Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

Кафедра химии

О.И. Болдырева, Е.М. Мозгунова

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ

Рекомендовано к изданию Редакционно-издательским советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет» в качестве методических указаний для студентов, обучающихся по программе высшего профессионального образования по специальности 020201.65 Фундаментальная и прикладная химия, а также по направлению подготовки 020100.62 Химия, профиль подготовки «Нефтехимия».

Оренбург
ОГУ
2012

УДК 664 (07)
ББК 36-1 я 7
Б 79

Рецензент – доцент, доктор биологических наук Г. В. Карпова

Болдырева, О. И.
Б 79 Методы исследования пищевых продуктов: методические указания к лабораторным работам / О. И. Болдырева, Е. М. Мозгунова. Оренбургский гос.ун-т. – Оренбург: ОГУ, 2012. - 70 с.
ISBN

Методические указания содержат теоретические аспекты и методики количественного химического анализа для определения основных нутриентов пищевого сырья и продуктов питания – белков, углеводов, жиров, ферментов, витаминов в различных пищевых объектах.

Методические указания предназначены для студентов, обучающихся по специальности 020101.65 Фундаментальная и прикладная химия, специализация «Аналитическая химия», а также по направлению подготовки 020100.62 Химия, профиль подготовки «Нефтехимия» для подготовки к лабораторным занятиям по курсам «Анализ пищевого сырья», «Химическая экспертиза пищевого сырья и продуктов», а также могут быть полезны для студентов, преподавателей и научных сотрудников других химических и пищевых специальностей при подготовке курсовых и дипломных проектов.

УДК 664 (07)
ББК 36-1 я 7

ISBN

© Болдырева О. И.,
Мозгунова Е. М., 2012
© ОГУ, 2012

Содержание

1 Методы определения белков 6

1.1 Общие сведения 6

1.2 Лабораторная работа №1 Биуретовый микрометод определения белка (по Мерку К.Е.) 7

1.3 Лабораторная работа № 2 Фотоколориметрический метод определения белка (по Лоури) 10

1.4 Лабораторная работа № 3 Фотоколориметрический метод определения содержания белка (по Дженнингсу) 12

1.5 Лабораторная работа № 4 Нефелометрический метод определения содержания белка 14

1.6 Контрольные вопросы 15

2 Методы определения углеводов 17

2.1 Общие сведения 17

2.2 Лабораторная работа № 5 Определение сахара в готовых хлебобулочных изделиях (ГОСТ 5672-68). Метод Шорля 18

2.3 Лабораторная работа № 6 Колориметрический метод определения сахаров 22

2.4 Лабораторная работа № 7 Определение фруктозы и других кетоз 24

2.5 Лабораторная работа № 8 Микрометод определения сахаров по методу Швецова А. С. и Лукьяненко Э. Х. 25

2.6 Лабораторная работа № 9 Фотоколориметрический метод определения редуцирующих сахаров в кондитерских изделиях и полуфабрикатах (ГОСТ 5903-89) 26
2.7 Контрольные вопросы 30
2.8 Лабораторная работа № 10 Содержание пшеничного крахмала по методу Эверса 30
2.9 Лабораторная работа №11 Определение крахмала объемным методом (по Починку Х. Н.) 33
2.10 Контрольные вопросы 35
3 Определение общего содержания жиров 37
3.1 Общие сведения 37
3.2 Лабораторная работа № 12 Определение содержания сырого жира методом Сокслета 37
3.3 Лабораторная работа № 13 Рефрактометрический метод определения жира (ГОСТ 5899-85) 39
3.4 Лабораторная работа № 14 42
3.4.1 Определение содержания жира весовыми методами (ГОСТ 5668 - 68) 42
3.4.2 Определение содержания сырого жира методом настаивания 44
3.5 Лабораторная работа № 15 Оценка качества пищевых жиров по основным показателям 45
3.6 Контрольные вопросы 50
4 Определение активности ферментов 52
4.1 Общие сведения 52

4.2 Лабораторная работа № 16 Определение активности каталазы 53
4.3 Лабораторная работа № 17 Колориметрический метод
определения активности амилаз 55
4.4 Контрольные вопросы 57
5 Количественное определение витаминов 58
5.1 Общие сведения 58
5.2 Лабораторная работа № 18 Количественное определение каротина
(по Цирелю К.Е.) 58
5.3 Лабораторная работа № 19 Количественное определение витамина Р
(рутина) в чае 61
5.4 Лабораторная работа № 20 Количественное определение витамина С 62
5.5 Лабораторная работа № 21 Определение витамина С
методом перманганатометрии 64
5.6 Лабораторная работа № 22 Суммарное определение свободного и
связанного рибофлавина в комбикормах методом фотофлуориметрии 65
5.7 Контрольные вопросы 68
Список использованных источников 70

1 Методы определения белков

1.1 Общие сведения

Белки – высокомолекулярные органические полимеры, главный строительный материал живой клетки. Выделение белков из биологического материала заключается в экстрагировании их тем или иным растворителем после измельчения материала. В качестве растворителя применяются вода, солевые растворы, водно-спиртовые растворы, слабые кислоты и щелочи.

Альбумины – растворяются в воде, из водных растворов хорошо высаливаются при насыщении их солями (например, сульфатом аммония). К альбуминам относятся белок куриного яйца овальбумин, белок зародыша пшеницы лейкозин.

Глобулины – нерастворимы в чистой воде, но растворяются в водных растворах солей. Обычно используют теплый 10 % раствор хлорида натрия. При разбавлении его большим количеством воды чистый глобулин выпадает в осадок. Глобулины составляют большую часть белка семян бобовых и масличных культур. Представители – легумин – белок семян гороха, глицинин – сои; лактоглобулин – белок молока.

Проламины – глиадин ржи и пшеницы, зеин кукурузы, авенин овса – получают, экстрагируя сырье 70 % этанолом. Затем этанол отгоняют в вакууме, получая густую клейкую массу. Ее снова растворяют в спирте и выливают раствор в большой объем ацетона. Тонкий чистый осадок белка отфильтровывают и сушат.

Глютелины получают экстракцией водным раствором щелочи (примерно 0,2 %), высаливают подкислением, отфильтровывают и сушат. Представители – глютенин семян пшеницы, оризенин семян риса.

Качественное определение белков обычно проводится с помощью цветных реакций. Универсальной (на все белки) является биуретовая реакция. В щелочной среде раствор белка при взаимодействии с ионами меди приобретает сине-фиолетовый цвет. Биуретовая реакция обусловлена образованием биуретового комплекса в результате соединения меди с пептидной группировкой белка, продукты неполного гидролиза белка при этом дают розовую окраску. Степень окраски биуретового комплекса зависит от концентрации белка и количества медной соли в растворе. Большого избытка биуретового реактива при количественных определениях белка следует избегать, так как синяя окраска ионов меди мешает определению.

1.2 Лабораторная работа №1 Биуретовый микрометод определения белка (по Мерку К.Е.)

Метод позволяет определить белок в растворах с концентрацией от 0,04 до 1,6 мг/мл.

Реактивы:

1) биуретовый реактив (готовят 1 л 0,2 н раствора гидроксида натрия, свободного от карбоната; к 400 мл этого раствора в мерной колбе на 1 л добавляют 9 г калия-натрия виннокислого, после растворения добавляют 3 г безводного сульфата меди

(II), перемешивают, затем добавляют 5 г иодида калия и доводят раствор до метки 0,2 н раствором гидроксида натрия);

2) раствор мочевины (к 300 г мочевины прибавляют кусочек тимола, величиной с горошину, приливают 700 мл воды и смесь нагревают, затем прибавляют 3 г активированного угля, тщательно перемешивают, фильтруют в колбу на 1 л и доводят до метки дистиллированной водой;

3) стандартный раствор белка – яичный белок переносят в мерную колбу на 250 мл, доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают. Фильтруют через марлю, хранят в холодильнике. 1 мл раствора содержит 10 мг яичного альбумина.

Ход анализа:

1) построение градуировочного графика:

Готовят рабочие растворы белка, для чего в пробирки на 10 мл помещают 2,0; 4,0;…10,0 мл стандартного раствора белка и доводят объем до 10 мл. Перемешивают. Рабочие растворы содержат от 20 до 100 мг белка.

Далее готовят окрашенные растворы. В пробирки отмеряют по 2,4 мл раствора мочевины, 0,2 мл рабочего раствора белка и 2,6 мл биуретового реактива. Засекают время 30 минут. Пробирки помещают в термостат при 40 °С на 10 минут. Вынимают пробирки из термостата и через 30 минут после прибавления биуретового реактива измеряют оптическую плотность растворов на фотоэлектроколориметре при длине волны 545 нм и толщине светопоглощающего слоя 10 мм.

По полученным данным строят калибровочный график (зависимость оптической плотности от содержания белка, D – мг);

2) анализ образца:

а) анализ муки:

Мука злаков содержит в основном белки, растворимые в этаноле (проламины) и слабых растворах щелочей (глютелины). Поэтому экстракцию белка ведут спиртовым раствором щелочи. Навеску муки массой 3 г, взвешенную с точностью до 0,01 г помещают в фарфоровую ступку, прибавляют 2 г битого стекла или кварцевого песка и приливают 3 мл спиртового раствора щелочи (0,2 % раствор NaOH в 50 % этаноле) и тщательно растирают пестиком в течение 3 минут. Затем добавляют еще 25 мл этого раствора и переносят в мерную колбу на 50 мл, доводят до метки растворителем (50 % этанолом), колбочку закрывают пробкой, тщательно перемешивают и оставляют на 1 час. После настаивания фильтруют в сухую коническую колбу на 100 мл. В фильтрате определяют белок биуретовой реакцией, для этого аликвоту раствора (2-10 мл) помещают в мерную пробирку и доводят объем до 10 мл дистиллированной водой, перемешивают. Затем 0,2 мл полученного раствора переносят в другую пробирку и приливают реагенты, как и при построении градуировочного графика;

б) анализ сырья животного происхождения:

Сырье животного происхождения содержит в основном водорастворимые белки (альбумины) и белки, растворимые в солевых растворах (глобулины). Эти белки легко фракционируются.

Навеску сырья массой 2 г, взвешенную с точностью до 0,01 г тщательно измельчают ножом на предметном стекле и переносят количественно в стакан, куда приливают 10 мл дистиллированной воды. Перемешивают постоянно в течение 15

минут. При этом в раствор переходят альбумины. Смесь фильтруют через вату в мерную пробирку, фильтрат доводят до объема 10 мл и перемешивают. При помощи биуретовой реакции определяют в нем количество альбумина. Остаток после фильтрования вместе с ватой переносят в стакан и прибавляют 10 мл 10 % раствора хлорида аммония. Перемешивают постоянно в течение 15 минут. Затем содержимое стакана переносят в центрифужную пробирку, центрифугируют 15 минут при 4000 об/мин. Осторожно сливают надосадочную жидкость и доводят объем до 10 мл. Определяют в ней количество глобулинов;

3) расчет белка ведут по формуле (1):

$$x = \frac{a \cdot V_1 \cdot 100}{m_{нав} \cdot V_2 \cdot 1000} \quad (1)$$

где a – количество белка, в мг (по графику);

$m_{нав}$ – масса навески, г;

V_1 – объем исходной вытяжки, мл;

V_2 – объем фильтрата, взятого для анализа, мл.

