

Azúcar blanco - Métodos de análisis - Parte 5: Determinación de azúcares reductores

Preámbulo

El Instituto Nacional de Normalización, INN, es el organismo que tiene a su cargo el estudio y preparación de las normas técnicas a nivel nacional. Es miembro de la INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) y de la COMISION PANAMERICANA DE NORMAS TECNICAS (COPANT), representando a Chile ante esos organismos.

La norma NCh1243/5 ha sido preparada por la División de Normas del Instituto Nacional de Normalización, y en su estudio participaron los organismos y las personas naturales siguientes:

Coca Cola de Chile S.A.
CORPORA Tres Montes

Dirección Nacional de Aduanas

Embotelladora Andina S.A.
Hipermercado JUMBO, Kennedy
Industria Azucarera Nacional S.A.

Industria de Alimentos DOS EN UNO Ltda.

Industrias Ambrosoli S.A.
Instituto de Salud Pública, ISP
Instituto Nacional de Normalización, INN
Ministerio de Agricultura, ODEPA
Ministerio de Salud Pública

Oscar Valenzuela
Marianela Bernal
Jeannette González
Jorge González
Luisa Harding
Verónica Santoro
René Valdés
Marcela Riveiro
Ricardo Cereceda
Orietta Rodríguez
Alejandro Gebauer
Rosa Rebeco
Luis Borie
Emilia Raymond
Ramona Villalón
Rebeca Iglesias
Luisa Kipreos

NCh1243/5

NABISCO Royal Chile
Servicio Nacional del Consumidor, SERNAC

Ema Arrieta
Miguel Valenzuela

Esta norma se estudió para actualizar el método de ensayo para la determinación de azúcares reductores en el azúcar blanco.

Esta norma ha sido aprobada por el Consejo del Instituto Nacional de Normalización, en sesión efectuada el 25 de Abril de 1996.

Esta norma ha sido declarada Norma Chilena Oficial de la República por Resolución N°345, de fecha 02 de Julio de 1996, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, publicada en el Diario Oficial N°35.517, del 16 de Julio de 1996.

Azúcar blanco - Métodos de análisis - Parte 5: Determinación de azúcares reductores

1 Alcance y campo de aplicación

Esta norma establece los siguientes métodos para la determinación de los azúcares reductores en el azúcar blanco:

- Método de Emmerich, como método de referencia
- Método de Knight y Allen, como método de rutina

2 Definiciones

2.1 azúcares reductores: D-glucosa, D-fructosa y otros compuestos reductores presentes en el azúcar blanco, que convencionalmente se expresan como azúcares reductores, cuando se determinan con los métodos descritos en la presente norma.

3 Método de Emmerich - Método de referencia

3.1 Principio

Para evitar la oxidación atmosférica, la determinación se realiza en una atmósfera de nitrógeno; bajo estas condiciones los azúcares reductores reducen el ácido 3,6-dinitroftálico a un derivado hidroxilamino. Esta sustancia, en presencia de oxígeno atmosférico y tiosulfato de sodio, es convertida a un compuesto anaranjado azo, cuya intensidad de color es proporcional a la cantidad de azúcares reductores.

NCh1243/5

3.2 Reactivos

3.2.1 Solución de ácido 3,6-dinitroftálico

Disolver sucesivamente en agua destilada, 1,00 g de ácido 3,6-dinitroftálico y 0,50 g de carbonato de sodio anhidro, mezclar en un matraz volumétrico de 500 ml y llevar a volumen con agua destilada. El reactivo debe mantenerse en una botella oscura.

3.2.2 Solución alcalina

Disolver sucesivamente en agua destilada, 100 g de carbonato de sodio anhidro y 25 g de tiosulfato de sodio pentahidratado, mezclar en un matraz volumétrico de 500 ml y llevar a volumen con agua destilada. Después de 3 días, filtrar la solución a través de papel filtro pre-lavado y almacenar en una botella oscura.

3.2.3 Sacarosa purificada

Preparar una solución de sacarosa, que tenga una concentración de 70 g de sacarosa/100 g de solución, calentando a 40°C, agua y azúcar refinada en las proporciones calculadas. Cuando se complete la disolución, enfriar y llevar a pH 8,0 con solución de carbonato de sodio. Filtrar la solución a través de vidrio sinterizado (tamaño de poro entre 90 y 150 µm). Adicionar al filtrado etanol libre de agua, lentamente y con agitación vigorosa, hasta que la relación entre el agua y el volumen de etanol sea 30:70. Al concluir esta adición, la solución debería verse clara o ligeramente turbia. Continuar mezclando en forma lenta durante 15 h adicionales; a continuación, centrifugar para separar los cristales finos de sacarosa que se han formado.

