

Uygulamanın Adı: Fenol-Sülfürik Asit Yöntemiyle Toplam Karbonhidrat Tayini

Uygulamanın Amacı: Meyve Sularında Toplam Karbonhidrat Miktarının Belirlenmesi

Yöntemin Prensipleri: Karbonhidratların (basit şekerler, oligosakkaritler, polisakkaritler ve bunların türevleri) kuvvetli asit ve sıcaklığın etkisinde, fenol ile muamele edildiğinde sarı-turuncu renkli bileşikler oluşturması, renk yoğunluğunun karbonhidrat miktarına bağlı olması ve rengin spektrofotometrik olarak ölçülmesi.

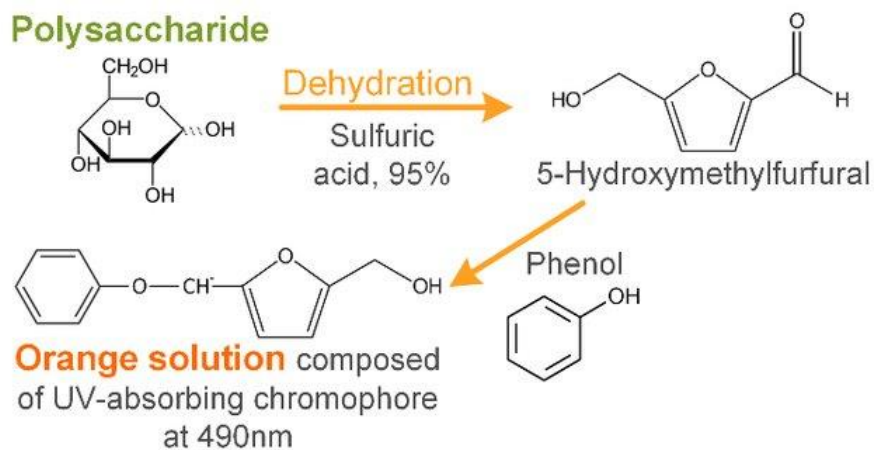
Genel Bilgiler: Karbonhidratlar gıdaların ana bileşenlerindendir. Beslenme açısından diyetin temel enerji kaynağı olmasının yanında karbonhidratlar, gıdalarda lezzet, renk, yapının oluşumunu, gıdaların fermente olabilirliğini belirleyen bileşendir ve gıdaların üretim işlemlerinde sürece yön veren etmenlerdendir. Bu sebeple gıdalarda bulunan karbonhidrat miktarının bilinmesi

- Gıdaların genel bileşiminin belirlenmesi
- Gıdaların bileşiminde bulunan toplam şeker miktarını tespit etmek
- Bazı bitkisel ürünlerin olgunluk düzeylerini belirlemek
- Gıdaların üretimin süreçlerine yön vermek
- Gıdaların sahip oldukları enerji miktarını bulabilmek
- Gıdaların standarda uygun olup olmadığını saptamak, taklit ve tağşişi tespit etmek açısından önemlidir.

Karbonhidratlar gıdalarda monosakkarit, disakkarit, oligosakkarit ve polisakkarit formlarında bulunurlar. Gıdanın toplam karbonhidrat içeriğini belirleyebilmek için bu formların tümünü tespit edebilecek metodlara gereksinim vardır.

Fenol-sülfürik asit yöntemi, toplam karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi için yaygın olarak faydalanılan, basit, hızlı, düşük maliyetli ve monosakkaritler, disakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritler dahil hem indirgen hem de indirgen olmayan karbonhidratların tespitinde kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir.

Karbonhidratlar (di, oligo, poli) kuvvetli asitler varlığında ısıtılırsa monosakkaritlere parçalanırlar. Açığa çıkan monosakkaritler bir dizi dehidrasyon reaksiyonu geçirerek furan türevlerini (pentozlar furfurala, heksozlar hidroksimetil furfurala dehidre olur) oluştururlar. Oluşan furanlar daha sonra kendileriyle veya eğer ortamda bulunuyorsa fenolik maddelerle kondensasyona girerek çeşitli bileşikler oluştururlar. Bu bileşikler belli dalga boyundaki ışınları absorblayabilirler ve bu özelliklerinden faydalanılarak spektrofotometre ile izlenebilirler. Bu bileşiklerin yaptıkları absorbans doğrudan başlangıçtaki karbonhidrat miktarı ile orantılıdır.