1.3 Лабораторная работа № 2 Фотоколориметрический метод определения белка (по Лоури)

Метод основан на реакции белков с реактивом Фолина, дающее синее окрашивание. Метод применяют для определения белка в растворах с концентрацией от 10 до 100 мкг.

Реактивы:

1) реактив Фолина. 100 г вольфрамата натрия (Na_2WO_4) и 25 г молибдата натрия (Na_2MoO_4) растворяют в 700 мл воды, добавляют 50 мл 85 % фосфорной кислоты и 100 мл соляной кислоты, плотностью 1,19 г/мл. Кипятят (не слишком сильно) 10 ч в колбе с обратным холодильником в вытяжном шкафу. Охлаждают, добавляют 150 г сульфата лития, 50 мл воды и 5 капель бромной воды. Смесь кипятят в течение 15 минут в вытяжном шкафу для удаления избытка брома, после охлаждения доводят водой до 1 л. Фильтруют, хранят в темной склянке с притертой пробкой. Раствор должен быть ярко-желтого цвета. Перед употреблением разбавляют в два раза;

2) 2 % раствор Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH (раствор I);

3) 0,5 % раствор медного купороса в 1 % растворе двузамещенного виннокислого калия или натрия (раствор 2);

4) опытный раствор: готовят, смешивая растворы (1) и (2) в соотношении 50 : 1 в день анализа.

Ход анализа:

1) построение градуировочного графика:

а) приготовление стандартного раствора. 100 мг чистого белка (сывороточного γ-глобулина или кристаллического альбумина) растворяют в 100 мл 0,1 н NaOH. 1 мл раствора содержит 1 мг белка;

б) приготовление окрашенных растворов. В шесть мерных колб на 25 мл наливают 3, 6, 9, 12, 15, 18 мл стандартного раствора белка, доводят водой до метки, перемешивают. В пробирки помещают 0,4 мл рабочего раствора из каждой колбы и 2 мл опытного раствора 4. Перемешивают и через 10 мин приливают 0,2 мл

рабочего раствора Фолина. Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 750 нм.

По полученным данным строят график зависимости оптической плотности от содержания белка;

2) анализ образца:

К 0,4 мл исследуемого раствора белка добавляют 2 мл опытного раствора. Смесь перемешивают и через 10 мин приливают к ней 0,2 мл рабочего раствора Фолина. Через 30 минут измеряют оптическую плотность раствора на фотоэлектроколориметре при длине волны 750 нм. Количество белка в растворе находят по калибровочной кривой.

1.4 Лабораторная работа № 3 Фотоколориметрический метод определения содержания белка (по Дженнингсу)

Различные модификации биуретового метода определения содержания белков отличаются условиями экстрагирования белка, способом внесения биуретового реактива и техникой колориметрирования.

Настоящий метод отличается простотой и высокой точностью.

Реактивы:

1) биуретовый реактив. 15 мл 10 н раствора КОН и 25 г сегнетовой соли, взвешенной с точностью до 0,01 г, растворяют примерно в 900 мл дистиллированной воды. 30 мл 4 % раствора $CuSO_4$ отмеренных цилиндром, медленно добавляют при постоянном помешивании и доводят объем до 1 л.

Ход анализа:

1) навеску муки около 1,5 г с точностью до 0,001 г, помещают в сухую коническую колбу на 250 мл. Образец полностью смачивается 2 мл четыреххлористого углерода для извлечения жира. Затем пипеткой добавляют 100 мл биуретового реактива. Закрытая пробкой колба встряхивается на механическом встряхивателе в течение 60 мин, затем вытяжка центрифугируется 10 мин при частоте 4500 об/мин, прозрачный центрифугат колориметрируют при длине волны 550 нм в кювете с толщиной поглощающего слоя 5 мм;

2) построение градуировочного графика:

Для построения градуировочного графика подбирают образцы муки с различным содержанием белка в диапазоне, встречающемся в реальных условиях (от 8 до 20 %). Интервал в содержании белков должен находиться в пределах не более 1 %, а количество образцов муки не менее 10. С увеличением их числа точность определения возрастает. Образцы обрабатывают также, как и исследуемый, определяют оптическую плотность центрифугата и получают зависимость оптической плотности от содержания белка;

3) вычисление результатов анализа:

По оптической плотности белковой вытяжки исследуемого образца при помощи градуировочного графика определяют содержание в ней белка.

Результат выражают в процентах на сухое вещество.

1.5 Лабораторная работа № 4 Нефелометрический метод определения содержания белка

Метод основан на определении интенсивности светового потока, рассеянного твердыми коллоидными частицами, находящимися в растворе во взвешенном состоянии. По интенсивности светорассеяния, определяемой нефелометром, судят о концентрации вещества.

Растворы белков способны опалесцировать в присутствии некоторых реагентов, например, в присутствии сульфосалициловой кислоты. Продукты гидролиза белков при этом не опалесцируют.

Метод отличается быстротой, высокой точностью и хорошей корреляцией с методом Кьельдаля.

Реактивы:

1) 0,05 н раствор NaOH;

2) 10 % раствор сульфосалициловой кислоты.

Ход анализа:

1) анализ образца муки:

Около 0,5 г исследуемой муки, взвешенной с точностью до 0,0001 г помещают в коническую колбу на 250 мл, снабженную пробкой. В колбу добавляют 50 мл 0,05 н раствора NaOH. Закрытую пробкой колбу встряхивают 15 минут. Затем вытяжку центрифугируют 10 мин при частоте вращения 6000 об/мин. 5 мл прозрачного центрифугата переносят в мерную колбу на 50 мл и содержимое колбы доводят до метки сульфосалициловой кислотой.

При нефелометрическом анализе правильность результатов в значительной мере зависит от методики получения суспензии, в частности, от порядка и скорости смешивания реактивов. Поэтому после добавления сульфосалициловой кислоты колбу быстро переворачивают 2-3 раза (не более), раствор наливают в кювету с толщиной измеряемого слоя 5 мм и измеряют оптическую плотность при длине волны 550 нм. Замеры следует проводить сразу после добавления реактива, так как частицы белка быстро агрегируют;

2) построение градуировочного графика:

Для построения градуировочного графика может быть использован раствор яичного альбумина известной концентрации или образцы муки с различным содержанием белка в диапазоне, встречающемся в реальных условиях (от 8 до 20 %). Интервал в содержании белков должен находиться в пределах не более 1 %, а количество образцов муки не менее 10. Каждую навеску муки (или переменное количество раствора белка) обрабатывают аналогично исследуемому образцу и получают зависимость оптической плотности от содержания белка. Зависимость должна быть линейной. По градуировочному графику находят содержание белка в исследуемом образце.

1.6 Контрольные вопросы

1 Состав и структура белковых веществ.

2 Классификация белков по растворимости. Белки муки, их извлечение.

3 Цветные реакции на белки.

4 Сущность биуретового метода. Количественное определение белка.

Назначение мочевины, тимола, биуретового реактива.

5 Закон Бугера - Ламберта - Бера. Зависимость молярного коэффициента погашения от концентрации. Факторы, влияющие на величину ε.

6 Сущность определения белка по Лоури.

7 Нефелометрический метод определения белка.

2 Методы определения углеводов

2.1 Общие сведения

Углеводы является основной частью пищевого рациона человека. В состав пищевого сырья они входят в виде простых сахаров (моно-, ди-, три-, тетрасахаридов) и полисахаридов. К полисахаридам относятся гемицеллюлозы, крахмал, инулин, гликоген, целлюлозы, пектин, камеди, декстраны и декстрины, которые состоят из цепей различной длины тех или иных моносахаридов.

С точки зрения способности к усвоению в организме человека углеводы делятся на усваиваемые и неусваиваемые.

Усваиваемые, к примеру, моносахариды глюкоза, фруктоза, галактоза; полисахариды I порядка - сахароза, мальтоза, лактоза и рафиноза; полисахариды II порядка - инулин, крахмал и декстрины. К неусваиваемым относятся грубые пищевые волокна (целлюлоза, гемицеллюлозы, лигнин) и мягкие пищевые волокна (пектиновые вещества, камеди, декстраны). Степень усвоения углеводов определяется наличием в желудочно-кишечном тракте человека определенных ферментов.

Легче всего усваиваются глюкоза, фруктоза, сахароза, мальтоза и лактоза; несколько медленнее крахмал и декстрины (т.к. они должны расщепиться до простых сахаров). Углеводы содержатся в основном в растительном сырье.

Сахара с пищевой точки ценятся за их сладость. Если сладость сахарозы условно принять за 1, то относительная сладость фруктозы будет 1,73; глюкозы - 0,74; сорбита - 0,48; ксилозы - 0,4; мальтозы - 0,32; лактозы - 0,16.

Сахара легко растворяются в воде и на этом основано их извлечение. Из объектов волокон, крахмалов сахара извлекают 80 - 82 % этанолом.

Общим признаком полисахаридов II порядка является то, что их можно расщепить до моносахаров при использовании кислотного или ферментативного гидролиза. Изменяя условия гидролиза (температуру, время, концентрацию катализатора) можно определить содержание отдельных полисахаридов в исследуемом материале.

Большинство методов определения сахаров основано на их редуцирующей способности по отношению к ионам Cu (II) в щелочном растворе либо феррицианид-иону. Количество восстановленной меди определяют с помощью перманганатометрии (метод Бертрана), иодометрии (метод Шорля), фотометрически - оно эквивалентно содержанию сахара.

2.2 Лабораторная работа № 5 Определение сахара в готовых хлебобулочных изделиях (ГОСТ 5672-68). Метод Шорля

Сущность метода:

При кипячении точно отмеренного количества Фелинговой жидкости с исследуемым раствором редуцирующего сахара двухвалентная медь восстанавливается до оксида одновалентной меди:

$$Cu^{2+} + 1\bar{e} \rightarrow Cu^{+}$$

На избыток двухвалентной меди действуют иодидом калия, причем иодид-ион окисляется до свободного иода:

$$2Cu^{2+} + KI \leftrightarrow 2Cu^{+} + I_2$$

Иод оттитровывают раствором тиосульфата натрия:

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \leftrightarrow 2I^{-} + S_4O_6^{2-}$$

Количество восстановленного сахаром оксида одновалентной меди определяют по разности объемов 0,1 н раствора тиосульфата натрия, пошедшего на титрование раствора в контрольном опыте (без сахаров) и анализируемого раствора. По количеству восстановленной меди находят эквивалентное количество сахара в аликвоте исследуемого раствора. Для приведенной методики титр 0,1 н раствора тиосульфата натрия по сахарозе равен 3,1 мг/мл.

Реактивы:

1) 1 н раствор сульфата цинка;
2) 1 н раствор гидроксида натрия;
3) 20 % раствор HCl;
4) 2,5 н раствор гидроксида натрия;
5) метиловый красный;
6) 6,925 % раствор сульфата меди;

7) щелочной раствор сегнетовой соли;

8) 20 % раствор иодида калия.

Ход анализа:

1) приготовление водной вытяжки:

Навеску, взвешенную с точностью до 0,001 г (взятую с расчетом, чтобы концентрация сахара в растворе была около 0,5 %), переносят в мерную колбу на 200 мл, приливают на 2/3 объема дистиллированной воды и взбалтывают 5 мин для полного растворения сахара. Затем осаждают мешающие вещества, добавив в колбу 10 мл 1 н раствора сульфата цинка и 10 мл 1 н раствора гидроксида натрия. Тщательно перемешивают, доводят водой до метки и оставляют на 15 минут. Отстоявшуюся жидкость фильтруют через складчатый фильтр в сухую колбу;

2) проведение гидролиза сахарозы:

Сахароза не обладает редуцирующей способностью, поэтому перед определением её приходится превращать в инвертный сахар.