Lavar la sacarosa separada, con etanol al 70% y secar al aire. El rendimiento obtenido de sacarosa varía entre 50% y 60%.

Repetir el proceso de purificación una segunda vez.

Para la precipitación se puede usar etanol desnaturalizado con 10% de éter.

NOTA 1) La sacarosa purificada (libre de invertidos), grado para análisis, se puede adquirir en el comercio, recomendándose verificar que su contenido de azúcar invertido sea menor de 0,002%.

3.2.4 Solución estándar de azúcar invertido, 1 g/100 ml

Disolver 23,750 g de sacarosa purificada, en aproximadamente 120 ml de agua destilada. Agregar 9 ml de HCl concentrado (1,16 g/ml o 32 g/100 g), y mezclar con agitación suave durante la adición. Cubrir la boca del matraz con un vaso pequeño para prevenir la entrada de materias extrañas y dejar en reposo por un período suficiente de tiempo para completar la inversión de la sacarosa. Este período depende de las condiciones de temperatura; por ejemplo, la inversión está completa al dejar la solución durante 3 días a 20°C - 25°C u 8 días a 12°C - 15°C. A continuación llevar el volumen a 250 ml. Verificar mediante lectura sacarimétrica si se ha completado la hidrólisis. (-11,80 ± 0,05°Z a 20°C).

A 200 ml de esta solución (que contiene 10 g de azúcar invertido/100 ml), agregar con agitación, suficiente solución 1 N de hidróxido de sodio (aproximadamente 71,5 ml), que asegure que la solución, después de diluida a 2 000 ml, tenga una acidez aproximadamente 0,001 N con respecto al ácido clorhídrico. Disolver 4 g de ácido benzoico en agua tibia, agregarlo a la solución de azúcar invertido y mezclar. Dejar enfriar la solución y llevar a un volumen de 2 000 ml.

Esta solución, que contiene 1 g de azúcar invertido/100 ml, es una solución concentrada estable (solución madre), la cual debe diluirse inmediatamente antes de su uso.

NOTA 2) Puede emplearse glucosa o fructosa, grado para análisis, para preparar directamente la solución estándar de azúcar invertido.

3.2.5 Solución diluida de azúcar invertido

Preparar una solución apropiada que contenga 25 mg de azúcar invertido/100 ml, diluyendo la solución estándar de azúcar invertido (3.2.4), inmediatamente antes de usar.

3.3 Aparatos

3.3.1 Tubos de ensayo, de 16 mm x 160 mm, paredes delgadas y masa aproximadamente igual.

3.3.2 Cilindro de nitrógeno, equipado con un regulador de presión y conectado a un tubo con punta fina, para introducir al fondo de los tubos de ensayo.

3.3.3 Baño de agua, regulado a 80°C. Los tubos de ensayo se introducen en el baño de agua, en forma tal que el nivel del agua esté 1 cm más arriba del nivel de la solución que contiene cada tubo de ensayo.

3.3.4 Espectrofotómetro, para leer a 450 nm en celdas de 4 cm ó 5 cm de paso óptico.

3.4 Procedimiento

3.4.1 Preparación de la solución de ensayo

Se usan dos rangos de concentración. Disolver 25 g de la muestra de azúcar en agua destilada, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a volumen con agua destilada. Para azúcares que contienen 0 g a 0,025 g de azúcar invertido/100 g, usar para el ensayo la solución indicada anteriormente. Para azúcares que contienen 0,025 g a 0,15 g de azúcar invertido/100 g, diluir la solución transfiriendo 10 ml de la solución de la muestra hacia un matraz volumétrico de 100 ml y llevar a volumen con agua destilada.

3.4.2 Determinación

Transferir 2 ml de la solución de ensayo (3.4.1) a un tubo de ensayo; agregar 1 ml de la solución de ácido 3,6-dinitroftálico y a continuación 1 ml de la solución alcalina. Introducir

NCh1243/5

en el fondo del tubo de ensayo, el extremo del tubo de nitrógeno y dejar fluir suavemente el gas a través de la solución, durante 10 min.

