Każdy oceniający dostaje serię (10-15) zakodowanych próbek zawierających roztwory o wzrastającym stężeniu. Ponadto w każdym zestawie powinny znajdować się próbki powtarzające się (np. w szeregu: D8, D7, D7, D6, D5, D5, D5, D4... itd.). Oceniający zaczyna badanie od najniższych stężeń. Oceny dokonuje się poprzez opłukanie jamy ustnej ok. 15 ml roztworu. Po każdej próbce oceniający zaznacza na arkuszu ocen (Rycina 18.1.) brak wrażenia (O) lub wrażenie smaku (X), za każdym razem, gdy oceniający rozpozna przyrost stężenia dostawia kolejny „X”. Jeżeli oceniający nie rozpozna smaku poniżej stężenia D3 – określa się to jako wysoki próg wyczuwalności (mała wrażliwość smakowa), nierozpoznanie próbki poniżej stężenia D2 świadczy o wysokim progu rozpoznania (małej wrażliwości dla danego smaku).

Tabela 18.1. Serie rozcieńczeń roztworów podstawowych.

Nr	Kwaśny		Gorzki		Słony		Słodki		Umami		Metaliczny	
	V (ml)	p (g/l)	V (ml)	p (g/l)	V (ml)	p (g/l)	V (ml)	p (g/l)	V (ml)	p (g/l)	V (ml)	P* (mg/l)
D1	500	0,60	500	0,27	500	2,00	500	12,00	500	1,00	500	8,0
D2	400	0,48	400	0,22	350	1,14	300	7,20	350	0,70	350	5,6
D3	320	0,38	320	0,17	245	0,98	180	4,32	245	0,49	245	3,9
D4	256	0,31	256	0,14	172	0,69	108	2,59	172	0,34	172	2,7
D5	205	0,25	205	0,11	120	0,48	65	1,56	120	0,24	120	1,9
D6	164	0,20	164	0,09	84	0,34	39	0,94	84	0,17	84	1,3
D7	131	0,16	131	0,07	59	0,24	23	0,55	59	0,12	59	0,9
D8	105	0,13	105	0,06	41	0,16	14	0,34	41	0,08	41	0,7

V – objętość roztworu podstawowego potrzebna na 1 l końcowego roztworu [ml];

p – stężenie końcowe roztworu [g/l]; p* [mg/l]

18.1.2. Próba na daltonizm smakowy

Zasada metody

Metoda polega na określeniu zdolności osoby badanej do rozpoznawania podstawowych jakości smaku na podstawie identyfikacji smakowej roztworów bodźcowych (Tabela 18.2.).

Wykonanie oznaczenia

Wykonać rozcieńczenia 4 wybranych roztworów podstawowych do stężeń przedstawionych w Tabeli 18.2. poprzez wymieszanie równych objętości roztworów D2 i D3. Przygotować dla osób podlegających badaniu 10-15 numerowanych zlewek po 30 ml roztworów różnych smaków oraz jeden z wodą destylowaną. Przygotować klucz do oceny wyników – zestawienie numerów zlewek z odpowiadającymi im smakami. Osoba badana otrzymuje blankiet oceny smaków (Ryc. 18.2.). W trakcie testowania należy przepłukiwać usta ok. 15 ml płynu, nie wolno połykać badanych roztworów, po każdej testowanej próbie, osoba badana przepłukuje usta wodą i zapisuje wynik w tabeli oceny. Należy zachować min. 30 sek. odstęp pomiędzy badanymi próbami. Za minimum sensoryczne w zakresie rozpoznawania smaków określa się 8 lub więcej prawidłowych odpowiedzi. Osoba, która rozpoznaje poprawnie wszystkie smaki może zostać zakwalifikowana do zespołu przeprowadzającego oceny organoleptyczne.

Tabela 18.2. Stężenia roztworów bodźcowych

Smak	Substancja bodźcowa	Stężenie (g/l)
Słodki	sacharoza	5,76
Słony	chlorek sodu	1,19
Kwaśny	kwas cytrynowy	0,43
Gorzki	kofeina	0,195
Metaliczny	siarczan (VI) żelaza (II)	0,00475
Umami	glutaminian sodu	0,595

Imię i Nazwisko

.....

Data

.....

Nr próby	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
ocena*															
smak**															

* O – brak wrażenia smaku, x – odczucie smaku, xx, xxx – kolejne znaki przy rozpoznaniu przyrostu smaku

** - określić smak w miejscu rozpoznania

Rycina 18.1. Arkusz oceny progu wrażliwości smakowej.

Imię i Nazwisko

.....

Data

.....

Nr próby	Smak						
	**	słony	sodki	kwaśny	gorzki	metaliczny	umami
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							
6.							
7.							
8.							
9.							
10.							

** - smak niezidentyfikowany

Ryc. 18.2. Blankiet oceny próby na daltonizm smakowy.

19. RAPORT Z BADANIA PRODUKTU ŻYWNOŚCIOWEGO

IMIĘ I NAZWISKO

DATA

1. TEMAT ĆWICZENIA

2. CEL BADANIA

3. MATERIAŁ DO BADAŃ

4. ZASTOSOWANA METODYKA

5. OBLICZENIA ORAZ INTERPRETACJA WYNIKÓW

6. WNIOSEK KOŃCOWY

7. ZALICZENIE ĆWICZENIA

PODPIS PROWADZĄCEGO

DATA