В мерную колбу на 100 мл переносят пипеткой 50 мл фильтрата и прибавляют 5 мл 20 % соляной кислоты. Колбу погружают в нагретую до 70 °С водяную баню и выдерживают 6 минут при этой температуре. Затем содержимое колбы осторожно нейтрализуют по метиловому красному 1 н раствором гидроксида натрия до появления желто-розового окрашивания. Избытка щелочи необходимо избегать, так как моносахара в щелочной среде могут разлагаться. После нейтрализации колбу доводят до метки дистиллированной водой и содержимое хорошо перемешивают. Полученный раствор используют для определения в нем сахара;

3) иодометрическое определение сахара:

В коническую колбу на 250 мл вносят пипеткой 25 мл исследуемого раствора, добавляют пипеткой 5 мл раствора сульфата меди и 5 мл щелочного раствора сегнетовой соли, быстро доводят смесь до кипения и кипятят ровно 2 минуты, быстро охлаждают до комнатной температуры, прибавляют 5 мл 20 % раствора иодида калия, 5 мл 25 % серной кислоты и сразу же титруют 0,1 н раствором тиосульфата натрия до соломенно-желтой окраски. Затем прибавляют 2 мл раствора крахмала и продолжают титрование до исчезновения синей окраски. Проводят контрольный опыт, взяв вместо исследуемого раствора 25 мл дистиллированной воды;

4) массовую долю сахара рассчитывают по формуле (2):

$$x = \frac{3{,}1 \cdot (V_0 - V) \cdot 100}{m_{нав} \cdot (100 - W)} \qquad (2)$$

где 3,1 - титр 0,1 н раствора тиосульфата по сахарозе, мг/мл;

1,6 - коэффициент пересчета, учитывающий разбавление и пересчет на 100 г продукта;

$m_{нав}$ - масса навески, г;

V_0 - объем тиосульфата в холостом опыте, мл;

V - объем тиосульфата в анализируемом образце, мл;

W - влажность образца, %.

2.3 Лабораторная работа № 6 Колориметрический метод определения сахаров

Метод основан на восстановлении ионов двувалентной меди редуцирующими сахарами и изменении окраски глицерата меди.

Реактивы:

1) раствор глицерата меди (готовят перед проведением анализа): К 40 мл раствора NaOH (0,15 г/мл) прибавляют 1 мл чистого глицерина, тщательно перемешивают, затем прибавляют 80 мл раствора сульфата меди (8 г/л);

2) стандартный раствор глюкозы с концентрацией 10 мг/мл;

3) 1 % раствор HCl.

Ход анализа:

1) построение градуировочного графика:

В пробирки отмеряют 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл стандартного раствора глюкозы и доводят объем до 1 мл дистиллированной водой. Перемешивают и прибавляют в пробирку 15 мл раствора глицерата, снова перемешивают и нагревают пробирки в кипящей водяной бане ровно 6 мин. Вынимают, охлаждают пробирки в холодной воде и измеряют оптическую плотность прозрачного раствора при длине волны 580 нм и толщине светопоглощающего слоя 10 мм;

2) анализ исследуемого вещества:

В ступке со стеклянным песком растирают навеску массой 8 г, взвешенную с точностью до 0,01 г. Затем в ступку приливают 50 мл дистиллированной воды с температурой 70 °С и тщательно перемешивают содержимое. Далее проводят

анализ на содержание редуцирующих сахаров, а также суммы моно- и дисахаридов в анализируемом объекте следующим образом:

а) для определения редуцирующих сахаров после охлаждения отбирают в пробирку 1 мл прозрачной вытяжки, прибавляют 15 мл раствора глицерата меди, перемешивают. Пробирку нагревают на кипящей водяной бане 6 мин, охлаждают. После отстаивания отбирают прозрачный раствор и измеряют его оптическую плотность. По градуировочному графику определяют содержание сахаров;

б) для определения суммы моно- и дисахаридов 0,5 мл прозрачной вытяжки помещают в сухую пробирку, прибавляют 0,5 мл 1 % раствора HCl и нагревают на кипящей водяной бане 15 мин. Затем в пробирку добавляют 15 мл глицерата меди и нагревают еще 6 мин. Пробирку охлаждают, отстаивают содержимое и измеряют оптическою плотность прозрачного раствора;

3) содержание сахаров рассчитывают по формуле (3):

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 100}{m_{нав} \cdot 1000} \qquad (3)$$

где a - содержание сахаров, найденное по калибровочному графику, мг (при определении суммы моно- и дисахаридов удваивается, так как отнесено к 1 мл вытяжки);

V - общий объем вытяжки, мл (равен объему прибавленной воды);

$m_{нав}$ - масса навески, г.

2.4 Лабораторная работа № 7 Определение фруктозы и других кетоз

Метод основан на способности кетоз давать окраску с резорцином в кислой среде.

Реактивы:

1) спиртовой раствор резорцина - 1 г резорцина растворяют в 1 л 95 % этанола;

2) 30 % раствор HC1 (раствор 5:1), не должен давать окраски с резорцином;

3) стандартный раствор фруктозы - 100 мг фруктозы растворяют в 100 мл насыщенного раствора бензойной кислоты, хранят в холодильнике. Рабочий раствор – 4 мл стандартного раствора доводят в мерной колбе на 100 мл водой.

Ход анализа:

В пробирку вносят 5 мл экстракта, содержащего от 1 до 8 мг фруктозы в 100 мл, 5 мл спиртового раствора резорцина и 15 мл 30 % раствора соляной кислоты. В другой пробирке готовят холостой опыт - вместо экстракта вливают 5 мл дистиллированной воды. Перемешивают, затем выдерживают пробирки 20 минут на водяной бане при температуре 80 °С. Охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность при длине волны 540 нм.

Аналогично обрабатывают стандартные растворы для построения градуировочного графика. По градуировочному графику определяют содержание фруктозы в исследуемом объекте.

2.5 Лабораторная работа № 8 Микрометод определения сахаров по методу Швецова А. С., Лукьяненко Э. Х.

Метод Швецова и Лукьяненко основан на восстановлении феррицианида калия редуцирующими сахарами до ферроцианида. Последний в присутствии желатина образует с сульфатом трехвалентного железа устойчивую синюю окраску:

$$3K_4Fe(CN)_6 + 2Fe_2(SO_4) \rightarrow Fe_4\left[Fe(CN)_6\right]_3 + 6K_2SO_4$$

Достоверно определяется концентрация сахара от 0,01 до 0,1 мг/мл.

Реактивы:

1) 5 % растворы HC1 и NaOH;

2) раствор феррицианида - 1,65 г $K_3Fe(CN)_6$ и Na_2CO_3 растворяют в 1л воды, хранят в темной склянке;

3) раствор $Fe_2(SO_4)_3$ – 1 г $Fe_2(SO_4)_3$ растворяют в 10 мл концентрированной серной кислоты (плотностью 1,84 г/мл) и доводят в мерной колбе до 1 л;

4) 10 % раствор желатина.

В день анализа готовят рабочий раствор, смешивая растворы 3 и 4 в соотношении 20:1;

5) 4 % раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты.

Ход анализа:

При суммарном определении сахаров после гидролиза (см. п.п. 2.3 (колориметрический метод определения сахаров) «анализ исследуемого вещества»,

определение суммы моно- и дисахаридов) в пробирки с 2 мл экстракта приливают 1 мл 5 % HC1 и нагревают 5 мин на водяной бане при температуре 70 °С. Затем пробирки охлаждают и нейтрализуют 5 % щелочью по лакмусовой бумажке и поступают, как указано ниже.

В вытяжке осаждают мешающие вещества фосфорно-вольфрамовой кислотой. Затем в пробирки, имеющие метки на 20 $см^3$, приливают 2 мл вытяжки, по 2 мл раствора феррицианида и дистиллированной воды, перемешивают и нагревают 15 мин на кипящей водяной бане. После нагревания пробирки охлаждают и приливают в каждую по 4 мл раствора сульфата железа. Перемешивают и доводят объем водой до метки - до 20 мл. Перемешивают, измеряют оптическую плотность на красном светофильтре.

Вычисление результатов производят по градуировочному графику, построенному по стандартному раствору глюкозы.

Метод дает завышенные результаты при исследовании веществ с повышенным содержанием азотистых соединений.

2.6 Лабораторная работа № 9 Фотоколориметрический метод определения редуцирующих сахаров в кондитерских изделиях и полуфабрикатах (ГОСТ 5903-89)

Сущность метода

В основе метода лежит способность редуцирующих сахаров при нагревании со щелочным раствором феррицианида восстанавливать его в ферроцианид, причем сахара окисляются до соответствующих кислот:

$$C_6H_{12}O_6 + 6K_3Fe(CN)_6 + 6KOH \rightarrow (CHOH)_4(COOH)_2 + 4H_2O + 6KFe_4(CN)_6$$

Принцип метода заключается в том, что к раствору редуцирующих веществ прибавляют точно отмеренный избыток раствора окислителя - феррицианида. О количестве сахара судят по остатку феррицианида после реакции (чем меньше этот остаток, тем больше редуцирующих веществ). Остаток феррицианида определяют по оптической плотности раствора.

Реактивы:

1) раствор $K_3Fe(CN)_6$ с концентрацией 10 мг/мл;

2) стандартный раствор глюкозы или инвертного сахара с концентрацией 2 мг/мл редуцирующего сахара;

3) 2,5 н раствор гидроксида калия;

4) 1 н раствор сульфата цинка;

5) 1 н раствор гидроксида натрия;

6) фенолфталеин.

Ход анализа:

1) построение градуировочного графика:

В шесть конических колб вместимостью 100 мл вносят пипеткой по 20 мл раствора феррицианида, 5 мл 2,5 н раствора КОН и 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 мл стандартного раствора сахара. Доводят объем раствора до 35 мл дистиллированной водой. Содержимое колб нагревают до кипения и кипятят ровно 1 минуту. Затем быстро охлаждают до комнатной температуры и измеряют оптическую плотность растворов при длине волны 440 нм. Толщину светопоглощающего слоя

выбирают так, чтобы оптическая плотность раствора, содержащего 6 мл сахара, была в пределах 0,2-0,25. Строят градуировочный график зависимости оптической плотности от количества мг сахара;

2) анализ исследуемого образца:

Масса навески рассчитывается из условия, чтобы в 100 мл вытяжки содержалось 0,2 г редуцирующих веществ по формуле (4):

$$m_{нав} = \frac{0{,}2 \cdot V}{p} \qquad (4)$$

где V - объем мерной колбы для приготовления вытяжки, мл;

p - предполагаемая массовая доля редуцирующих веществ, %.

(При анализе хлебобулочных изделий необходимо воспользоваться справочником «Химический состав пищевых продуктов", ч. 2 так как содержание редуцирующих сахаров определяется их содержанием в сырье и мало изменяется в ходе технологических процессов).

Навеску, взвешенную с точностью до 0,01 г, помещают в химический стакан и тщательно растирают с 50 мл нагретой до 70 °С дистиллированной воды. Однородную массу количественно переносят в мерную колбу на 250 мл, смывая дистиллированной водой в количестве примерно половины объема колбы. Колбу помещают в водяную баню с температурой 60 °С и выдерживают при этой температуре 15 мин, периодически взбалтывая содержимое.