Retirar el tubo de nitrógeno pero antes de sacarlo completamente, apoyar el extremo en la pared interior del tubo de ensayo, con el objeto de evitar cualquier pérdida de la solución de ensayo en la parte exterior del tubo de nitrógeno. No enjuagar el extremo del tubo de nitrógeno con agua destilada.

Colocar los tubos de ensayo en el baño de agua (ver 3.3.3) y mantener exactamente a 80°C durante 20 min. Después de enfriar en agua fría hasta temperatura ambiente, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml y llevar a volumen con agua destilada. Medir la absorbancia de la solución a 450 nm, en una celda de 4 ó 5 cm de paso óptico. Usar como referencia agua destilada libre de turbidez (filtrada a través de un filtro con tamaño de poro de 0,2 µm).

3.4.3 Estandarización

Con la sacarosa purificada (3.2.3), preparar soluciones como se indica en 3.4.1 pero antes de llevar a volumen, adicionar volúmenes de la solución diluida de azúcar invertido.

Para el rango de concentración 0 g a 0,025 g de azúcar invertido/100 g, el estándar superior en el tubo de ensayo, requiere 250 µg de azúcar invertido. Para el rango de concentración desde 0,025 g a 0,15 g de azúcar invertido/100 g, el estándar superior en el tubo de ensayo, requiere 150 µg de azúcar invertido. Analizar las soluciones como se indica en 3.4.2.

3.4.4 Resultados

Preparar una curva de calibración con los resultados de la estandarización (3.4.3). Colocar los µg de azúcar invertido en el eje de la abscisa y en el eje de la ordenada, la absorbancia/cm. La relación es esencialmente lineal para ambos rangos; se puede encontrar una leve curvatura hasta los 20 µg en el rango superior de contenido de azúcar invertido y hasta los 40 µg en el rango inferior.

4 Método de Knight y Allen - Método de rutina

4.1 Principio

Una solución del azúcar mezclada con un reactivo alcalino de cobre, es calentada en un baño de agua hirviendo. Los iones cúpricos son reducidos a óxido cuproso por los azúcares reductores presentes. Después de enfriar, los iones cúpricos remanentes son titulados con EDTA usando murexida como indicador.

4.2 Reactivos

Advertencias y precauciones de seguridad.

Se insta a los usuarios de este método a consultar la legislación de salud y seguridad antes de manipular estos reactivos; en particular, tomar precauciones para no inhalar el polvo fino de azul de metileno durante la molienda indicada en 4.2.3.

Usar reactivos grado analítico a menos que se especifique de otra manera.

4.2.1 Reactivo alcalino de cobre

Disolver 25 g de carbonato de sodio y 25 g de tartrato de sodio y potasio (sal de Rochelle), en aproximadamente 600 ml de agua, que contenga 40,0 ml de hidróxido de sodio 1,0 mol/L, en un matraz de 1 L. Disolver 6,000 g de sulfato cúprico pentahidratado ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) en aproximadamente 100 ml de agua y adicionar cuantitativamente a la solución alcalina de tartrato. Diluir la mezcla a 1 L y mezclar completamente.

4.2.2 Solución EDTA 0,0025 mol/L

Preparar una solución que contenga 0,930 g por litro de sal disódica del ácido etilendiaminotetra-acético (EDTA), en la cantidad que se requiera y descartar después de su uso.

Alternativamente, diluir 50 ml de solución EDTA 0,01 mol/L (disponible en el comercio) a 200 ml, según se requiera.

4.2.3 Indicador de murexida

Preparar moliendo conjuntamente 0,5 g de polvo de murexida (purpurato de amonio), con 0,15 g de polvo de azul de metileno y 40 g de cloruro de sodio. El indicador se almacena en mejor forma, en un desecador sobre sílica gel, ya que el ambiente húmedo tiende a aglomerarlo. La solución del indicador no es estable.

NOTA 3) La murexida y el azul de metileno están disponibles solamente como reactivos de propósito general o grados de indicador.

4.2.4 Sacarosa, que contenga menos de 0,002% de azúcares reductores (designada como "*libre de invertidos*").

4.3 Aparatos

4.3.1 Balanza, sensible a 2 mg.

4.3.2 Tubos de ensayo, de 150 mm x 20 mm.

4.3.3 Cápsula de porcelana blanca para titulación, que permite detectar con mayor facilidad el punto final.

NCh1243/5

4.3.4 Baños de agua, uno mantenido al punto de ebullición, preferiblemente con algún medio para sostener los tubos, por ejemplo perforaciones en la tapa, y otro para contener agua fría de la llave.

