



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

257566

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/02,
G 01 N 21/25

(22) Přihlášeno 02 12 85

(21) PV 8704-85

(40) Zveřejněno 15 10 87

(45) Vydáno 15 03 89

(75)

Autor vynálezu

BACÍLEK JAROMÍR ing. CSc., PODĚBRADY,
MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc., JARÝ JIŘÍ prof. ing. DrSc., PRAHA

(54) Způsob stanovení sacharózy v medu

Způsob stanovení sacharózy v medu, založený na reakci hydrolýzou sacharózy vzniklých D-glukózy a D-fruktózy s koncentrovanou kyselinou sírovou a následné reakci vzniklého 5-hydroxymethylfurfuralu s anthronem. Interrefující monosacharidy a redukující disacharidy jsou z analyzovaného vzorku medu odstraněny před vlastní hydrolýzou sacharózy účinkem hydroxidu alkalického kovu. Metoda stanovení spočívající v přidavku koncentrované kyseliny sírové a anthronu v ethylacetátu s přidavkem stabilizující kyseliny octové nebo mravenčí umožňuje subjektivní vyhodnocení vzniklého odstínu zbarvení s přesností stanovení 11 % hmot. sacharózy při celkovém obsahu sacharózy 10 % hmot. Způsob stanovení sacharózy podle řešení tím umožňuje sledování kvality medu již při jeho výkupu "v terénu" mimo chemickou laboratoř.

Vynález se týká způsobu stanovení sacharózy v medu jednoduchou rychlou vizuální kolorimetrickou metodou, kterou je možno aplikovat přímo ve výkupnách medu bez nutnosti práce v chemické laboratoři spojené s použitím potřebných přístrojů.

Z hlediska určování kvality medu je jedním z rozhodujících kritérií obsah sacharózy především ve vztahu k pravosti včelího medu. Množství přítomné sacharózy je možno stanovit přímo použitím některé chromatografické techniky (např. HPLC na upravených silikagelech - Thean, J. E., Funderburk, W. C. Jr. 1977, J. AOAC 60, 838-841) nebo iontoměničích (Palmer, J. K., Brandes, W. B. 1974, J. Agric. Food Chem. 22, 709-712), popřípadě plynové chromatografie po příslušném převedení sacharózy na těžké deriváty (Zürcher, K., Hadorn, H., Strack, Ch., 1975, Mitt. Geb. Lebensm. Hyg. 66, 92-116).

Daleko častěji se však obsah sacharózy stanoví po její hydrolýze na ekvimolární směs D-glukózy a D-fruktózy. Nejběžnější metodou založenou na tomto principu je polarimetrické stanovení sacharózy (Simpson, J. 1952, Bee World 33, 112-117.). Naproti tomu postupy založené na určování obsahu vzniklých redukcujících monosacharidů (Simpson, J. 1960, J. Insect. Physiol. 4, 107-121) jsou pro stanovení sacharózy v medu komplikovány vysokým obsahem kontaminujících monosacharidů a oligosacharidů (hlavně maltóza).

Při postupu podle VanHandela (VanHandel, E. 1968, Anal. Biochem. 22, 280-283) jsou tyto interferující monosacharidy předem rozloženy účinkem silné báze a potom se teprve provede kyselá hydrolýza sacharózy, která zůstává v předchozím stepu v silně alkalickém prostředí zachována. Monosacharidy vzniklé hydrolýzou sacharózy se potom stanoví tepelnou dehydratací v přítomnosti kyselin a následnou kondenzací vzniklého 5-hydromethylfurfuralu s barvotvornými látkami (většinou aromatickými aminy, fenoly či ketony). Absorbance reakční směsi je přitom úměrná obsahu v roztoku přítomné D-glukózy a D-fruktózy vzniklých hydrolýzou sacharózy.

Při použití zředěné kyseliny sírové s anthronem a vnějším záhřevem reakční směsi (postup podle VanHandela) vzniká modrozelené zbarvení, jehož intenzitu je nutno vyhodnocovat objektivně pomocí fotometrů, protože odchylky ve zbarvení jsou subjektivně těžko porovnatelné. Pracovní postup podle VanHandela vyžaduje dvojnásobné vnější zahřívání reakční směsi, z toho jedenkrát přesnost zahřívání ovlivní přímo intenzitu zbarvení.