Охладив раствор, осаждают мешающие несахара, прибавляя в колбу 10 мл 1 н раствора сульфата цинка, если масса навески была меньше 5 г (15 мл раствора сульфата цинка, если масса навески была больше 5 г) и такой объем 1 н раствора NaOH, который был установлен отдельным титрованием соответствующего объема раствора сульфата цинка по фенолфталеину. Содержимое колбы взбалтывают, доводят до метки, перемешивают и фильтруют в сухую колбу.

В коническую колбу на 100 мл вносят пипеткой 20 мл раствора феррицианида, 5 мл 2,5 н КОН, 8 мл фильтрата и 2 мл дистиллированной воды. Нагревают до кипения, кипятят ровно 1 минуту, быстро охлаждают и измеряют оптическую плотность так же, как и при построении калибровочного графика. Если значения оптической плотности не входят в интервал 0,15-0,6 определение повторяют, изменив количество мл фильтрата и дистиллированной воды;

3) массовую долю редуцирующих веществ определяют по формуле (5):

$$x = \frac{a \cdot V_1 \cdot 100 \cdot K}{V_2 \cdot m_{нав} \cdot 1000}, \% \qquad (5)$$

где a – масса инвертного сахара, найденная по градуировочному графику, мг;

V_1 – объем мерной колбы, взятой для приготовления вытяжки, мл;

V_2 - объем фильтрата, взятого на реакцию с феррицианидом, мл;

$m_{нав}$ - масса навески, г;

K - поправочный коэффициент, учитывающий частично окисление сахарозы, для хлебобулочных изделий $K = 0,95$

2.7 Контрольные вопросы

1 Собственные сахара муки и продуктов его переработки. Редуцирующие и нередуцирующие сахара.

2 Определение редуцирующих сахаров ферроцианидным методом. Расчет навески исследуемого продукта.

3 Определение сахаров медно-глицератным методом. Возможность определения общего сахара и редуцирующих сахаров из одной навески.

4 Определение сахара по Шорлю. Ход анализа, реакции, лежащие в основе метода.

2.8 Лабораторная работа № 10 Содержание пшеничного крахмала по методу Эверса

Метод основан на гидролизе крахмала при нагревании в слабом растворе соляной кислоты и определении его концентрации по отклонению плоскости поляризации поляризованного луча продуктами гидролиза, полученными в строго определенных условиях.

Реактивы:

1) 0,31 н (1,124 %) раствор HC1;
2) реактив Карреза 1 – 13 % раствор $K_4Fe(CN)_6$;
3) реактив Карреза 2 – 17 % раствор $ZnSO_4$.

Ход анализа:

1) отвешивают на технических весах навеску измельченного исследуемого образца массой 5 г, взвешенную с точностью до 0,01 г и количественно переносят её в сухую мерную колбу на 100 мл. Приливают туда 25 мл 0,31 н HC1, перемешивают, добиваясь полного смачивания вещества и разрушения комочков. Следующими 25 мл той же кислоты смывают с горлышка и стенок колбы прилипшие частицы. Колбу помещают на 15 минут в кипящую водяную баню. В течение первых трех минут содержимое колбы непрерывно размешивают плавными круговыми движениями. Через 15 минут колбу вынимают, вливают в неё 30 мл дистиллированной воды, взбалтывают и охлаждают до 20 °С;

2) для осаждения белков и осветления раствора в колбу добавляют по 2 мл растворов реактивов Карреза 1 и 2, через 5 минут колбу доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают содержимое. Затем фильтруют через складчатый фильтр в сухую колбу. Первые примерно 10 мл фильтрата отбрасывают. Прозрачный фильтрат поляризуют при 20 °С немедленно после заполнения поляриметрической трубки;

3) содержание крахмала рассчитывают по формуле (6):

$$C = \frac{\alpha_{on} \cdot 100 \cdot 100}{[\alpha]_p \cdot m_{нав} \cdot l}\% \qquad (6)$$

где C – массовая доля крахмала, %

$\alpha_{оп}$ – величина отклонения плоскости поляризации поляризованного луча продуктами гидролиза крахмала, выраженная в градусах шкалы поляриметра;

$[\alpha]^{20}_{p}$ - среднее удельное вращение продуктов гидролиза крахмала, его величина зависит от вида крахмала, условий и глубины гидролиза. Для приведенных условий значения даны в таблице 1 (см. ниже);

l - длина поляриметрической трубки, дм;

$100/[\alpha]^{20}_{p}$ - количество крахмала, соответствующее повороту плоскости поляризации на 1° круговой шкалы поляриметра;

$m_{нав}$- масса навески, г.

При навеске 5 г и длине трубки 2 дм формула (6) приобретает вид (7):

$$C = \alpha_{оп} \cdot K \qquad (7)$$

где K - коэффициент, зависящий от типа прибора и вида крахмала.

В пересчете на сухое вещество массовая доля крахмала равна согласно формуле (8):

$$C_{с.в.} = \frac{c \cdot 100}{1 - w} \qquad (8)$$

где w - влажность исследуемого материала, %

Таблица 1 – Оптические показатели различных видов крахмалов

Крахмал	Удельное вращение, град/дм	Коэффициенты	
		Для сахариметра (линейная шкала)	Для поляриметра (линейная шкала)
Кукурузный	184,6	1,879	5,416
Пшеничный	182,7	1,898	5,474
Картофельный	194,5	1,775	5,118
Ржаной	184,0	1,885	5,434
Ячменный	181,5	1,912	5,506
Овсяный	181,3	1,914	5,504
Рисовый	185,9	1,866	5,380

2.9 Лабораторная работа №11 Определение крахмала объемным методом (по Починку Х. Н.)

Метод основан на получении комплексного соединения крахмала с иодом, последующем окислении крахмала бихроматом и иодометрическом учете избытка последнего.

Реактивы:

1) 0,5 н раствор бихромата. 12,5 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 125 мл воды, затем постепенно прибавляют 400 мл концентрированной серной кислоты, после перемешивания и охлаждения переливают в склянку с притертой пробкой;

2) 80 % раствор $Ca(NO_3)_2$. 20 г $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ растворяют в 70 мл дистиллированной воды в мерном цилиндре и постепенно доводят водой до 250 мл; из этого раствора по мере надобности готовят 20 % или

5 % раствор;

3) 0,5 % раствор иода в растворе иодида калия;

4) 0,1 н раствор тиосульфата натрия.

Ход анализа:

1) получение раствора крахмала:

Берут 0,25 г зерна или муки, содержащих от 20 до 200 мг крахмала растирают в ступке с 5 мл 80 % раствора нитрата кальция, переносят в коническую колбу на 200 мл, смывают 25 мл того же раствора, колбу накрывают стеклянной воронкой ставят на плитку и несильно кипятят 3 мин. При этом крахмал переходит в раствор. После охлаждения воронку ополаскивают водой. Содержимое переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. Затем перемешивают и фильтруют через складчатый фильтр;

2) осаждение крахмала:

5 мл фильтрата переносят в центрифужную пробирку, добавляют 2 мл раствора иода, перемешивают стеклянной палочкой, разбавляют 5-6 каплями воды и оставляют на 30 мин. При этом осаждается соединение крахмала с иодом, содержащее 14-16 % йода. Затем центрифугируют и прозрачный фильтрат сливают как можно полнее. Осадок промывают несколько раз 5 % раствором нитрата кальция, прибавляя его каждый раз по 5 мл, перемешивая той же стеклянной палочкой, что и при центрифугировании;

3) окисление крахмала:

Промытый осадок крахмала с иодом сливают в коническую колбу на 200 мл небольшими порциями - по 0,2 – 0,3 мл воды, хорошо перемешивая стеклянной

палочкой. Общее количество воды не должно превышать 3 мл. В колбу прибавляют 5 мл раствор бихромата, перемешивают и тотчас же помещают на 15 мин на кипящую водяную баню. При этом крахмал окисляется до углекислоты и воды:

$$(C_6H_{12}O_6)_n + K_2Cr_2O_7 + H_2SO_4 \rightarrow 6nCO_2 + K_2SO_4 + Cr_2(SO_4)_3 + 5nH_2O$$

Затем колбу снимают, дают остыть, прибавляют 5 мл 20 % раствора *KI,* который реагирует с избытком бихромата, выделяется иод. Его оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата в присутствии органического растворителя (в колбу для титрования приливают 20 капель органического растворителя). 1 мл 0,1 н раствора тиосульфата соответствует 0,675 мг крахмала. Отдельно титруют 5 мл бихромата после разбавления ее 60 мл воды и прибавления 1 мл бензола (20 капель) и 5 мл 20 % раствора *KI;*

4) содержание крахмала рассчитывают по формуле (9):

$$x = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 100 \cdot T}{5 \cdot m_{нав}} \qquad (9)$$

где V_1, - объем тиосульфата в холостом опыте (титрование бихромата), л;

V_2 - объем тиосульфата, затраченный при титровании крахмала, л;

$m_{нав}$ – масса навески, г;

100 – общий объем, в котором растворена навеска, мл;

5 – объем аликвоты, взятый для осаждения крахмала, мл;

T - титр раствора тиосульфата, моль/л.

2.10 Контрольные вопросы

1 Крахмал, его состав. Отличительные особенности крахмала в зависимости от вида сырья.

2 Гидролиз крахмала. Факторы, обуславливающие его глубину.

3 Отличительная особенность вещества. Удельное вращение, факторы, от которых зависит его величина.

4 Определение крахмала по Эверсу. Его основные этапы.

5 Определение крахмала по Починку, его основные этапы. Химические реакции, лежащие в основе метода.

3 Определение общего содержания жиров

3.1 Общие сведения

Методы количественного определения жиров основаны на их способности растворяться в органических растворителях. Как правило, в исследуемых объектах присутствуют вещества, которые полностью или частично переходят в органический растворитель вместе с жиром. Диэтиловый или петролейный экстракты после удаления растворителя называют сырым жиром. Сырой жир представляет собой сложную смесь, которая помимо жиров содержит в себе свободные жирные кислоты, воски, стерины, эфирные масла и другие органические соединения. Состав сырого жира меняется в зависимости от вида растворителя и его чистоты. Наличие влаги как в самом растворителе, так и в исследуемом образце значительно завышает результаты при определении сырого жира, т. к. некоторые нерастворимые в органическом растворителе части продукта (сахара, соли и др.) растворяясь в воде переходят в вытяжку. Поэтому перед определением растворитель очищают от примесей и воды, а исследуемый материал высушивают.

3.2 Лабораторная работа № 12 Определение содержания сырого жира методом Сокслета

Извлечение сырого жира по этому методу проводят в аппарате Сокслета, обеспечивающем непрерывность экстрагирования (рисунок 1). Этот аппарат состоит из трех частей: экстрактора 1, приемной колбы 2 и обратного холодильника 3. Все части прибора соединяются при помощи шлифов.

Главная часть прибора представляет собой цилиндрический сосуд, снабженный двумя боковыми трубками: более широкая трубка 4 служит каналом для отвода паров растворителя в холодильник, более тонкая 5 является сифоном, отводящим эфирную вытяжку в колбу.

