

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

БІОЛОГІЧНА ТА ХАРЧОВА ХІМІЯ

Методичні вказівки
до лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти першого
(бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти за
спеціальністю 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво,
переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)»

Електронний ресурс

Харків – 2025

УДК 577.176
Б 63

Рецензенти:

Євлаш В. В. – доктор технічних наук, професор, зав. кафедри хімії, біохімії, мікробіології та гігієни харчування Державного біотехнологічного університету;

Литвин О. О. – доктор фізико-математичних наук, професор, в.о. зав. кафедри харчових технологій легкої промисловості і дизайну Навчально-наукового інституту «Українська інженерно-педагогічна академія» Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна.

*Затверджено до розміщення в мережі Інтернет рішенням Науково-методичної ради
Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна
(протокол № 8 від 28 березня 2025 року)*

Біологічна та харчова хімія : методичні вказівки до лабораторних робіт
Б 63 для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти за спеціальністю 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво, переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)» [Електронний ресурс] / укладачі І. В. Цихановська, О. В. Александров. – Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2025. – (PDF 83 с.)

Методичні вказівки для здобувачів вищої освіти першого (бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти спеціальності 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво, переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)» містять рекомендації щодо виконання лабораторних робіт. Рекомендації складено відповідно до програми дисципліни «Біологічна та харчова хімія», яка викладається студентам 3 курсу спеціальності 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво, переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)» ХНУ імені В. Н. Каразіна. Методичні вказівки допоможуть здобувачам вищої освіти засвоїти теоретичний курс і набути практичних навичок.

УДК 577.176

© Харківський національний університет
імені В. Н. Каразіна, 2025

© Цихановська І. В., Александров О. В.,
уклад., 2025

ЗМІСТ

Лабораторна робота № 1. «Визначення золи та масової частки вологи прискореним методом висушування»	4
Лабораторна робота № 2. «Амінокислоти, пептиди, білки. Якісні реакції, фізико-хімічні властивості (діаліз білків, визначення ізоелектричної точки білку, денатурація, коагуляція та пептизація, висолювання білків)»	6
Лабораторна робота № 3. «Природа і властивості ферментів. Активатори і інгібітори ферментів»	17
Лабораторна робота № 4. «Дослідження вуглеводів. Виявлення редукуючих вуглеводів. Взаємодія глюкози та фруктози з йодом»	22
Лабораторна робота № 5. «Визначення ступеня оцукрювання крохмалю»	27
Лабораторна робота № 6. «Ліпіди, ліпоїди, жири. Фізико-хімічні властивості. Фізико-хімічні перетворення жирів»	30
Лабораторна робота № 7. «Визначення фенольних речовин в сировині та харчових продуктах. Дослідження водо- та жиророзчинних вітамінів»	39
Лабораторна робота № 8. «Визначення харчових волокон»	43
Лабораторна робота № 9. «Визначення харчових консервантів. Визначення антибіотиків у молоці. Аналіз кольору пива»	46
Лабораторна робота № 10. «Визначення якісного складу природних та синтетичних підсолоджувачів»	54
Лабораторна робота № 11. «Дослідження харчових барвників: екстрагування з харчових продуктів, розділення та ідентифікація»	64
ЛІТЕРАТУРА	82

Лабораторна робота № 1

«Визначення золи та масової частки вологи прискореним методом висушування»

Мета роботи: визначення масової частки золи та вологи ваговим методом у харчовому продукті.

План

- 1.1. Визначення масової частки золи
- 1.2. Визначення масової частки вологи

1. Визначення золи. Мінеральні речовини є природною складовою частиною структурних елементів всіх клітин і тканин. Крім макроелементів - кальцію, магнію, фосфору, хлору, сірки, в них містяться мікроелементи - мідь, залізо, йод, кобальт, цинк, нікель, ванадій і ін. Їх вміст у харчових продуктах рослинного і тваринного походження залежить від ряду факторів: виду, сорту, агротехніки, кліматичних умов, а також технології переробки. Загальні уявлення про зміст мінеральних речовин дає масова частка золи. Зольність багатьох харчових продуктів є нормованим показником.

Техніка виконання. Наважку аналізованого продукту масою 1,5-25 г (для зерна, борошна, висівки - 1,5 ÷ 2,0 г; 3 ÷ 5 г - для м'ясо-рибного і консервованого продукту; 5 ÷ 10 г - для кондитерських виробів, крохмалю; 10 г - для фруктів і овочів; 25 г - для молока) поміщають в прожарений до постійної маси тигель (прожарювання проводять при 500⁰С). Якщо в продукті міститься багато вологи, то зміст тигля випарюють на водяній бані до сухого залишку, підсушують в сушильній шафі при температурі 100-150⁰С. Обережно обвуглюють на електричній плитці або інфрачервоної лампи і прожарюють в муфельній печі при температурі 500-550⁰С. При роботі зі зразком не можна допускати його займання або розбризкування. Для прискорення озолення можна в тигель після охолодження додати кілька крапель Н₂О₂ (50 г/дм³), яку потім необхідно видалити в сушильній шафі при температурі 90-100⁰С, а сухий залишок знову прожарити в муфельній печі до повного озолення проби. Отримана зола повинна бути пухкої, білого або світло сірого кольору, без обвуглених частинок.

Масову частку золи X_z (в%) розраховують за формулою (1.1):

$$X_z = \frac{100(m_1 - m)}{m_2}, \quad (1.1)$$

де m_1 – маса тигля із золою, г;

m – маса тигля, г;

m_2 – маса наважки продукту, г

Розбіжність між результатами декількох дослідів не повинно перевищувати 5%.

Реєстровані показники:

Маса порожнього тигля (m), г
Маса тигля з наважкою продукту (m_2), г
Маса тигля із золю (m_1), г
Маса наважки ($m_2 - m$), г
Масова частка золи (X_3), %

2. Визначення масової частки вологи.

Показник масової частки вологи є найважливішим для оцінки якості сировини, напівфабрикатів і готових виробів. Кількість вологи в продукті характеризує його енергетичну цінність, тому що чим більше в ньому міститься води, тим менше корисних сухих речовин (білка, жиру, вуглеводів та ін.) в одиниці маси.

Зі змістом води тісно пов'язані стійкість продукту при зберіганні і транспортабельність, а також придатність до подальшої переробки, так як надлишок вологи сприяє протіканню ферментативних і хімічних реакцій, активізує діяльність мікроорганізмів, в тому числі таких, які викликають псування продуктів, зокрема пліснявіння. У зв'язку з цим вміст вологи в об'єкті зумовлює умови і терміни його зберігання.

Крім того, кількість води в сировині впливає на техніко-економічні показники роботи підприємств. Найбільш поширеним є метод визначення масової частки вологи по сухому залишку, тобто коли кількість вологи встановлюють за різницею в масі навішення до і після висушування.

Багато ДСТУ на методи визначення масової частки вологи в харчових продуктах передбачають прискорені методи висушування певної наважки в сушильних шафах з терморегуляторами. Так, прискореними методами визначають масову частку вологи в зерні (ГОСТ 13586.5-93), крохмалі (ГОСТ 7699-78 і ГОСТ 7697-82), макаронних виробах (ГОСТ 14849-89) і т.д.

Для кожного продукту в залежності від фізико-хімічних властивостей підібрані свої температура висушування і тривалість процесу. Найчастіше час висушування становить 50 хв.

Техніка визначення.

Досліджуваний продукт: борошно

Обладнання: ваги квадрантні ВЛКТ-500г-М; шафа сушильна електричний СЕШ-3М.

У дві заздалегідь висушені і зважені бюкси беруть наважки досліджуваного зразка масою по 5 г. Бюкси з наважками поміщають в сушильну шафу, нагріту до температури 140-145⁰С, кришки у бюксах повинні бути відкриті і підкладені під дно. Температура при цьому швидко падає (нижче 130⁰С). Протягом 10-15 хв її доводять до 130⁰С і при цій температурі продовжують висушувати протягом 40 хв. (Відхилення температури не повинно перевищувати 2⁰С). Потім бюкси тигельними щипцями виймають, закривають кришками, охолоджують в ексікаторі протягом 20-30 хв і зважують.

Масову частку вологи розраховують за формулою (1.2):

$$m - m_1$$

$$W = \frac{\quad}{m} \cdot 100, \quad (1.2)$$

де W - масова частка вологи, %;

m - маса зразка до висушування, г;

m_1 - маса зразка після висушування, г.

Запис в лабораторному журналі

Маса порожнього бюкса (m_1), г

Маса бюкса з наважкою зразка до висушування (m_2), г

Маса наважки зразка ($m = m_2 - m_1$), г

Маса бюкса з наважкою зразка після висушування (m_3), г

Маса висушеного зразка ($m_4 = m_3 - m_1$)

Маса вологи, що випарувалася ($m - m_4$), г

Масова частка вологи W , %

Контрольні запитання

1. Вкажіть макро- та мікроелементи, що входять до складу золи, яку одержують озоленням харчової продукції.

2. Назвіть фізико-хімічний метод, на якому ґрунтується визначення масової частки золи та вологи.

3. Поясніть, чому показник масової частки вологи є найважливішим для оцінки якості сировини, напівфабрикатів і готових харчових виробів

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

Амінокислоти, пептиди, білки. Якісні реакції, фізико-хімічні властивості (діаліз білків, визначення ізоелектричної точки білку, денатурація, коагуляція та пептизація, висолювання білків)

Мета роботи: визначення білків, амінокислот, амінного Нітрогену в білкових сполуках. Дослідження фізико-хімічних властивостей білків, реакції осадження білків. Очищення білка від низькомолекулярних домішок методом діалізу. Визначення ізоелектричної точки (ІЕТ) білка.

План

2.1. Кольорові реакції на білки і деякі амінокислоти.

2.2. Фізико-хімічні властивості білків, реакції осадження білків

2.3. Очищення білка від низькомолекулярних домішок методом діалізу.

2.4. Визначення ізоелектричної точки (ІЕТ) білка.

2.1. Кольорові реакції на білки і деякі амінокислоти

Мета: Ознайомитися з універсальними кольоровими реакціями на білки і специфічними реакціями на окремі амінокислоти, що містяться в білкових розчинах.

Все різноманіття кольорових реакцій на білки і амінокислоти можна

ЗВЕСТИ ДО ДВОХ ОСНОВНИХ ТИПІВ:

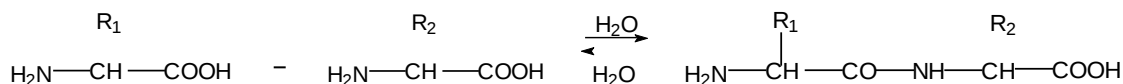
1) кольорові реакції, характерні для всіх білків, пов'язані з наявністю в білках відповідних функціональних груп або типів хімічного зв'язку;

2) реакції, характерні для окремих амінокислот, що містять специфічні функціональні групи. Сюди відноситься велика кількість індивідуальних реакцій, частина з яких буде розглянуто.

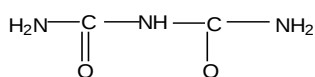
2.1.1 Універсальні реакції на білки

а) Виявлення в білках пептидних зв'язків (біуретова реакція)

Ця реакція зумовлена наявністю в білкової молекулі пептидних зв'язків, що виникають при взаємодії молекул амінокислот.



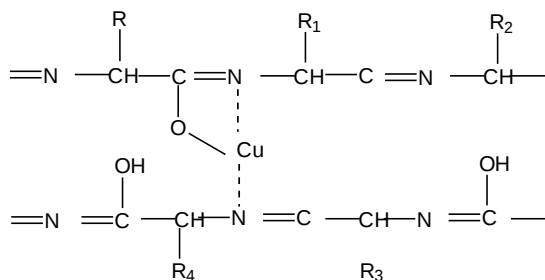
В результаті взаємодії іонів двухвалентного Купруму з пептидними зв'язками в лужному середовищі утворюється комплексна сполука, забарвлене в червоно-фіолетовий колір. Назва реакції обумовлено тим, що біурет (продукт конденсації двох молекул сечовини в аналогічних умовах дає такий же комплекс).



биурет

Біуретову реакцію дають всі сполуки, що містять в молекулі два і більше двох близько розташованих пептидних зв'язків.

Хімізм реакції: дієнольні форми пептидних зв'язків утворюють комплексні сполуки з гідроксидом купруму, в якому ковалентні зв'язки утворені за рахунок Гідрогену фенольного гідроксилу, а координаційна –

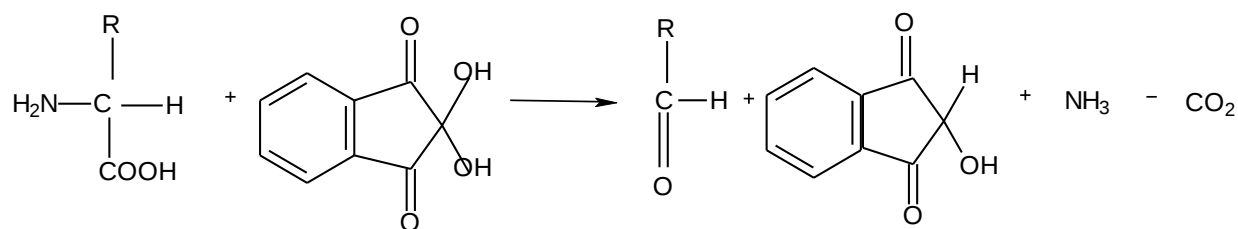


за рахунок електронних пар атомів Нітогену імінних груп.

Хід роботи: до 5 крапель досліджуваного розчину білка і желатину додаємо 3 краплі 10% розчину NaOH і 1 краплю 1% розчину CuSO₄. При наявності білка в пробірці з'являється стійке синьо-фіолетове забарвлення.

б) Нінгідринова реакція на білки і природні α -амінокислоти

Нінгідринова реакція є універсальною реакцією на всі амінокислоти, які мають групу в α -положенні. Розчини білка і пептидів, що мають вільну α -аміногрупу також як і α -амінокислоти при нагріванні з нінгідрином дають синє або фіолетове забарвлення. У цій реакції α -амінокислоти і пептиди окиснюються нінгідрином і зазнають окисне дезамінування, декарбоксилування з утворенням аміаку, альдегіду і CO_2 . Хімізм реакції:

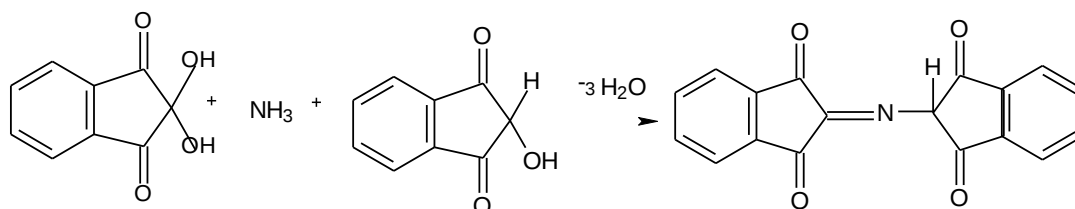


α-амінокислота

нінгідрин

альдегід

*відновлена форма
нінгідрину
(гідриндантин)*



продукт конденсації синє-фіолетового кольору

Нінгідрин відновлюється і зв'язується з другою молекулою нінгідрина за допомогою молекули аміаку, утворюючи продукти конденсації, пофарбовані в синій, фіолетовий, червоний, а в разі проліна - в жовтий колір.

Хід роботи: до 5 крапель досліджуваного розчину білка і желатину додаємо 5 крапель 0,1% водного розчину нінгідрину і кип'ятимо 1-2 хв. З'являється рожево-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення. При стоянні розчин синіє. Фарбування вказує на наявність α-аміногрупи.

в) *Визначення амінного азоту в білкових сполуках*

У пробірку наливають 1 мл нерозведеного розчину білка і додають подвійний об'єм концентрованого розчину їдкого натру. Отриману суміш кип'ятять 2-3 хв (Обережно, рідина може викинутися!). При гідролізі білка виділяється аміак, який легко можна знайти за запахом і по посинінню вологого лакмусового паперу.

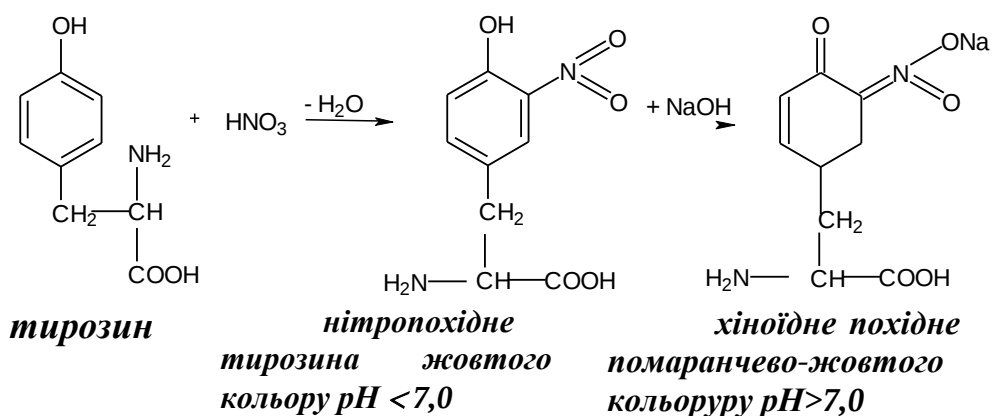
Для якісного виявлення амінного азоту наливають в пробірку 1 мл розчину яєчного білка, додають 3-4 краплі розчину нінгідрину. Вміст пробірки нагрівають до кипіння. Які зміни відбуваються з забарвленням розчину білка? Див. вище - пункт б).

Кольорові реакції на окремі амінокислоти

г) **Ксантепротеїнова реакція на циклічні амінокислоти**

Ця реакція заснована на утворенні нітропохідних ароматичних амінокислот (фенілаланін, тирозин, триптофан). Нітропохідні мають жовте забарвлення в кислому середовищі і помаранчеве - в нейтральній і лужних середовищах (ксантос - по-грецьки - жовтий).

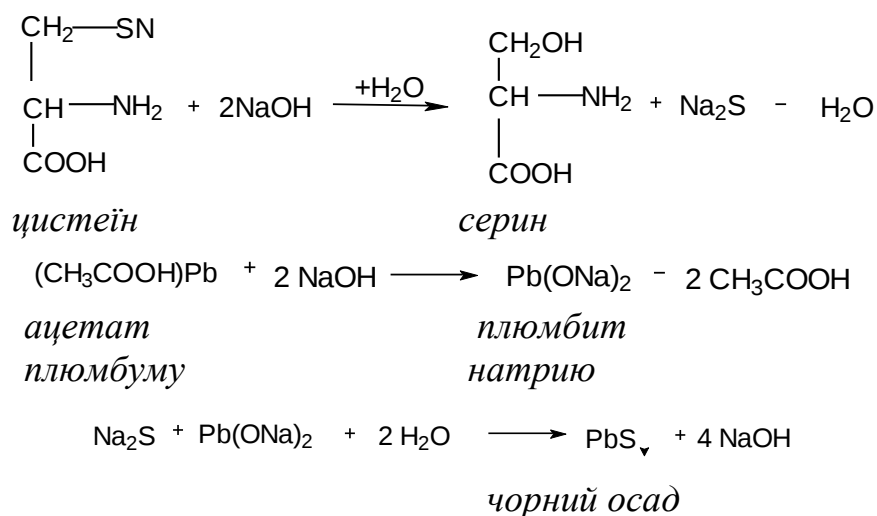
Хімізм реакції:



Хід роботи: беруть 2 пробірки і наливають в першу 5 крапель розчину яєчного білка, а в другу - 5 крапель розчину желатину. Потім в обидві пробірки додають по 3-5 крапель концентрованої нітратної кислоти. Випадає осад згорнутого білка (осадова реакція). Якщо осад містить ароматичні амінокислоти, то при нагріванні осад буде жовтіти і розчинятися. Після охолодження в кожен пробірку додають по краплях 10% р-р NaOH до появи помаранчевого забарвлення внаслідок утворення натрієвої солі динітротирозина.

г) Реакція Фоля на амінокислоти, що містять сірку.

Хімізм реакції:



Реакція обумовлена наявністю в білку сульфурвмісних амінокислот - цистеїну, цистину. Вона заснована на відщепленні H_2S від амінокислот при лужному гідролізі білка з утворенням сульфїду натрію.

Хід роботи: беремо 2 пробірки і наливаємо в першу 5 крапель розчину яєчного білка, а в другу 5 крапель желатину. Потім в обидві пробірки додаємо по 5 крапель реактиву Фоля. Інтенсивно кип'ятимо обидві пробірки. Через 1-2 хв після кип'ятіння при наявності сірковмісних кислот з'являється осад чорного кольору.

2.1.2. Практична значимість роботи

Практичне застосування кольорових реакцій має наступні аспекти:

1. Універсальні реакції на білки (нінгідринова, біуретова) використовуються для якісного виявлення білків.

2. Універсальні реакції на білки використовуються також для кількісного визначення вмісту білків в розчинах, продуктах, біологічних рідинах, тваринних тканинах.

3. Специфічні кольорові реакції застосовуються для ідентифікації амінокислотного складу досліджуваного білка, а також для якісного виявлення білка, якщо відповідне угруповання входить до його складу.

2.1.3. Оформлення роботи

Результати дослідів занести в таблицю 2.1:

Таблиця 2.1.– Результати дослідів

Найменування реакцій	Реагент	Субстрат	Спостережуване забарвлення	Чим обумовлена реакція
Біуретова		а) яєчний білок б) желатин		
Нінгідринова		а) яєчний білок б) желатин		
Ксантопротеїнова		а) яєчний білок б) желатин		
Реакція Фоля		а) яєчний білок б) желатин		

2. 2. Фізико-хімічні властивості білків, реакції осадження білків

Мета: Вивчити характер реакцій осадження білків в розчинах. Пояснити механізм дії осаджувальних агентів на підставі знання фізико-хімічних властивостей білка. Очищення білка від низькомолекулярних домішок методом діалізу. Визначення ізоелектричної точки білка.

Білками називаються високомолекулярні сполуки, молекули яких побудовані із залишків α -амінокислот. Білкові речовини діляться на протеїни і протеїди. Протеїни складаються тільки із залишків α -амінокислот. До складу протеїдов крім цього входять залишки вуглеводів, ліпідів, нуклеїнових кислот і т.д.

По відношенню до розчинників розрізняють альбуміни, проламіни, глобуліни, глютеліни.

Основні групи білків рослинної сировини: запасні білки, ферменти, інгібітори ферментів білкової природи.

При дії на білок сильних кислот і лугів, високих температур і деяких інших впливів вони денатурують. При денатурації порушується структура білка (вторинна, третинна, четвертична), змінюються його фізико-хімічні

властивості.

Для білків характерні кольорові реакції, зв'язані з наявністю в молекулі певних угруповань і амінокислотних залишків.

Основне значення білків як складової частини харчових продуктів полягає в незамінності іншими компонентами їжі. Білки складають основу процесів життєдіяльності організму. Необхідність їх постійного оновлення лежить в основі обміну речовин.

Білки в організмі виконують ряд функцій. Перша – пластична або структурна функція, оскільки протеїн входить до складу ядра, протоплазми, мембран клітин всіх органів і тканин. Білки беруть участь в процесі відтворення живої матерії. Білки кісток, хрящів виконують опорну функцію. Захисна функція полягає в тому, що антитіла, що утворюються при надходженні в організм чужорідних речовин, є протеїнами. Білки є енергетичним матеріалом (при окисненні 1 г білка виділяється 16,74 кДж).

Дефіцит білка в харчовому раціоні підвищує сприйнятливість організму до інфекційних захворювань, порушує процеси кровотворення, обмін ліпідів, вітамінів та ін. У дітей при білкової недостатності сповільнюються ріст і розумовий розвиток. Тривалий надлишок білка в харчуванні також негативно позначається на життєдіяльності організму, викликаючи перевозбудимість нервової системи, порушення обмінних процесів, перевантаження печінки та нирок.

Денатурація білків (лат. Denaturatus - позбавлений природних властивостей; від de- – приставка, що означає відділення, видалення + natura - природа, єство) – зміна нативної конформації білкової молекули під дією різних дестабілізуючих факторів. Амінокислотна послідовність білка не змінюється. Призводить до втрати білками їх природних властивостей (розчинності, гідрофільності та ін.).

Процес денатурації окремої білкової молекули, що призводить до розпаду її «жорсткої» тривимірної структури, іноді називають плавленням молекули.

Білки діляться на дві групи за принципом «особливого ставлення» з водою. Виділяють гідрофільні і гідрофобні групи білків. З огляду на те що білкові ланцюжки досить щільно згорнуті в клубок, всередині нього утримується значна кількість води. Коли білок руйнується, вода з великим вмістом білка виділяється назовні. Така «вода» в їжі називається ні чим іншим, як «соком» страви або продукту.

Під час приготування їжі протікають фізичні і хімічні процеси, які призводять до різних метаболічних змін білків.

Два найважливіших процесу в кулінарії, описані в органічній хімії, про яких справжній кулінар повинен знати майже все, – це «**денатурація**» та «**коагуляція**» білків.

Розглянемо ці найважливіші кулінарні процеси докладніше.

Досить слабкі зв'язки, які утримують тривимірну структуру білка, можуть бути цілком легко зруйновані. Для цього необхідно просто нагріти продукт, що містить білок, або додати трохи кислоти (лимонної або оцту),

або докласти певних механічне зусилля (наприклад, притиснути до сковороди або перемішати в каструлі).

У міру того як зв'язку, які утримують білок в складеному вигляді, руйнуються, білки розгортаються в довгі ланцюжки, і захищені раніше всередині білка амінокислоти просто «вивалюються» назовні. Цей процес і називається «денатурацією».

Кулінарний закон:

♦ Шлунок людини набагато легше перетравлює денатуровані білки, ніж будь-які інші.

Це означає, що сира риба (у суші і ролах) перетравлюється набагато гірше, ніж запечена. Їжа, приготована на вогні, або з додаванням солі і кислоти, перетравлюється набагато краще, ніж сира, солонка, в'ялена або незначно термічно оброблена!

Швидше за все білки денатуються температурою, ніж кислотою, сіллю або шляхом механічної дії, тому приготувати м'ясо можна набагато швидше на вогні, ніж замаринувавши або законсервувавши його (сушене, в'ялене м'ясо).

Кулінарний закон:

♦ Білки руйнуються при різних температурах, знання діапазону температур, при яких руйнуються і денатурируют білки, дає ключ до отримання найкращих результатів в процесі приготування їжі.

Коагуляція білків. Процес коагуляції білка – головний процес в кулінарії, яким потрібно вчитися управляти.

Якщо продукт, що містить білок, нагрівають після його денатурації далі, то доданий тепло змушує денатуровані білки пересуватися набагато швидше. Розгорнуті білкові ланцюги при контакті будуть притягатися один до одного і формувати білкові мережі. Цей процес відомий в науці під назвою «коагуляція».

Коагуляція в кулінарії «відповідальна» в тому числі і за втрату прозорості сирого яйця в процесі нагрівання.

Змикаються ланцюга білка не дозволяють світлу проникати всередину, і прозорість продукту втрачається.