Podstatou vynálezu je kvantitativní stanovení sacharózy, při kterém jsou interferující sacharidy odstraněny v alkalickém prostředí a potom oproti postupu VanHandela je k roztoku medu přidán roztok anthronu v ethylacetátu přidavkem stabilizačně působící kyseliny octové, která brání kondenzačním reakcím anthronu, které se projevují vytvářením nerozpustných produktů v ethylacetátu. Teplo pro kondenzační reakci je získáno přidavkem kyseliny sírové (kombinace zředovacího tepla a entalpické bilance reakce hydroxidu draselného, ethylacetátu, kyseliny octové, kyseliny sírové).

Výhodou způsobu stanovení sacharózy v medu podle vynálezu je především rychlost stanovení, nenáročnost na provedení i pro nekvalifikované síly a dále možnost subjektivního posouzení vzniklého barevného odstínu v oblasti největší citlivosti lidského oka (od žluté až k modrozelenému odstínu), a tím i možnost stanovení obsahu sacharózy v medu bez použití fotometrů nebo jiných přístrojů.

K výhodám způsobu stanovení patří také vyšší stabilita roztoku anthronu v ethylacetátu, ve srovnání s roztokem anthronu ve zředěné kyselině sírové jak je používána v původním VanHandelově postupu. Stabilita anthronu v ethylacetátu je několik dnů, po přidavku stabilizujících organických kyselin až několik týdnů. Naproti tomu při VanHandelově pokusném provedení je nutno připravovat anthronové činidlo denně. Vytvořené barvivo je v popsáném provedení dostatečně stále po dobu minimálně 75 minut.

K výhodám způsobu stanovení podle vynálezu je i jednoduchý způsob odběru a dávkování tekutých i krystalických medů objemově pomocí injekční stříkačky. Navažování přesných množství

medu je časově značně náročné a proto tento způsob představuje značnou časovou úsporu, nehledě na nereálnost vážení množství 1 g medu s přesností na 2 % v podmínkách mimo laboratoř.

V praktickém provedení značně urychlí postup také použití poloautomatických skleněných dávkovačů s teflonovým pístem, které současně zvýšily bezpečnost práce při vlastním stanovení v praktických podmínkách. V současné době je tato metoda rozšířena při výkupu medu prakticky po celé SSR.

Výhodou způsobu stanovení sacharózy v medu podle vynálezu je časová úspora při vlastním stanovení, které je podstatně materiálově i časově méně náročné než dosud používané polarimetrické stanovení. Přesnost subjektivního kolorimetrického stanovení podle vynálezu je přitom ± 1 % obsahu sacharózy při celkovém obsahu v medu 10 % hmot. Metoda stanovení je natolik jednoduchá, že ji může provádět i nequalifikovaný pracovník po krátkém zaškolení. Způsob stanovení sacharózy podle vynálezu proto umožňuje sledování kvality medu již při výkupu mimo chemickou laboratoř.

V dalším textu je vynález dokumentován příklady stanovení, aniž by se jimi omezoval.

P ř í k l a d 1

Injekční stříkačkou na 2 ml odměříme 0,7 ml zkoušeného medu do odměrného válce na 100 ml se zátkou a rozpustíme do objemu 100 ml vodou (destilovanou nebo užitkovou) - roztok A.

Rozřízneme ampulku s 0,1 g anthronu a rozpustíme v 5 ml octanu ethylnatého s přídavkem stabilizátoru (5 ml ledové kyseliny octové na 100 ml octanu ethylnatého) - roztok B.

Příprava barevného standardu: K 0,1 ml standardního roztoku sacharózy (0,1 g/100 ml) přidáme 0,2 ml roztoku hydroxidu draselného (30 g/100 ml) a zahříváme na vodní lázni 10 minut při 80 až 100 °C. Po ochlazení přidáme 0,5 ml roztoku B a 3,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Promícháme.

Vlastní stanovení: K 0,1 ml roztoku A přidáme 0,2 ml 30% (v/o) roztoku hydroxidu draselného, zahřejeme na vodní lázni na 80 až 100 °C na dobu 10 minut a po ochlazení přidáme 0,5 ml roztoku B a 3,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Promícháme a vzniklé zbarvení porovnáme se standardem. Roztoky je možno objektivně srovnat spektrofotometricky při 620 nm.

Citlivost subjektivního stanovení je ± 1 hmot. procento sacharózy při celkovém obsahu 10 % hmot. Trvání analýzy včetně přípravy vzorku a zahřívání 17 až 20 minut.