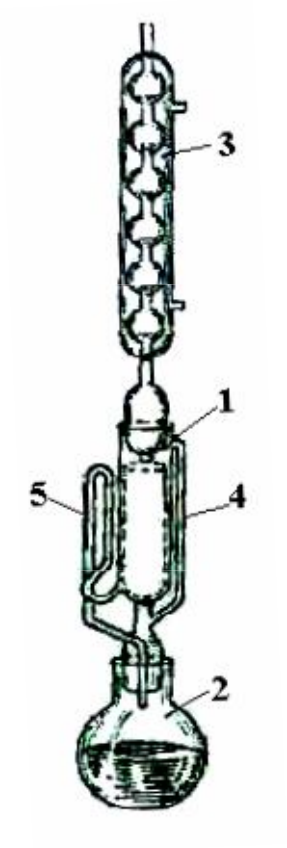


Рисунок 1 - Аппарат Сокслета

Ход анализа:

Навеску хорошо измельченного вещества после определения в нем влажности массой от 3 до 12 г взвешивают с точностью до 0,001 г. Если ожидаемое содержание жиров в продукте до 10 % , берут навеску 10 г; при содержании жира 50-60 % достаточна навеска массой 1 – 2 г.

Навеску заделывают в пакетики или патроны из плотной фильтровальной бумаги. Пакетик помещают в экстрактор аппарата Сокслета. Патрон должен размещаться ниже верхнего изгиба сифонной трубки 5, а его диаметр должен быть несколько меньше внутреннего диаметра экстрактора. Сухую и чистую приемную колбу аппарата Сокслета взвешивают на аналитических весах и наливают в нее на 2/3 - 3/4 объема петролейный эфир ($t_{кип}$ = 40-80 °С). Затем собирают аппарат, пускают в холодильник воду, подогревают колбу с эфиром в колбонагревателе. Нагрев не должен быть очень сильным во избежание потерь растворителя. При слишком слабом кипении нарушается периодичность сливания эфира по боковой трубке, что замедляет экстракцию. Пары кипящего эфира проходят по широкой трубке в холодильник, конденсируются и эфир по каплям стекает в патрон с веществом. Экстрактор постепенно наполняется эфиром. Когда

уровень его поднимется несколько выше верхнего колена сифона, тогда эфир стекает в колбу через сифон. В колбе, вновь нагреваясь, эфир вновь превращается в пары, которые вновь поднимаются в холодильник, а жир остается в колбе и т.д. Таким образом, одним и тем же небольшим количеством растворителя можно перевести в приемную колбу жир, содержащийся в навеске. Конец экстракции устанавливается практическим путем. При обычной частоте сливании эфира из экстрактора в приемную колбу 10-15 капель в час, на полную экстракцию требуется 4-5 часов. После окончания экстракции выключают колбонагреватель, дают колбе остыть, выключают воду, отсоединяют холодильник. Наклонив экстрактор, сливают в приемную колбу остатки растворителя и отсоединяют колбу от экстрактора. Если эфирная вытяжка получилась мутной от попавших частиц исследуемого вещества, ее отфильтровывают через сухой бумажный фильтр в другую предварительно взвешенную колбу. Затем растворитель отгоняют на водяной бане (рисунок 2) при температуре 60-70 °С.

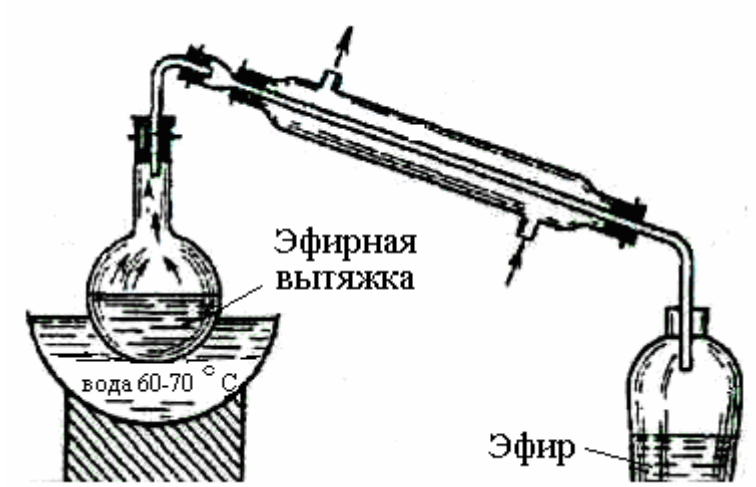


Рисунок 2 – Отгонка растворителя методом простой перегонки

3.3 Лабораторная работа № 13 Рефрактометрический метод определения жира (ГОСТ 5899-85)

Сущность метода

Метод основан на измерении показателя преломления раствора жира в органическом растворителе. Коэффициент преломления растворителя должен значительно отличаться от показателя преломления жира - чем больше разница, тем точнее результаты. Кроме того, растворитель не должен растворять воду и иметь достаточно высокую температуру кипения. Этим условиям удовлетворяет монобромнафталин. Стандартами допускается также использование монохлорнафталина, но показатель преломления последнего несколько ниже, к тому же он летуч и обладает очень резким неприятным запахом.

Перед определением жира устанавливают плотность растворителя, показатели преломления чистого растворителя и чистого жира и калибруется микропипетка емкостью 2 мл с ценой деления 0,02 мл.

Для работы используется универсальный рефрактометр с пределом измерений показателя преломления 1,70.

Реактивы:

1) уксусная кислота (ледяная);
2) монобромнафталин (монохлорнафталин);
3) карбонат натрия (крист.).

Ход анализа:

Навеску исследуемого продукта около 1 г, взятую с точностью до 0,0002 г помещают в фарфоровую ступку, прибавляюсь 0,5 мл воды нагревают на водяной бане, прибавляют 1 г чистого сухого песка, все хорошо растирают. Затем добавляют 1 мл ледяной уксусной кислоты и нагревают на песчаной бане 2 мин. Охладив ступку, прибавляют точно 2 мл растворителя, тщательно растирают содержимое ступки с растворителем в течение 3 мин, добавляют 1 г карбоната натрия, перемешивают и фильтруют в маленький стаканчик. 2 капли фильтрата переносят на призму рефрактометра и определяют показатель преломления раствора жира.

Массовую долю жира рассчитывают по формуле (10):

$$\varpi = \frac{V_P \cdot d_{ж}}{m_{нав}} \cdot \frac{n_p - n_{ж}}{n_{р.ж} - n_{ж}} \cdot 100 \qquad (10)$$

где V_p - объем растворителя, взятый для извлечения жира, мл;

$d_{ж}$ - плотность жира, г/см (см. таблицу жировых констант);

$m_{нав}$ - масса навески, г;

n_p - коэффициент преломления растворителя (для α-монобромнафталина равен 1,658);

$n_{ж}$ - коэффициент преломления жира (справочная величина, если природа жира неизвестна, то коэффициент преломления чистого жира определяют предварительно);

$n_{р.ж}$ - коэффициент преломления раствора жира в растворителе.

Для сливочного масла $n_{ж}$ = 1,4506; плотность - 0,920 г/см^3.

Для маргарина $n_{ж}$ = 1,4690; плотность 0,923 г/см^3.

3.4 Лабораторная работа № 14

3.4.1 Определение содержания жира весовыми методами (ГОСТ 5668 - 68)

Метод основан на извлечении жира из предварительно гидролизованной навески изделия органическим растворителем и определении количества жира весовым методом после удаления растворителя из определенного объема полученного раствора.

Реактивы:

1) 5 % раствор HC1;
2) NaOH - концентрированный раствор;
3) фенолфталеин, 1 % спиртовой раствор;
4) органический растворитель (петролейный эфир, диэтиловый эфир, гексан).

Ход анализа:

Предварительно измельченную навеску продукта с предполагаемым содержанием жира не более 0,5 г, взвешенную с точностью до 0,01 г, количественно переносят в коническую колбу. Приливают 50 мл 5 % HC1 и кипятят 30 минут на слабой плитке с обратным холодильником.

После охлаждения колбы содержимое количественно переносят в делительную воронку, смывая небольшими порциями (примерно 3-5 мл) той же кислоты, прибавляют 5 мл концентрированного аммиака, 50 мл органического растворителя, закрывают делительную воронку и встряхивают в течение 15 минут. Затем

оставляют на 1 час для расслаивания. Если расслаивания не произойдет, добавляют еще 1-2 мл аммиака, следя за тем, чтобы реакция по фенолфталеину была кислой.

После расслаивания четко обозначен слой органического растворителя. Аликвотную часть его (20 мл) осторожно пипеткой сливают в предварительно взвешенный на аналитический весах бюкс. Бюкс оставляют в вытяжном шкафу открытым до полного испарения растворителя, затем неплотно прикрывают крышкой и сушат в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С до постоянной массы (обычно не менее 1 часа). Бюкс охлаждают в эксикаторе и взвешивают на аналитических весах.

Перед началом работы необходимо довести навеску до постоянной массы при температуре 100-105 °С, чтобы учесть содержание влаги в определяемом продукте; довести до постоянной массы бюксы при той же температуре. Массовую долю жира в образце рассчитывают по формуле (11):

$$w = \frac{(m_1 - m_0) \cdot 50}{m_{нав} \cdot 20} \cdot \frac{100}{100 - \varpi} \qquad (11)$$

где m_1 - масса бюкса с высушенным жиром, г;

m_0 - масса пустого бюкса, г;

$m_{нав}$ - масса навески, г;

ω - влажность продукта, %.

Окончательное удаление растворителя и высушивание жира ведут в шкафу при температуре 100-105 °С. Затем колбу охлаждают и взвешивают на аналитических весах.

Массовую долю сырого жира рассчитывают по формуле (12):

$$X = \frac{m_1 - m_2 \cdot 50}{m_{нав}} \cdot 100\% \qquad (12)$$

где m_1 - масса колбы с жиром, г;

m_2 - масса пустой колбы, г;

$m_{нав}$ – масса навески, г.

3.4.2 Определение содержания сырого жира методом настаивания

Метод предложен А.И. Островским, не требует сложного оборудования и при повторных определениях дает хорошую сходимость.

Ход анализа:

Из фильтровальной бумаги размером 10х10 см делают пакет, в который между двумя слоями обезжиренной ваты помещают от 2 до 5 г исследуемого вещества, предварительно высушенного и тщательно измельченного. Навеску берут на аналитических весах. Закрытый и закрепленный нитками пакет помещают в коническую колбу емкостью 100 мл. Пакет должен быть таким, чтобы он мог свободно разместиться на дне колбы горизонтально. В колбу отмеряют 50 мл петролейного эфира, затем плотно закрывают её корковой пробкой и оставляют в вытяжном шкафу на 24 часа. После настаивания из колбы пипеткой с помощью

груши переносят 10 мл раствора в предварительно взвешенные на аналитических весах стеклянные бюксы. Растворитель из бюксов отгоняют на кипящей водяной бане, после чего остаток сушат при температуре 100-105 °С в течение 1 часа, охлаждают и взвешивают. Массовую долю жира рассчитывают по формуле (13):

$$X = \frac{5 \cdot (m_1 - m_2)}{m_{нав}} \cdot \frac{100}{100 - \varpi} \qquad (13)$$

где m_2 - масса пустого бюкса, г;

m_1 - масса бюкса с жиром, г;

$m_{нав}$ - масса навески, г;

ω - влажность, %.