Мережі білків в процесі коагуляції виступають якоїсь «пасткою» для води. Потрапляючи всередину і зв'язуючись з білками, вона перетворює рідину на гель, знижуючи його плинність.

Коагуляція може бути як корисна для кулінара, так і доставляти реальні незручності на кухні. Пельмені, вареники, галушки, макарони та інші вироби з пшеничного борошна зберігають свою форму тільки завдяки коагуляції білкових мереж, а заварний крем стає грудкуватим тому, що яєчні білки були нагріті до дуже високої температури і в денатурованих білках почався процес коагуляції.

Кулінарний закон:

♦ Кислоти сприяють і прискорюють коагуляцію білків, крохмалі – уповільнюють коагуляцію.

Говорячи про білках і їх ролі в кулінарних процесах не можна не сказати про таке явище, як синерезис. Синерезис - процес витіснення води або рідини з білкових мереж в продукті. Це відбувається через наявність електростатичних напруг між позитивними і негативними зарядженими атомами сірки в білкових продуктах.

Процес синерезиса завжди небажаний в приготуванні їжі, оскільки веде до того, що їжа висихає.

Отже, коагуляція - це склеювання білкових частинок і випадання їх в осад.

Висолювання – це додавання до розчину білка нейтральних солей (сульфату натрію, сульфату амонію). Іони солей взаємодіють із зарядженими групами білка (NH_3^+ і COO^-). В результаті заряд зникає і взаємодія молекул білка тяж. Одночасно різко зменшується гідратна оболонка. Все це призводить до злипання молекул і їх осадження.

Існує різна кількість різноманітних реакцій осадження білків. Залежно від застосовуваного осаджувача вони можуть бути оборотними і необоротними. Реагенти, які беруть в облогу білки, можуть надавати:

1) дегідратувальну дію (руйнують гідратну оболонку), внаслідок чого втрачається один з факторів їх стійкості: частка білка легко коагулює і випадає в осад;

2) зняття заряду білкової частки (другий фактор стійкості).

Максимальна осадження білка відбувається при знищенні обох факторів стійкості. При цьому опади білків можуть бути знову розчинені, тобто білки зберігають свої нативні властивості та осадження буде оборотним.

3) утворення нерозчинних комплексів. При незворотному осадженні відбувається денатурація білка, що супроводжується деградацією просторовою конфігурацією молекули білка (четвертинної, третинної і частково вторинної структури) і осад білка не може бути знову переведений в розчин. До необоротних реакцій відносяться осадження білка: при кип'ятінні ($>80^\circ\text{C}$); концентрованими мінеральними (HNO_3 , H_2SO_4 , HCl і т.д.) і органічними (сульфосаліцилова, пікринова, трихлороцтова) кислотами; солями важких металів (свинцю, міді, срібла, ртуті та ін.).

2.2.1. Оборотно і необоротне осадження білків

Хід роботи: у 5 пробірок наливають по 5 крапель розчину білка.

а) в першій пробірці проводимо денатурацію кип'ятінням. При кип'ятінні білок денатурує і випадає в осад у нейтральному або слабнокислому середовищі. До білку додають 1 краплю 1% розчину оцтової кислоти для слабнокислої реакції і нагрівають - спостерігаємо випадання осаду;

б) у другій пробірці дивимося дію неорганічних кислот (проба Геллера). Реакція заснована на деградації і денатурації білка при дії міцної нітратної кислоти. До білку додаємо по краплях до появи осаду концентровану нітратну кислоту;

в) у третій пробірці проводимо осадження білка органічною кислотою. До білку додаємо 1 - 2 краплі 20% розчину сульфасаліцилової кислоти.

Випадає осад, при невеликій кількості білка з'являється каламуть або опалесценція;

г) в четвертій пробірці проводимо денатурацію солями важких металів. Білки при взаємодії з солями важких металів адсорбують їх, утворюючи нерозчинні солеподібні і комплексні сполуки. Здатність деяких амінокислот і білків міцно зв'язувати іони важких металів використовується в медичній практиці як протиотруту при отруєнні солями ртуті, міді, свинцю і ін. До білку додаємо по краплях 2% розчин сульфата купруму до осадження білка.

д) в п'ятій пробірці проводимо оборотне осадження білка (висолювання). Висолюванням називається осадження білків з допомогою великих концентрацій нейтральних солей: NaCl, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KCl та ін. (Солі лужних і лужно-земельних металів). Реакція обумовлена дегідратацією макромолекул білка з одночасною нейтралізацією електричного заряду. При Висолювання білок майже не втрачає своїх нативних властивостей. Цей метод знайшов широке застосування для отримання білків в кристалічному стані. До білку додаємо рівний об'єм (5...6) крапель насиченого розчину сульфату амонію і добре перемішуємо; випадає осад.

У всі 5 пробірок з осадами додаємо дистильовану воду в об'ємі, рівному вмісту пробірок, перемішуємо і перевіряємо, розчинилися чи осад. Солі важких металів, мінеральні та сильні органічні кислоти необоротно денатурують білки, тому осад не розчиняється у воді. Сульфат амонію, як водо віднімаючий засіб, оборотне висолює білок, і осад розчиняється при додаванні води.

2.2.2. Практична значимість роботи

1) На явищах денатурації білків засновані прийоми і методи асептики і антисептики, дезінфекції в лікувальній і практичній медицині; пастеризація та консервування продуктів в харчовій промисловості;

2) Фракціоноване осадження білків лежить в основі приготування лікувальних сироваток і біологічних препаратів в імунології та фармації; розділення і очищення білків в препаративній біохімії.

2.2.3 Оформлення роботи. Записати осадові реакції білків. Результати дослідів занести в таблицю 2.2.

Таблиця 2.2. – Результати дослідів

№ пробирки	Субстрат	Осаджуючий реагент	Характер і колір осаду	Оборотне або необоротне осадження	Чим обумовлена реакція і її особливості
1.					
2.					
3.					
4.					
5.					

2.3. Очищення білка від низькомолекулярних домішок методом діалізу

Реактиви: Насичений розчин сульфату амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5% розчин

хлориду барію BaCl_2 , 20% розчин їдкого натру NaOH , розбавлений розчин мідного купоросу CuSO_4 .

Устаткування: Целофан, стакан з дистильованою водою, скляні палички, гумові колечка, мірний стаканчик на 50 мл, штатив із пробірками, піпетки.

Матеріали: Розчин яєчного білка.

Завдання 1. Для проведення очищення розчину яєчного білка від низькомолекулярних домішок готуємо найпростіший діалізатор, який являє собою зроблений з целофану мішечок, наповнений розчином білка, що очищається, і занурений в стакан з дистильованою водою. Краї мішечка затискають між двома скляними паличками, які притискають один до одного за допомогою одягнутих з двох кінців гумових кілець. Рівень рідини в мішечку не повинен бути вище рівня рідини в склянці.

Намалюйте в зошиті діалізатор в робочому стані.

Завдання 2. Наливаємо в мірний стаканчик 20 мл розчину яєчного білка і додаємо піпеткою 4 краплі насиченого розчину сульфату амонію $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Вміст стаканчика ретельно перемішуємо скляною паличкою. З отриманої суміші відбираємо в дві пробірки проби по 10 крапель для проведення якісного аналізу на білок і сульфат іони (SO_4^{2-}) . Частину суміш яєчного білка з сульфатом амонію, що залишилася, з мірного стаканчика переливаємо в целофановий мішечок і поміщаємо в склянку з дистильованою водою для проведення очистки білка методом діалізу.

Завдання 3. Якісний аналіз на сульфат іони (SO_4^{2-}) .

Для виявлення сульфат іонів в розчині білка додаємо до вмісту однієї з пробірок 2-3 краплі розчину хлориду барію (BaCl_2) . Що при цьому спостерігається? Яка причина утворення пластівчастовидного осаду білого кольору? Напишіть реакцію хімічної взаємодії.

Завдання 4. Якісний аналіз білка.

У другу пробірку для виявлення білка додаємо 20% розчин їдкого натру, потім долийте 3-4 краплі розведеного, майже безбарвного, розчину мідного купоросу і вміст пробірки ретельно перемішуємо. Що спостерігається? В який колір забарвлюється розчин? Про що свідчить проведена реакція?

Завдання 5. Через 1 годину після початку діалізу відбираємо в пробірки дві проби (по 10 крапель) з зовнішньої рідини склянки (діалізат) і дві проби (по 10 крапель) з рідиною всередині целофанового мішечка для проведення якісного аналізу сульфат іонів і білка. Якісні реакції проводимо аналогічно завданням 3 і 4.

Завдання 6. Результати аналізів оформляємо у вигляді таблиці 2.3., зазначивши знаками «плюс» чи «мінус» наявність реакції:

Таблиця 2.3. – Результати дослідів

Зумовлені компоненти	До діалізу		Після діалізі	
	зовнішня	внутрішня	зовнішня	внутрішня

	рідина	рідина	рідина	рідина
Білок				
Сульфат - іон				

2.4. Визначення ізoeлектричної точки (ВЕТ) білка

Реактиви: 0,2 М розчин оцтової кислоти (CH_3COOH), 0,2 М розчин ацетату натрію (CH_3COONa), 96% етиловий спирт ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$).

Устаткування: Піпетки місткістю 1 і 2 мл, штатив із пробірками.

Матеріали: Розчин білка.

Завдання 1. Готуємо в шести пронумерованих пробірках буферні суміші з різним значенням рН. Для цього змішуємо 0,2 М розчин оцтової кислоти і 0,2 М розчин оцтовокислого натрію в співвідношеннях, зазначених в таблиці 2.4.

Таблиця 2.4. – Склад буферної суміші

№ пробирки	Склад буферної суміші, мл		рН суміші
	0,2М CH_3COOH	0,2М CH_3COONa	
1	1,9	0,1	3,4
2	1,8	0,2	3,8
3	1,4	0,6	4,4
4	1,0	1,0	4,7
5	0,6	1,4	5,1
6	0,2	1,8	5,7

Завдання 2. У кожену пробірку з буферною сумішшю додаємо по 0,5 мл розчину білка. Після цього суміш в пробірках струшуємо і відзначаємо помутніння розчину білка.

Завдання 3. У кожену пробірку додаємо по 2 мл етилового спирту і оцінюємо ступінь каламутності розчину білка.

Завдання 4. Результати спостережень оформляємо у вигляді таблиці 2.5, відзначаючи ступінь каламутності розчину до і після додавання етилового спирту за п'ятибальною шкалою: 1-відсутність помутніння, 2-слабке, 3-помірне, 4-сильне, 5-дуже сильне.

Таблиця 2.4. – ступінь каламутності розчину білка

рН буферної суміші	Ступінь каламутності розчину білка	
	до додавання спирту	після додавання спирту

3,4		
3,8		
4,4		
4,7		
5,1		
5,7		

Після проведення лабораторних дослідів у висновках відзначте значення рН буферної суміші, відповідної ізоелектричної точки білка.

Контрольні запитання

1. Вкажіть аспекти практичного застосування кольорових реакцій на білки.
2. Дайте визначення поняттю «висолювання білку»
3. Дайте визначення поняттю «коагуляція білку»
4. Дайте визначення поняттю «денатурація білку»
5. Вкажіть для яких амінокислот використовується реакція Фоля.

Лабораторна робота № 3.

«Природа і властивості ферментів. Активатори і інгібітори ферментів»

Мета: Вміти застосовувати знання про властивості ферментів і їх структурі, специфічності, впливу на активність ферментів рН, температури, концентрації, активаторів і інгібіторів для подальшого вивчення основних реакцій метаболізму в органах, тканинах, клітинах організму.

План

- 3.1. Порівняльне дію ферментів і небіологічних каталізаторів
3. 2. Вплив неспецифічних факторів на активність ферментів
- 3.3. Вплив реакції середовища на активність ферментів і визначення оптимуму рН для амілази слини
- 3.4. Властивості ферментів

3.1. Порівняльне дію ферментів і небіологічних каталізаторів

Реактиви: Крохмаль, 1% розчин в 0,3% -ному розчині хлориду натрію, свіжоприготований; розчин йоду в йодиді калію, розчин Фелінга №1 пероксид водню, 10% розчин.

Обладнання: Штатив з пробірками; воронка з ватою; скляні палички; очні піпетки; водяна баня з термометром, піпетки місткістю 5 мл.

Матеріали: 1. Розбавлена слина. Для її отримання промивають рот водою від залишків їжі. Набирають в рот порцію дистильованої води близько 20 мл і тримають її приблизно 2 хв, змішуючи язиком зі слиною. Рідину зі слиною випускають в стаканчик і профільтровивають через вату в пробірку.

Отриманий фільтрат використовують для роботи.

2. Хлоридна кислота, 10% розчин.

Завдання 1. Порівняння дії α -амілази слини і хлоридної кислоти на реакцію гідролізу крохмалю

Візьміть три пробірки. В першу пробірку налейте 1 мл води, в другу - 1 мл розчину хлоридної кислоти, в третю - 1 мл розведеної слини. У всі пробірки додайте по 5 мл розчину крохмалю, перемішайте вміст пробірок скляній паличкою. Першу і третю пробірки поставте в водяну баню при 38°C , а другу пробірку поставте в киплячу водяну баню. Через 15 хвилин пробірки охолодіть. З кожної пробірки відберіть по 5 крапель в інші пробірки і додайте по 1-2 краплі розчину йоду і порівняйте забарвлення проб в кожній пробірці. Поясніть, чому вміст пробірок відрізняються за кольором?

Для визначення мальтози з кожної пробірки відберіть по 3 мл, потім додайте по 1 мл реактиву Фелінга і нагрійте верхній шар суміші до кипіння. Які зміни спостерігаються в аналізованих пробірках?

У висновках вкажіть різницю в дії каталізаторів на швидкість гідролізу крохмалю.

Завдання 2. Визначення швидкості реакції від кількості ферменту.

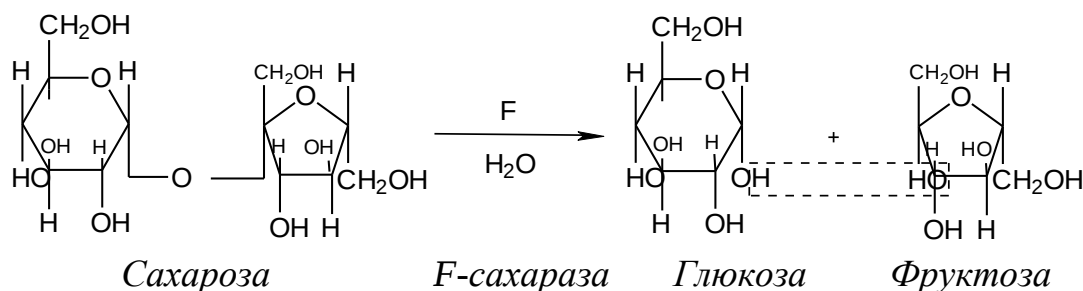
Приготуйте розбавлені в 20, 40, 80 і 160 разів водні розчини слини. Візьміть 4 пробірки і в кожную пробірку налейте по 1 мл з розбавлених розчинів слини. В кожную пробірку додайте по 4мл розчину крохмалю, пробірки помістіть у водяну баню при 38°C і засічіть час початку реакції.

Через кожні 1-2 хвилини відберіть з пробірок по 2 краплі рідини і додайте до кожної аналізованої пробі по 1 краплі розчину йоду в йодиді калію. На початку проби дають синє, потім червоно-фіолетове і нарешті червоне забарвлення. З точністю до 0,5 хв відзначте час від початку дослідів до появи червоного забарвлення – стадія утворення еритродекстринів з крохмалю. Результати дослідів покажіть графічно, відкладаючи по осі ординат швидкість реакції (величина, зворотна часу утворення еритродекстринів), а по осі абсцис – відносну концентрацію амілази (розведення в 20, 40, 80, 160 разів).

3.2. Вплив неспецифічних факторів на активність ферментів

Дія неспецифічних факторів вивчається на ферменті сахараза, яка каталізує гідролітичні розщеплення сахарози з утворенням глюкози і фруктози.

Принцип методу:



Активність ферменту сахарози оцінюють за наявністю в середовищі продуктів реакції: вільної глюкози і фруктози.

Вільна глюкоза дає позитивну реакцію Троммера внаслідок наявності в молекулі глюкози вільного напівацетального гідроксилу.

Сахароза цієї реакції не дає, тому що напівацетальний гідроксил в ній відсутня.

Хід роботи: У 4 пробірки наливають по 0,5 мл дріжджового екстракту, що містить фермент сахаразу. Одну пробірку нагрівають на киплячій водяній бані протягом 5 хв., У другу додають 2 краплі 10% розчину NaOH, в третю - 2 краплі 1% CdCl_2 , четверту використовують для визначення активності нативного ферменту (контроль).

Через 5 хв в усі пробірки додають по 1 мл розчину сахарози (субстрат) і витримують їх у термостаті при 38°C протягом 15 хв.

Після цього присутність вільної глюкози виявляється у всіх пробірках за допомогою реакції Троммера: до пробі додають 5 крапель 10% NaOH і 1 краплю 1% CuSO_4 . Пробу нагрівають на водяній бані протягом 2-5 хв.

Позитивну реакцію відзначають по появі червоно-бурого осаду закису купруму (Cu_2O).

У цій окисно-відновній реакції купрум відновився, а глюкоза окиснюлася до глюконової кислоти.

Результати дослідів наводимо у вигляді таблиці 3.1.

Таблиця 3.1. – Результати дослідів

№ проби	Фермент сахаразу, 0,5 мл	Вплив неспецифічних факторів			Субстрат сахароза 1 мл	Результат реакції Троммера (+) або (-)
		100 °C	10 % NaOH	1 % CdCl_2		
1-я	+	+	-	-	+	
2-я	+	-	+	-	+	
3-я	+	-	-	+	+	
4-я (контр.)	+	-	-	-	+	

3.3. Вплив реакції середовища на активність ферментів і визначення оптимуму рН для амілази слини

Для різних ферментів існує свій оптимум рН в кислому, лужному і нейтральному середовищі, при якій фермент найбільш активний. Наприклад, для ферментів шлункового соку (пепсину) оптимум рН 1,5-2,5, для ферменту печінки (аргінази) оптимум рН 9,5 і т.д. Для амілази слини оптимум рН 6,8; в кислому і лужному середовищі активність амілази знижується. Оптимум рН для амілази слини можна визначити при взаємодії її з крохмалем при різних значеннях рН середовища.

Про ступінь розщеплення крохмалю судять по його реакції з розчином йоду. При оптимальному значенні рН розщеплення крохмалю відбудеться повністю і реакція на крохмаль з йодом буде негативна, але в міру віддалення від цієї точки в кислу або лужну середу розщеплення крохмалю відбудеться тільки частково, до стадії декстринів, які дадуть з йодом червоно-бурого або

фіолетового забарвлення, або ж крохмаль зовсім буде розщеплюватися і реакція з йодом буде позитивною.

Хід роботи: Слину попередньо розводять в 100 разів. Беруть 6 пробірок і в кожен з них наливають до 2 мл буферного розчину з різним значенням рН: 6,0; 6,4; 6,8; 7,2; 7,6; 8,0. Потім доливають по 1 мл 0,5% розчину крохмалю і по 1 мл розведеної слини (в залежності від активності слини її можна розводити не в 100, а в 50 раз).

Перемішують вміст пробірок і поміщають їх в термостат при температурі 38°C на 10 хв. Потім в усі пробірки доливають по 1 краплі розчину йоду, перемішують, спостерігають забарвлення і відзначають рН (оптимум рН), при якому амілаза діє найбільш активно. Доцільно в кожен пробірку додати трохи води, перемішати і забарвлення буде більш наочним.

Результати роботи оформлюють у вигляді таблиці 3.2.

Таблиця 3.2. – Результати дослідів

№ проби	1	2	3	4	5	6
РН						
Фарбування йодом						

3.4. Властивості ферментів

Прилади та реактиви: водяна баня або термостат, нагрітій до 37°C; холодильник; піпетки на 1...2 мл; крапельниці; нагрівальний прилад; штатив із пробірками, що закриті пробками; слина, розведена в 500 разів, або розчин панкреатину; крохмаль картопляний, 1%-й розчин; буферний розчин, рН якого дорівнює 5,0 (10,30 мл 0,2 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ змішується з 9,7 мл 1,1 М розчином лимонної кислоти); буферний розчин з рН 6,8 (15,45 мл 0,2 М $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ змішується з 4,55 мл 0,1 розчином лимонної кислоти); розчин йоду в КІ 0,004 Н; що готують шляхом розбавлення безпосередньо перед дослідженням (у такій концентрації, йод забарвлює крохмаль у синій колір та не припиняє дії амілази); джерела амілази (наприклад, слина, розведена в 500 разів або розчин панкреатину); NaCl, 0,85% -й розчин; CuSO_4 , 5% -й розчин; дистильована вода; слина, розведена в 5 разів; дріжджі; сахароза, 1%-й розчин та 0,5%-й розчин; NaOH, 10%-й розчин; реактив Фелінга I; Фелінга II.

Дослід 1. Визначення впливу різних температур на активність амілази. Фермент амілаза каталізує гідроліз крохмалю до декстринів та мальтози. Такий процес відбувається, наприклад, у ротовій порожнині при вживанні їжі продуктів, що містять крохмаль: картоплі, хліба, макаронних виробів. Джерелом амілази є слина. Цей фермент знаходиться і в других відділах травного тракту, а також у печінці та других тканинах. Різні типи амілаз використовують в харчовій промисловості, наприклад, у пивоварній, де їх джерелом є рослини (ячмінь).

Дію амілази розпізнають по зникненню синього забарвлення, яке утворюється при додаванні йоду. У 3 пробірці наливають по 1 мл джерела амілази, одну з них кип'ятять протягом не менш, ніж 5 хв. і дають охолонути;

другу кладуть у холодильник для охолодження до 10°C; третю - ставлять у термостат. Потім до всіх 3 пробірок приливають по 1 мл крохмалю і ставлять у термостат на 10 хв. при температурі 37°C. Через 10 хв. до всіх пробірок приливають по 1...2 краплі розчину йоду. Якщо крохмаль не перетравився амілазою, то утворюється синє забарвлення. При наявності продуктів гідролізу колір з йодом стає фіолетовим, червоним або жовтим в залежності від розміру утворених молекул декстринів. Амілодекстрини забарвлюються йодом у фіолетовий колір, ерітродекстрини - у червоний, ахродекстрини — утворюють жовте забарвлення, як і мальтоза. По кольору визначають глибину розщеплення крохмалю.

Дослід 2. Визначення чутливості ферментів до рН середовища.

У 2 пробірки наливають по 1 мл джерела амілази, в одну з них додають 1 мл буфера з рН 5,0; у другу - стільки ж із рН 6,8, в обидві пробірки приливають по 2 краплі йоду і по 1 мл крохмалю. Пробірки закривають пробками і залишають їх при кімнатній температурі, спостерігають за зникненням синього забарвлення в кожній пробі. Відзначають, при якому значенні рН швидше гідролізувався крохмаль.

Примітка: якщо під дією двох крапель йоду крохмаль не посинів, додають ще однакову кількість розчину крохмалю в усі пробірки, доки не з'явиться синє забарвлення.

Дослід 3. Визначення впливу активаторів та інгібіторів на активність ферментів. В організмі дія ферментів регулюється різноманітними механізмами: інтенсивністю синтезу каталітичних білків генетичним апаратом, їхнім руйнуванням продуктами реакції каталізу, гормонами і іншими факторами. Важлива роль належить активаторам та інгібіторам ферментів, які впливають на різні їхні ділянки або беруть участь в утворенні тимчасових комплексів із субстратами. Активатори та інгібітори дії ферментів використовуються для регуляції відповідних технологічних процесів, наприклад, заміс тіста, а також, в медичній практиці, для припинення життєдіяльності мікроорганізмів або заміщення недостатньої активності ензимів у тканинах, наприклад, у підшлунковому соку. У 3 пробірки наливають по 1 мл джерела амілази. До першої доливають 1 мл води; до другої - 1 мл розчину $NaCl$ і до третьої - 1 мл розчину купрум сульфату. Потім до всіх трьох пробірок доливають по 2 краплі йоду і по 1 мл крохмалю. Пробірки закривають пробками і спостерігають за швидкістю зникнення синього забарвлення.

Результати роботи наводимо у вигляді таблиці 3.3.

Таблиця 3.3. – Результати дослідів

№ проби	1. H_2O	2. $NaCl$	3. $CuSO_4$
Фарбування з йодом			

Дослід 4. Визначення специфічності дії ферментів. Ферментам притаманна специфічність дії, оскільки вони здатні каталізувати тільки певні хімічні реакції.

Специфічність дії ферментів буває абсолютна, відносна, групова і стереохімічна. Ферменти специфічні відносно як типу реакцій, що каталізуються, так і субстратів, на які вони діють. Деяким ферментам притаманна абсолютна специфічність, що виявляється з дії тільки на один будь-який субстрат. Висока специфічність ферментів визначається тим, що тільки деякі строго визначені функціональні групи, що входять до складу ферментів, можуть брати участь в утворенні фермент-субстратних комплексів.

Амілаза слини прискорює гідроліз тільки полісахаридів, не впливаючи на дисахариди. Мальтаза слини прискорює гідроліз дисахариду мальтози, що утворюється при гідролізі крохмалю, але зовсім не впливає на інший дисахарид - сахарозу. Сахароза не має вільної альдегідної групи, тому не дає реакції з реактивом Фелінга. Реакція може бути позитивною тільки в тому разі, якщо сахароза розщепиться на свої складові - глюкозу і фруктозу.

Хід роботи: у дві пробірки приливають по 5 крапель слини. У першу пробірку додають 1..3 мл 1 %-го розчину крохмалю, у другу - 2...3 мл 1 %-го розчину сахарози. Обидві пробірки ставлять на 10 хв. у термостат або водяну баню при температурі 38 С, після чого проводять реакцію Фелінга, тобто в обидві пробірки додають рівний об'єм реактиву Фелінга і Фелінга II (по 0,5 мл) і нагрівають до кипіння.

Позитивна реакція Фелінга має місце в пробірці, де зустрічаються субстрат та відповідний фермент, результатом дії якого є гідроліз, наприклад, крохмалю та амілази слини. При цій реакції утворюються мальтоза, а потім глюкоза, яка має вільну альдегідну групу, що забезпечує появу червоного осаду купрум (І) оксиду.

Контрольні запитання

1. Поясніть різницю у швидкості реакції гідролізу крохмалю α -амілазою слини і хлоридної кислотою.
2. Як змінюється швидкість ферментативної реакції від кількості ферменту?
3. Вкажіть оптимум рН для ферментів шлункового соку (зокрема, пепсину)
4. Вкажіть оптимум рН для ферменту печінки (аргінази).
5. Вкажіть оптимум рН для ферменту ротової порожнини (зокрема, α -амілази слини).