P ř í k l a d 2

Roztok A - podle příkladu 1

Rozřízneme ampulku s 0,1 g anthronu a rozpustíme v 5 ml octanu ethylnatého s přídavkem stabilizátoru (7 ml 98% (objemově) kyseliny mravenčí na 100 ml octanu ethylnatého) roztok B. Příprava barevného standardu: K 0,1 ml standardního roztoku sterilního roztoku sacharózy (0,1 g/100 ml) z rozříznuté ampulky, přidáme 0,2 ml roztoku hydroxidu sodného (25 g/100 ml) a zahříváme na vodní lázni 5 minut při 100 °C. Po ochlazení přidáme 0,5 ml roztoku B a 3,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Promícháme.

Vlastní stanovení: K 0,1 ml roztoku A přidáme 0,2 ml 25% (v/o) roztoku hydroxidu sodného, zahřejeme na vodní lázni 5 minut při 100 °C a po ochlazení přidáme 0,5 ml roztoku B a 3,5 ml koncentrované kyseliny sírové. Promícháme a vzniklé zbarvení porovnáme se standardem (pro úroveň 10 % hmot. sacharózy v medu). Citlivost stanovení je ± 1 % hmot. sacharózy při celkovém obsahu 10 % hmot. sacharózy.

Stabilita chemikálií a roztoků:
roztoky hydroxidů - neomezeně v uzavřené láhvi
anthron - 3 roky
ethylacetát se stabilizátory - neomezeně v uzavřené láhvi
koncentrovaná kyselina sírová - neomezeně
sterilizovaný roztok sacharózy - 4 roky
stabilita roztoku B - 2 měsíce

P ř í k l a d 3

Injekční stříkačkou na 2 ml odměříme 0,7 ml medu do odměrné baňky na 1 000 ml a doplníme vodou (obyčejnou nebo destilovanou) do 1 000 ml - roztok A.

Roztok B - 0,5 g anthronu rozpustíme v 100 ml octanu ethylnatého s přidavkem stabilizátoru (10 ml kyseliny octové na 100 ml octanu ethylnatého).

Příprava barevného standardu: K 0,1 ml standardního roztoku sacharózy (0,01 g/100 ml) přidáme 0,2 ml 5% (v/o) roztoku NaOH, zahřejeme na vodní lázni 5 minut při 100 °C. Po ochlazení přidáme 0,5 ml roztoku B a 0,8 ml koncentrované kyseliny sírové, promícháme.

Vlastní stanovení: K 0,1 ml roztoku A přidáme 0,2 ml 5% (v/o) roztoku NaOH, zahřejeme 5 minut při 100 °C, přidáme po ochlazení 0,5 ml roztoku B a 0,8 ml koncentrované kyseliny sírové, promícháme. Vzniklé zbarvení porovnáme se standardem při 620 nm.

P ř í k l a d 4

Roztok A - viz příklad 1

Roztok B - 2,5 g anthronu rozpustíme v 50 ml octanu ethylnatého stabilizovaného kyselinou octovou (20 ml koncentrované kyseliny octové v 100 ml octanu ethylnatého).

Vlastní stanovení: K 0,1 ml roztoku A přidáme 0,2 ml 5% (v/o) roztoku hydroxidu draselného, zahřejeme 10 minut při 80 až 100 °C. Po ochlazení přidáme 0,5 ml roztoku B a 7 ml koncentrované kyseliny sírové, promícháme.

Příprava barevného standardu: K 0,1 ml standardního roztoku sacharózy (0,1 g/100 ml) přidáme 0,2 ml 5% hmot. roztoku KOH, zahřejeme 10 minut při 80 až 100 °C, ochladíme, přidáme 0,5 ml roztoku B a 7 ml konc. kyseliny sírové. Porovnáme spektrofotometricky při 620 nm s vlastním stanovením nebo subjektivně. Citlivost metody a trvání analýzy jako v příkladu 1.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob stanovení sacharózy v medu kolorimetricky, vyznačující se tím, že směs 1 hmot. dílu medu odměřeného objemově pomocí injekční stříkačky se smísí s 100 až 1 000 hmot. díly vody a 10 až 100 hmot. díly hydroxidu sodného nebo draselného, směs se zahřívá 5 až 15 minut na teplotu 80 až 100 °C a potom se k ochlazené reakční směsi přidá 5 až 100 hmot. dílů anthronu ve formě 0,5 až 5% hmot. roztoku v ethylacetátu stabilizovaného přidavkem 1 až 20 % obj. koncentrované kyseliny octové nebo mravenčí a potom se přidá 1 000 až 15 000 hmot. dílů koncentrované kyseliny sírové a potom se vyhodnotí obsah sacharózy stanovením absorpance směsi při 620 nm, popřípadě subjektivně porovnáním se standardem.