ω(муки) ≈ 12,5 %, ω(зерна) ≈ 12 %, ω(хлеба) ≈ 14 %

3.5 Лабораторная работа № 15 Оценка качества пищевых жиров по основным показателям

Основными качественными показателями жиров являются кислотное число, число омыления, иодное число.

Кислотным числом называется количество мг едкого кали, необходимого для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира. Оно зависит от качества сырья, способа получения масел или жиров, длительности и условий хранения и пр. Кислотное число - один из основных показателей степени свежести жира и регламентировано стандартами на различные виды пищевых масел и жиров.

Определяют кислотное число нейтрализацией свободных жирных кислот, содержащихся в навеске исследуемого вещества, спиртовым раствором щелочи (ГОСТ 5476-64)

Реактивы:

1) смесь этанола и этилового эфира (1:1);

2) 0,1н раствор КОН в этаноле;

3) фенолфталеин, либо тимолфталеин – 1 % спиртовые растворы.

Ход анализа:

В коническую колбу вместимостью 150-200 мл отвешивают 3 г испытуемого масла, приливают 25 мл смеси этанола и эфира, добавляют несколько капель индикатора (фенолфталеин для светлых масел или тимолфталеин - для темноокрашенных). Полученный раствор при постоянном перемешивании тируют раствором КОН до получения розовой окраски, устойчивой в течение 30 секунд (при тимолфталеине - до грязно-зеленой).

Кислотное число рассчитывают по формуле (14):

$$К.Ч. = \frac{V \cdot K \cdot 5{,}61}{m_{нав}} \qquad (14)$$

где V - объем раствора КОН, израсходованный на титрование, мл;

K - поправочный коэффициент к титру щелочи;

5,61 - титр 0,1 н раствора КОН, мг/мл;

$m_{нав}$ - масса навески, г.

В соответствии со стандартами кислотное число пищевых растительных масел в зависимости от природы и сорта колеблется в пределах от 0,2 до 6 мг.

Число омыления характеризует общее количество свободных и связанных жирных кислот, входящих в состав данного жира. Оно выражается количеством мг едкого кали, необходимого для нейтрализации свободных и связанных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Для жиров и масел одинакового происхождения колеблется в незначительных предела, характеризуя таким образом его природу. Для определения числа омыления (ГОСТ 5478-64) навеску исследуемого жира обрабатывают спиртовым раствором щелочи до полного омыления глицеридов и жирных кислот, избыток щелочи оттитровывают раствором соляной кислоты с точно установленной концентрацией.

Реактивы:

1) 0,5 н раствор КОН в этаноле;
2) 0,5 н раствор HCl;
3) 1 % спиртовой раствор фенолфталеина.

Ход анализа:

В коническую колбу на 250-300 мл отвешивают 2 г испытуемого масла с точностью до 0,0001 г. Чтобы взять точную навеску жидких масел, поступают следующим образом: в предварительно взвешенный на аналитических весах стакан на 50 мл пипеткой помещают 10 капель масла, взвешивают и рассчитывают массу одной капли, затем считают число капель для необходимой навески и отсчитывают их той же пипеткой в коническую колбу, не касаясь пипеткой её стенок.

Приливают из бюретки точно 20 мл спиртового раствора КОН. Колбу соединяют с обратным холодильником и кипятят в течение 1 часа, периодически взбалтывая содержимое колбы.

К полученному прозрачному, еще не остывшему мыльному раствору приливают несколько капель индикатора и тируют 0,5 н раствором НС1 до исчезновения розовой окраски.

Одновременно в тех же условиях проводят контрольный опыт без масла.

Число омыления рассчитывают по формуле (15):

$$Ч.О. = \frac{28{,}05 \cdot (V_0 - V) \cdot K}{m} \qquad (15)$$

где 28,05 – титр 0,5 н раствора KOH, мг/мл;

V_0 – объем 0,5 н HCl, пошедший на титрование контрольной пробы, мл;

V – объем 0,5 н HCl, пошедший на титрование избытка KOH после взаимодействия с жиром, мл;

K – поправочный коэффициент к титру щелочи;

m – масса навески, г.

Иодное число – характеризует степень стойкости жира в процессе хранения, склонность его к химическим превращениям, так как ненасыщенные жирные кислоты присоединяют по месту двойных связей кислород воздуха, обуславливая процессы прогоркания и высыхания жиров.

Определение иодного числа основано на способности непредельных жирных кислот количественно присоединять молекулу галогена по месту двойной связи в условиях, при которых эта реакция не сопровождается замещением водорода на галоген.

По методу Маргошеса определение иодного числа осуществляется при помощи спиртового раствора иода. Сущность метода заключается в реакции:

$$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH + HIO \rightarrow CH_3(CH_2)_7CHOHCHI(CH_2)_7COOH$$

Иодноватистая кислота образуется при взаимодействии иода с водой по уравнению:

$$I_2 + H_2O \rightarrow HI + HIO$$

Остаток неприсоединившегося иода оттитровывают тиосульфатом натрия.

Реактивы:

1) этанол 96 %;
2) 2,5 % спиртовой раствор иода;
3) 0,1 н раствор тиосульфата натрия;
4) 0,1 % раствор крахмала.

Ход анализа:

На предварительно взвешенное часовое стекло помещают несколько капель исследуемого масла и снова взвешивают. Опускают стекло с маслом в

химический стакан и добавляют стократное количество спирта. (При навеске в 0,2 - 0,3 г добавляют 20-30 мл спирта). Для лучшего и более быстрого растворения навески смесь подогревают на водяной бане при температуре 45 - 50 °С, периодически встряхивая.

Прибавляют пипеткой 20 мл спиртового раствора иода, хорошо перемешивают и добавляют мерным цилиндром 200 мл дистиллированной воды. Добавляя воду, постоянно перемешивают смесь стеклянной палочкой. Затем оставляют на 5 мин, прикрыв стакан часовым стеклом, после чего остаток неприсоединившегося иода оттитровывают 0,1 н раствором тиосульфата натрия.

Одновременно проводят контрольный опыт (без жира) и рассчитывают иодное число по формуле (16):

$$И.Ч. = \frac{(V_0 - V) \cdot K \cdot 100 \cdot 0{,}01269}{m} \qquad (16)$$

где V_0 - объем раствора тиосульфата, израсходованный в контрольном опыте, мл;

V - объем раствора тиосульфата, израсходованный на титрование остатка иода после взаимодействия его с жиром, мл;

K - поправочный коэффициент к титру тиосульфата, К=1;

0,01269 - титр тиосульфата по иоду, мг/мл;

m – масса навески, г.

3.6 Контрольные вопросы

1 Липиды. Состав жидких и твердых жиров.

2 Что такое «сырой жир»?

3 Сравнить применяемые методы определения «сырого жира».

4 Качественная оценка жиров, ее основные показатели.

5 Кислотное число – характеристика понятий, в каких единицах выражается, техника ее определения.

6 Значение числа омыления для качественной оценки жиров и масел. Единицы выражения, техника определения.

7 Иодное число – что характеризует, в каких единицах выражается, определение по методу Маргошеса.

4 Определение активности ферментов

4.1 Общие сведения

Ферменты - специфические белковые вещества, катализирующие биохимические процессы. Активность и специфичность действия ферментов зависят в первую очередь от концентрации субстрата, активной кислотности среды и температуры. Поэтому измерение активности необходимо проводить в строго определенных условиях и за короткий промежуток времени, пока в составе реакционной смеси не произошли существенные изменения.

За единицу активности любого фермента обычно принимают такое его количество, которое способствует превращению 1 мкмоль субстрата за 1 минуту. Часто активность выражают в произвольно выбранных ферментных единицах на единицу массы анализируемого объекта. Международная единица измерения каталитической активности ферментов — катал (кат). Катал или микрокатал - каталитическая активность, способная осуществлять реакции со скоростью 1 моль/с (или мкмоль/с).

Каталаза - фермент, относящийся к классу оксидоредуктаз. Роль каталазы в организме заключается в том, что она разрушает ядовитый для клеток пероксид водорода, который образуется в ряде ферментативных процессов жизнедеятельности клетки. В каталазе белковая часть связана двумя карбоксилами с тетрапиррольным коферментом, содержащим ионы железа. Именно кофермент непосредственно участвует в катализируемой реакции, являясь составной

частью активного центра. Каталаза ингибируется цианидами, сероводородом, фторидами.

4.2 Лабораторная работа № 16 Определение активности каталазы

Сущность метода

Метод основан на измерении объема выделившегося кислорода после прибавления H_2O_2 к водному экстракту каталазы. Кислород собирают в специально собранном приборе. Он состоит из бюретки, заполненной 5 % раствором H_2SO_4, уровень которой регулируется резервуаром, соединенным с нею резиновой трубкой.

Ход анализа:

Отвешивают по 1 г свежеразмельченных семян (муки) или 10 г мелконарезанных листьев с точностью до 0,01 г. Переносят в ступку, добавляют 0,5 г $CaCO_3$ для нейтрализации среды, растирают со стеклянным песком. Затем добавляют 5 мл воды в размельченную массу семян (10 мл в массу других органов) и снова растирают. Полученную массу переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки дистиллированной водой. Препараты муки настаивают 30 минут, из других продуктов - 3 - 4 часа.

Определение активности проводят в суспензиях или центрифугатах.

Активность каталазы в суспензиях выше, чем в прозрачных растворах, что можно объяснить потерей фермента с твердой фазой.

В коническую колбу наливают 50 мл суспензии и прибавляют 3-5 капель толуола, чтобы избежать вспенивания. Затем помещают на дно колбы маленький стаканчик с 5 мл 3 % H_2O_2. Колбу герметично соединяют с бюреткой и ставят на

водяную баню с температурой 20 °С. Регулируют уровень жидкости в приборе и устанавливают ее на нулевом уровне в бюретке. Затем, встряхнув колбу, опрокидывают стаканчик с пероксидом водорода и тотчас пускают секундомер. В течение 10 секунд колбу перемешивают вращательными движениями и колбу снова помещают на баню.

Отсчет выделившегося кислорода делают через 2, 4, 6, 8, минут после начала реакции, уравнивая каждый раз жидкость в бюретке и резервуаре. Активность каталазы выражают в каталах. Катал - это количество фермента, способное превращать 1 моль субстрата в секунду. Ее можно рассчитать по формуле (17):

$$V = 0{,}016 \cdot V(O_2) \cdot \frac{P - h}{T} \cdot \frac{1}{\tau}, \text{ моль/с} \qquad (17)$$

где $V(O_2)$ - объем выделившегося кислорода, л;

τ - время, с;

P - давление, мм. рт. ст.;

T - абсолютная температура, К;

h - давление паров над 5 % раствором H_2SO_4 при данных условиях, рассчитывается по закону Рауля для растворов электролитов (18):

$$h = h_0 \cdot (1 - \frac{5/98}{5/98 + 95/18}) = h_0 \cdot 0{,}99 \qquad (18)$$

для t = 20 °С h = 23,38·0,99 = 23,16 мм.рт.ст.

Активность ферментного препарата определяется по формуле (19):

$$AC = \frac{V}{m_{нав}}, \qquad (19)$$

где V – активность фермента, моль/с;

$m_{нав}$ – масса навески, г;

Для сравнения активности каталазы в различных продуктах можно просто сопоставить объемы кислорода, выделяющиеся через одинаковые промежутки времени при исследовании различных образцов.