Лабораторна робота №4

**“Дослідження вуглеводів. Виявлення редукуючих вуглеводів.
Взаємодія глюкози та фруктози з йодом”**

Мета: дослідити перетравлення сахарози ферментами дріжджів, перетравлюваність крохмалю (кількісне визначення активності α -амілази за методом Вольгемута), взаємодію вуглеводів із купрум гідроксидом (реакція Троммера) та з реактивом Фелінга. Провести виявлення редукуючих вуглеводів за допомогою реакції Селіванова на визначення кетоз, виявлення моносахаридів у моркві, редукуючого вуглеводу лактози в молоці, сахарози в харчовому цукрі. Дослідити процес ізомеризації глюкози у фруктозу. Визначити глюкозу у присутності фруктози іодометричним методом

План

- 4.1. Дослідження перетравлення сахарози ферментами дріжджів
- 4.2. Дослідження перетравлюваності крохмалю (кількісне визначення активності α -амілази за методом Вольгемута).
- 4.3. Взаємодія вуглеводів із купрум гідроксидом (реакція Троммера)
- 4.4. Взаємодія вуглеводів з реактивом Фелінга.
- 4.5. Виявлення редукуючих вуглеводів. Реакція Селіванова на визначення кетоз
- 4.6. Виявлення моносахаридів у моркві
- 4.7. Виявлення редукуючого вуглеводу лактози в молоці
- 4.8. Виявлення сахарози в харчовому цукрі
- 4.9. Ізомеризація глюкози у фруктозу
- 4.10. Визначення глюкози у присутності фруктози іодометричним методом

Прилади та реактиви: штатив із пробірками; нагрівальний прилад; водяна баня; фільтри паперові; мірний циліндр; мірні колби на 100 мл; піпетки; крапельниці; скляні палички; колби конічні (об'ємом 50 мл); піпетки; бюретки; сахароза, 0,5%-й розчин; витяжка з дріжджів; CuSO_4 5%-й розчин; NaOH , 10%-й розчин; крохмаль – 1%-й розчин; витяжка з підшлункової залози, розбавлена в 1000 разів (джерело α -амілази); йод, 0,02 N розчин; глюкоза, 1%-й розчин; мальтоза, 1%-й розчин; фруктоза, 1%-й розчин; лактоза, 1%-й розчин; сахароза, 1%-й розчин; крохмаль, 1%-й розчин; реактив Фелінга (Фелінг I + Фелінг II у рівних об'ємах); реактив Селіванова; морква; молоко; KOH , 1%-й розчин; цукор, 1%-й розчин; H_2SO_4 , концентрована; концентрований розчин NaOH (або KOH); H_2SO_4 , 10%-й розчин; розчин гідролізату сахарози; йод, 0,05 N ; KOH , 0,05 N розчин; HCl , 10%-й розчин; натрій гіпосульфід ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), 0,05 N розчин.

4.1. Дослідження перетравлення сахарози ферментами дріжджів.

У дві пробірки наливають по 1 мл 0,5 %-го розчину сахарози. У першу додають 0,5 мл витяжки з дріжджів. Обидві проби ставлять у термостат на 15 хв. при температурі 37°C. Потім проводять пробу Троммера на наявність редукуючих вуглеводів.

4.2. Дослідження перетравлюваності крохмалю (кількісне визначення активності α -амілази за методом Вольгемута).

У чотири пробірки наливають по 1 мл води. У першу приливають 1 мл джерела ферменту, потім з неї відбирають 1 мл вмісту і переносять у другу пробірку, а потім з другої 1 мл приливають у третю пробірку, з третьої - в четверту, а з неї 1 мл рідини виливають, тобто послідовно розбавляють фермент у 2, 4, 8, і 16 разів. До всіх пробірок додають по 1 мл 1 %-го розчину крохмалю і помішують у термостат при температурі 37°C. Через 10 хвилин додають по 1 краплі 0,02 н розчину йоду. Відзначають забарвлення. Активність ферменту визначають за найменшою концентрацією джерела ферменту, яка викликала зникнення синього забарвлення. Потім помножують розбавлення в цій пробі на 1000 і одержують показник активності, який виражається кількістю мілілітрів 1 %-го розчину крохмалю, що розщеплює 1 мл нерозбавленого джерела фермента при температурі 37°C протягом 10 хв (рівняння 4.1):

$$D_{37^{\circ}}^{10} = 1000 \cdot a \quad (4.1)$$

де: D — активність ферменту;

a — розбавлення ферменту в пробірці, що передуює тій, в якій забарвлення синє.

Результати дослідів заносяться в таблицю 4.1.

Таблиця 4.1. – Результати дослідів

№ проби	1	2	3	4
Розбавлення джерела ферменту				
Забарвлення з I_2				
Наявність декстринів				

4.3. Взаємодія вуглеводів із купрум гідроксидом (реакція Троммера)

Всі моносахариди, а також більш складні сахари, що мають вільну карбонільну (альдегідну або кетонну) групу, мають здатність відновлюватися у лужному середовищі.

Реакція Троммера полягає у відновленні купрум (II) оксиду в купрум (I) оксид. При цій реакції купрум сульфат реагує з лугом, утворюючи блакитний купрум (II) гідроксид. При його нагріванні колір змінюється на жовтий, а потім на червоний.

У пробірки (за кількістю існуючих у лабораторії вуглеводів) наливають по 1 мл глюкози, лактози, мальтози, фруктози, сахарози, крохмалю, додають такий же, об'єм $NaOH$ і 0,5 мл $CuSO_4$ до появи блакитного осаду $Cu(OH)_2$. Усі пробірки обережно нагрівають. Моносахариди і поновлені дисахариди (лактоза і мальтоза) відновлюють $Cu(OH)_2$ до Cu_2O — осад жовтого кольору, який при тривалому нагріванні перетворюється на CuO — осад цеглисто-червоного кольору. Сахароза і крохмаль (необновлені вуглеводи) не змінюють забарвлення $Cu(OH)_2$

Роблять висновок щодо відповідності властивостей вуглеводів у

залежності від хімічної будови.

4.4. Взаємодія вуглеводів з реактивом Фелінга.

Механізм реакції з Фелінговою рідиною такий само, як і реакції Троммера. Перевагою Фелінгової рідини є те, що мідь при надлишку реактиву не випадає у вигляді CuO .

У пробірки (за кількістю існуючих у лабораторії вуглеводів) наливають по 1 мл глюкози, фруктози, лактози, мальтози, сахарози, крохмалю, додають такий же об'єм реактиву Фелінга. Пробірки обережно нагрівають. Моносахариди, відновлені дисахариди (лактоза і мальтоза), відновлюють реактив Фелінга через купрум (II) гідроксид жовтого кольору до купрум (II) оксиду цеглисто-червоного кольору. Сахароза і крохмаль (невідновлені вуглеводи) не змінюють забарвлення реактиву Фелінга. Роблять висновок щодо відповідності властивостей вуглеводів у залежності від хімічної будови.

4.5. Виявлення редукуючих вуглеводів. Реакція Селіванова на визначення кетоз

Найважливішою кетозою є фруктоза. Вона зустрічається в природі як у вільному (у складі меду), так і в зв'язаному (у складі сахарози, деяких інших полісахаридів) стані. У живих організмах фруктоза перетворюється на глюкозу. Характерною реакцією на фруктозу та інші кетози є реакція Селіванова. Суть реакції полягає в тому, що при нагріванні розчину кетози з концентрованою хлоридною кислотою утворюється оксиметилфурфурол, який із резорцином дає продукт конденсації червоного кольору. Ця реакція дає можливість визначити як вільні, так і зв'язані кетози. Швидше реакція Селіванова відбувається з фруктозою.

У пробірку наливають 0,5 мл розчину фруктози, додають 1 мл реактиву Селіванова і кілька хвилин нагрівають. Спостерігають червоне забарвлення розчину. Роблять висновок щодо значення цієї реакції для визначення фруктози.

4.6. Виявлення моносахаридів у моркві

Кладуть у пробірку трохи протертої моркви, додають 5 мл води, струшують 2...3 хвилини, фільтрують і фільтрат ділять на дві частини. В одній пробірці відкривають моносахариди реакцією Фелінга, у другій - фруктозу — реакцією Селіванова.

4.7. Виявлення редукуючого вуглеводу лактози в молоці

В мірний циліндр на 50 мл виміряють 2,5 мл молока, додають 40 мл дистильованої води і 1 мл 1 % розчину KOH . Об'єм суміші доводять до 50 мл. Струшують вміст. Фільтрують. Відмірюють в окрему пробірку 2-3 мл фільтрату і проводять реакцію Фелінга.

4.8. Виявлення сахарози в харчовому цукрі

Готують 1 %-й розчин харчового цукру. З 1...2 мл розчину проводять реакцію Фелінга. 2...3 мл розчину цукру піддають кислотному гідролізу, гідролізат розливають у дві пробірки: в одній після нейтралізації проводять реакцію Фелінга, у другій - реакцію Селіванова.

4.9. Ізомеризація глюкози у фруктозу

Глюкоза і фруктоза - моносахариди. Глюкоза - виноградний, фруктоза - плодовий цукор. Моносахариди, що містять альдегідну групу, одержали назву альдоз (глюкоза), а ті, що містять кетонну групу - кетоз (фруктоза). Усі альдози і кетози є ізомерами. Це ізомерія альдоз і кетоз з відкритим ланцюгом і з однаковим числом атомів вуглевода в молекулі.

Глюкоза і фруктоза мають однакову молекулярну формулу $C_6H_{12}O_6$ отже є ізомерами. Всі моносахариди, що мають в окисній формі вільний глюкозидний гідроксил, а у відкритій - вільну карбонільну групу, в тому числі глюкоза, фруктоза, при нагріванні в лужному розчині легко розщеплюються, подібно до альдегідів і кетонів, утворюючи брунатний або чорний розчин.

При осмолюванні утворюється складна суміш речовин, при цьому вуглеводи ізомерізуються по різних напрямках. При дії дуже слабких лугів вуглеводи не зазнають глибоких змін, проте все ж здатні ізомеризуватися. Так, глюкоза в таких умовах частково ізомеризується у фруктозу.

Дослід проводять одночасно з кількома різними вуглеводами, використовуючи готові 5...10 %-і розчини або розчинюючи 0,1...0,2 г вуглеводів в 1.. 2 мл дистильованої води.

До 1 мл розчину вуглеводу додають удвічі менший об'єм концентрованого розчину лугу, нагрівають суміш до кипіння і кип'ятять 2...3 хв. Відзначають зміну забарвлення розчину, якщо таке спостерігається. Потім охолоджують рідину і підкислюють її розбавленою сульфатною кислотою, при цьому забарвлення блідніє і з'являється виразний запах карамелі (палений цукор).

4.10. Визначення глюкози у присутності фруктози іодометричним методом

В основі цієї методики лежить здатність молекулярного іоду (I_2) у лужному середовищі окиснювати тільки альдегідоспирти, не діючи на кетоспирти. При внесенні надмірної кількості іод, який не прореагував, можна визначити у кислому середовищі титруванням натрій гіпосульфітом (індикатор - розчин крохмалю).

У дві колби вносять по 50 мл розчину йоду. В одну з них (проба) додають 10 мл розчину, який досліджується (гідролізат сахарози або інвертний цукор) а в другу (контроль) - 10 мл дистильованої води. Потім, збовтуючи, доливають по краплям 10 мл розчину калій гідроксиду і залишають стояти при кімнатній, температурі 15 хв.

Після цього до обох колб доливають по 10 мл розчину хлоридної кислоти і 2...3 краплі розчину крохмалю. Вміст колб титрують розчином натрій гіпосульфату до зникнення синього забарвлення, яке з'явилося в результаті додавання крохмалю.

Масову концентрацію глюкози у досліджуваному розчині (мг/мл) обчислюють за формулою (4.2):

$$C = (B - A) \cdot f \cdot Q \cdot V_0 / V_1, \quad (4.2)$$

де A і B - об'єми розчину натрій гіпосульфїту, який необхідний для титрування проби і контролю;

f - коефіцієнт поправки на титр $0,05$ моль/л розчину натрій гіпосульфїту що дорівнює 1;

Q - маса глюкози (9 мг), еквівалентна 1 мл $0,05$ моль/л розчину натрій гіпосульфїту

V_0 - загальний об'єм проби: $50+10$ (вуглевод) $+10$ (KOH) $+ 10$ (HCl) = 80 (мл);

V_1 - об'єм досліджуваної суміші, яку взяли для аналізу - 10 мл.

Контрольні запитання

1. Вкажіть рН середовища (кисле, нейтральне або лужне), в якому мають здатність відновлюватися всі моносахариди, а також більш складні сахари, що мають вільну карбонільну (альдегідну або кетонну) групу.

2. Вкажіть результат (кольор осаду) якісної реакції Тромера на відновлювальні (редуючі) моноцукри.

3. Вкажіть моноцукри, які відносять до редуючих.

4. Вкажіть дисахариди, які відносять до нередуючих

5. Наведіть приклади моносахаридів альдоз та кетоз.

Лабораторна робота № 5.

«Визначення ступеня оцукрювання крохмалю»

Мета: порівняти ефективність процесу оцукрювання крохмалю при різних режимах його проведення.

План

5.1. Отримати у викладача варіант проведення гідролізу крохмалю.

5.2. Сформулювати основні етапи роботи.

5.3. Провести гідроліз крохмалю по заданому варіанту.

5.4. Визначити в гідролізаті кількість гідролізованого крохмалю за вмістом глюкози, що утворилася при гідролізі

5.5. Розрахувати ступінь оцукрювання крохмалю при заданому режимі.

5.6. Порівняти отриманий результат з даними досліджень за іншими варіантами проведення гідролізу.

5.7. Зробити висновок про найбільш ефективних параметрах проведення гідролізу.

Теоретичні питання.

Основними видами крохмалевмісної сировини є картопля, зерно і продукти його переробки (борошно, крупа). Вміст крохмалю в картоплі становить у середньому $70-80\%$ його сухої маси, в зернівці злаків – $40-80\%$.

Складається крохмаль з полісахаридів двох типів, що розрізняються по своїм фізичним і хімічним властивостям, – амілози і амілопектину. В

пшеничному крохмалі міститься 25% амілози і 75% амілопектину. У молекулі амілози залишки глюкози зв'язані 1,4-глюкозидним зв'язком; утворюють лінійний ланцюжок. Молекулярна маса амілози $3 \times 10^5 \dots 1 \times 10^6$ а.о.м..

Молекула амілопектину має не тільки 1,4-глюкозидні зв'язки, але і зв'язки між 1-м і 6-м атомами карбону залишків глюкози; утворюється розгалужена структура. Молекулярна маса амілопектину досягає сотень мільйонів а.о.м. Крохмаль на 96,1-97,7% складається з полісахаридів, що утворюють при гідролізі глюкозу.

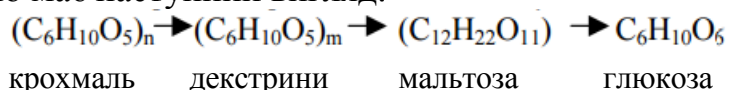
При оптимальних температурах під дією ферментів солоду і їх достатній кількості повне оцукрювання розчиненого при $140 \dots 150^\circ\text{C}$ крохмалю відбувається практично миттєво. Однак через те, що на практиці можливі відступу від оптимальних режимів технології і, крім того, одночасно з крохмалем основної сировини ферменти солоду повинні оцукрювати і крохмаль солоду, який менш підготовлений до оцукрюванню, в промисловому виробництві спирту тривалість оцукрювання становить кілька десятків хвилин і ступінь оцукрювання крохмалю обов'язково контролюють. Такий контроль особливо необхідний в побутових умовах.

Ступінь оцукрювання крохмалю визначають методом йодної проби.

З цією метою порцію оцукрюваної маси фільтрують через фільтр з щільної тканини, після чого до 5..10 частин фільтрату додають одну частину спиртового розчину йоду (можна всього кілька крапель). Зміна кольору проби в присутності йоду означає:

- - синій - крохмаль перетворився в клейстер і розчинний крохмаль;
- - фіолетовий - крохмаль перетворився в декстрини;
- - червоний - крохмаль менш ніж на половину перетворився в мальтозу;
- - колір не змінився, тобто має відтінок кольору розчину йоду, - весь крохмаль перетворився в мальтозу і декстрини.

Оцукрювання крохмалю називають процес його гідролітичного розщеплення до ді- і моносахаридів. Крохмаль є полісахаридом, що складається з молекул α -глюкози, зв'язаних між собою α -1,4 зв'язком. Схема гідролізу крохмалю має наступний вигляд:



Керуючи глибиною гідролізу крохмалю, можна отримати продукти харчування з заданим вмістом цукрів.

Хімічний гідроліз крохмалю проходить дуже повільно, тому його проводять при підвищених температурах у присутності каталізатора, яким є кислота. Швидкість оцукрювання залежить від концентрації кислоти, температури і тривалості гідролізу.

Варіанти проведення гідролізу крохмалю:

Варіант №1. Наважку крохмалю в 0,2 г заливають 50 см³ гарячого розчину HCl (0,5 моль/дм³) в хімічному стакані і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 60 хв при періодичному помішуванні.

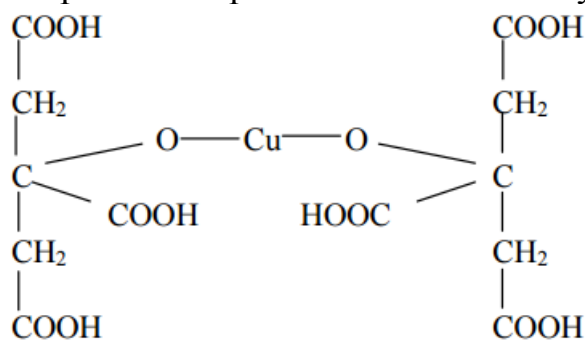
Варіант №2. Гідроліз проводять аналогічно варіанту №1, але протягом 90 хв.

Варіант №3. Наважку крохмалю в 0,2 г заливають 50 см³ гарячого розчину HCl (1 моль/дм³) в хімічному стакані і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хв при періодичному помішуванні.

Варіант №4. Гідроліз проводять аналогічно варіанту №3, але протягом 60 хв.

Визначення кількості оцукрюваного крохмалю

Про кількість оцукрюваного (гідролізованого) крохмалю судять за вмістом глюкози, що утворилася з нього. Визначення глюкози засноване на її окисно-відновних властивостях. Глюкозу окиснюють купрум (II) оксидом, в складі комплексної сполуки купруму з лимонною кислотою в лужному середовищі, яку створює карбонат натрію. Комплексна сполука має вигляд:



Надлишок купрум (II) оксиду, що знаходиться в комплексі, визначається йодометрично на основі такої реакції:



Йод, що виділився, оттитровують розчином тіосульфату (Na₂S₂O₃). Кількість останнього, який пішов на титрування, еквівалентно кількості купрум (II) оксиду, що залишився після окиснення глюкози.

Техніка виконання. Після проведення гідролізу гідролізат охолоджують і в тому ж склянці нейтралізують за допомогою 30% розчину NaOH, додаючи його обережно по краплях і контролюючи, щоб рН був не вище 6,5. Нейтралізований гідролізат переносять в мірну колбу на 100 см³ і доводять дистильованою водою до мітки. З отриманого об'єму 25 см³ переносять в мірну колбу на 100 см³, додають 25 см³ мідного окисного реактиву, ставлять на азбестову дротяну сітку і нагрівають до кипіння. Кип'ятять 10 хв., швидко охолоджують до кімнатної температури і доводять водою до мітки. У конічну колбу відбирають 25 см³ яскраво-синього розчину, не зачіпаючи утвореного осаду Cu₂O червоного кольору, додають 30 см³ свіжоприготованого 10% розчину KJ і 25 см³ 25% розчину H₂SO₄. Йод, що виділився, оттитровують розчином Na₂S₂O₃ (0,1 моль/дм³). Одночасно проводять контрольний дослід в таких же умовах, але замість 25 см³ досліджуваного розчину беруть 25 см³ дистильованої води. Різниця об'ємів тіосульфату, що пішов на контрольний і робочий досліди, еквівалентна кількості купрум (II) оксиду, який пішов на окиснення глюкози. Помноживши отриману різницю на 4 (оскільки з 100 см³ взято 25 см³) знаходять вміст оцукрюваного крохмалю в 25 см³ нейтралізованого розчину (в мг) по таблиці 5.1.

Таблиця 5.1

Дані для знаходження вмісту оцукрюваного крохмалю

Кількість Na ₂ S ₂ O ₃ , мл	Вміст крохмалю, мг	Кількість Na ₂ S ₂ O ₃ , мл	Вміст крохмалю, мг
1	2,8	8	23,6
2	5,6	9	26,1
3	8,4	10	29,2
4	11,3	11	32,3
5	14,2	12	35,4
6	17,1	13	38,6
7	20,1	14	41,8
		15	45,0

З огляду на розведення гідролізату, розраховують ступінь оцукрюваного крохмалю, виходячи з його кількості до гідролізу (0,2 м). Масова частка крохмалю, X (в %) (5.1.):

$$X = \frac{100 \cdot A \cdot V_1 \cdot V_3}{1000 \cdot m \cdot V_2}, \quad (5.1)$$

де: A - кількість крохмалю по таблиці 5.1., мг;

V₁ - загальний об'єм гідролізату (100 мл);

V₃ - об'єм розчину після окиснення глюкози (50 мл);

m - маса наважки, г;

V₂ - об'єм гідролізату для окиснення глюкози (25 мл).

Запис в лабораторних зошитах.

Кількість тіосульфату в см³, який пішов на титрування контрольної проби.

Кількість тіосульфату в см³, який пішов на титрування аналізованої проби.

Вміст оцукрюваного крохмалю, знайденого по таблиці 5.1.

Розрахунок ступеня оцукрювання крохмалю.

Контрольні запитання

1. Вкажіть основні види крохмалевмісної сировини
2. Назвіть два типи полісахаридів, з яких складається крохмаль.
3. Наведіть назву фізико-хімічного методу, за допомогою якого визначають ступінь оцукрювання крохмалю
4. На якому біохімічному процесі ґрунтується оцукрювання крохмалю?
5. Назвіть моносахарид, який утворюється при оцукрюванні (гідролізі) крохмалю та за вмістом якого визначають кількість вихідного крохмалю.

Лобораторна робота № 6.

«Ліпіди, ліпоїди, жири. Фізико-хімічні властивості.

Фізико-хімічні перетворення жирів»

Мета: дослідження фізико-хімічних властивостей та перетворень жирів (ліпідів). Визначення присутності кетонівих тіл в біологічних рідинах та вмісту β – ліпопротеїдів і загальних ліпідів в сироватці крові.

План

6.1. Фізико-хімічні властивості жирів.

- 6.2. Фізико-хімічні перетворення жирів.
- 6.3. Якісні реакції на ацетон і ацетооцтову кислоту
- 6.4. Визначення вмісту β - ліпопротеїдів у сироватці крові.
- 6.5. Визначення загальних ліпідів в сироватці крові

6.1. Фізико-хімічні властивості жирів.

Прилади та реактиви: штатив з пробірками; піпетки; воронки; фільтри паперові; мірні циліндри; колби конічні на 50...100 мл з пробірками; бюретки; колби конічні на 50...100 мл з пробками; бюретки; колби конічні на 200 мл з притертими корками; склянна паличка; хімічні склянки; крапельниці; водяна баня; паперові фільтри; мірні колби на 250 мл; холестерин, 0,3%-й розчин в хлороформі; лецитин, 0,3%-й розчин в хлороформі; соняшникова олія, 0,3%-й розчин в хлороформі; H_2SO_4 , концентрована; жовч, лецитин; $NaHCO_3$, 1%-й розчин; вода дистильована; нейтралізована спиртово-ефірна суміш; KOH , 0,1 N розчин; фенолфталеїн, 0,1%-й розчин; суміш льодяної оцтової кислоти і хлороформу (2:1); KI , насичений розчин; дистильована вода; натрій гіпосульфід ($Na_2S_2O_3$), 0,002 N розчин; крохмаль, 1%-й розчин; хлороформ; іод, 0,1 N спиртовий розчин; $Na_2S_2O_3$, 0,1 N розчин; гліцерин або рослинна олія; $NaCl$ кристали; етанол; сухий яєчний жовток; ацетон, 5%-й розчин; яловичий жир; сало; $NaOH$ або KOH концентровані; $NaCl$, насичений розчин; фуксин, 1%-й спиртовий розчин; етанол, 5%-й розчин; суміш концентрованої H_2SO_4 з формаліном (50:1).

Дослід 1. Реакція стеридів з сульфатною кислотою

У сухі пробірки наливають по 1 мл хлороформних розчинів, що будуть досліджуватися, і в кожную додають по стінці пробірки 1 мл концентрованої сульфатної кислоти. Вміст пробірок обережно перемішують. У присутності стеринів верхній шар рідини забарвлюється в темно-червоний колір, нижній - у жовто-червоний з зеленою флуоресценцією.

Результати усіх трьох дослідів оформлюють у вигляді таблиці 6.1., позначаючи характер реакції знаками „+”, „-”.

Таблиця 6.1

Результати дослідів

Реактиви	Характер реакції з різними видами ліпідів		
	соняшникова олія	лецитин	холестерин
H_2SO_4 , конц.			

Дослід 2. Емульгування жирів

Емульгуванням називають розподіл однієї нерозчинної рідини в іншій у вигляді краплин. Таке подрібнення на краплини звичайно здійснюється при енергійному перемішуванні двох рідин. Щоб емульсія не розшаровувалася,

використовують спеціальні речовини - *емульгатори* або *стабілізатори*. Емульгатор розподіляється по поверхні краплинок диспергованої рідини у вигляді тонкої плівки і перешкоджає їх злиттю. Стійкість одержаної емульсії, в значній мірі залежить від природи емульгатора. Наприклад, молочно-жирова емульсія маргарину має високу стійкість і не розшаровується при механічній і термічних діях. У вітчизняному маргариновому виробництві як емульгатори використовують суміші моно- і дигліцеридів, фосфатиди, сухе молоко. При виготовленні майонезів з цією метою використовують яєчний і гірчичний порошки.

Основними емульгаторами в шлунково-кишковому тракті є солі жовчних кислот, білки, фосфатиди, мила, гідрокарбонати лужних металів. Емульгування жирів сприяє кращому їх розщепленню та всмоктуванню в кишечнику.

У чотири пробірки наливають по 5 мл дистильованої води. До другої пробірки вносять на кінчику ножа лецитин, до третьої - 1 мл жовчі, до четвертої - 1 мл розчину NaHCO_3 . Потім до всіх пробірок додають по 0,2 мл олії. Пробірки енергійно струшують і залишають на 5 хвилин. У першій пробірці емульсія швидко розшаровується на воду і олію. У інших пробірках завдяки присутності жовчі, лецитину і соди утворюються стійкі емульсії.

Вміст пробірок фільтрують через паперові фільтри у другі пробірки. У першій пробірці через фільтр проходить прозорий розчин, а олія залишається на фільтрі. У інших пробірках фільтрується мутна рідина (емульсія). Отже стабілізатори сприяють емульгуванню, жирів і значно полегшують їхнє проходження через мембрани.

Дослід 3. Проба на згіркнення жиру.