4.3.5 Buretas graduadas al 0,1 ml.

4.3.6 Pipetas

4.3.7 Instrumental usual de laboratorio

4.4 Procedimiento

4.4.1 Pesar exactamente 5,0 g de azúcar en un tubo de ensayo y disolver en 5 ml de agua destilada con agitación pero sin calentamiento. Agregar exactamente 2 ml del reactivo alcalino de cobre (4.2.1). Mezclar completamente el contenido del tubo y sumergir en el baño de agua hirviendo, durante 5 min, enfriar inmediatamente en el baño de agua fría.

4.4.2 Transferir el contenido del tubo y sus lavados a la cápsula de porcelana blanca y agregar aproximadamente 0,1 g del indicador empleando una espátula pequeña o una varilla de vidrio con un extremo aplanado.

4.4.3 Titular con la solución de EDTA (4.2.2), mientras se agita con una varilla de vidrio. El color cambia desde verde a gris y finalmente a púrpura. Se debe titular rápidamente hasta la primera aparición del color púrpura - ya que este color desaparecerá lentamente debido a oxidación - a una velocidad que depende en algún grado de la cantidad de óxido cuproso presente. Registrar el título como T ml.

NOTA 4) Si en cualquier momento durante la etapa de ebullición, el color azul-amarillo verdoso desaparece completamente, se debe repetir el análisis con menos muestra, preparada como se indicó anteriormente.

4.5 Cálculos

4.5.1 El contenido de azúcares reductores es obtenido de la tabla que se presenta a continuación, o bien y en forma preferente, empleando una curva de calibración derivada del análisis de sacarosa libre de invertidos (4.2.4), a la que se han adicionado cantidades conocidas de azúcares invertidos, siguiendo el procedimiento indicado en 4.4.

El método gráfico muestra que la relación es lineal hasta una concentración de 0,02 g de azúcares reductores por 100 g de sacarosa.

Tabla - Contenido de azúcares reductores

Volumen de titulación T ml de solución EDTA	% Azúcares reductores
1,7 - 2,2	0,017
2,3 - 2,9	0,016
3,0 - 3,6	0,015
3,7 - 4,2	0,014
4,3 - 4,8	0,013
4,9 - 5,5	0,012
5,6 - 6,2	0,011
6,3 - 6,8	0,010
6,9 - 7,5	0,009
7,6 - 8,1	0,008
8,2 - 8,7	0,007
8,8 - 9,4	0,006
9,5 - 10,1	0,005
10,2 - 10,7	0,004
10,8 - 11,3	0,003
11,4 - 11,8	0,002

4.5.2 Azúcares con un contenido mayor de 0,017%

Para muestras que tengan un contenido de azúcares reductores mayor que 0,017%, tomar cantidades reducidas de muestra y adicionar sacarosa libre de invertidos (4.2.4), para producir la alícuota estándar de 5 g para el análisis.

Llevar a cabo el análisis de acuerdo con el método descrito y multiplicar el resultado por el factor de dilución correspondiente.

NOTA 5) Si en cualquier momento durante la etapa de ebullición, el color azul-amarillo verdoso desaparece completamente, se debe repetir el análisis con menos muestra, preparada como se indicó anteriormente.

NORMA CHILENA OFICIAL

NCh 1243/5.Of96

INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION • INN-CHILE

Azúcar blanco - Métodos de análisis - Parte 5: Determinación de azúcares reductores

White sugar - Test Methods - Part 5: Determination of reducing sugars

Primera edición : 1996

Reimpresión : 1999

Descriptores: *azúcar, análisis químico, determinación de contenido*

CIN 67.18.10

COPYRIGHT ©1996 : INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACION - INN

* Prohibida reproducción y venta *

Dirección : Matías Cousiño N° 64, 6° Piso, Santiago, Chile

Casilla : 995 Santiago 1 - Chile

Teléfonos : + (56 2) 441 0330 • Centro de Documentación y Venta de Normas (5° Piso) : + (56 2) 441 0425

Telefax : + (56 2) 441 0427 • Centro de Documentación y Venta de Normas (5° Piso) : + (56 2) 441 0429

Internet : inn@entelchile.net

Miembro de : ISO (International Organization for Standardization) • COPANT (Comisión Panamericana de Normas Técnicas)