Fenol-sülfürik asit yöntemi, toplam karbonhidrat içeriğinin belirlenmesi için yaygın olarak faydalanan bir yöntemdir. Uygulamada, analiz edilecek karbonhidratların sulu çözeltisi üzerine fenol ve sülfürik asit eklenir. Sülfürik asit karbonhidratları yapıtaşlarına ayırır, açığa çıkan monosakkaritler dehidrasyona uğrar ve daha sonra fenol ile etkileşime girerler. Karbonhidratlar ve fenol arasındaki etkileşimin bir sonucu olarak sarı-turuncu renge sahip bileşikler oluşur. Bu rengi veren bileşikler, glukoz gibi heksozlardan kaynaklanırsa 490 nm'deki, riboz gibi pentozlardan kaynaklanırsa 480 nm'deki ışınlar maksimum absorbands yapar. Absorbans, başlangıçta numunedeki karbonhidrat konsantrasyonu ile orantılıdır. Ancak önemli bir nokta reaksiyonlar stokiyometrik değildir ve karbonhidrat miktarının belirlenebilmesi için çalışma grafiği hazırlanmalıdır. Çalışma grafiği için glukozun belli konsantrasyonlardaki (20 µg/2 mL, 40 µg/2 mL, 60 µg/2 mL, 80 µg/2 mL, 100 µg/2 mL) standart çözeltileri hazırlanır ve analize sokularak çözeltilerin yaptığı absorbands (Abs) değerleri belirlenir. Daha sonra elde edilen Abs değerleri konsantrasyon değerlerine karşı grafiğe işlenir.

Kullanılan Kimyasallar/Malzemeler

Sülfürik Asit (konsantre, %95)

Fenol (%80 lik çözelti, 80 g fenol ile 20 g saf su karıştırılarak hazırlanır)

Glukoz

Spektrofotometre, vorteks

Analizin Yapılışı

Çalışma grafiği için

- 0 µg/2 mL, 20 µg/2 mL, 40 µg/2 mL, 60 µg/2 mL, 80 µg/2 mL, 100 µg/2 mL konsantrasyonlardaki glukoz çözeltilerini hazırlamak için öncelikle
- %1 lik glukoz çözeltisi (litresinde 10 g glukoz içerir) hazırlanır.
- Hazırlanan %1 lik çözelti saf su ile 100 kat seyreltilir ve litresinde 100 miligram, mililitresinde 100 mikrogram glukoz içeren çözelti elde edilir.
- Bu çözeltden 5 adet boş test tüpüne sırasıyla 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL alınır ve tüpler saf su ile 10 mL ye tamamlanır.
- Ayrı bir tüpe ise sadece saf su eklenir.
- Bu sayede 0 µg/2 mL, 20 µg/2 mL, 40 µg/2 mL, 60 µg/2 mL, 80 µg/2 mL, 100 µg/2 mL konsantrasyonlarda glukoz çözeltileri elde edilir.
- 0 µg/2 mL konsantrasyonundaki tüp spektrofotometrede Abs ölçümünde kör olarak kullanılır.
- Hazırlanmış 0 µg/2 mL, 20 µg/2 mL, 40 µg/2 mL, 60 µg/2 mL, 80 µg/2 mL, 100 µg/2 mL konsantrasyonlardaki glukoz çözeltilerinden boş test tüplerine 2şer mL alınır.
- Üzerlerine 0,05 mL %80 lik fenol ilave edilir, karıştırılır.
- Daha sonra 5 mL H₂SO₄ tüplere hızlıca ilave edilir, tekrar karıştırılır.
- Tüpler oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

- Süre sonunda tüpler tekrar karıştırılır, spektrofotometre küvetlerine alınarak köre karşı 490 nm dalga boyunda Abs değerleri belirlenir.
- Elde edilen Abs değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçilerek çalışma grafiği hazırlanır.

Analiz örneği için

- Meyve suyu örneği 1:1000 oranında seyreltilir.
- Seyreltilmiş örnekten test tüpü içerisine 1 mL alınır ve üzerine 1 mL saf su eklenir (örnekdeki karbonhidrat konsantrasyonu, çalışma grafiği için hazırlanan glukoz konsantrasyonlarına denk getirilmiş olur).
- Test tüpü içerisindeki örnek üzerine 0,05 mL %80 lik fenol ilave edilir ve karıştırılır.
- Karıştırılan tüpe 5 mL H₂SO₄ hızlıca ilave edilir, tekrar karıştırılır ve oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.
- Süre sonunda tüp tekrar karıştırılır, spektrofotometre küvetlerine alınarak köre karşı 490 nm dalgaboyunda Abs değerleri belirlenir.

Hesaplama

Örneğin Abs değerine, çalışma grafiği üzerinde denk gelen konsantrasyon değeri belirlenir.

Seyreltme katsayısı ile çarpılarak örnekteki toplam karbonhidrat miktarı hesaplanır.

Kaynaklar

NELSEN, S. (2020). Gıda Analizleri (Çev. K. N. TURHAN), Ankara: Nobel.

YETİM, H., KESMEN, Z. (2008). Gıda Analizleri (Erciyes Analizleri Ders Yayınları No 163), Erciyes Üniversitesi Matbaası, Kayseri.

VIEL, M., COLLET, F., LANOS, C. (2018). Chemical and Multi-Physical Characterization of Agro-Resources' By-Product as a Possible Raw Building Material, *Industrial Crops and Products*, 120: 214-237.