При зберіганні або тепловій обробці жирів відбуваються різні хімічні перетворення (гідроліз, окиснення жирних кислот), які викликають зміни фізико-хімічних і органолептичних характеристик жирів. Накопичення в продукті вільних жирних кислот, пероксидів, альдегідів і кетонів призводить до погіршення харчових властивостей жирів. На практиці при оцінюванні якості жирів використовуються такі хімічні показники, як кислотне і йодне числа. Для аналізу різних жирів (свіжих, після зберігання або після жаріння у фритюрі, тобто у великій кількості жиру при 150...190 °C) група студентів проводить спільну роботу. Кожен студент проводить дослід з одним із досліджуваних жирів.

Для одержання добрих результатів необхідно акуратно проводити титрування: об'єм розчинів у бюретці відраховувати від нуля, розчини додають краплями при постійному перемішуванні суміші в колбі. Титрування зупиняють при появі забарвлення, яке не зникає після струшування протягом 30 секунд.

Дослід 4. Визначення кислотного числа. В колбу вносять наважку (близько 1 г) досліджуваного матеріалу (за різницею маси колби до і після внесення масла), приливають 10 мл нейтралізованої суміші спирту і ефіру, вміст колби перемішують до розчинення жиру. Додають у колбу 2...3 краплі

розчину фенолфталеїну і титрують суміш 0,1 Н розчином КОН до появи рожевого забарвлення.

Кислотне число визначають по формулі (6.1):

$$KЧ = \frac{v \cdot k \cdot 5,61}{n} \quad (6.1)$$

де v - кількість 0,1 Н спиртового розчину КОН (мл), витраченого на титрування наважки жиру;

k - поправочний коефіцієнт до титру 0,1 Н розчину КОН;

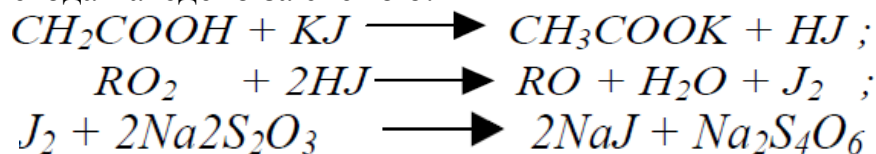
5,61 - титр точно 0,1 Н розчину КОН;

n - наважка жиру (г).

Дослід 5. Визначення перекисного (пероксидного) числа. Ненасичені жирні кислоти легко піддаються окисненню під впливом кисню, вологи, світла. Цей процес каталізує фермент ліпооксигеназа. Кількісне вимірювання пероксидів олії, що утворилися, засновано на реакції виділення йоду з калій йодиду в кислому середовищі. Йод потім титрують розчином гіпосульфату. Перекисне число — ПЧ - це кількість г йоду, виділене пероксидами тими у 100 г олії.

У конічну колбу або склянку з притертою коркою вміщують 2 г рослинної олії, суміш льодяної оцтової кислоти її хлороформу - 20 мл. Додають 5 мл насиченого розчину KI. Колбу укупорюють і ставлять у темне місце на 10 хв. Потім доливають 50 мл дистильованої води, титрують йод, що виділяється, 0,002 Н розчином гіпосульфату (індикатор - крохмаль, додають у колбу 1...2 краплини). Паралельно проводять контрольну пробу з водою.

Хімізм метода наведено за схемою:



Перекисне (пероксидне) число розраховують за формулою (6.2):

$$ПЧ = \frac{(C - O) \cdot 0,0002538 \cdot 100}{n} \quad (6.2)$$

де C - кількість 0,002 Н розчину натрій гіпосульфату (мл), що була витрачена на контрольне вимірювання;

O - кількість 0,002 Н розчину натрій гіпосульфату (мл), що була витрачена на титрування дослідного зразка;

0,0002538 - титр 0,002 Н розчину натрій гіпосульфату по йоду;

n - наважка олії.

Дослід 6. Визначення іодного числа. В колбу з пробкою вносять близько 5 мл досліджуваного масла. До другої колби (контрольної) вносять рівний об'єм дистильованої води. В обидві додають по 5 мл хлороформу. Колби закривають пробками і струшують. У колби (точно) піпеткою приливають по 10 мл 0,1 Н розчину йоду, закривають пробками, струшують і ставлять у темне місце на 5 хвилин. Потім проби титрують 0,1 Н розчином натрій гіпосульфату до світло-жовтого кольору, після чого додають 1 мл

розчину крохмалю і продовжують титрувати до зникнення синього забарвлення. Іодне число (ІЧ, г) визначають за формулою (6.3):

$$ІЧ = \frac{(A - b) \cdot K \cdot 0,01269 \cdot 100}{C} \quad (6.3)$$

де ($A - b$) - різниця об'ємів 0,1 N натрій гіпосульфїту що витрачається для титрування в дослідній і контрольній пробах;

K — поправочний коефіцієнт на титр емпіричного 0,1 N розчину натрій гіпосульфїту;

0,01269 - коефіцієнт перерахунку витраченого розчину натрій гіпосульфїту (1 $мл$ 0,1 N розчину натрій гіпосульфїту еквівалентний 0,01269 $г$ іоду);

C - наважка жиру, $г$;

100 - коефіцієнт перерахунку на 100 $г$ жиру.

Дослід 7. Проба на гліцерин (акролейнова проба).

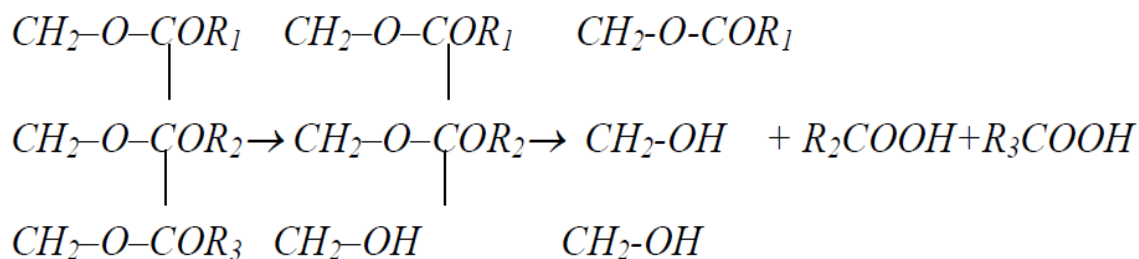
Якісною реакцією на якість жиру є акролейнова проба. При нагріванні гліцерин втрачає воду і утворює ненасичений альдегід - акролейн, який легко виявляється завдяки специфічному подразливому запаху. Акролейнову пробу здійснюють нагріваючи жир у присутності Na або K , $NaHSO_4$ або $KHSO_4$ (як водовіднімаючий засіб). В суху пробірку сиплюють 1 $г$ сухої солі $NaCl$, капають дві краплі концентрованої H_2SO_4 , накапують 1...2 краплі жиру і нагрівають. Різкий подразний запах свідчить про наявність акролейну. Ця реакція протікає ступенево.

Дослід 8. Якісна реакція на лецитін

Лецитін є фосфоліпідом, тобто жироподібною сполукою. Він відіграє велику біологічну роль: входить до складу біологічних мембран, має ліпотропну дію, тобто запобігає атеросклерозу судин, протидіє ожирінню печінки та інше. Лецитин є гарним емульгатором. Він не розчиняється у ацетоні, а з водою утворює стійку емульсію. В хімічну склянку кладуть 200 $мг$ сухого розтертого яєчного жовтка, додають 15 $мл$ гарячого спирту, перемішують. Через 10...15 $хв.$ суміш охолоджують і фільтрують у суху пробірку. В другу суху пробірку вливають 2...3 $мл$ ацетону, потім краплями додають фільтрат з першої пробірки. Спостерігають появу помутніння, а потім випадає осад лецитину, який не розчиняється в ацетоні. При додаванні до 2...3 $мл$ фільтрату декілька краплин дистильованої води утворюється стійка емульсія.

Дослід 9. Дослідження процесу омилення (лужного гідролізу) жирів.

В процесі технологічної обробки, зокрема, при нагріванні, жири здатні гідролізувати. Ступінь гідролізу залежить від режимів теплової обробки. В результаті гідролізу відбувається накопичення вільних жирних кислот за схемою:



Оскільки жири є складними естерами вони мають властивість вмилюватися. При омиленні жиру в лужному середовищі утворюються гліцерин і мила (солі вищих жирних кислот). Реакція відбувається повільно. При додаванні спирту омилення різко прискорюється, тому що підвищується розчинність жиру, і суміш стає однорідною. Гліцерин і спирт також розчинні у розчині натрій хлориду мило ж не розчиняється і виділяється з розчину у вигляді твердої маси (висолування). З рідких жирів утворюються більш м'які мила.

Дослід проводять одночасно з різними жирами. В пробірку вміщують приблизно 3 г жиру додають спирту і 3 мл концентрованого розчину натрій гідроксиду або калію. Вміст пробірки старанно збовтують і нагрівають до початку кипіння. Суміш стає однорідною і через 5...7 хвилин омилення закінчується. До отримання густої маси добавляють при перемішуванні гарячий насичений розчин натрій хлориду. Дають відстоятись і спостерігають за виділенням шару мила, який спливає на поверхню. Роблять висновок про умови утворення мила при омиленні жирів.

Дослід 10. Реакція на альдегіди з реактивом Шиффа

Однією з найбільш специфічних є реакція з фуксинсульфітною кислотою (реактивом Шиффа). Безбарвний розчин фуксинсульфітної кислоти під впливом альдегідів приймає червоно-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення.

У пробірку наливають 1 мл олії, додають 0,5 мл реактива Шиффа і перемішують. Якщо у рідині є альдегіди, то з'являється червоно-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення. Якщо забарвлення, не з'явилося через 20 хвилин після початку дослідження, то це свідчить про відсутність альдегідів в олії.

Дослід 11. Реакція Вітбі на наявність стеринів в олії

У суху пробірку наливають 1 мл хлороформу, додають 2...3 краплі олії і легко перемішують до розчинення олії. До хлороформного розчину олії додають 20 крапель суміші концентрованої сульфатної кислоти з формаліном (50:1) і перемішують. Верхній хлороформний шар забарвлюється у вишнево-червоний колір, нижній, кислотний - у червоно-коричневий з зеленою флюоресценцією.

6.2. Фізико-хімічні перетворення жирів

Мета: ознайомитися з основними фізико-хімічними перетвореннями в процесі зберігання і переробки. У процесі переробки і зберігання жири піддаються гідролитическим і окисним перетворенням.

Прилади та реактиви: штатив зі пробірками; жовч, водний розчин

(1:2); сахароза або фруктоза, 3%-й розчин; H_2SO_4 , концентрована; мурашиний альдегід; натрій гідроксид, 10%-й розчин; розчин Люголя (розчин йоду в NaI); ацетон; ацетон, 5%-й розчин; сеча; сеча з ацетоном; натрій нітропрусид, 3%-й розчин; оцтова кислота, концентрована.

Дослід 1. Фурфуролова проба на жовчні кислоти

В тонкій кишці відбувається гідроліз жирів. Попереднім етапом є емульгування ліпідів. Основний емульгатор - жовчні кислоти. Для їх визначення використовують їхню здатність при взаємодії з оксиметілфурфуролом давати червоне забарвлення. Оксиметілфурфурол утворюється при взаємодії сахарози або фруктози з концентрованою сульфатною або хлоридною кислотою. У пробірку наливають 10 крапель жовчі, розбавленої у 2 рази, додають 1 краплю 3 %-го розчину сахарози і обережно (!) по стінці пробірки додають 1 мл концентрованої H_2SO_4 . На лінії розділу двох рідин визначають появу забарвленого кільця.

Дослід 2. Виявлення кетонових тіл. Проба Лібена

Ацетон є цінним розчинником і вихідною сполукою в синтезі різноманітних органічних сполук. При деяких захворюваннях, а також при інтенсивному фізичному навантаженні ацетон перетворюється в організмі в ацетооцтову кислоту і виділяється з сечею разом з ацетооцтовою і β -гідрооксималярною кислотами (так званими кетоновими тілами). Реакції на визначення кетонових тіл використовуються в клінічній та біохімічній практиці і мають певне діагностичне значення.

Ацетон визначають при взаємодії з реактивом Люголя (розчин йоду у водному розчині калій йодиду у лужному середовищі. Під час реакції виникає іодоформ. Мурашиний альдегід не містить у молекулі необхідні для перетворення йодоформу групи атомів і в умовах дослідів окиснюється до мурашиної кислоти.

В одну пробірку наливають 1 мл водного розчину мурашиного альдегіду, в другу - такий самий об'єм водного розчину ацетону. В обидві пробірки додають по 1 мл реактиву Люголя і кілька крапель розчину натрій гідроксиду. У пробірці з ацетоном спостерігають жовтуватий осад йодоформу з характерним запахом.

Дослід 3. Гідроліз жирів

В процессе технологической обработки, в частности, при нагревании, жиры способны гидролизаться. Степень гидролиза зависит от режимов тепловой обработки. В результате гидролиза происходит накопление свободных жирных кислот (див. дослід 3, 6 в пункті 1).

6.3. Якісні реакції на ацетон і ацетооцтову кислоту.

Дослід 1. Нітропрусидна проба на ацетон і ацетооцтову кислоту.

1. Проба Леголю.

Хід роботи: До 10 крапель сечі додають 1-2 краплі свіжовиготовленого 5% розчину нітропрусиду натрію і 3-4 краплі 10% розчину $NaOH$. З'являється оранжево-червоне забарвлення. Додають 5-8 крапель концентрованої оцтової

кислоти. У присутності ацетону і ацетооцтової кислоти виникає вишнево-червоне забарвлення.

2. Проба Ланге.

Хід роботи: До 10 краплях сечі додають 2 краплі концентрованої оцтової кислоти, 1-2 краплі свіжовиготовленого 5% розчину нітропрусиду натрію і перемішують. Пробірку нахиляють під кутом 45 градусів і обережно по стінці нашаровуються рівний об'єм концентрованого аміаку. У присутності ацетону і ацетооцтової кислоти на межі утворюється червоно-фіолетове або фіолетове кільце.

Дослід 2 Ферріхлоридна проба на ацетооцтову кислоту (проба Герхардта).

Хід роботи: До 15-20 краплях сечі доливають 3-5 крапель 5% розчину ферум хлориду. У присутності ацетооцтової кислоти в кількості понад 0,07% з'являється червоне забарвлення. Подібне фарбування виходить і під час відсутності ацетооцтової кислоти в сечі, після прийому всередину деяких лікарських речовин: саліцилової кислоти, аспірину та ін. При стоянні та при кип'ятінні протягом 2 хв в присутності зазначених вище лікарських речовин забарвлення не зникає.

6. 4. Визначення вмісту β - ліпопротеїдів у сироватці крові.

Принцип методу: В основу методу покладено здатність β -ліпопротеїдів (ЛП) осідати в присутності хлориду кальцію і гепарину; при цьому змінюється каламутність розчину. За ступенем помутніння розчину і судять про концентрацію β -ліпопротеїдів в сироватці крові.

Порядок виконання роботи: В пробірку вносять 2 мл 0,27% розчину CaCl_2 і 0,2 мл сироватки крові, перемішують. Визначають оптичну щільність розчину (E_1) в кюветах на 5 мм, при червоному світлофільтрі (670 нм). Розчин з кювети переливають в пробірку, додають мікропіпеткою 0,04 мл 1% р-ра гепарину, перемішують і точно через 3 хв знову визначають оптичну щільність розчину (E_2) в тих же умовах. Розчин порівняння – дистильована вода.

Розрахунок концентрації β -ліпопротеїдів за формулою (6.4.):

$$X (\text{мг}\%) = E \cdot 1000 \quad (6.4)$$

1000 - емпіричний коефіцієнт, запропонований Ледвіном, так як побудовання калібрувальної кривої зв'язане з рядом труднощів;

$E = E_2 - E_1$ - оптичні щільності розчинів

Норма: 300- 550 мг%

6.5. Визначення загальних ліпідів в сироватці крові

Принцип методу: Ненасичені ліпіди і жирні кислоти, фосфоліпіди і холестерин взаємодіють після гідролізу сірчаної кислотою з фосфоаніліновим реактивом з утворенням червоного забарвлення.

Схема постановки дослідів наведено в таблиці 6.2.

Таблиця 6.2.

Схема постановки дослідів

Вміст пробірки	Проба	Стандарт	Контроль
Сироватка, мл	0,02	-	-
Реактив 1, мл	-	0,02	-
Кислота сульфатна конц, мл	1,5	1,5	1,5
H ₂ O, мл	—	—	0,02

Перемішують і нагрівають 15 хв на киплячій водяній бані. Після охолодження пробірок проточною водою відміряють (див. табл. 6.3.)

Таблиця 6.3.

Кількість гідролізату та реактиву

Гідролізат, мл	0,1	0,1	0,1
Реактив 2, мл	1,5	1,5	1,5

Перемішують і залишають стояти 50 хв при температурі 15...25°C.

Не пізніше ніж через 60 хв вимірюють оптичну щільність проби / A_1 / і стандарту / A_2 / проти контрольного розчину. Довжина хвилі (510-550) нм, кювета 5 мм.

Розрахунок за формулою (6.5)

$$C = 8 \frac{A_1}{A_2}, \quad (6.5)$$

де

C - загальний вміст ліпідів, г/л;

A_1 - оптична щільність проби;

A_2 - оптична щільність стандарту.

Результати аналізу:

Як фізіологічне явище збільшення вмісту ліпідів в крові (гіперліпемія) настає через 1-4 год після прийняття їжі. Концентрація ліпідів крові збільшується (гіперліпемія) при діабеті / до 10-20 г/л, ліпоїдному нефрозі, цирозі печінки, ожирінні, атеросклерозі, ішемічній хворобі серця, гіпотермозі, панкреатиті.

Норма: 4-8 г/л.

Контрольні запитання

1. Дайте визначення поняттю «емульгування»
2. Поясніть принцип дії емульгаторів або стабілізаторів емульсій
3. Наведіть приклади емульгаторів, що використовуються у вітчизняному маргариновому виробництві
4. Наведіть приклади емульгаторів, що використовуються при виготовленні майонезів
5. Вкажіть основні емульгатори в шлунково-кишкового тракту

Лабораторна робота №7
«Визначення фенольних речовин в сировині та харчових продуктах.
Дослідження водо- та жиророзчинних вітамінів»

Мета: визначення фенольних речовин в сировині та харчових продуктах. Дослідження водо- та жиророзчинних вітамінів.

План

- 7.1. Визначення фенольних речовин в сировині та харчових продуктах
- 7.2. Дослідження водо- та жиророзчинних вітамінів

7.1. Визначення фенольних речовин в сировині та харчових продуктах

Визначення загального вмісту фенольних речовин у вині, соку, фруктах і плодах

Необхідні реактиви і посуд:

Реактив Фолина-Чокальтеу, 20% розчин Na_2CO_3) розчин енотаніну, виділеного з насіння винограду або таніну (3мг таніну розчиняють в 100 см³ 10% об. спирту, рН 3,2).

Витрата вина, соку 1см³ на один аналіз.

Техніка визначення

У мірну колбу місткістю 100 см³ поміщають 1 см³ білого вина, соку або 1 см³ червоного вина або темнозabarвленого соку, попередньо розведеного в 5 разів (2 см³ червоного вина або соку і 8 см³ дистильованої води розводять в пробірці). Потім в мірну колбу додають 2 см³ реактиву Фолина-Чокальтеу і 10 см³ 20% розчину соди. Об'єм доводять водою до мітки, перемішують і витримують 30 хв. Після витримки в розчині визначають оптичну щільність розчину при $\lambda=630$ нм, довжина кювети 10 мм на фотоелектроколориметрі або спектрофотометрі. При значеннях оптичної щільності більше 0,5 од. аналізований зразок слід додатково розбавити, при цьому розведення слід враховувати в розрахунку вмісту фенольних речовин. Як розчин порівняння використовують реактив, приготований з 1 см³ дистильованої води, 1 см³ реактиву Фолина-Чокальтеу і 10 см³ 20% розчину соди, доведених в мірній колбі до 100 см³.

При аналізі плодово-ягідної сировини спочатку готують витяжку. На технічних терезах зважують 10 г сировини, розтирають у фарфоровій ступці протягом 10 хв, поступово додають при розтиранні 10 см³ води. Подрібнену наважку переносять кількісно в мірну колбу місткістю 100 см³, доводять дистильованою водою до мітки, перемішують і фільтрують через паперовий складчастий фільтр. На аналіз відмірюють 1 см³ в мірну колбу місткістю 100 см³ і додають реактиви як зазначено вище. При визначенні загального вмісту фенольних речовин в темнозabarвлену сировину, наприклад в чорній смородині, приготований фільтрат необхідно розбавити в 5 разів, як червоне вино, при цьому розведення слід враховувати в розрахунку вмісту фенольних речовин.

Вміст фенольних речовин визначають за калібрувальним графіком. Для побудови калібрувального графіка відмірюють по 1, 2, 5, 10, 20 см³ стандартного розчину енотаніна в мірні колби на 100 см³, що відповідає 0,3; 0,6; 1,5; 3,0; 6,0; мг/дм³ таніну. У кожену колбу додають 1 см³ реактиву Фолина-Чокальтеу, 10 см³ 20% розчину соди, вміст колб доводять до мітки, перемішують. Через 30 хв витримки визначають оптичну щільність розчинів, при тих же параметрах. Використовуючи отримані результати, будують калібрувальну криву, відкладаючи на осі абсцис вміст таніну в досліджуваних зразках, а на осі ординат – значення оптичної щільності.

У відсутності енотаніна калібрувальний графік, з певною похибкою, що вноситься використанням приладом, може бути побудована за такими даними:

вісь абсцис – 0,3; 0,6; 1,5; 3,0; 6,0; мг/дм³ таніну;

вісь ординат – 0,024; 0,046; 0,108; 0,214; 0,424; – значення оптичної щільності.

Для розрахунку вмісту фенольних речовин необхідно концентрацію таніну, знайдену за калібрувальним графіком, помножити на коефіцієнт розведення: для червоних вин і темнозabarвлених соків - 500, а для білих вин і світлозabarвлених соків - 100. Для плодово-ягідної сировини коефіцієнт розведення 10 в перерахунку на 1 г сировини і 1000 в перерахунку на 100 г сировини.

Приклад: Для дослідження використовували 10 г обліпихи. Оптична щільність досліджуваного зразка склала 0,045 од, що відповідає за калібрувальним графіком 0,6 мг/дм³ таніну. При врахуванні розведення це складає: $0,6 \cdot 10 = 6$ мг/г або 600 мг/100 г вихідної сировини.

7.2. Дослідження водо- та жиророзчинних вітамінів

Мета:

1) Засвоїти, що для прояву активності багатьох ферментів необхідний небілковий компонент - кофактор. Багато коферменти є похідними вітамінів (біотин, ТПФ, НАД, ФАД, КОА і т.д.)

2) Вміти писати формули вітамінів В1, В2, В6, РР, А, Д, Е, фолієва кислота, знати джерела і добові дози водорозчинні і жиророзчинних вітамінів, знати до складу яких коферментів і в якій формі входять вітаміни групи «В»; ознаки гіпо-, і авітамінозу водорозчинних і жиророзчинних вітамінів.

3) Вміти проводити якісні реакції і виявляти в харчових продуктах вітаміни В₁, В₂, В₆, РР, А, Д, Е.

7.2.1. Якісна реакція на вітамін В₁ (тіамін)

Принцип методу: в лужному середовищі окиснюється тіамін в тіохром ферриціаніда калію. Тіохром володіє синьою флюорісценцією при ультрафіолетовому опроміненні розчину на флюороскоп.

Діазореакція:

Принцип методу: в лужному середовищі тіамін з діазореактивом утворює складну комплексну сполуку оранжевого кольору.

Хід роботи: до діазореактиву, що складається з 5 крапель 1% розчину сульфанілової кислоти і 5 крапель 5% розчину нітриту натрію, додають 5 крапель 5% розчину тіаміну і потім по стінці, нахиливши пробірку, обережно додають 5...7 крапель 10% розчину бікарбонату натрію. На межі двох рідин з'являється кільце оранжевого кольору.

7.2.2. Якісна реакція на вітамін В₂ (рибофлавін)

Принцип методу: Окислена форма вітаміну В₂ є жовта флюоресцируюча в ультрафіолетових променях речовина. Реакція на вітамін В₂ заснована на здатності його легко відновлюватися; при цьому розчин вітаміну В₂, що володіє жовтим забарвленням, набуває спочатку рожевий колір проміжних сполук, а потім знебарвлюється, тому що відновлена форма вітаміну В₂ безбарвна.

Хід роботи: У пробірку наливають 10 крапель розчину вітаміну В₂, додають 5 крапель концентрованої хлоридної кислоти і опускають зернятку металевого цинку. Починається виділення бульбашок водню, рідина поступово рожевіє, потім знебарвлюється.

7.2.3. Якісна реакція на вітамін РР (нікотинова кислота)

Принцип методу: вітамін РР при нагріванні з розчином купрум ацетату утворює синій осад мідної солі нікотинової кислоти, погано розчинної.

Хід роботи: У пробірку набирають 5...7 крапель 3% розчину вітаміну РР, потім доливають 7...10 крапель 5% розчину купрум ацетату. Витримують 2...3 хв. (не перемішуючи), спостерігають випадання осаду мідної солі нікотинової кислоти.

7.2.4. Якісна реакція на вітамін В₆

Принцип методу: Вітамін В₆ при взаємодії з розчином ферум хлориду утворює комплексну сіль типу фенолята феруму червоного кольору.

Хід роботи: На скло нанести скляною паличкою 1 краплю 1% розчину вітаміну В₆ і 1 краплю 1% розчину ферум хлориду і перемішують. Розвивається червоне забарвлення.

7.2.5. Якісна реакція на вітамін А

Принцип методу: Сульфатна кислота, що володіє водовіднімаючою властивістю, сприяє перетворенню вітаміну А в забарвлений комплекс фіолетово-червоного кольору. Реакція специфічністю не володіє.

Хід роботи: На сухе предметне скло наносять 2 краплі рибиного жиру в хлороформі і 1 краплю концентрованої сульфатної кислоти. Спостерігають за появою забарвлення.

7.2.6. Якісна реакція на вітамін Д

Принцип методу: вітамін Д при взаємодії з аніліновим реактивом при нагріванні забарвлюється в червоний колір.

Хід роботи: у суху пробірку вносять 3...5 крапель рибиного жиру і 5 крапель хлороформу (або розчин вітаміну в маслі), перемішують і додають 1 мл суміші аніліну і концентрованої хлоридної кислоти (15:1). При нагріванні жовта емульсія набуває червоне забарвлення. Через 1...2 хв емульсія розділяється на два шари, нижній з яких пофарбований в інтенсивний червоний колір.

7.2.7. Якісна реакція на вітамін Е

Принцип методу: спиртовий розчин α -токоферолу окиснюється ферум (III) хлоридом в токоферілхінон і розчин забарвлюється в червоний колір.

Хід роботи: у суху пробірку беруть 4...5 крапель 0,1% спиртового розчину α -токоферолу, додають 0,5 мл 1% розчину ферум (III) хлориду, ретельно перемішують. Вміст пробірки набуває червоне забарвлення.