4.3 Лабораторная работа № 17 Колориметрический метод определения активности амилаз

Под действием амилаз в растениях происходит гидролиз высокополимерного углевода - крахмала - с образованием декстринов и мальтозы. В растениях встречаются α- и β-амилазы. Раздельное количественное определение активности α- и β-амилаз основано на их различной термостабильносги. β-амилаза разрушается нагреванием до 70 °С, α-амилаза при этом сохраняет свою активность.

Реактивы:

1) ацетатный буфер с pH 5,5;

2) 1 % раствор NaC1;

3) 2 % раствор водорастворимого крахмала (2 г крахмала, размешанного в 20 мл холодной воды выливают в 80 мл кипящей воды, после чего нагревают на кипящей водяной бане до

просветления раствора;

4) 1 н раствор HCl и 0,1 н раствор HC1;

5) 0,3 % раствор иода в 3 % растворе иодистого калия.

Ход анализа:

Навеску 1 г муки или проростков растирают в ступке с небольшим количеством 1 % NaC1 и переносят в коническую колбу на 50 мл. Соотношение между навеской и раствором NaC1 1:20. Содержимое колбы хорошо перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре в течение 30 минут, периодически встряхивая. Затем фильтруют через плотный складчатый фильтр. При трудном фильтровании можно сочетать фильтрование и центрифугирование при 4000-5000 об/мин.

Прозрачный раствор используют как ферментный препарат. Для определения активности α- и β – амилазы берут 4 пробирки (2 опытные и 2 контрольные) и вносят в них по 3 мл ацетатного буфера и 3 мл 2 %-ного раствора крахмала. Смесь нагревают на водяной бане или в термостате до 40 °С. Затем в опытные пробирки вносят по 0,2-1,0 см ферментного препарата (в зависимости от активности амилаз в объекте изучения), а в контрольные - такое же количество H_2O. Содержимое пробирок перемешивают и ставят в термостат при 40 °С на 30 минут. После инкубации в каждую пробирку сразу приливают по 2 $см^3$ 1н раствора HCl для прекращения действия амилаз.

Для выявления непрореагировавшего с ферментом крахмала проводят реакцию с йодом. В мерные колбы на 50 мл приливают около 30 мл воды, 1 мл 0,1 н HC1, 5 капель 0,3%-ного раствора иода и вносят из каждой пробирки по 0,5 мл смеси.

Содержимое колб хорошо перемешивают, доводят до метки водой и колориметрируют на фотоэлектроколориметре при красном светофильтре или на спектрофотометре при 595 нм в кювете с рабочей длиной 1 см.

Для определения активности α - амилазы в коническую колбу на 100 мл приливают 5 мл фильтрата (ферментного препарата), добавляют на кончике ножа сухого уксуснокислого кальция и выдерживают в течение 15 мин в ультратермостате или на водяной бане при 70 °С. Затем содержимое колбы быстро охлаждают в сосуде с холодной водой. При таком прогревании β - амилаза полностью инактивируется, α - амилаза сохраняет свою активность. Далее определение α - амилазной активности сводится к описанной выше процедуре.

Действие обоих ферментов выражают в миллиграммах гидролизованного крахмала в условиях опыта (за 30 минут) на 1 г муки. Активность β - амилазы определяют по разности между суммарной активностью α- и β – амилаз и активностью α - амилазы.

Активность амилаз на 1 г муки за 1 ч рассчитывают по формуле (20):

$$X = \frac{(D - D_1) \cdot a \cdot V}{D \cdot H \cdot V} \qquad (20)$$

где D - оптическая плотность контрольного раствора;

D_1 - оптическая плотность опытного раствора;

а - количество внесенного крахмала (0,06 г);

Н - масса навески, г;

V - объем исходной ферментной вытяжки, мл;

V_1 - объем вытяжки, взятой для инкубирования, мл.

4.4 Контрольные вопросы

1 К какому классу ферментов относится каталаза? Ее функции в организме.

2 Факторы, определяющие активность каталазы.

3 Единицы измерения активности. Расчет активности каталазы в приведенной методике.

4 Природа ферментов. К какому классу ферментов относятся амилазы? К какому классу белков относятся амилазы? Механизм расщепления крахмала α- и β - амилазами. Сахарообразующая и газообразующая способность муки.

5 Получение ферментного препарата. Различие ферментных препаратов из муки и солода.

6 Определение суммарной активности α- и β - амилаз. Кислотный оптимум активности α- и β - амилаз.

7 Определение активности α - амилазы. Температурный оптимум α- и β - амилаз. Роль ацетата кальция в ходе анализа.

8 Расчет активности β - амилазы.

5 Количественное определение витаминов

5.1 Общие сведения

Витамины - это биологически активные вещества с относительно низкой молекулярной массой. Они входят в активные группы двухкомпонентных ферментов. При отсутствии или недостаточном их количестве в пище ослабляются биохимические процессы, нарушается обмен веществ, что приводит к тяжелым заболеваниям, а иногда и гибели организма. Недостаток витаминов приводит к авитаминозам, избыток их также вреден - возникают нарушения процессов обмена - гипервитаминозы.

К витаминам относятся несколько десятков различных химических соединений. Некоторые из них обладают аналогичной витаминной активностью, поэтому их объединяют в родственные группы, иногда обозначаемые как один витамин.

Классификация витаминов обычно основана на их растворимости в воде или жирах.

5.2 Лабораторная работа № 18 Количественное определение каротина (по Цирелю К.Е.)

Определение каротинов основано на их растворимости в органических растворителях. Растворы каротинов в органических растворителях имеют интенсивно желтую окраску. Кристаллический каротин очень легко окисляется на воздухе, поэтому для фотоколориметрического его определения в качестве калибровочных растворов используют раствор бихромата калия (молярный коэффициент погашения растворов $K_2Cr_2O_7$ практически равен молярному

коэффициенту погашения каротинов). При исследовании растительного сырья в органический растворитель переходят и другие пигменты (хлорофилл), которые отделяют от каротина путем настаивания с сорбентами (Al_2O_3, CaO).

Реактивы:

1) стандартный раствор бихромата калия (0,707 г $K_2Cr_2O_7$ растворяют в 1л дистиллированной воды). Титр этого раствора по каротину 0,00416 мг/мл;

2) Al_2O_3 10 % влажности (к 90 г безводной окиси алюминия прибавляют 10 мл воды, тщательно перемешивают, хранят под шлифом);

3) CaO безводная;

4) Na_2SO_4 безв.;

5) органический растворитель (бензин авиационный, гексан).

Ход анализа:

1) построение градуировочного графика:

В мерные колбы на 50 мл помещают 5, 10, 15, 20, 25 мл стандартного раствора бихромата калия и доводят до метки дистиллированной водой. При измерении оптической плотности (длина волны 400 нм и толщина светопоглощающего слоя 25 мм) в качестве раствора сравнения используют воду. Строят зависимость оптической плотности от количества мг каротина;

2) анализ образца:

Навеску исследуемого материала 1-3 г, взвешенную с точностью до 0,01 г растирают с 5 г песка или измельченного стекла, количественно переносят в коническую колбу, добавляют 5 г сульфата натрия, 10 г окиси алюминия, 0,5 г окиси кальция и 50 мл гексана. Тщательно перемешивают, герметично закрывают колбу и

оставляют на 18-20 часов в темном месте. Затем осторожно пипеткой с резиновой грушей отбирают прозрачный раствор и измеряют его оптическую плотность. Если оптическая плотность раствора очень велика, его разбавляют в определенное число раз, учитывая это разбавление при расчете. Количество каротина в образце определяют с помощью градуировочного графика. Расчет ведут по формуле (21):

$$X = \frac{V_{K_2Cr_2O_7} \cdot T_{K_2Cr_2O_7/кар} \cdot 100}{m_{нав}} \qquad (21)$$

где X – количество мг каротина в 100 г продукта;

$V_{K_2Cr_2O_7}$ - объем бихромата калия, найденный по градуировочному графику;

$T_{K_2Cr_2O_7/кар}$ - титр бихромата калия по каротину, равен 0,00416 мг/мл;

$m_{нав}$ - масса навески анализируемого материала, г.

5.3 Лабораторная работа № 19 Количественное определение витамина Р (рутина) в чае

Сущность метода

Рутин способен окисляться перманганатом калия, в качестве индикатора используется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после того, как окислится весь рутин. Экспериментально установлено, что 1 мл 0,1 н раствора перманганата калия окисляет 6,4 мкг рутина.

Реактивы:

1) раствор $KMnO_4$ 0,05 н;

2) индигокармин (0,5 г индигокармина растирают в фарфоровой ступке, растворяют в 5 мл концентрированной серной кислоты, осторожно доводят водой до объема 100 мл, фильтруют и хранят в темной склянке 7-10 дней);

3) чай или готовый экстракт.

Ход анализа:

К 100 мг чая приливают 50 мл горячей дистиллированной воды, настаивают в течение 5 минут и перемешивают. Переносят 10 мл экстракта в коническую колбу на 100 мл, добавляют 10 мл дистиллированной воды и 5 капель индикатора индигокармина; появляется синее окрашивание. Титруют из микробюретки 0,05 н раствором перманганата калия до появления устойчивой желтой окраски.

5.4 Лабораторная работа № 20 Количественное определение витамина С

Сущность метода

Чистое кристаллическое вещество с противоцинготным действием было выделено в 1932г. Кингом. Установили, что оно идентично гексуроновой кислоте $C_6H_8O_6$, полученной четырьмя годами раньше из фруктов и овощей. Вещество получило название аскорбиновой кислоты, после того как была показана его чрезвычайная биологическая активность.

Наиболее характерное химическое свойство аскорбиновой кислоты – ее восстанавливающее действие, проявляющееся в обратимом окислении ее до дегидросоединения $C_6H_6O_6$.

Метод основан на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать 2,6-дихлорфенолиндофенол, который в кислой среде имеет красную окраску, а при восстановлении обесцвечивается, в щелочной среде окраска синяя. Так как витамин С соединение неустойчивое, особенно в нейтральной и щелочной средах, исследуемый раствор титруют в кислой среде щелочным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания.

Реактивы:

1) натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,001 н раствор;

2) 10 % HCl.

Ход анализа:

1) определение витамина С в капусте:

Навеску капусты около 1 г, взвешенную с точностью до 0,01 г, растирают в ступке с 2 мл 10 % HC1, приливают 8 мл воды и фильтруют. На титрование берут пипеткой 2 мл фильтрата в коническую колбу на 100 мл, прибавляют 10 капель HC1 и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до розовой окраски, устойчивой в течение 30 секунд;

2) определение витамина С в картофеле:

Навеску картофеля около 5 г, взвешенную с точностью до 0,01 г растирают в ступке с 20 каплями 10 % HC1. Постепенно вливают в ступку 15 мл дистиллированной воды, постоянно помешивая. Полученную массу количественно переносят в коническую колбу на 100 мл и титруют 0,001 н раствором 2,6-днхлорфенолиндофенола до розовой окраски, устойчивой в течение 30 секунд.

Расчет ведут по формуле (22):

$$X = \frac{0{,}088 \cdot U \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot m_{нав}}, \text{ мг/100 г продукта} \qquad (22)$$

где 0,088 - титр 0,001 н раствора титранта по аскорбиновой кислоте, мг/мл;

V_1 - объем вытяжки;

V_2 - аликвота вытяжки, взятая на титрование, мл;

$m_{нав}$ - масса навески, г.