7.2.8. Кількісне визначення вітаміну С

Біологічна роль аскорбінової кислоти в організмі різноманітна. Вона бере участь в окисно - відновних процесах і зв'язана з системою глутатіона. Аскорбінова кислота бере участь в синтезі стероїдних гормонів в корі надниркових залоз і катехоламінів в мозковій речовині надниркових залоз і необхідна для процесу гідроксилування як кофактор для прояву дії ферментів гідроксилази, наприклад дофамінгідроксилаза та ін. Вона бере участь в утворенні тетрагідрофолієвої кислоти з фолієвої кислоти, в гідроксилуванні лізину в оксілізин, проліну в оксипролін, необхідних для утворення колагенових волокон; прискорює всмоктування заліза, активізує фермент шлункового соку пепсиноген, що особливо важливо при нестачі хлоридної кислоти в шлунковому соку.

Хід роботи: відважують 1 г продукту, розтирають у ступці зі скляним порошком, додають 2 мл 10% розчину хлоридної кислоти, доливають 8 мл води і фільтрують. Відмірюють для титрування 2 мл фільтрату, додають 10 крапель 10% розчину хлоридної кислоти і титрують 2,6 – діхлорфеноліндофенол до рожевого забарвлення, що зберігається протягом 30 с в двох повторностях. Обчислюють середній вміст аскорбінової кислоти в 100 г продукту за формулою (7.1):

$$X = \frac{0.0088 \times A \times \Gamma \times 100}{B \times V} \quad (7.1)$$

де:

X - вміст аскорбінової кислоти в мг на 100 г продукту;

0,0088 - вміст аскорбінової кислоти, мг;

A - результат титрування 0,0001N розчином 2,6 – дихлорфеноліндофенола, мл;

B – об'єм екстракту, взятий для титрування, мл;

V - кількість продукту, узяті для аналізу, г;

Γ - загальна кількість екстракту, мл;

100 - перерахунок на 100 г продукту.

У 100 г капусти міститься аскорбінової кислоти 25-60 мг, в 100 г шипшини 500-1500 мг, а в хвої 200-400 мг.

Висновок: порівняти кількість аскорбінової кислоти в досліджених продуктах.

Контрольні запитання

1. Вкажіть назву основного хімічного реактиву, за допомогою якого визначають загальний вмісту фенольних речовин у вині, соку, фруктах і плодах

2. Написати хімічні формули вітамінів писати формули вітамінів B₁, B₂,

В₆, РР.

3. Написати хімічні формули вітамінів писати формули вітамінів А, Д, Е, фолієва кислота.

4. Вкажіть до складу яких коферментів і в якій формі входять вітаміни групи «В»

5. Вкажіть ознаки гіпо-, і авітамінозу водорозчинних і жиророзчинних вітамінів.

Лабораторна робота №8.

«Визначення харчових волокон»

Мета: ознайомитися з методами визначення загальної кількості харчових волокон.

План

8.1. Визначення сирової клітковини

8.2. Визначення пектинових речовин

Під терміном «харчові волокна» розуміють хімічні сполуки, що входять до складу харчових продуктів рослинного походження, які не здатні розщеплюватися в травному тракті людини під дією його тканинних ферментів. За хімічною природою харчові волокна являють собою складні вуглеводи: целюлозу (клітковина), гемицеллюлозу, пектинові речовини. До харчових волокон відноситься також лігнін, хоча не є вуглеводом, завжди супроводжує клітковину в досить помітних кількостях, хімічно зв'язаний з нею і практично не відділимо. У кислотних і інших середовищах гідролізується. Лігнін не є індивідуальною хімічною сполукою. Лігніном називають групу опорних речовин фенольної природи, що складаються з полімерізаторів дегідрованих спиртів. Сумарну кількість харчових волокон можна визначити за кількістю окремих компонентів, що входять до проби, - клітковини, гемицеллюлози, лігніну, пектинових речовин.

8.1. Визначення сирової клітковини

Для визначення сумарних компонентів (клітковина, гемицеллюлоза, лігнін) найбільш придатний метод «сирий» клітковини по Геннесбергу і Штоману. До складу «сирий» клітковини входять інкрустуючі речовини (лігнін, кутин, суберин), частково гемицеллюлоза, пентозани, гексозани і інші речовини. «Сиру» клітковину отримують в результаті послідовної обробки наважки кислотою і лугом в точно визначених умовах, в деякій мірі імітують дію середовища травного тракту організму. Під дією кислоти з проби віддаляються прості і складні цукор, деякі азотисті сполуки. Луг обмилюють жири, розчиняє білки і частину інкрустуючих речовин.

Техніка виконання. Беруть наважку 3 г на аналітичних вагах і поміщають в хімічний стакан ємністю 300 мл, додають 200 мл 1,25% розчину сульфатної кислоти і кип'ятять на сітці протягом 30 хв (час фіксується з моменту закипання). Для підтримки даної концентрації кислоти в склянку

регулярно доливають гарячу дистильовану воду до мітки (200мл). Воду підливають сильним струменем з промивалки, так щоб вона змивала частки, що пристали до стінок склянки. Після закінчення часу стакан знімають з нагрівального приладу, дають осісти осадку, охолоджують при кімнатній температурі. Потім рідину відсмоктують на воронці Бюхнера, після цього осад кілька разів промивають гарячою дистильованою водою до нейтральної реакції (проба на універсальний або червоний лакмусовий папір).

Після промивання осад знову переносять з фільтра в той же хімічний стакан і додають 200 мл 1,25% розчину NaOH і кип'ятять 30 хв, регулярно додаючи воду по аналогії з сульфатною кислотою. Потім рідину відсмоктують на воронці Бюхнера, осад промивають гарячою дистильованою водою до нейтральної реакції (проба на універсальний або червоний лакмусовий папір). Тільки після цього осад переносять на висушений і заздалегідь зважений на аналітичних вагах фільтр.

Фільтр повинен бути висушений в сушильній шафі при температурі 100-150°C протягом 3-4 год. Осад на фільтрі промивають сумішшю спирту і ефіру (1:1) для видалення жиру.

Осад вважається промитим тоді, коли краплі фільтрату, що випливають, стануть безбарвними. Потім осад разом з фільтром сушать в сушильній шафі при температурі 100-150°C протягом 3-5 год. Осад після висушування охолоджують в ексікаторі і зважують на аналітичних вагах.

За різницею ваг осаду з фільтром і самого фільтра знаходять вагу «сирий» клітковини, і по формулі (8.1) обчислюють процентний вміст «сирий» клітковини в пробі (y),%:

$$y = \frac{100 \times b}{a} \quad (8.1)$$

де b- вага «сирий» клітковини, г;
а - наважка проби, г.

8. 2. Визначення пектинових речовин

Пектинові речовини є кальцієвими і магнієвими солями полімерів частково метоксильованої галактуронової кислоти. Пектини можуть перебувати в розчинній і нерозчинній формах. Нерозчинна форма називається протопектином. При дії розбавлених кислот протопектин гідролізується до розчинного пектину.

Для визначення пектину найчастіше користуються ваговим кальцієво-пектиновим методом. Метод заснований на гідролізі пектинових речовин до полігалактуронової (пектинової) кислоти, її осадженні в формі кальцієвої солі, висушуванні і зважуванні. Нерозчинні кальцієві і магнієві солі полігалактуронової кислоти попередньо переводять в розчин цитрату амонію або натрію.

Техніка виконання. На технічних терезах відважують наважку масою 3 г, розтирають у ступці до однорідного стану і переносять в колбу місткістю 100-150 мл. Заливають 50 мл розчину HCl (0,3 моль/дм³) і нагрівають зі

зворотним холодильником протягом 30 хв на киплячій водяній бані. Потім гідролізат фільтрують через складчастий фільтр в мірну колбу місткістю 250 мл.

Осад з фільтром повертають в колбу, заливають 50 мл 1% розчину лимоннокислого амонію і знову поміщають на 30 хв на киплячу водяну баню. По закінченню часу гідролізат фільтрують в ту ж мерну колбу, що і в перший раз. Гідролізати в обох випадках фільтруються після водяної бані без попереднього охолодження.

Далі фільтрат нейтралізують 10% розчином NaOH (в середньому 5 мл) і вміст колби доводять до мітки дистильованою водою. Пектинові речовини, включаючи протопектину, знаходяться в формі пектинової кислоти. Потім з мірної колби беруть 50 мл фільтрату, додають 50 мл 0,4% розчину NaOH і залишають на ніч при кімнатній температурі для омилення метоксильних груп.

На наступний день розчин нейтралізують 50 мл оцтової кислоти (1 моль/дм³) і додають 50 мл CaCl₂ (2 мл/дм³). Для повноти реакції CaCl₂ з пектиноювою кислотою розчин відразу кип'ятять 5 хв або залишають на 1 год. Після кип'ятіння осад пектату кальцію фільтрують через висушений до постійної маси беззольний фільтр. Осад на фільтрі промивають киплячою водою до зникнення позитивної реакції на хлор. Потім осад пектату кальцію разом з фільтром переносять в бюкс і при температурі 100°C доводять до постійної маси.

Виходячи з маси пектату кальцію, розраховують вміст пектину X_b (в%) за формулою (8.2):

$$X_b = \frac{0,9235 \times 100 \times M_0 \times V_1}{M \times V_2} \quad (8.2)$$

де M_0 - маса осаду пектату кальцію, г;

M - маса наважки, г;

0,9235 - коефіцієнт, що враховує масу кальцію в молекулі пектату;

V_1 - загальний об'єм гідролізату, мл;

V_2 - об'єм гідролізату, взятого для омилення метоксильних груп, мл.

Реєстровані показники:

Маса наважки (а), г

Маса «сирий» клітковини (b), г

Кількість «сирий» клітковини в пробі (у),%

Маса осаду пектату кальцію (M_0), г

Маса наважки (M), г

Об'єм гідролізату (V_1), мл

Об'єм гідролізату, взятого для омилення метоксильних груп (V_2), мл

Кількість пектину (X_b),%

Контрольні запитання

1. Які хімічні сполуки харчових продуктів розуміють під терміном «харчові волокна»?

2. Які сполуки являють собою харчові волокна за хімічною природою?

3. Вкажіть – чи здатні харчові волокна розщеплюватися в травному тракті людини під дією його тканинних ферментів?
4. Вкажіть чи гідролізується лігнін у кислотних та інших середовищах?
5. Назвіть метод, який найбільш придатний для визначення сумарних компонентів харчових волокон (клітковина, геміцелюлоза, лігнін).

Лабораторна робота № 9

«Визначення харчових консервантів. Визначення антибіотиків у молоці. Аналіз кольору пива»

Мета: ознайомитися з методиками: визначення харчових консервантів (якісного і кількісного аналізу вмісту сорбінової і бензойної кислот в харчових продуктах) та визначення антибіотиків у молоці й кольору пива колориметричним методом

План роботи

- 9.1. Визначення харчових консервантів
- 9.2. Визначення антибіотиків у молоці
- 9.3. Визначення кольору пива колориметричним методом

9.1. Визначення харчових консервантів

У харчовій промисловості широко використовуються харчові добавки. Це природні або синтезовані речовини, навмисно вводяться в харчові продукти для додання їм певних властивостей.

Серед речовин, які спеціально додаються для консервування, особливе значення мають хімічні сполуки, що отримали назву консервантів. Вони запобігають мікробного псування продуктів. Механізм дії консервантів на збудників різноманітний, можна виділити з них:

- консерванти, що пригнічують певну фазу проростання спор мікроорганізмів;
- консерванти, що знижують активність води в субстраті, пригнічуючи тим самим ріст і розвиток мікроорганізмів.

Кількість речовин, що консервують регламентується стандартами, так як їх поведінка в організмі неоднозначно. Їх використання дозволяється тільки тоді, коли вони технологічно необхідні і не становлять ризику для здоров'я і використовуються в інтересах споживача.

Існує кілька варіантів участі їх в обміні речовин:

- 1) нерозчинні речовини, які, як правило, проходять незмінними через кишковник;
- 2) речовини, які всмоктуються з шлунково-кишкового тракту, але хімічному перетворенню не піддавалося. Вони не дають токсичних метаболітів і виводяться з організму через нирки;
- 3) речовини, які всмоктуються з шлунково-кишкового тракту, але після біохімічного розкладання виводяться з організму. На першому етапі вони окиснюються, на другому - набувають гідрофільність (зв'язуючись з

глюкуроною, сульфатною, фосфатною кислотами або іншим шляхом), тобто здатність до виведення з організму. Для даних речовин, метаболізуючих таким чином, характерні досить швидкі біохімічні перетворення і відсутність накопичення метаболітів в організмі. Наприклад, бензойна кислота, яка в організмі людини утворює з гліцином гіпурову кислоту і виводиться через нирки.

Бензойна кислота (C_6H_5COOH) і її натрієва сіль (C_6H_5COONa) використовуються в концентраціях до 0,1% для консервування різних харчових продуктів. Незважаючи на низький консервуючий ефект, бензоат натрію застосовують частіше, ніж кислоту, через кращу розчинність його у воді. Ефективність консерванту підвищується в кислому середовищі (рН менше 5).

Активність проти дріжджів вище, ніж проти цвілі. Бензойна кислота впливає на ферментативну систему мікроорганізмів, а також діє на клітинні мембрани. Бензойна кислота хороший консервант для кислої фруктово-овочевої продукції. Бензойна кислота і її солі застосовуються для консервування плодово-ягідних пюре, соків, використовується в кондитерському виробництві, плодово-ягідного повидла, фруктових соків, ікри рибної, рибних пресервів в кількості не більше 1000 мг/кг, а так само мармеладу, пастили, меланжу, призначеного для виробництва печива в кількості не більш 700 мг/кг;

4) сполуки, які всмоктуються і метаболізуються подібно речовин третьої групи, але їх виведення або виведення їх метаболітів відбувається повільно. Наприклад, борна і саліцилова кислоти;

5) сполуки, які після всмоктування використовуються організмом так само, як звичайні поживні речовини. Вони піддаються біохімічному розкладанню, подібно білкам, жирам, вуглеводам. Наприклад, пропіонова і сорбінова кислоти.

Сорбінова кислота застосовується з метою консервування і запобігання пліснявіння безалкогольних напоїв, плодово-ягідних соків, хлібобулочних кондитерських виробів (мармелад, джем, варення, креми), а також зернистої ікри і запобігання пліснявіння сирів, напівкопчених ковбас і при виробництві згущеного молока для запобігання його потемніння (ця кислота повністю гальмує розвиток шоколадно-коричневої плісняви в згущеному молоці).

Сорбінова кислота застосовується також для обробки пакувальних матеріалів для харчових продуктів. Сорбінова кислота не володіє будь-якими шкідливими своїми властивостями, вона пригнічує ріст більшості мікроорганізмів. Найбільшу антимікробну і антигрибкову активність сорбінова кислота проявляє в кислому середовищі. При високих значеннях рН (більше 5,5) вона діє краще, ніж бензойна, а при рН 5 сорбінова кислота діє в 2-5 разів сильніше, ніж бензойна. За своєю структурою сорбінова кислота є простою сполукою, близькою до ненасичених жирних кислот. Сорбінова кислота не утворюється в тваринному організмі, але цикл її перетворень в організмі повністю відповідає перетворенням ненасичених жирних кислот, зокрема капронової. Завдяки цьому сорбінова кислота повністю утилізується

організмом до вуглекислого газу і води, і може служити джерелом енергії. У той же час вона не робить антиметаболічної дії на життєво важливі жирні кислоти в організмі. Сорбінова кислота має сприятливу біологічну дію на організм, так як вона здатна підвищувати імунологічну реактивність і детоксикаційну здатність організму.

Якісне визначення бензойної та сорбінової кислот методом тонкошарової хроматографії

Метод заснований на виділенні бензойної кислоти (БК) і сорбінової кислоти (СК) з харчових продуктів перегонкою з паром або екстракцією органічним розчинником з наступним хроматографічним розділенням їх в тонкому шарі сорбенту, елюації і вимірі оптичної щільності отриманих елюатів.

Виділення бензойної та сорбінової кислот

Техніка виконання. Пробу продукту (крім напоїв) масою близько 10 г зважують з точністю до 0,01 г, подрібнюють і гомогенізують з добавкою 25 г Na_2SO_4 і 40 мл 1М H_2SO_4 . Гомогенат переносять в колбу ємністю 1 л, з'єднану з пароутворювачем (рис.9.1), і нагрівають. У момент, коли рідина в колбі починає закипати, закривають пароутворювач пробкою і відганяють БК і СК з паром, збираючи близько 80 см³ дистилату в приймач, що містить 10 мл 1М NaOH . Дистилат переносять в ділільну воронку, насичують Na_2SO_4 (на 10 мл дистилату додають 6 г Na_2SO_4), підкисляють 1М H_2SO_4 до pH 2,0÷3,0 і екстрагують етилацетатом тричі по 10 мл. Об'єднаний екстракт сушать, додаючи 2 г прожареного безводного Na_2SO_4 . Цей екстракт позначають Vi. Екстракт випарюють на ротаційному випарнику (допускається упаривание в порцеляновій чашці на піщаній бані) до обсягу 1 мл.

При аналізі напоїв виключають стадію відгону, 10 мл напою розбавляють вдвічі 0,5М H_2SO_4 , додаючи 10 г Na_2SO_4 , інтенсивно перемішують і екстрагують БК і СК 3 рази по 5 мл етилацетату.

Об'єднаний екстракт (Vi) сушать 1 г безводного прожареного Na_2SO_4 . Екстракт випарюють на ротаційному випарнику або в порцеляновій чашці до кінцевого об'єму 1 мл.

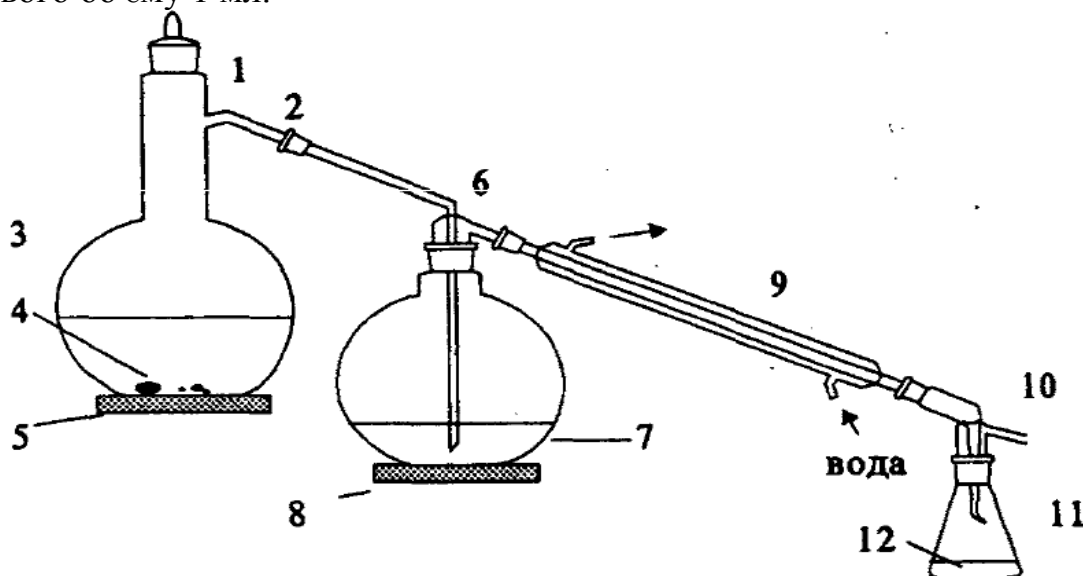


Рис. 9.1. Прилад для перегонки з парою

1-пробка пароутворювача; 2 - насадка пароутворювача; 3 - пароутворювач з дистильованою водою; 4 - кипелки; 5 - нагрівач пароутворювача; 6 - насадка; 7 - гомогенат продукту; 8 - нагрівач; 9 - холодильник; 10 - алонж; 11 - приймальня колба; 12 - розчин лугу.

Ідентифікація кислот

Техніка виконання. Готують суміш розчинників: петролейний ефір-хлороформ-діетиловий ефір-мурашина кислота, щодо обсягів 20,0:8,0:2,8:1,2 і заливають в камеру для тонкошарової хроматографії. Платівку «Силуфол Уф 254» розмічають м'яким простим олівцем і в точки 1 і 4, вносять по 2 і 4 мкл розчину 3, при цьому кількість БК в плямах становить 4 і 8 мкг, а СК - 0,4 і 0,8 мкг відповідно. В точки 2 і 3 вносять 3 і 10 мкл екстракту. Нанесення проб проводять мікрошприцем або каліброваним капіляром з постійним поддувом повітрям за допомогою, наприклад, фена. Діаметр плями на старті не повинен перевищувати 2-3 мм.

Платівку опускають в камеру і хроматографують до 15 см від лінії старту. Потім пластинку виймають, підсушують і розглядають в УФ-світлі з хвилею 254 нм. Наявність темних плям в екстракті по R_f відповідним стандартам свідчить про присутність цих консервантів в продукті. Плями в екстракті порівнюють з плямами стандартів візуально і орієнтовно оцінюють вміст бензойної та сорбінової кислот в пробі. Темні плями в екстракті і стандартах обводять олівцем в УФ-світлі.

Бензойна кислота. Висушену платівку розрізають між точками 3 і 4. Одну частину обприскують розчином ферум хлориду, а потім – гідроген пероксиду і нагрівають 2 хв при 80-100°C в сушильній шафі. Поява буро-фіолетово забарвлених плям на хроматограмі екстракту, за кольором і R_f відповідних плям в стандарті БК, підтверджує наявність БК в пробі.

Сорбінова кислота. Другу частину пластинки обприскують розчином $K_2Cr_2O_4$ в H_2SO_4 , підсушують, обприскують розчином 2-тіобарбітурової кислоти і нагрівають 5 хв при 100°C в сушильній шафі. Поява малиново забарвлених плям на хроматограмі екстракту, за кольором і R_f відповідних плям в стандарті СК підтверджує її наявність в пробі.

Кількісне визначення бензойної кислоти

Суть методу визначення бензойної кислоти і бензоату натрію зводиться до приготування водної витяжки з досліджуваного продукту, осадження з неї білкових речовин, екстракції бензойної кислоти з водної витяжки хлороформом з подальшим титруванням.

Техніка виконання. Для проведення аналізу готують водну витяжку в мірній колбі на 250 мл з наважки продукту масою 20-50 г (якщо продукт твердий його подрібнюють). Додають по краплях 10% розчин NaOH до лужного середовища (проба по лакмусовому паперу). Для осадження білкових речовин додають 5-10 мл $K_4(Fe(CN)_6)$ і 5-10 мл $ZnSO_4$. Вміст колби доводять до мітки дистильованою водою, енергійно перемішують і через 5 хв фільтрують. Потім 100 мл фільтрату поміщають в ділильну воронку,

нейтралізують 10% розчином НС1 до нейтральної реакції, після чого додають ще 5 мл НС1. Бензойну кислоту екстрагують 4 рази хлороформом по 40-50 мл; тривалість кожної екстракції 15-20 хв. Збовтування проводять круговими обертовими рухами через кожні 5 хв.

Після кожної екстракції хлороформенні витяжки збирають в одну колбу і потім відганяють 3/4 об'єму хлороформу на водяній бані при 65°C, після чого залишок витяжки переносять в форфорову чашку і випарюють насухо при температурі 40-50°C.

При попаданні в витяжку водного шару, необхідно хлороформенний шар промити дистильованою водою 2 рази по 5 мл. Залишок бензойної кислоти в чашці розчиняють в 30-50 мл спирту (нейтралізованого за фенолфталеїном), додають 10 мл дистильованої води, 2-3 краплі фенолфталеїну і титрують 0,05 моль/дм³ розчином NaOH.

1 мл розчину NaOH відповідає 0,0061 г бензойної кислоти або 0,0071 г бензоату натрію.

Масова частка бензойної кислоти X (в%) (9.1):

$$X = \frac{100 \times V \times C \times M \times V_1}{1000 \times V_2 \times m} \quad (9.1)$$

де: V - об'єм NaOH, витрачений на титрування, мл;

C - молярна концентрація розчину NaOH, моль/дм³;

M - молекулярна маса бензойної кислоти, г/моль;

V₁ - загальний об'єм приготованого розчину, мл;

V₂ - об'єм фільтрату, взятий для екстракції хлороформом, мл;

m - маса наважки продукту, г.

Реєстровані показники:

Підтвердження наявності БК і СК.

Об'єм NaOH, витрачений на титрування (V), мл

Молярна концентрація розчину NaOH (C), моль/дм³

Молекулярна маса бензойної кислоти (M), г/моль

Загальний об'єм приготованого розчину (V₁), мл

Об'єм фільтрату, взятий для екстракції хлороформом (V₂), мл

Маса наважки продукту (m), г

Масова частка бензойної кислоти (X), %

9.2. Визначення антибіотиків в молоці

Антибіотики в молоці є чужорідними речовинами, можуть потрапити в нього при безпосередньому лікуванні вимені або опосередковано, через корми або при лікуванні самої тварини. Методи виявлення антибіотиків в молоці засновані на відновленні резазуріна або метиленового блакитного при розвитку в молоці чутливих до антибіотиків мікроорганізмів виду *Streptococcus thermophilus*.

Метод дозволяє виявити пеніцилін більш 0,01 МО/мл, стрептоміцин більше 30 мкг/мл, тетрациклін - від 1 МО/мл, олендоміцин - від 10 МО/мл.

Визначення антибіотиків

Техніка виконання. У чисту пробірку наливають 10 мл досліджуваного молока, закривають гумовою пробкою і нагрівають на водяній бані до $85 \div 90^{\circ}\text{C}$ з витримкою 10 хв, потім охолоджують до $42 \div 45^{\circ}\text{C}$. Після цього в пробірку вносять стерильною піпеткою 0,3 мл робочої тест-культури.

Вміст пробірки ретельно перемішують шляхом 3-кратного перевертання, після чого пробірку витримують у водяній бані при температурі $42 \div 43^{\circ}\text{C}$ протягом 1 год. 40 хв-2 год. 20 хв. Потім в пробірку вносять 1 мл 0,05% розчину резазуріна з температурою не нижче $18 \div 20^{\circ}\text{C}$ і ретельно перемішують, перевертаючи пробірку.

Пробірку з молоком і резазуріном витримують при $42 \div 43^{\circ}\text{C}$ протягом 15 хв. У разі використання метиленового блакитного його вносять одночасно з робочою тест-культурою в кількості 0,1 мл 0,5% розчину.

Примітка: розчини резазуріна і метиленового блакитного готуються на дистильованій кип'яченій воді.

Читання результатів

При відсутності в молоці антибіотиків, ферменти, що виділяються термофільним стрептококом, відновлюють барвник, і молоко буде мати білий або рожевий колір.

При наявності антибіотиків, вони інгібують розвиток тест-культури, в результаті чого вона не виробляє ферменти, і барвник не відновлюється, при цьому молоко забарвлене в їх колір: у випадку з резазуріном - синьо-сталеий, синьо-фіолетовий, у випадку з метиленовим блакитним - блакитний.

Блакитне кільце, що утворюється в пробірці на поверхні молока висотою 1 см, не враховують.

Реєстровані показники: Забарвлення досліджуваних проб.

Вивчення та практичне освоєння прямих і непрямих методів визначення антибіотиків у молоці.

Антибіотики (пеніцилін, тетрациклін, стрептоміцин та ін.) потрапляють в молоко при лікуванні маститу у корів. Вони порушують молочнокисле бродіння. Для встановлення наявності антибіотиків і миючих або дезінфікуючих засобів в молоці використовують прямі і непрямі методи.

Метод прямого мікроскопування

Метод заснований на придушенні розмноження бактерій і зміні їх форми під дією антибіотиків.

У пробірку відбирають 10 мл досліджуваного молока, закривають корковою пробкою і поміщають у водяну баню при $80-85^{\circ}\text{C}$ на 5 хв. Потім швидко охолоджують до 4°C .

До контрольної пробірку відбирають 10 мл молока, яке свідомо не містить антибіотиків. В обидві пробірки додають по 3-4 краплі свіжої культури - чутливого до антибіотиків термофільного стрептокока, вирощеного на гідролізованому або знежиреному молоці. Ретельно струснувши закриті пробками пробірки поміщають у водяну баню при 40°C на 90 хв. Потім проводять мікроскопію пофарбованих препаратів з

іммерсійним об'єктивом. На присутність антибіотиків вказує різке зменшення кількості клітин в випробуваному молоці, в порівнянні з контролем, наявність потовщених форм клітин і їх скупчення.

Метод відновлення індикаторів

а) Використання метиленового синього.

У пробірку з досліджуванним і контрольованим молоком вносять по 1 мл розчину метиленового синього (див. пробу на редуктазу) і потім 3-4 краплі свіжої культури чутливого до антибіотиків термофільного стрептокока.

Струснувши, пробірки ставлять у водяну баню при 38-40°C на 5,5 год. Стежать за зміною кольору в досліджуваному зразку в порівнянні з контролем, який повинен відновлюватися. Наявність синього кольору в досліджуваному молоці вказує на присутність антибіотиків.

б) Використання резазуріна.

У пробірки з досліджуванним і контрольним молоком вносять по 1 мл розчину резазуріна (див. пробу з резазуріном); 3-4 краплі чутливого до антибіотиків термофільного стрептокока, перемішують і ставлять у водяну баню на 45 хв. Відзначають зміна кольору досліджуваного зразка в порівнянні з контролем. Фіолетово-рожевий або синьо-сталекий колір молока вказує на присутність антибіотиків

9.3. Визначення кольору пива колориметричним методом

Метод заснований на вимірюванні оптичної щільності шару пива певної товщини і обчисленні показника поглинання, який характеризує колір пива. Методика виконання вимірювання забезпечує отримання достовірних даних при визначенні кольору пива в діапазоні 0,1-4,0 см³ розчину йоду концентрацією 0,1 моль/дм³ на 100 см³ води.

Хімічні реактиви, посуд, обладнання.

- Мірні колби об'ємом 100 і 500 см³ ;
- Хімічні стакани місткістю 200 - 250 см³ ;
- Піпетки об'ємом 25 і 50 см³
- Фотоелектроколориметр з набором кювет;
- Фільтрувальний папір;
- Лійки діаметром 8-10 см;
- Вода дистильована.

Порядок виконання роботи

Підготовка проби пива. Близько 200 см³ пива з температурою (20 ± 2) °C наливають в мірну колбу об'ємом 500 см³ і струшують, закривши колбу, періодично відкриваючи її до тих пір поки не припиниться відчуття тиску зсередини. Непрозоре пиво фільтрують через паперовий фільтр.

Темне пиво розбавляють водою так, щоб значення оптичної густини було не більше 0,7. Для цього 50 см³ прозорого пива вносять піпеткою в мірну колбу об'ємом 100 см³ і доводять об'єм розчину дистильованою водою до мітки. Якщо таке розбавлення недостатнє беруть 25 см³ пива.

Мийка кювет. Кювети миють водою і обполіскують дистильованою

водою. Допускається застосування суміші розчину соляної кислоти і етилового спирту у співвідношенні 1:1. Не допускається застосування розчинів лугів, концентрованих кислот і механічне чищення за допомогою абразивних засобів.

Проведення вимірювання Пиво, підготовлене до випробування, наливають у вимірювальну кювету з номінальною товщиною поглинаючого шару 10 мм, попередньо ополоснувши її пивом не менше двох разів. Оптичну густину вимірюють при $\lambda_{\text{max}}=(440\pm 10)$ нм відносно до дистильованої води. Після вимірювання кювету миють, як зазначено вище.

Обробка результатів експерименту

Показник поглинання при довжині хвилі 440 нм (K_{440}) в м^{-1} обчислюють за формулою (9.2):

$$K_{440} = \frac{D_{440} \times V_2}{L \times V_1} \quad (9.2)$$

де D_{440} - оптична густина при довжині хвилі 440 нм,

L - дійсна товщина шару рідини в кюветі (довжина оптичного шляху), м,

V_1 – об'єм пива, взятого для розбавлення, см^3 ,

V_2 - об'єм пива після розбавлення водою, см^3 .

Обчислення проводять до першого десяткового знака. За результат випробування приймають середнє арифметичне результатів двох паралельних визначень, розбіжність між якими не повинна перевищувати 3%, і записують цілим числом. Колір пива визначають переведенням величини показника поглинання в см^3 розчину йоду концентрацією 0,1 моль/дм³ на 100 см^3 води по таблиці 9.1.

Таблиця 9.1.

Показники поглинання йоду

К	Колір, см^3 розчину йоду концентрацією-0,1 моль/дм ³ на 100 см^3 води	К	Колір, см^3 розчину йоду концентрацією-0,1 моль/дм ³ на 100 см^3 води	К	Колір, см^3 розчину йоду концентрацією-0,1 моль/дм ³ на 100 см^3 води
1	2	3	4	5	6
10	0,17	41	1,04	71	2,10
11	0,20	42	1,07	72	2,14
12	0,22	43	1,10	73	2,18
13	0,25	44	1,13	74	2,22
14	0,27	45	1,17	75	2,26
15	0,30	46	1,20	76	2,30
16	0,32	47	1,23	77	2,34
17	0,35	48	1,27	78	2,38
18	0,37	49	1,30	79	2,42
19	0,40	50	1,33	80	2,46
20	0,43	51	1,37	81	2,51
21	0,45	52	1,40	82	2,55

1	2	3	4	5	6
22	0,48	53	1,44	83	2,53
23	0,51	54	1,47	84	2,63
24	0,53	55	1,51	85	2,67
25	0,56	56	1,54	86	2,72
26	0,59	57	1,58	87	2,76
27	0,62	58	1,61	88	2,80
28	0,65	59	1,65	89	2,85
29	0,68	60	1,69	90	2,89
30	0,70	61	1,72	91	2,93
31	0,73	62	1,76	92	2,98
32	0,76	63	1,80	93	3,02
33	0,79	64	1,83	94	3,07
34	0,82	65	1,87	95	3,11
35	0,85	66	1,91	96	3,16
36	0,88	67	1,95	97	3,20
37	0,91	68	1,99	98	3,25
38	0,94	69	2,02	99	3,29
39	0,98	70	2,06	100	3,34
40	1,01				

Результати оформіть у вигляді таблиці 9.2.

Таблиця 2

Результати визначення кольору пива

Показник	Оптична густина	Показник поглинання	см ³ розчину йоду	Норма кольорності по ДСТУ 3888-99
Колір пива				0,4 – 1,8

Контрольні запитання

1. Наведіть класифікацію консервантів за механізмом дії на збудників псування харчової продукції
2. Наведіть хімічну формулу бензойної кислоти та її натрієвої солі. Вкажіть масову частку цих речовин, яка використовуються для консервування.
3. Вкажіть механізм дії бензойної кислоти та її натрієвої солі, а також харчову продукцію, для консервування якої використовуються ці сполуки.
4. Вкажіть мету використання сорбінової кислоти для харчової продукції
5. Назвіть фізико-хімічний метод, який використовується для якісного визначення бензойної та сорбінової кислот.

Лабораторна робота № 10

«Визначення якісного складу природних та синтетичних підсолоджувачів»

Мета: ознайомитись з видами харчових підсолоджувачів, умовами їх застосування, методами визначення якісного складу природних і синтетичних підсолоджувачів, спектрофото-метричним методом визначення вмісту аспартаму в безалкогольних виробах

План роботи

10.1. Теоретична частина. Класифікація та характеристика харчових підсолоджувачів

10.2. Практична частина. Методи якісного визначення харчових підсолоджувачів

10.1. Теоретична частина. Класифікація та характеристика харчових підсолоджувачів

Характеристика підсолоджувачів. Відповідно до Санітарних правил і норм по застосуванню харчових добавок, **підсолоджувачі** – це група харчових добавок, які використовуються з метою надання солодкого смаку продуктам харчування. Підсолоджувачі використовуються у виробництві дієтичних харчових продуктів спеціального призначення самостійно або у комбінації з іншими підсолоджувачами чи цукром. Використовуючи комбінацію підсолоджувачів, необхідно враховувати їх якісний та кількісний синергізм.

Останнім часом з врахуванням розширення виробництва низькокалорійних продуктів, а також продуктів для людей, які страждають різними захворюваннями (цукровий діабет, ожиріння), збільшився випуск замінників цукру як природного походження (нативних і модифікованих), так і штучних. Застосування підсолоджувачів з метою економії цукру неприпустимо з гігієнічних позицій, оскільки суперечить принципам раціонального харчування.

Підсолоджувачі можуть бути використані у громадському харчуванні тільки для приготування дієтичних страв, при цьому у кожній порції вміст підсолоджувача не повинен перевищувати його разову дозу. Використання підсолоджувачів замість цукру у харчуванні дитячих організованих колективів неприпустимо. Продукти дитячого харчування не повинні містити підсолоджувачі.

Класифікація підсолоджувачів

Підсолоджувачі класифікують за такими ознаками:

- **походження** – натуральні і синтетичні;
- **ступінь солодкості** – висока, середня, низька;
- **енергетична цінність** – висока, низька;
- **засвоєння організмом людини** – повне, часткове і відсутнє.

До **натуральних підсолоджувачів** відносять: цукри, багатоатомні спирти (сорбіт, ксиліт, манніт, мальтіт), стевіозид, монеліт, ізомальт, лактіт, тауматін, гліцирізін, дигідрофалкони. Вони можуть служити цукрозамінниками.

До **синтетичних підсолоджувачів** відносять: сахарин, аспартам, цикламат, ацесульфам калію та ін.

Сорбіт (Е420) відноситься до групи солодких шестиатомних спиртів – поліолів. Солодкість сорбіту складає 0,6 від солодкості сахарози. Він повільніше всмоктується у порівнянні з глюкозою і фруктозою. 1 г сорбіту

дає 3,4 ккал енергії. В організмі сорбіт спочатку окиснюється до фруктози. При тривалому вживанні сорбіту виявлено прийнятність і безпечність його у харчуванні хворих цукровим діабетом. Сорбіт використовується в дієтичних плодоовочевих консервах, кондитерських виробах і безалкогольних напоях. Вміст сорбіту у харчових продуктах не нормується, а його додавання в харчові продукти проводиться згідно із затвердженими інструкціями.

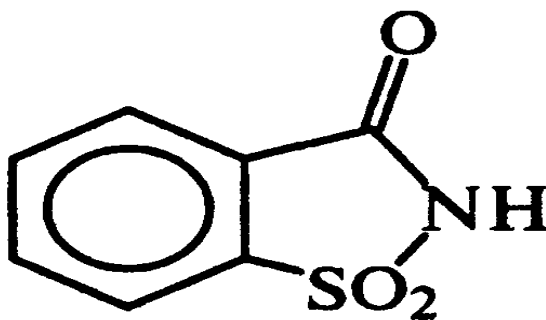
Ксиліт (E967) – солодкий п'яти атомний спирт, кристалічна речовина білого кольору. Енергетична цінність ксиліту прирівнюється до енергетичної цінності глюкози: 1 г ксиліту дає близько 4 ккал енергії. Він швидко засвоюється і не впливає на процентний вміст цукру у крові. Ксиліт не впливає на обмінні процеси і не володіє токсичністю, а також будь-якими іншими негативними властивостями. Він використовується для заміни цукру при виробництві кондитерських виробів для хворих цукровим діабетом і ожирінням. Вміст ксиліту в харчових продуктах не нормується, а його додавання у харчові продукти проводиться згідно із затвердженими рецептурами. Застосовують ксиліт в дієтичних плодоовочевих консервах, кондитерських виробах, безалкогольних газованих напоях.

Основними «інтенсивними» підсолоджувачами є сахарин, аспартам, цикламат, тауматин та ін. У таблиці 10.1 наведені коефіцієнти солодкості в порівнянні з цукром.

Таблиця 10.1

Коефіцієнти солодкості	
Підсолоджувачі	Коефіцієнт солодкості
Цукор	1
Аспартам	200
Цикламат	30-35
Сахарин	300-550
Тауматін	2000-3000
Сукралоза	600
Ацесульфам калію	150-200

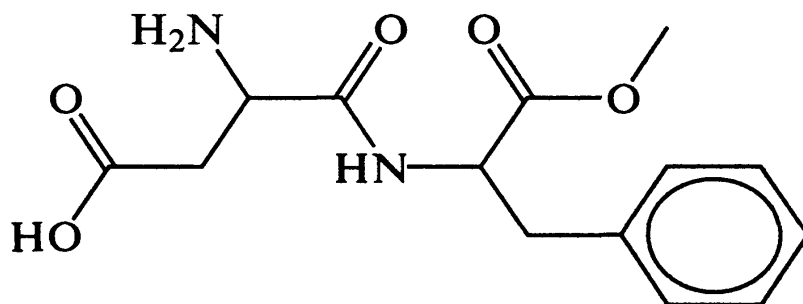
Сахарин (E954) відноситься до групи синтетичних солодких речовин. Він є о-сульфамідом бензойної кислоти.



Сахарин в 300-550 раз солодший від сахарози і зазвичай використовується у вигляді натрієвої солі, солодкість якої в 500 раз більша від солодкості сахарози, тому дозування сахарину може бути дуже низьким.

Сахарину властивий «металічний» присмак. При змішуванні сахарину з цикламатом «металічний» присмак зникає. Сахарин швидко всмоктується і виводиться у незмінному вигляді. Сахарин використовується при виробництві харчових продуктів для хворих цукровим діабетом, дієтичних сирів, напоїв, жувальної гумки. Сахарин стабільний при заморожуванні і нагріванні, зберігає солодкість у рідких і кислотних продуктах (*наприклад*, лимонад). Технологічні характеристики і широка область застосування роблять його придатними для всіх видів переробки і консервування.

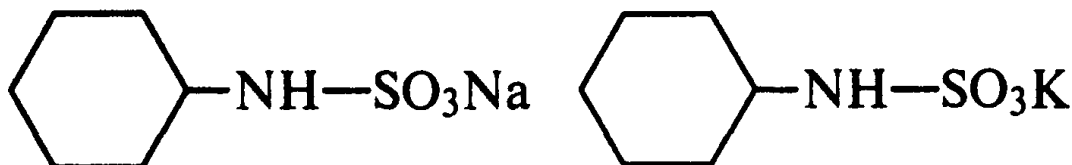
Аспартам (E951) – підсолоджувач, який в 200 раз солодший від цукру. Аспартам є дипептидом і складається із двох амінокислот – аспарагінової кислоти і фенілаланіну.



Встановлена для аспартаму величина допустимої добової дози складає 40 мг/кг маси тіла. В процесі виробництва харчових продуктів аспартам частково перетворюється у дикетопиперазин. Трансформація аспартаму залежить від рН середовища, температури, вмісту вологи. Враховуючи, що аспартам містить залишок амінокислоти фенілаланіну, він протипоказаний хворим на фенілкетонурію (фенілкетонурія – рідкісний (1:15 000) генетичний дефект, який вимагає спеціальної дієти). У зв'язку з цим продукти, у які вноситься аспартам, на етикетці повинні містити спеціальну інформацію.

Використовується для підсолоджування харчових продуктів (кремів, морозива), які не потребують теплової обробки, напоїв, соків, а також продуктів лікувально-профілактичного призначення. Входить до складу жувальної гумки. У продуктах, при отриманні яких сировина піддається тепловій обробці, а готовий продукт – тривалому зберіганню, його застосування недоцільне через зниження солодкості.

Цикламат натрію і цикламат калію (E952) – сполуки з приємним солодким смаком, без присмаку гіркоти.



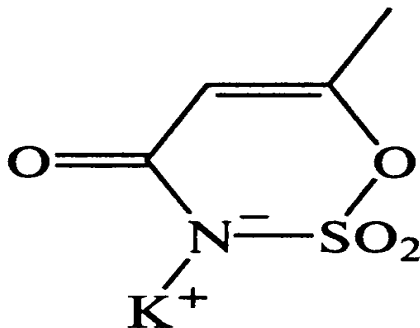
Цикламат стабільні при варінні, випіканні і добре розчинні у воді. Солодкість цикламатів у 30 разів вища, ніж сахарози. Комітет експертів ФАО/ВОЗ по харчових добавках встановив допустиму добову дозу

кальцієвої і натрієвої солей цикламату на рівні 0-11 мг/кг маси тіла, через це вони використовуються в суміші з іншими підсолоджувачами, в яких вони проявляють ефект синергізму. Цикламат покращує смак класичного підсолоджувала сахарину і використовується у співвідношенні «сахарин : цикламат» – 1:110.

У ряді країн цикламат використовують в кондитерській промисловості і при виробництві напоїв. Відповідно до Санітарних правил і норм по застосуванню харчових добавок цикламатин одержали абсолютного статусу дозволеності через недостатній обсяг інформації про особливості їх біологічної дії, сферу застосування або допустимі рівні. Остаточне вирішення питання про доцільність їх застосування у кожному конкретному випадку є прерогативою Міністерства охорони здоров'я України.

Тауматин (E957)– натуральна протеїнова сполука (містить 207 залишків амінокислот), яка володіє аромат підсилюючим ефектом. Його солодкість в 2000-3000 раз більша солодкості сахарози. Тауматин отримують екстрагуванням водою західноафриканського фрукту катемфе (*thaumatococcus daniellii*). Солодкий смак тауматину відчувається з невеликою затримкою, але залишається надовго. Стійкий до заморожування, сушіння і кислотного середовища. Добова доза необмежена.

Ацесульфам калію (E950) – відноситься до оксатиацинондиоксидів. Інша назва сунет. Термічно і хімічно стійка сполука. Солодкість ацесульфаму калію приблизно в 200 раз більша від солодкості сахарози.



Ацесульфам калію нетоксичний, неканцерогенний, не виявлено його мутагенну дію. Не засвоюється організмом людини, виводиться в незмінному вигляді. Допустима добова доза – 15 мг/кг маси тіла людини. Застосовується при виробництві кондитерських виробів, безалкогольних напоїв, дієтичних хлібобулочних виробів, морозива.

Суміші підсолоджувачів

В останні роки більшу увагу приділяють комплексним підсолоджувачам, які є сумішшю різних підсолоджувачів. При складанні сумішей враховують її солодкість, можливість покращення смаку, збільшення відчуття солодкості, синергічний ефект, технологічні характеристики, кількість заміни цукру (повна або часткова), ціну суміші. У таблиці 10.2 наведені можливі варіанти поєднання підсолоджувачів).

Таблиця 10.2

Деякі варіанти поєднання підсолоджувачів

№ п/п	Склад водних розчинів, які мають солодкість 10%-ного розчину цукру, г/л					
	ацесульфам К	аспартам	сукралоза	сахарин	цикламат	цукор
1	2	3	4	5	6	7
1	-	-	-	-	-	100
2	-	-	-	-	3,33	-
3	-	-	-	0,25	-	-
4	-	-	0,15	-	-	-
5	-	0,50	-	-	-	-
6	0,50	-	-	-	-	-
7	0,16	0,16	-	-	-	-
8	0,12	0,23	-	-	-	-
9	0,18	-	-	-	0,72	-
10	0,12	0,12	-	-	0,40	-
11	0,20	-	-	-	-	50
12	0,07	0,07	-	-	-	50
13	0,13	0,13	-	-	-	20
14	0,08	0,08	-	0,05	-	30
15	0,07	0,07	0,05	0,05	-	40
16	0,20	-	0,07	-	-	-
17	0,7	0,07	0,07	-	-	-
18	-	-	0,05	0,03	0,34	-
19	-	-	0,07	0,15	-	-
20	-	-	0,08	-	0,39	-

Кількість таких варіантів постійно збільшується, при цьому виробники стараються надати конкретні рекомендації щодо застосування для окремих видів харчових продуктів.

10.2. Практична частина. Методи якісного визначення харчових підсолоджувачів

Природні підсолоджуючі сполуки

Дослід 1. Якісне визначення наявності глюкози

Прилади, обладнання, матеріали: пальник, пробірки, 5 % розчин меду, 2 Н розчин NaOH, 0,2 Н розчин CuSO₄, 0,5 % розчин глюкози, 0,2 Н розчин AgNO₃, 2 Н розчин NH₄OH.

Методика виконання роботи

А. Для встановлення наявності глюкози у чисту пробірку поміщають 0,5 мл розчину натурального підсолоджувача (меду) і 6-8 крапель 2 Н NaOH. Потім по краплях додають 0,2 Н розчин CuSO₄, поки не припиниться його розчинення. Обережно нагрівають пробірку на пальнику.

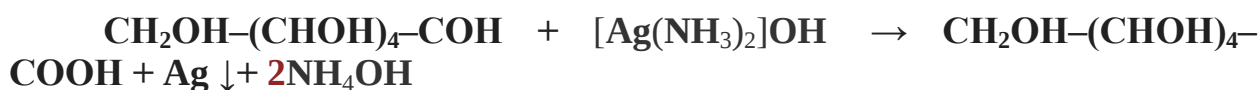
Спостереження:

Б. У велику пробірку поміщують 3 краплі 0,2 Н розчину AgNO_3 , 5 крапель 2 Н розчину NaOH і додають по краплях 2 Н розчин NH_4OH до повного розчинення утвореного осаду AgOH . Одержаний розчин – амоніачний розчин аргентум оксиду.



Потім до амоніачного розчину аргентум оксиду додають 3-4 краплі розчину меду і злегка підігрівають на пальнику.

Спостереження:



Аналогічний дослід проводять з 0,5 % розчином глюкози.

Дослід 2. Якісне визначення наявності фруктози

Прилади, обладнання, матеріали: пальник, пробірки, 5 % розчин меду, 0,5 % розчин глюкози, 0,5 % розчин фруктози, свіжоприготовлений розчин Селіванова (0,05 % розчин резорцину в 20 % хлоридній кислоті).

Методика виконання роботи

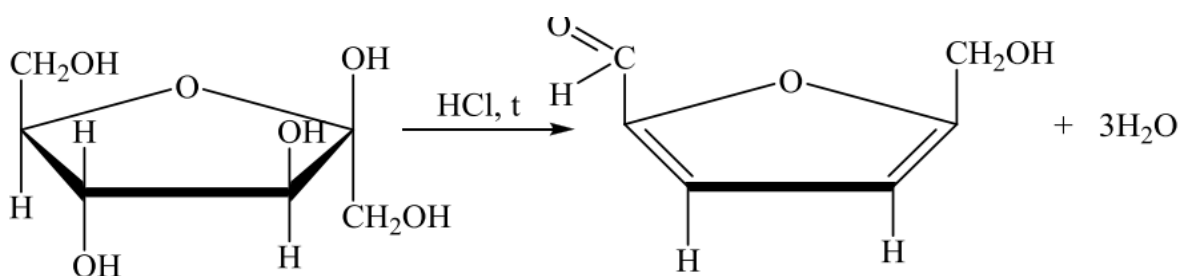
1. Приготувати розчини меду, глюкози і фруктози.

2. Провести реакції з розчином Селіванова.

3. Зробити висновок про якісне визначення фруктози.

В першу пробірку вносять 10 крапель 5 % розчину меду, в другу – 0,5 % розчину фруктози, в третю – 0,5 % розчину глюкози. У всі пробірки додають у рівних об'ємах свіжоприготовлений розчин Селіванова. Обережно нагрівають на пальнику.

Спостереження:



Синтетичні підсолоджувачі

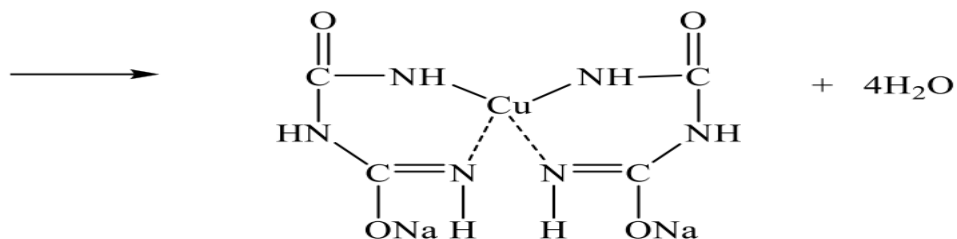
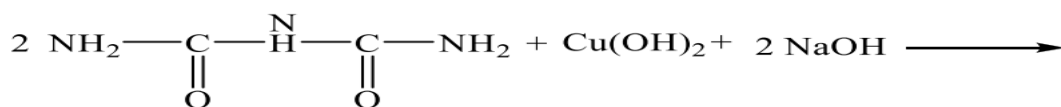
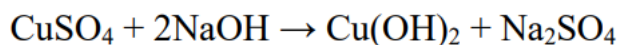
Дослід 3. Дослідження якісного складу аспартаму

Прилади, обладнання, матеріали: водяна баня, пальник, пробірки, 10 % розчин NaOH , 1% розчин CuSO_4 , 0,2 % розчин нінгідрину, концентрована нітратна кислота, 0,5 % розчин аспартаму.

Методика виконання роботи

А. До 1 мл розчину аспартаму додають 1 мл 10 % розчину NaOH і 2 краплі 1% розчину CuSO_4 .