5.5 Лабораторная работа № 21 Определение витамина С методом перманганатометрии

Метод основан на окислении витамина С перманганатом калия, в качестве индикатора используется индигокармин, который вступает в реакцию с перманганатом после того, как окислится вся аскорбиновая кислота.

Реактивы:

1) 0,05 н раствор перманганата калия;

2) раствор соляной кислоты (1:1);

3) стандартный раствор аскорбиновой кислоты: готовят раствор аскорбиновой кислоты с концентрацией 1 мг/мл на 50 мл, с подкислением соляной кислотой (ρ = 1,17 г/см^3) в объеме 1 мл.

Ход анализа:

В ступку помещают 5 г перца, добавляют 1 мл соляной кислоты и растирают с песком. Далее полученную смесь количественно переносят в мерную колбу на 50 мл. Объем доводят до метки. Полученный раствор фильтруют.
На анализ берут 2 и 5 мл полученного раствора, переносят в коническую колбу, добавляют 10 мл дистиллированной воды. Титруют 0,05 н раствором перманганата

калия в присутствии и в отсутствии индикатора индигокармина. Титр перманганата определяют по стандартному раствору аскорбиновой кислоты. Расчеты ведут по формулам (23), (24):

$$T(KMnO_4 / Аск.кислота) = \frac{m(кислоты)}{V(KMnO_4)} \quad (23)$$

где *m(кислоты)* - масса аскорбиновой кислоты в анализируемом объеме, мг;

V(KMnO₄) - объем перманганата калия, пошедшего на титрование, мл;

$$X = \frac{T \cdot U \cdot V_1 \cdot 100}{V_2 \cdot m_{нав}}; \; мг/100г \; продукта \quad (24)$$

где T - титр 0,05 н раствора титранта по аскорбиновой кислоте, мг/мл;

U - объем титранта, мл;

V_1 - объем вытяжки, мл;

V_2 - аликвота раствора, взятого на титрование, мл;

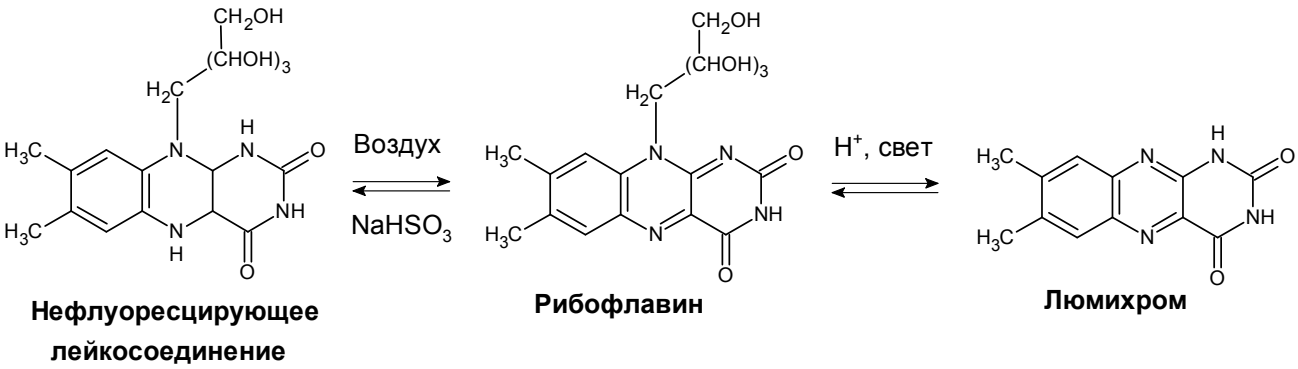
$m_{нав}$ - масса навески, г.

5.6 Лабораторная работа № 22 Суммарное определение свободного и связанного рибофлавина в комбикормах методом фотофлуориметрии

Сущность метода

Рибофлавин (витамин B_2) содержится в мясе и мясных продуктах (в колбасе, фарше), яичном желтке и в других пищевых продуктах. В нейтральных водных растворах рибофлавина флуоресцирует желто-зеленым светом (за счет азометиновой группировки), в кислой среде образуется люмихром, флуоресцирующий голубым светом. Для предотвращения образования люмихрома при выполнении анализа растворы необходимо защищать от действия света.

Восстановители (например, гидросульфит натрия) превращают рибофлавин в нефлуоресцирующее лейкосоединение, из которого под действием воздуха вновь образуется рибофлавин:



Нефлуоресцирующее лейкосоединение **Рибофлавин** **Люмихром**

В комбикормах содержится свободный (несвязанный) рибофлавин и рибофлавин, связанный с белками и другими веществами. Метод основан на кислотном гидролизе, при котором разрываются связи рибофлавина с белками, и последующем фотофлуориметрическом определении свободного рибофлавина.

Реактивы:

1) стандартный раствор рибофлавина: на аналитических весах отбирают 0,0400 г рибофлавина, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в дистиллированной воде, перемешивают. 1 мл приготовленного раствора содержит 0,4 мг рибофлавина;

2) рабочий раствор рибофлавина: готовят перед выполнением анализа, для этого 1 мл стандартного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, разбавляют дистиллированной водой до метки, перемешивают. В 1 мл приготовленного раствора содержится 0,004 мг рибофлавина;

3) гидрокарбонат натрия $NaHCO_3$ крист.;

4) тиосульфат натрия NaS_2O_3 крист.;

5) серная кислота, 0,5 М раствор;

6) серная кислота концентрированная, плотность $1{,}84 \cdot 10^3$ кг/м^3.

7) гидроксид натрия, 40 %-ный раствор;

8) трихлоруксусная кислота, 20 %-ный раствор.

Ход анализа:

На аналитических весах отбирают пробу измельченного комбикорма (5,00 г), переносят в мерную колбу, добавляют 50 мл 0,5 М серной кислоты и кипятят 30 мин на водяной бане. Объем жидкости доводят горячей дистиллированной водой до метки и фильтруют через складчатый фильтр в коническую колбу. Колбу ополаскивают 3,5 мл воды и переносят жидкость на тот же фильтр. Фильтрат перемешивают, отбирают 30 мл в коническую колбу, добавляют 30 мл раствора трихлоруксусной кислоты, кипятят 10 мин на водяной бане.

Колбу охлаждают струей водопроводной воды, доводят pH жидкости до 4-4,5 добавлением раствора гидроксида натрия, значение pH контролируют с помощью универсальной индикаторной бумаги. Жидкость вновь фильтруют, фильтрат помещают в кювету фотофлуориметра и снимают показания прибора; контроль - дистиллированная вода.

К стандартному и анализируемому растворам добавляют по 0,1 г гидрокарбоната и тиосульфата натрия для тушения флуоресценции. При этом флуоресценция стандартного раствора полностью исчезает, в анализируемом растворе остается

слабая флуоресценция, обусловленная примесями; интенсивность флуоресценции примесей учитывают при вычислениях.

Содержание рибофлавина в комбикормах (Q, мг/кг) рассчитывают по уравнению (25):

$$Q = \frac{(A - B) \cdot C_{cm} \cdot V \cdot 10^3}{(A_1 - B_1) \cdot 2{,}5} = \frac{(A - B) \cdot C_{cm} \cdot V \cdot 400}{A_1 - B_1} \qquad (25)$$

где A и B - показания фотофлуориметра для исследуемого раствора до и после тушения флуоресценции;

A_1 и B_1 - показания фотофлуориметра для стандартного раствора до и после тушения флуоресценции;

10^3 - коэффициент пересчета на 1 кг продукта;

2,5 - 0,5 пробы анализируемого продукта;

C_{cm} - концентрация стандартного раствора, мг/мл;

V - вместимость мерной колбы, мл.

5.7 Контрольные вопросы

1 Классификация витаминов.

2 В каком пищевом сырье содержатся определенные витамины? Их функции в организме, свойства.

3 Определение каротина. Связь между растворами $K_2Cr_2O_7$ и каротином. Закон Бугера-Ламберта-Бэра, границы его применимости.

4 К какому типу относятся реакции, лежащие в основе определения рутина и аскорбиновой кислоты? Основные реагенты для их определения.

5 Какое свойство рибофлавина может быть использовано для его определения? Сущность определения рибофлавина предложенным методом.

Список использованных источников

1 **Кретович, В. Л.** Биохимия растений : учебник для биол. факультетов ун-тов / В. Л. Кретович. – М. : Высшая школа, 1988. – 445 с.

2 **Комов, В. П.** Биохимия: учебник для вузов / В. П. Комов, В. Н. Шведова. 2-е изд., испр.– М. : Дрофа, 2006. – 638 с. – ISBN 5-358-01012-2.

3 Методы биохимического исследования растений / А. И. Ермаков [и др.], под ред. А. И. Ермакова. – 3-е изд., перераб. и доп. – Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд-ние, 1987. – 430 с.

4 **Антипова, Л. В.** Методы исследования мяса и мясных продуктов: учебник для вузов / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, И. А. Рогов. – М. : Колос, 2001. – 376 с. – ISBN 5-10-003612-5.

5 Пищевая химия / А. П. Нечаев, С. Е. Траубенберг, А. А. Кочеткова; под общей ред. А. П. Нечаева. – 2-е изд. – СПб. : ГИОРД, 2003. – 640 с. – ISBN 5-901065-38-0.

6 Практикум по аналитической химии. Анализ пищевых продуктов: учеб. пособие для вузов / Я. И. Коренман, Р. П. Лисицкая. – Воронеж: Воронеж. гос. технол. акад., 2002. – 408 с. – ISBN 5-89448-184-8.

7 **ГОСТ 5672 – 68** . Хлеб и хлебобулочные изделия. Методы определения массовой доли сахара. – Введ. 1969-07-01. – М. : Стандартинформ, 2006. – 11 с.

8 **ГОСТ 5903 – 89**. Изделия кондитерские. Методы определения сахара. – Введ. 1991-01-01. – М. : Стандартинформ, 2004. – 23 с.

9 Руководство по методам анализа качества и безопасности продуктов / под ред. И. М. Скурихина, В. А. Тутельяна; РАМН, Ин-т питания. – М. : Брамдес: Медицина, 1998. – 432 с.

10 Химический состав пищевых продуктов: справ. табл. содержания аминокислот, жирных кислот, витаминов, макро-микроэлементов, орган. кислот и углеводов / под ред. М. Ф. Нестерина, И. М. Скурихина. – М. : Пищевая промышленность, 1979. - 248 с.

11 **ГОСТ 5899 – 85**. Изделия кондитерские. Методы определения массовой доли жира. – Введ. 1986-01-07. – М. : Стандартинформ, 2004. – 12 с.

12 **ГОСТ 5668 – 68**. Хлеб и хлебобулочные изделия. Методы определения массовой доли жира. – Введ. 1969-07-01. - М. : Стандартинформ, 2006. – 11 с.

13 **Шепелев, А. Ф.** Товароведение и экспертиза зерномучных товаров [Текст] : учеб. пособие для студентов вузов, обучающихся по экон. специальностям / А. Ф. Шепелев, И. А. Печенежская. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : МарТ, 2004. – 128 с. – ISBN 5-241-00318-5.

14 Экспертиза молока и молочных продуктов. Качество и безопасность [Текст] : учебное пособие / Н. И. Дунченко [и др.] ; под общ. ред. В. М. Позняковского. – Новосибирск : Сиб. унив. изд-во, 2007. – 477 с. – ISBN 5-94087-042-2.