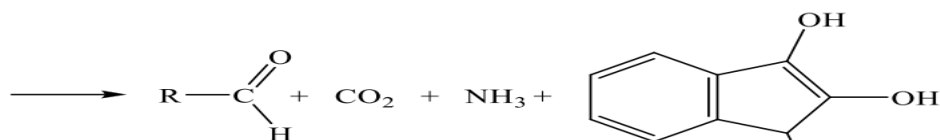
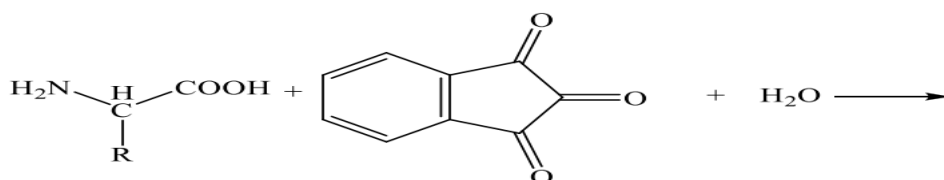
Спостереження:



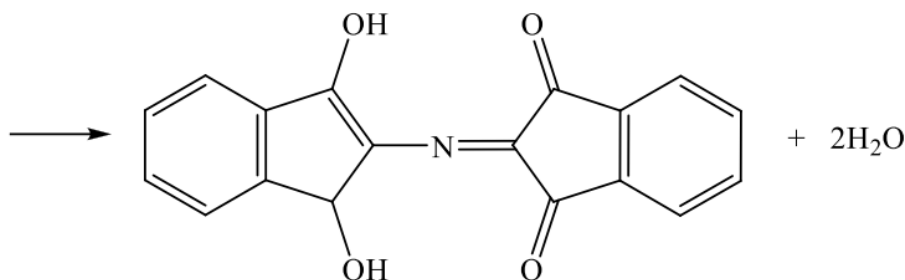
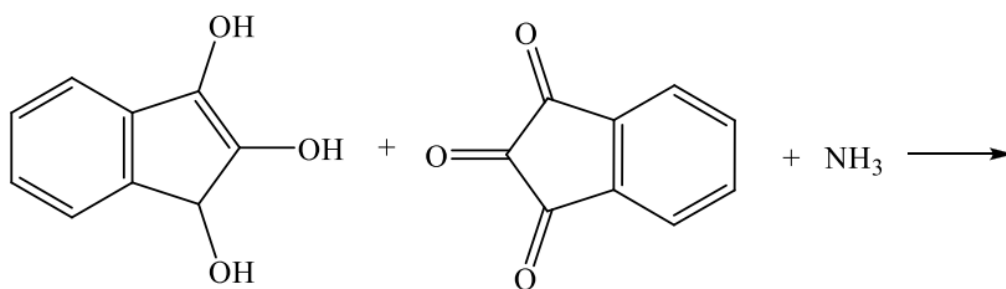
хелатний комплекс біурету з Cu^{2+}

Б. До 5-10 крапель розчину аспартаму додають 6-10 крапель 0,2% розчину нінгідрину. Нагрівають до кипіння на водяній бані.

Спостереження:



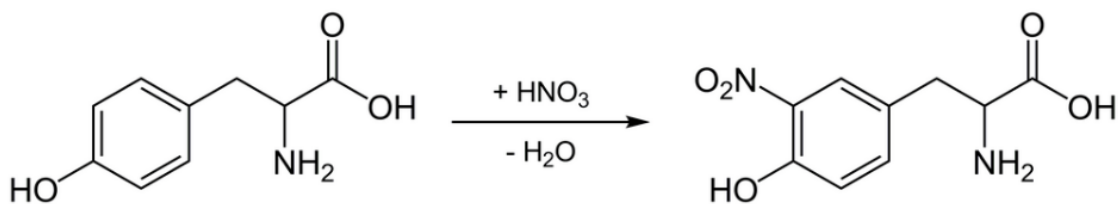
відновлений нінгідрин



комплексна сполука

В. До 0,5 мл розчину аспартаму додають 5-6 крапель концентрованої нітратної кислоти. Обережно нагрівають.

Спостереження:



Дослід 4. Визначення вмісту аспартаму в безалкогольних виробах

Прилади, обладнання, матеріали: фотометр КФК-3, баня водяна, аспартам, фруктоза, нінгідрин, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 спирт етиловий, папір фільтрувальний, колби мірні об'ємом 100, 500, 1000 мл, пробірки, піпетки об'ємом 2 і 10 мл.

Методика виконання роботи

1. Приготувати розчини.
2. Побудувати градувальний графік.
3. Зробити висновок про вміст аспартаму в напоях.

Приготування розчинів

Приготування буферного розчину

Наважку $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ масою 28,870 г переносять в мірну колбу об'ємом 1000 мл, розчиняють дистильованою водою, доводять до мітки і перемішують до повного розчинення. Наважку KH_2PO_4 масою 4,353 г переносять у мірну колбу об'ємом 500 мл, розчиняють в дистильованій воді, доводять до мітки і перемішують до повного розчинення. В кінчній колбі змішують 484,5 мл розчину Na_2HPO_4 і 15,5 мл розчину KH_2PO_4 . При необхідності доводять рН буферної суміші даними розчинами до $(8,0 \pm 0,1)$.

Приготування нінгідринового розчину

Розчиняють у 500 мл буферного розчину 1,5 г фруктози, після чого розчиняють 2,5 г нінгідрину.

Приготування базового розчину аспартаму

20 мг аспартаму розчиняють при перемішуванні і нагріванні до 40°C в 50-70 мл дистильованої води. Розчин кількісно переливають в мірну колбу об'ємом 100 мл і доводять вміст до мітки дистильованою водою.

Приготування ряду робочих розчинів аспартаму для побудови градувального графіку

У пробірках об'ємом по 10 мл кожна готують робочі розчини аспартаму, об'єм і концентрація яких вказані у таблиці 10.3.

Таблиця 10.3

Об'єм і концентрація розчинів аспартаму

Назва показника	Номер пробірки								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Об'єм базового розчину аспартаму, мл	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	-

Об'єм дистильованої води, мл	8,0	7,5	7,0	6,5	6,0	5,5	5,0	4,5	10,0
Концентрація аспартamu в робочих розчинах, мг/мл	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	-

Побудова градувального графіку

Для побудови градувального графіку в окремі пробірки переносять по 6 мл кожного робочого розчину і додають до них 3 мл нінгідринового розчину. Пробірки витримують 16 хв в киплячій бані, потім за 20 хв охолоджують до $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, після чого з кожної пробірки в окрему пробірку переносять по 3 мл розчину, до якого додають по 5 мл етилового спирту об'ємною часткою 60 %.

Оптичні густини розчинів визначають на фотометрі КФК-3 в кюветі товщиною 10 мм при довжині хвилі 582 нм. Контрольним розчином служить вміст пробірки № 9 (нульового розчину) і етилового розчину об'ємною часткою 60 %, змішаних у таких же кількостях, як інші проби.

Опрацювання результатів

В досліджуваних зразках напою видаляють вуглекислий газ при температурі не вище 20°C . Фільтрують через фільтр розміром пор не більше 0,5 мкм. 20 мл профільтрованої проби переносять в мірну колбу об'ємом 100 мл і доводять дистильованою водою до мітки.

В пробірки об'ємом 10 мл переносять по 6 мл кожного розбавленого зразка і до них додають по 3 мл нінгідринового розчину. Пробірки витримують 16 хв в киплячій бані, потім протягом 20 хв охолоджують до 20°C , після чого із кожної пробірки в окрему пробірку переносять по 3 мл розчину, до якого потім додають по 5 мл розчину етилового спирту об'ємною часткою 60 %.

Оптичні густини досліджуваних зразків визначають в порівнянні з нульовою пробою в кюветі товщиною 10 мм на фотометрі КФК-3 при довжині хвилі 582 нм.

Концентрацію аспартamu у розведених зразках досліджуваного напою визначають за оптичними густинами зразків, інтерпольованими по градувальному графіку.

Концентрацію аспартamu c , мг/100 мл, в напої визначають за формулою (10.1):

$$c = c_p \cdot K, \quad (10.1)$$

де c_p – концентрація аспартamu в розбавлених зразках, мг/100 мл;

K – ступінь розведення, рівна 5.



Рис. 10.1 Кока кола

Висновок:

Контрольні запитання

1. Дайте визначення поняттю «підсолоджувачі»
2. Вкажіть мету використання підсолоджувачів
3. В яких харчових виробах використовуються підсолоджувачі?
4. Вкажіть ознаки, за якими класифікують підсолоджувачі
5. Які сполуки відносять до натуральних підсолоджувачів?
6. Які сполуки відносять до синтетичних підсолоджувачів?

ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 11

«Дослідження харчових барвників: екстрагування з харчових продуктів, розділення та ідентифікація»

Мета роботи: ознайомитись з видами харчових барвників, їх застосуванням, способами екстрагування барвних речовин з рослинної сировини, методами визначення вмісту барвних речовин в натуральних барвниках.

План роботи

11.1. Теоретична частина. Значення забарвлення. Класифікація та характеристика харчових барвників

11. 2. Практична частина. Способи екстрагування барвних речовин з рослинної сировини

11.3. Методи визначення вмісту барвних речовин в натуральних барвниках

11.1. Теоретична частина. Значення забарвлення. Класифікація та характеристика харчових барвників

Значення забарвлення

Колір – важлива характеристика якості харчових продуктів, що не лише забезпечує їх зовнішню привабливість, але й має позитивний вплив на смакове сприйняття їжі, апетит і травлення загалом. При виробництві багатьох харчових продуктів (кондитерських, лікero-горілчаних виробів,

безалкогольних напоїв, харчових концентратів, киселів та ін.) виникає потреба у збереженні, корекції або відновленні кольору за допомогою натуральних чи синтетичних барвних компонентів.

Синтетичні барвники є складними органічними сполуками, не завжди нейтральними у функціональному відношенні, тому споживачі надають перевагу натуральним барвникам, які є природними компонентами їжі. Також натуральні барвники містять у своєму складі крім барвних пігментів інші корисні біологічно активні речовини: вітаміни, глікозиди, органічні кислоти, ароматичні речовини, мікроелементи. Тому їх використання для забарвлення продуктів дозволяє не лише покращити зовнішній вигляд, але й підвищити харчову цінність виробів. Індустріалізація харчового виробництва в значній мірі сприяла заміні натуральних барвників синтетичними.

Основними вимогами, яким повинні відповідати харчові барвники, є нетоксичність і безпечність їх для організму людини. Відповідно до Санітарних норм і правил по харчових добавках для підбарвлення продуктів харчування використовуються барвники, які містять в собі природні пігменти рослинного або тваринного походження – **природні барвники**, а також **синтетичні** або **штучні барвники**, які містять синтезовані хімічним шляхом пігменти, що не зустрічаються в природі. Для синтетичних барвників обов'язково, а для натуральних – вибірково, встановлюються максимально допустимі рівні. Синтетичні барвники можуть застосовуватись як поодиночі, так і в сумішах між собою. При цьому сумарна доза барвників в продукті не повинна перевищувати концентрацію того барвника, який має меншу межу. У якості барвників застосовують натуральні, синтетичні і мінеральні речовини.

Натуральні харчові барвники

Натуральні харчові барвники – це суміш барвних і супутніх речовин, отриманих фізичними способами із рослинних і тваринних джерел. Іноді їх піддають хімічній модифікації для покращення технологічних і споживчих характеристик. Ряд барвників отримують не тільки виділенням із природної сировини, але й синтетично. **Наприклад**, β -каротин, виділений з моркви, за хімічною будовою відповідає β -каротину, отриманому мікробіологічним або хімічним шляхом, але при цьому натуральний β -каротин суттєво дорожчий і в харчовій промисловості використовується як барвник не часто.

Сировиною для натуральних харчових барвників можуть бути ягоди, квіти, листя, коренеплоди, у тому числі у вигляді відходів переробки рослинної сировини на консервних і виноробних заводах. Одним з небагатьох винятків є кармін, який виділяють із тіл самок комах кошенилі. Сучасні технології дозволяють отримати препарати натуральних харчових барвників із заданими властивостями і стандартним вмістом основної барвної речовини. Основний спосіб вилучення барвних речовин із природних об'єктів – екстрагування розчинником, очищення від супутніх сполук і стабілізація пігменту. У якості розчинника-екстрагента використовують етиловий спирт, воду, олію та ін.

До натуральних барвників не відносять висушені або концентровані форми пряно ароматичних рослин, які володіють комплексом ароматичних харчових властивостей і одночасно барвним ефектом, – паприку, подрібнений корінь куркуми, шафран. За хімічною природою барвні речовини природного походження поділяють на три групи: флавоноїди, каротиноїди, хлорофіли.

До **флавоноїдів** відносяться **флавори** і **флавоноли**, які мають **жовте** або **жовто-оранжеве забарвлення**, а також **антоціани**, які забезпечують **червоне** і **червоно-фіолетове забарвлення** багатьох фруктів та овочів. Найбільшого поширення у виробництві харчових продуктів набули антоціани, які характеризуються добрими світло-, термо- і кислотостійкістю. Характер забарвлення природних антоціанів залежить від багатьох факторів: будови, рН середовища, утворення комплексів з металами, здатності адсорбуватися на полісахаридах, температури, світла. Найстійкіше забарвлення антоціани мають в кислому середовищі при рН 1,5-2; при рН 3,4-5 забарвлення змінюється на червоно-пурпурове або пурпурове.

У лужному середовищі при рН 6,7-8 забарвлення стає синім, синьо-зеленим, а при рН 9 – зеленим, яке при підвищенні рН до 10 змінюється на жовте. Колір цих барвників міняються також при утворенні комплексів з різними металами: солі магнію і кальцію мають синє забарвлення, калію – червоно-пурпурове. Збільшення метильних груп в молекулі антоціанів змінює забарвлення в сторону червоних відтінків. Представниками цієї групи барвників є власне антоціани (**E163i**): енобарвник і екстракт із чорної смородини. Антоціани добре розчиняються у воді, що дозволяє використовувати їх при виробництві безалкогольних напоїв, морозива, молочних виробів.

Каротиноїди широко використовуються для забарвлення харчових продуктів у **жовтий** і **жовто-оранжевий колір**. Особливістю натуральних барвників цієї групи є те, що вони володіють А-вітамінною активністю, антиоксидантними властивостями. Найбільш важливим з цієї групи є **β-каротин (E160a)**, який широко використовується для забарвлення і вітамінізації маргарину, майонезу, кондитерських і хлібобулочних виробів, безалкогольних напоїв. Із пігментів цієї групи слід відмітити **лікопін (E160d)**, жовто-оранжевий барвник **екстракт аннато (E160b)**, водні екстракти із зовнішніх оболонок насіння *Vicia orsellana* L., який містить у якості основної барвної речовини пігмент **біксин** (метиловий ефір пігменту норбіксину) $C_{22}H_{30}O_4$, він дозволений для забарвлення маргарину, ароматизованих сирів, сухих сніданків. До цієї групи барвників відносяться **каротиноїди паприки (E160c)** – екстракти із червоного перцю *Capsicum annuum* L. Вони володіють характерним гострим смаком, мають колір від жовтого до оранжевого.

Хлорофіли – магнійзаміщені похідні порфірину – природні пігменти, які надають **зеленого забарвлення** багатьом рослинам, овочам і плодам (салат, зелена цибуля, кріп і т.д.). Застосування їх у якості барвника (**E140**) в харчовій промисловості обмежене через нестійкість: при підвищеній

температурі і кислому середовищі зелений колір переходить в оливковий, а потім у брудно-жовто-зелений внаслідок утворення феофітину. Тому більш практичне значення мають мідні комплекси хлорофілу (**E141**). Для забарвлення харчових продуктів використовують зелені пігменти, виділені з капусти, гички моркви, кропиви. Крім вказаних груп барвних речовин у природі зустрічаються бетанін, рибофлавін, кармін, рослинне вугілля. До натуральних відносять також цукровий (карамельний) колер.

Синтетичні харчові барвники

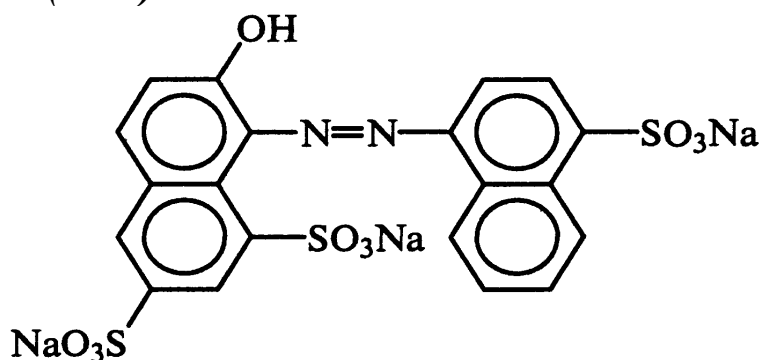
Синтетичні харчові барвники – це органічні сполуки, які не зустрічаються у природі, тобто штучні. Всі вони переважно використовуються у формі натрієвих солей. Оскільки вони добре розчиняються у воді, їх у продукти вносять у вигляді водних розчинів або розчинів рідких компонентів продукту. Синтетичні харчові барвники зазвичай дешевші, ніж натуральні, менш чутливі до умов технологічної переробки і зберігання, дають яскравіші і легше відтворювані кольори. З хімічної точки зору їх можна поділити на:

- **азобарвники** (тартазин – E102, жовтий «сонячний захід» - E110, азорубін, кармуазин – E122, понсо 4R – E124, діамантовий чорний PN – E151);
- **триарилметанові** (синій патентований V – E131, діамантовий синій FCF – E133, зелений S – E142, коричневий HT E155);
- **ксантанові** (еритрозин – E127);
- **хінолінові** (жовтий хіноліновий – E104);
- **індигоїдні** (індигокармін – E132).

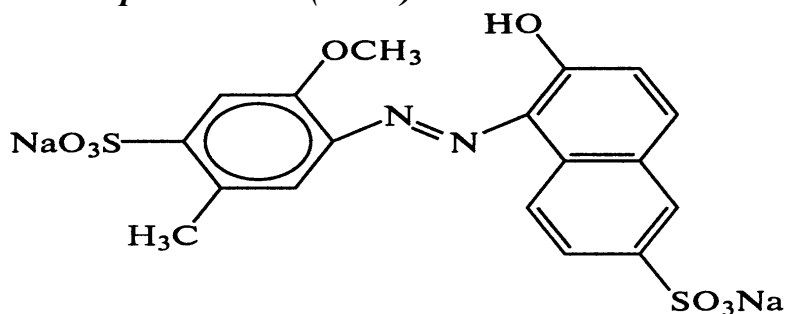
Різновиди синтетичних барвників

Жовті барвники

Тартазин (E102)

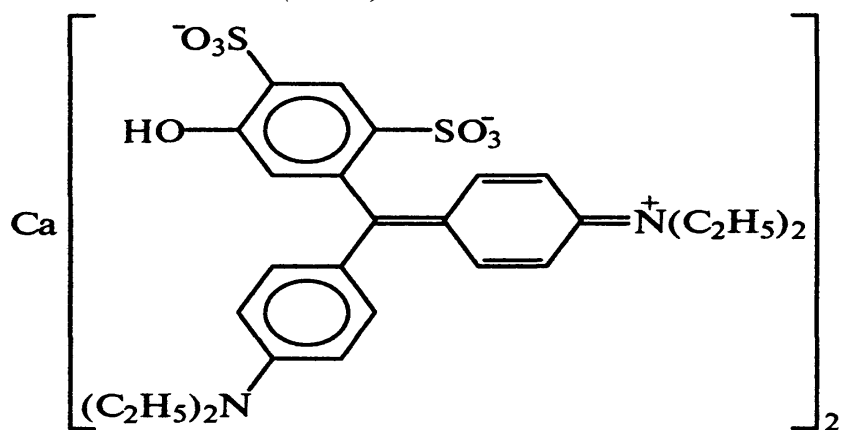


Спеціальний червоний AG (E129)

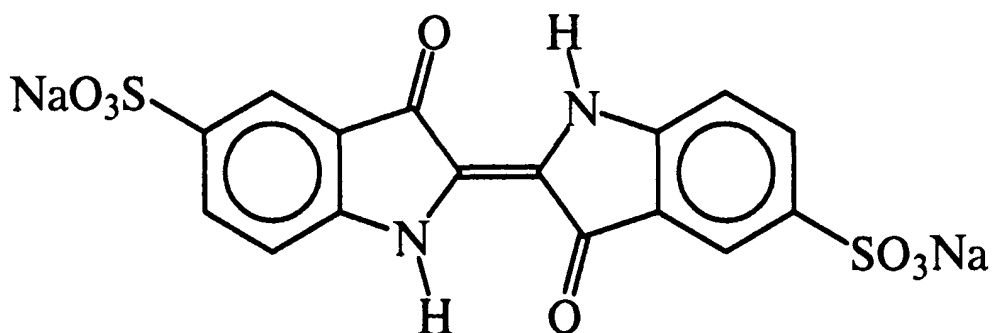


Сині барвники

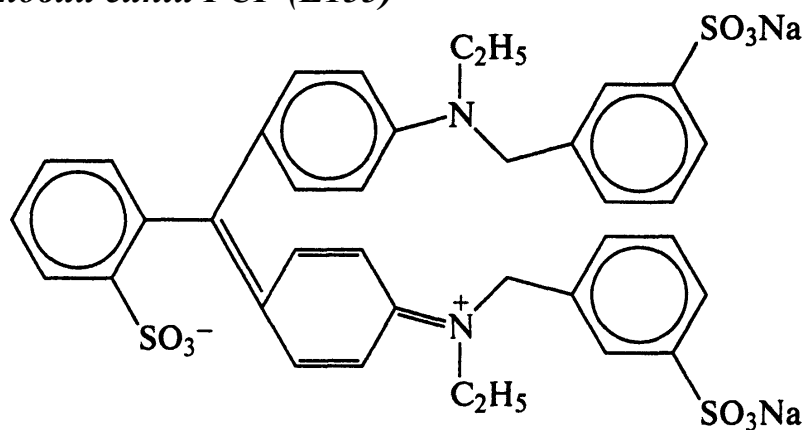
Синій патентований V (E131)



Індигокармін (E132)

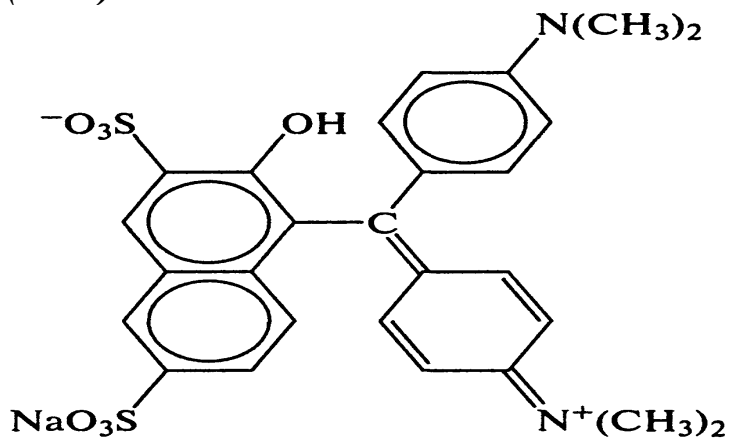


Діамантовий синій FCF (E133)

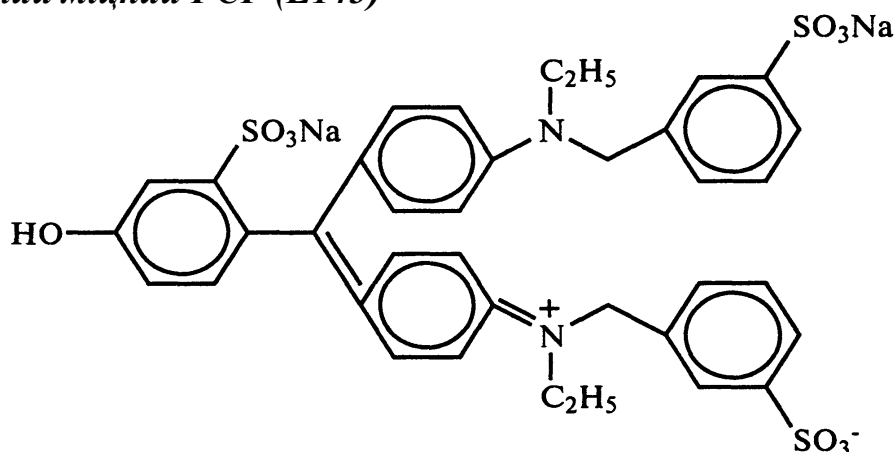


Зелені барвники

Зелений S (E142)

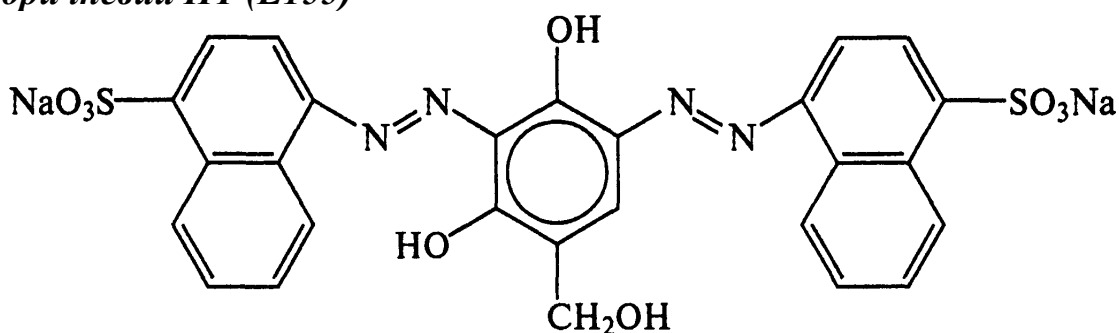


Зелений міцний FCF (E143)



Коричневі барвники

Коричневий HT (E155)



Мінеральні барвники. У якості харчових барвних речовин використовують деякі пігменти і метали, наприклад, ферум оксид (**E172**) надає чорного, червоного, і жовтого забарвлення, титан (IV) оксид (**E171**) і кальцій карбонат (**E170**) – білого. Із металів застосовується також золото (**E175**) і срібло (**E174**).

Гігієнічні вимоги до застосування харчових барвників

В правилах застосування окремих барвників обумовлюються вид продукту і максимально допустимі рівні їх використання, якщо вони встановлені. При використанні харчових барвників, передозування яких не становлять небезпеки для здоров'я людини, їх слід застосовувати відповідно з встановленою виробничою практикою і в кількості, яка не перевищує необхідну для досягнення поставленої мети, при цьому споживач не повинен вводитися в оману. Підфарбовування харчових продуктів може здійснюватися як окремими барвниками, так і комбінованими (змішаними), які складаються з двох і більше барвників.

Не допускається застосування барвників для маскування зміни кольору продукту, викликаного його псуванням, порушенням технологічних режимів або використанням недоброякісної сировини.

Згідно із Санітарними правилами і нормами щодо застосування харчових добавок, забарвленню (підбарвленню) не підлягають такі харчові продукти:

- необроблені продукти – це продукти, що не пройшли жодної обробки, котра могла б призвести до істотних змін в їх початковому стані;

- всі види мінеральної води;
- молоко, в тому числі знежирене, пастеризоване, стерилізоване, консервоване;
- вершки, кисломолочні продукти;
- природні олії та жири тваринного походження;
- яйця та яйцепродукти;
- борошно, крохмаль;
- хліб і хлібобулочні вироби;
- макаронні вироби;
- цукор, включаючи всі моно- та дисахариди;
- томат-паста, томатний соус, консерви з томатів;
- фруктовий сік, фруктовий нектар, овочевий сік;
- варення з фруктів, джеми;
- фрукти, овочі, включаючи картоплю, гриби консервовані та сушені;
- риба, молюски, ракоподібні, птиця, дичина;
- какао та шоколадні продукти;
- смажена кава, чай, цикорій; чайні та цикорієві екстракти та суміші для настойок;
- сіль та її замінники, спеції та суміші спецій;
- вина та зернові горілки;
- винний оцет;
- продукти дитячого харчування;
- мед;
- солод та солодові продукти;
- зрілі та недозрілі сири (неароматизовані);
- масло з молока вівці та кози.

Вибір і застосування харчових барвників

Вибір і дозування барвника (у межах безпечності) для харчового продукту обумовлений кольором, його інтенсивністю і фізико-хімічними властивостями самого продукту. Природні барвники, зазвичай, менш стійкі та чутливі до дії температури, кисню повітря, рН. Синтетичні барвники застосовуються індивідуально та в суміші один з одним. Вони можуть виготовлятися з наповнювачами (сіль, цукор) для спрощення дозування у випадку виготовлення невеликої партії. Склад деяких комбінованих барвників приведений у таблиці 11.1.

Таблиця 11.1

Склад і забарвлення, якого надають деякі суміші барвників

Колір водного розчину	Вміст сухого барвника в суміші, %							
	E102	E110	E122	E124	E131	E132	E133	E151
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Журавлиновий	-	-	32	68	-	-	-	-
Карміново-червоний	25	-	75	-	-	-	-	-
Персиковий	-	32	-	68	-	-	-	-

Світло-коричневий	70	-	26	-	-	-	4	-
Кавовий	40	12	20	-	-	28	-	7,8
Коричневий	31,4	12,6	-	43,8	4,4	-	-	7,8
Жовтий	92	-	-	8	-	-	-	-
Лимонний	99	-	-	-	-	-	-	-
Ясний	60	40	-	-	-	-	-	-
Зелений	85	-	-	-	-	-	15	-
Жовто-зелений	75	-	-	-	-	25	-	-
Трав'янисто-зелений	50	-	-	-	-	50	-	-
Морської хвилі	20	-	-	-	-	-	80	-
Оливковий	50	13,6	-	-	-	36,4	-	-
Фіолетовий	-	-	50	-	-	50	-	-
Виноградний	-	-	85	-	-	15	-	-
Бузковий	-	-	80	-	-	20	-	-

11. 2. Практична частина. Способи екстрагування барвних речовин з рослинної сировини

Дослід 1. Виділення антоціанів

Прилади, обладнання, матеріали: сировина, яка містить антоціани (смородина, вишня, малина та ін.), пробірки, лійки, ступка, пісок, паперовий фільтр.

Антоціани (грец. *ανθος* – *квітка*, *колір* і *κυανεος* – *синій*) – барвні речовини (пігменти) синього, червоного і фіолето-вого кольору, що містяться в багатьох рослинних клітинах. Антоціани здебільшого є глюкозидами; своєю будовою вони близькі до флавонів. Антоціани зумовлюють забарвлення квіток, плодів, стебел, листя. Їхньому нагромадженню в клітинах сприяють світло, низька температура, пошкодження тканин та ін. фактори. Колір антоціану залежить від рН.

Методика виконання роботи

2. Отримати антоціанові витяжки з різних видів сировини.

3. Зробити висновок щодо подібності отриманих витяжок.

Способи отримання антоціанової витяжки

4. **I.** Наважку сировини масою 0,5-1 г поміщають у пробірку.

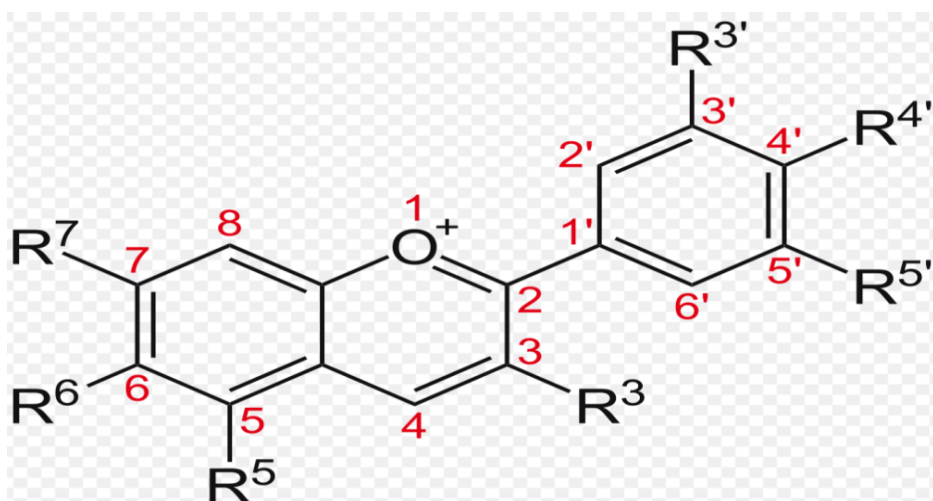
5. Заливають 5 мл води і доводять до кипіння над полум'ям пальника.

6. Нагрівання вище 70°C приводить до руйнування клітин. Антоціани вільно виходять із клітин, забарвлюючи воду в рожевий, синій або зеленуватий колір.

7. Отриманий екстракт відфільтровують у чисту пробірку через паперовий фільтр.

8. **II.** Наважку сировини поміщають у фарфорову ступку, розтирають з невеликою кількістю піску.

9. Після цього додають 5 мл дистильованої води добре перемішують і відфільтровують через паперовий фільтр.



Екстракти капусти червоноголової за різних значень рН: від низького до високого

Спостереження:

Таблиця 11.1

Колір екстракту різної сировини

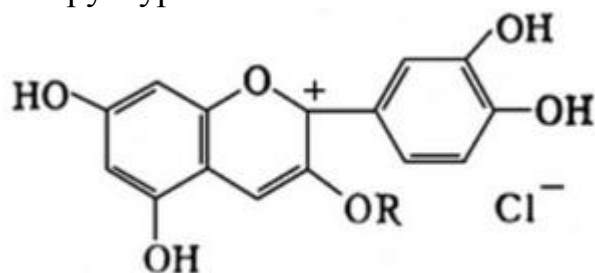
Найменування сировини	Колір екстракту
Вишня	
Червоноголова капуста	
Чорна смородина	
Полуниця	

Таблиця 11.2

Колір екстракту різної сировини (індикатору в різних середовищах)

№	З чого виготовлений індикатор	Колір Індикатора в дистильованій воді	Колір індикатора в лимонній кислоті	Колір індикатора в розчині NaOH	Колір індикатора в харчовій соді
1.	Сік буряка				
2.	Гранат				
3.	Вишня				
4.	Червонокачанна капуста				
5.	Чорна смородина				
6.	Лохина				

Тепер ми знаємо, що антоціани належать до глікозидів, а основою їхньої хімічної будови є структура:



Розмаїття забарвлень квіток залежить від числа гідроксильних груп у молекулах антоціанів: з їх збільшенням колір стає більш синім. Забарвлення визначається поєднанням антоціанів із іонами різних металів. Так, наприклад, солі магнію та кальцію сприяють переважанню синього кольору, а солі калію — пурпурового. Група антоціанів налічує близько 10 видів.

Відомо вже понад 500 індивідуальних антоціанових сполук, й їхнє число постійно збільшується.



Дослід 2. Вивчення зміни кольору антоціанів під дією кислот і лугів

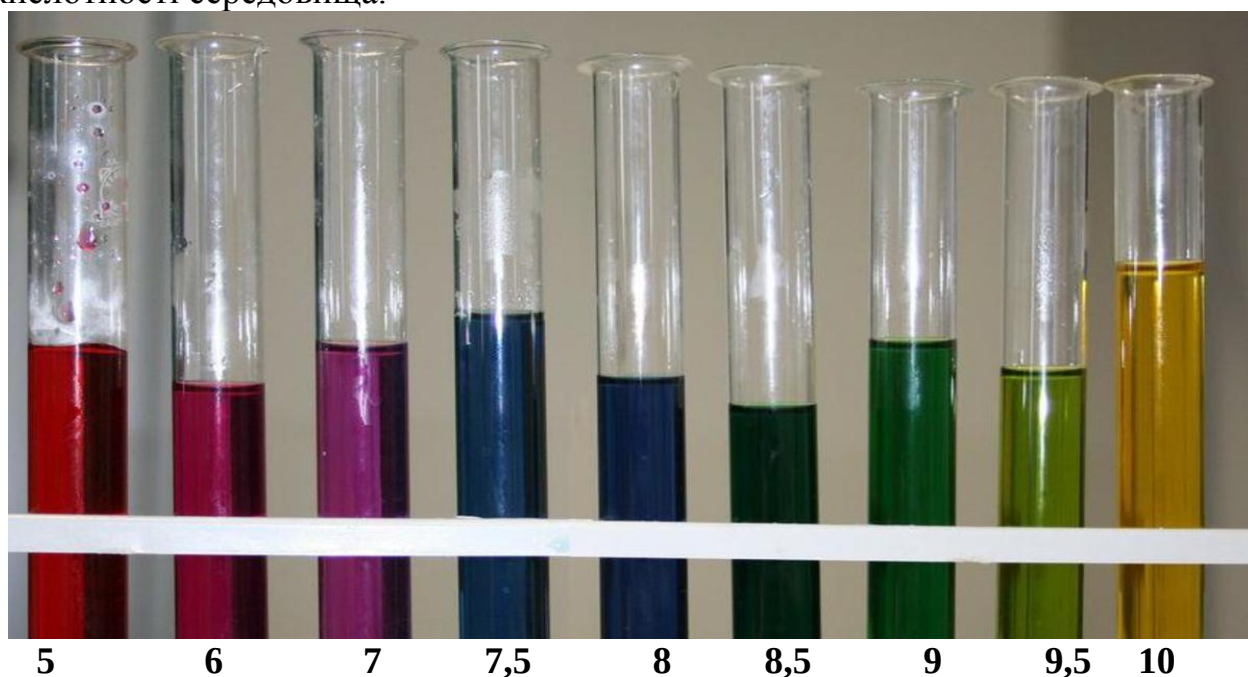
Прилади, обладнання, матеріали: водна витяжка антоціанів, отримана у досліді 1, 1%-й розчин HCl, 0,001%-й розчин NaOH, універсальний індикаторний папір.

Методика виконання роботи

1. Провести визначення впливу кислот та лугів на зміну забарвлення антоціанів з різних видів сировини.
2. Зробити висновок щодо зміни забарвлення антоціанів у різних середовищах.

Схема визначення розчинності натуральних барвних речовин у різних розчинниках

- В чисту пробірку наливають 2 мл водної витяжки антоціанів, додають краплю 1% розчину HCl.
- Спостерігають появу рожево-червоного-забарвлення, якщо отримана витяжка мала буруватий відтінок. Зміна забарвлення пов'язана з перебудовами у молекулах антоціанів.
- До забарвленого у рожевий колір розчину додають по краплях 0,001% розчин NaOH. Спостерігають за зміною забарвлення.
- Контролюючи за допомогою індикаторного паперу зміну рН розчину, яка проходить у результаті поступового додавання розчину кислоти або лугу, встановлюють більш точну залежність кольору розчинів антоціанів від кислотності середовища.



Спостереження:

Дослід 3. Визначення розчинності барвних речовин різного походження

Прилади, обладнання, матеріали: сировина, яка містить барвні речовини різні за хімічною природою (антоціани, каротиноїди), синтетичні

барвники, дистильована вода, олія соняшникова, етанол, пробірки, скляні палички, лійки, паперові фільтри, марлеві фільтри.

Методика виконання роботи

1. Провести визначення розчинності барвних речовин у різних розчинниках.
2. Дані спостережень занести в таблицю 11.3. та 11.4.
3. Зробити висновок про здатність барвних речовин розчинятися в тих чи інших розчинниках.

Схема визначення розчинності натуральних барвних речовин в різних розчинниках

- Наважку сировини (смородина, малина, морква, буряк) масою 1 г поміщають у пробірки.
- Готують одночасно три однакові зразки із кожного виду сировини.
- Додають до підготовлених зразків відповідно по 5 мл дистильованої води, олії соняшникової, етанолу.
- Ставлять пробірки на водяну баню, доводять до 70°C і витримують при цій температурі 15 хв.
- Знімають зразки із водяної бані, охолоджують до кімнатної температури і відфільтровують через паперовий фільтр, якщо у якості розчинника були використані дистильована вода і етанол; через марлевий фільтр, якщо була використана соняшникова олія.
- Прирівнюють забарвлення отриманих розчинів із однакових видів сировини.

Таблиця 11.3

Розчинність барвних речовин в різних розчинниках

Назва розчинника	Інтенсивність забарвлення розчинів			
	Буряк	Малина	Чорна смородина	Морква
Дистильована вода				
Соняшникова олія				
Етиловий спирт				

Висновок:

Схема визначення розчинності синтетичних барвних речовин у різних розчинниках

- Наважку невелику кількість синтетичних барвників (E102, E110, E124, E133 та ін., які є у наявності) поміщають у пробірки.

- Готують одночасно по три зразки розчину одного і того ж барвника.
- Додають до підготовлених зразків відповідно по 5 мл дистильованої води, олії соняшникової, етанолу.
- Ретельно перемішують і спостерігають за характером розчинення синтетичних барвників у тих чи інших розчинниках.

Таблиця 11.4

Розчинність синтетичних барвників в різних розчинниках

№ п/п	Назва розчинника	Характеристика розчинності синтетичних барвників*			
		E102	E110	E124	E133
1	Дистильована вода				
2	Соняшникова олія				
3	Етанол				

Примітка. Для характеристики розчинності використовують позначення: «не розчиняється», «слабо розчиняється», «розчиняється».

Дослід 4. Відновлення індигокарміну

Прилади, обладнання, матеріали: пальник, пробірки, 5 % розчин глюкози, 10 % розчин Na_2CO_3 , розчин індигокарміну (1:1).

Методика виконання роботи

1. Провести реакції відновлення індигокарміну.
2. Зробити висновок про перетворення індигокарміну при різних температурах.

Схема відновлення індигокарміну

- У пробірку наливають 2 мл 5 % розчину глюкози, додають 2 мл 10 % розчину Na_2CO_3 і розчин індигокарміну набуває темно-синього забарвлення.
- При обережному нагріванні отриманого розчину проходить відновлення індигокарміну і рідина набуває жовтуватого забарвлення. Якщо синє забарвлення довго не зникає, необхідно додати трохи розчину глюкози.
- Одержаний розчин лейкосполуки охолоджують і сильно струшують. Знову з'являється синє забарвлення внаслідок окиснення лейкосполуки киснем повітря.
- При повторному нагріванні синє забарвлення зникає, і розчин набуває жовтого кольору.

Взаємні перетворення синього індигокарміну в жовтувато-білий і жовтувато-білого індигокарміну в синій можна підсумувати за допомогою таких хімічних реакцій:



Висновок:

11.3. Методи визначення вмісту барвних речовин в натуральних барвниках

Дослід 5. Визначення кількості барвних речовин в натуральних харчових барвниках

5.1. Визначення кількості барвних речовин в натуральних червоних харчових барвниках

Застосовують фотоелектроколориметричний метод, який полягає в тому, що вміст барвних речовин в барвниках визначають шляхом порівняння інтенсивності забарвлення стандартного розчину сульфату кобальту і досліджуваного розчинів.

Прилади, обладнання, матеріали: $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, натуральні червоні барвники, етанол, вода дистильована, пробірки, колба на 250 мл, фотометр КФК-3.

Методика виконання роботи

1. Приготувати стандартний та дослідний розчини барвників.
2. Визначити вміст барвних речовин в розчинах за формулами 5.1-5.4.

Схема приготування стандартного розчину барвника

- Зважують 20 г кристалічного сульфату кобальту ($\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
- Розчиняють у хімічному стакані у дистильованій воді і кількісно переносять у мірну колбу об'ємом 1000 мл.
- Розчин в колбі доводять до мітки дистильованою водою при температурі 20°C і добре перемішують.
- Приготований стандартний розчин сульфату кобальту за інтенсивністю забарвлення відповідає вмісту 22 мг **барвної** речовини (еніну).

Схема приготування дослідного розчину барвника

- Наважку добре перемішаного барвника в кількості 1-4 г (в залежності від вмісту пігменту) зважують з точністю до 0,0002 г.
- Розчиняють в хімічному стакані дистильованою водою, кількісно переносять в мірну колбу об'ємом 1000 мл.
- У випадку, якщо колір барвних речовин досліджуваного барвника обумовлений антоціанами, тоді до розчину мірним циліндром приливають 40 мл концентрованої хлоридної кислоти (густиною 1190

кг/м³) і вміст колби доводять дистильованою водою з температурою 20°C до мітки. Приготовлений розчин барвника повинен бути прозорим.

- Якщо розчин мутний або містить нерозчинні частинки, його фільтрують через щільний паперовий фільтр або центрифугують.

Опрацювання результатів

Інтенсивність забарвлення досліджуваного розчину барвника і стандартного порівнюють на фотометрі КФК-3. Використовують кювети з товщиною вимірюваного шару 10 мл. Оптичну густину обох розчинів вимірюють при довжині хвилі 450 нм. При розрахунку кількості барвних речовин враховують те, що оптична густина розчину барвника пропорційна концентрації в ньому пігменту, тобто:

$$D_1 : D_2 = c_1 : c_2. \quad (11.1)$$

де D_1 – оптична густина стандартного розчину сульфату;

D_2 – оптична густина досліджуваного розчину барвника;

c_1 – концентрація еніну, рівна 0,022 г в 1 л стандартного розчину;

c_2 – концентрація пігменту в 1 л розчину.

Вміст барвних речовин x в грамах в 1 л розчину барвника визначають за наступною формулою, виведеною із попереднього рівняння:

$$c_2 = \frac{c_1 \cdot D_2}{D_1}, \quad (11.2)$$

$$x = \frac{0,022 \cdot D_2 \cdot 1000}{m \cdot D_1} \text{ г/л,} \quad (11.3)$$

$$x = \frac{22 \cdot D_2 \cdot 1000}{m \cdot D_1} \text{ г/л.} \quad (11.4)$$

де m – маса наважки барвника, г.

5.2. Визначення кількості барвних речовин в натуральних жовтих харчових барвниках.

Метод визначення барвних речовин в жовтих барвниках, наприклад в куркумі та її спиртових екстрактах, заснований на колориметруванні досліджуваного розчину і визначенні кількості жовтого пігменту за попередньо побудованим калібрувальним графіком. Графік будують за стандартним водним розчином дихромату калію ($K_2Cr_2O_7$), який містить 360 мг солі в 1000 мл. 1 мл стандартного розчину $K_2Cr_2O_7$ відповідає 2,08 мкг каротину.

Прилади, обладнання, матеріали: $K_2Cr_2O_7$, натуральні жовті барвники, етанол, вода дистильована, пробірки, колби на 1000 мл, фотометр КФК-3.

Методика виконання роботи

1. Приготувати стандартний розчин барвника.
2. Побудувати калібрувальний графік.
3. Визначити вміст барвних речовин в розчині за формулами 5.5-5.7.
4. Зробити висновок про особливості визначення барвних речовин у

різних натуральних барвниках.

Приготування стандартного розчину барвника

Використовують тричі перекристалізований дихромат калію ($K_2Cr_2O_7$), наважку якого в кількості 0,360 г, зважену з точністю 0,0002 г, розчиняють у дистильованій воді в мірній колбі об'ємом 1000 мл.

Побудова калібрувального графіку

Для побудови калібрувального графіка приготований стандартний розчин $K_2Cr_2O_7$ із бюретки відбирають у кількості, яка вказана у таблиці 5.4 і додають відповідну кількість дистильованої води. Потім в отриманих розчинах дихромату калію визначають оптичну густину в кюветі з товщиною шару 10 мм на фотометрі КФК-3 при довжині хвилі 510 нм. За отриманими даними будують графік, де на осі абсцис відкладають кількість каротину, якій відповідає 1 мл розчину $K_2Cr_2O_7$ (мкг), а на осі ординат відповідні оптичні густини розчинів дихромату калію.

Таблиця 11.5

Кількісні характеристики

Розведення стандартного розчину $K_2Cr_2O_7$		Кількість $K_2Cr_2O_7$ в 1 мл, мкг	Кількість каротину, яка відповідає 1 мл розчину $K_2Cr_2O_7$
стандартний розчин, мл	дистильована вода, мл		
5,0	—	360	2,08
4,5	0,5	324	1,87
4,0	1,0	288	1,66
3,5	1,5	252	1,46
3,0	2,0	216	1,25
2,5	2,5	180	1,04
2,0	3,0	144	0,83
1,5	3,5	108	0,62
1,0	4,0	72	0,42
0,5	4,5	36	т

Опрацювання результатів

Для визначення кількості барвної речовини у досліджуваному барвнику 0,5-1 мл його відміряють мікропіпеткою в мірну колбу об'ємом 50 мл. Вміст колби розчиняють спиртом до мітки і визначають оптичну густину приготовленого розчину у кюветі з товщиною шару 10 мм при довжині хвилі 510 нм. Потім за калібрувальним графіком знаходять відповідно до оптичної густини кількість каротину і розраховують вміст барвних речовин у досліджуваному барвнику. При цьому користуються наступним співвідношенням:

$$D_1 : D_2 = c_1 : c_2. \quad (11.5)$$

де D_1 – оптична густина стандартного розчину $K_2Cr_2O_7$;

D_2 – оптична густина досліджуваного розчину барвника;

c_1 – кількість каротину, яка відповідає 1 мл стандартного розчину $K_2Cr_2O_7$, рівна 2,08 мкг;

c_2 – кількість барвних речовин в 1 мл досліджуваного розчину, мкг.

З цього співвідношення отримаємо

$$c_2 = \frac{2,08 \cdot D_2}{D_1} \quad (11.6)$$

Вміст барвних речовин в 1 л барвника з урахуванням вказаного раніше розведення визначають за такою формулою:

$$c_2 = \frac{D_2 \cdot 0,104}{D_1 \cdot V} \quad \text{г/л,} \quad (11.7)$$

де V – кількість досліджуваного барвника, розведеного спиртом до 50 мл в мірній колбі, мл.

За описаною методикою вміст барвних речовин в натуральних харчових барвниках визначають в їх спиртових розчинах, які містять близько 10% сухого залишку. У випадку концентрованих розчинів або пастоподібних жовтих барвників для визначення кількості барвних речовин необхідно їх кількісно розводити спиртом до вмісту сухого залишку в розчині в середньому 10%.

Дослід 6. Визначення спектрів поглинання синтетичних барвників

Спектрофотометричний метод дозволяє ідентифікувати індивідуальні синтетичні барвники відповідно до таблиці 6 і деякі суміші синтетичних барвників, до складу яких входять індивідуальні синтетичні барвники, які мають спектри, що не перекривають один одного.

Прилади, обладнання, матеріали: синтетичні барвники, дистильована вода, фотометр КФК-3, кювети кварцові товщиною поглинаючого шару 10 мм.

Таблиця 11.6.

Спектри поглинання синтетичних барвників

№ п/п	Назва синтетичного барвника	Індекс	Довжина хвилі, яка відповідає максимуму поглинання, нм	Питомий коефіцієнт світлопоглинання $E_{1\text{см}}^{1\%}$
1	Тартразин	E102	426	530
2	Жовтий «сонячний захід»	E110	485	555
3	Азорубін	E122	516	510
4	Амарант	E123	520	440
5	Понсо 4R	E124	505	430
6	Еритрозин	E127	526	1100
7	Червоний 2G	E128	532	620
8	Спеціальний червоний АС	E129	504	540
9	Синій патентований V	E131	638	2000
10	Індигокармін	E132	610	480

11	Діамантовий синій FCF	E133	630	1630
12	Зелений F	E142	632	1720
13	Діамантовий чорний	E151	570	530
14	Коричневий HT	E155	460	403

Методика виконання роботи

1. Провести вимірювання оптичної густини в дослідних зразках синтетичних барвників.

2. Дані вимірювань занести в таблицю 6.

3. Зробити висновок щодо точності ідентифікації синтетичних барвників.

Схема вимірювання оптичної густини

- Кювету фотометра заповнюють розчином синтетичного барвника, отриманого у викладача.
- Вимірюють оптичну густину в діапазоні довжин хвиль від 400 до 650 нм з інтервалом 5 нм (в області максимуму поглинання вимірювання оптичної густини проводять з інтервалом 1 нм), використовуючи у якості контролю дистильовану воду.
- У випадку отримання значення оптичної густини розчину вище 0,8 розчин барвника необхідно розвести до концентрації, оптична густина якого знаходиться в діапазоні від 0,2 до 0,8.
- За отриманим значенням довжини хвилі, яка відповідає максимуму поглинання, по таблиці 11.7 ідентифікують синтетичний барвник.

Таблиця 11.7

Результати вимірювання оптичної густини

Значення довжини хвилі	Назва синтетичного барвника	Забарвлення
526		
632		
485		
505		

Контрольні запитання

1. Дайте визначення поняттю «колір».
2. Наведіть класифікацію барвників відповідно до Санітарних норм і правил по харчових добавках
3. Наведіть загальну характеристику натуральних харчових барвників
4. Що може бути сировиною для натуральних харчових барвників
5. Наведіть загальну характеристику синтетичних харчових барвників
6. Наведіть приклади натуральних харчових барвників
7. Наведіть приклади синтетичних харчових барвників

ЛІТЕРАТУРА

1. Біологічна хімія : підручник / Л. Ф. Павлоцька, Н. В. Дуденко, І. В. Цихановська, Є. Я. Левітін, О. В. Москаленко, О. В. Александров, М. Г. Ілюха, І. В. Довгопол. – Суми : Університетська книга, 2011. – 510 с.
2. Харчова хімія / А. П. Нечаєв, С. Є. Траубенберг, А. А. Кочеткова та ін. – 3-тє вид. випр. – К.: Світ, 2014. – 604с.
3. Біологічна хімія. Практикум : навч. посіб. / Л. Ф. Павлоцька, Н. В. Дуденко, І. В. Цихановська, Є. Я. Левітін, О. В. Москаленко, О. В. Александров, М. Г. Ілюха, І. В. Довгопол. – Суми : Університетська книга, 2011. – 63 с.
4. Столяр О.Б. Біологічна хімія: навч. посіб. Київ: КНТ, 2016. –369 с.
5. Столяр О.Б. Лабораторний практикум з біологічної хімії: навч. посіб.. Київ: КНТ, 2014. – 104 с.
6. Павленко Л.Л. Навчальні матеріали з дисципліни «Харчова хімія». Тернопіль: Навчально-виробнича майстерня редакційно-видавничих технологій Галицького коледжу імені В'ячеслава Чорновола, 2019.– 48 с.
7. Титаренко О.О. Хімічні добавки у продуктах харчування URL: <http://dspace.pnpu.edu.ua/handle/123456789/14838> (дата звернення 24.12.2020).
8. Левицька Н. М. Розвиток світової та вітчизняної харчової науки у XIX – на початку XX ст.: історичний аспект / Н. М. Левицька, Л. І. Синявська // Вісник Черкаського університету. Серія: Історичні науки. 2015. № 29. С. 71-80. URL: http://nbuv.gov.ua/UJRN/VchuI_2015_29_10 (дата звернення 24.12.2020).

Електронне навчальне видання комбінованого використання
Можна використовувати в локальному та мережному режимі

Цихановська Ірина Василівна
Александров Олександр Валентинович

БІОЛОГІЧНА ТА ХАРЧОВА ХІМІЯ

Методичні вказівки
до лабораторних робіт для здобувачів вищої освіти першого
(бакалаврського) рівня денної форми здобуття освіти за
спеціальністю 015 «Професійна освіта (Аграрне виробництво,
переробка сільськогосподарської продукції та харчові технології)»

В авторській редакції

Підписано до розміщення 28.03.2025. Гарнітура Times New Roman.
Ум. друк. арк. 3,5. Обсяг 2,087 Мб. Зам. № 142/25.

Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.2009
Видавництво ХНУ імені В.Н. Каразіна