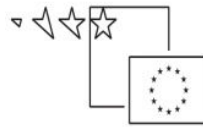




REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad

ŽIVILSKA KEMIJA Z ANALIZO ŽIVIL in ANALIZA ŽIVIL

ALENKA HMELAK GORENJAK

Višješolski strokovni program: Živilstvo in prehrana
Učbenik: Živilska kemija z analizo živil (2. del) in Analiza živil
Gradivo za 1. in 2. letnik

Avtorica:

Alenka Hmelak Gorenjak, univ. dipl. inž. živ. tehnolog.
IZOBRAŽEVALNI CENTER PIRAMIDA MARIBOR
Višja strokovna šola

Strokovni recenzent:

dr. Tomaž Langerholc, univ. dipl. inž. kemije

Lektor:

Miroslav Nidorfer, prof. slov., bibl. spec.

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana

Izdajatelj: Konzorcij višjih strokovnih šol za izvedbo projekta IMPLETUM
Založnik: Zavod IRC, Ljubljana.
Ljubljana, 2010

Strokovni svet RS za poklicno in strokovno izobraževanje je na svoji ____ seji dne ____ na podlagi 26. člena Zakona o organizaciji in financiranju vzgoje in izobraževanja (Ur. l. RS, št. 16/07-ZOFVI-UPB5, 36/08 in 58/09) sprejel sklep št. _____ o potrditvi tega učbenika za uporabo v višješolskem izobraževanju.

© Avtorske pravice ima Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije.

Gradivo je sofinancirano iz sredstev projekta Impletum 'Uvajanje novih izobraževalnih programov na področju višjega strokovnega izobraževanja v obdobju 2008–11'.

Projekt oz. operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo RS za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, razvojne prioritete 'Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja' in prednostne usmeritve 'Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja'.

Vsebina tega dokumenta v nobenem primeru ne odraža mnenja Evropske unije. Odgovornost za vsebino dokumenta nosi avtor.

KAZALO

PREDGOVOR	3
1 GRAVIMETRIČNA ANALIZA	5
1.1 POTEK GRAVIMETRIČNE ANALIZE	5
1.2 GRAVIMETRIČNI IZRAČUN.....	6
1.3 LITERATURA IN DODATNO BRANJE.....	9
1.4 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA SAMOEVALVACIJO ZNANJA	9
2 VOLUMetriJA	10
2.1 OSNOVNI PRINCIP TITRACIJE	10
2.1.1 Pogoji za izvedbo titracije.....	10
2.1.2 Standardna raztopina.....	11
2.1.3 Razdelitev volumetričnih metod	11
2.2 VOLUMETRIČNI IZRAČUN	12
2.2.1 Splošni izračun volumetrične analize.....	13
2.2.2 Volumetrični izračun pri standardizaciji	15
2.2.3 Volumetrični izračun pri povratni titraciji	16
2.3 NEVTRALIZACIJSKA TITRACIJA	17
2.3.1 Titracija močne kisline z močno bazo	17
2.3.2 Indikatorji.....	19
2.3.3 Titracije šibke kisline z močno bazo.....	20
2.3.4 Titracije šibke baze z močno kislino.....	21
2.3.5 Titracije poliprotičnih kislín.....	22
2.3.6 Nevtralizacijska titracija v nevodnem mediju	22
2.4 OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKA TITRACIJA	23
2.4.1 Titracijska krivulja	23
2.4.2 Indikatorji redoks titracije	24
2.4.3 Standardne raztopine oksidantov	25
2.4.4 Standardne raztopine reductentov.....	26
2.5 OBARJALNA TITRACIJA	27
2.5.1 Titracijska krivulja.....	27
2.5.2 Indikatorji.....	28
2.6 KOMPLEKSOMETRIČNA TITRACIJA	29
2.6.1 Standardne raztopine	29
2.6.2 Titracijska krivulja.....	30
2.6.3 Indikatorji.....	31
2.7 LITERATURA IN DODATNO BRANJE.....	32
2.8 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA SAMOEVALVACIJO.....	33
3 INSTRUMENTALNA ANALIZA	34
3.1 ELEKTROKEMIJSKE METODE	35
3.1.1 Elektrokemijska celica.....	35
3.1.2 Potenciometrija.....	38
3.1.3 Povzetek s preverjanjem znanja	41
3.2 SPEKTROMetriJA	43
3.2.1 Elektromagnetno valovanje.....	43
3.2.2 Kvantitativno vrednotenje	46
3.2.3 Spektrometer	48
3.2.4 Spektrofluorometrija	51
3.2.5 Atomska spektrometrija.....	52
3.2.6 Povzetek s preverjanjem znanja	53
3.3 KROMATOGRAFIJA	55
3.3.1 Tankoplastna kromatografija.....	56
3.3.2 Tekočinska kromatografija.....	59
3.3.3 Plinska kromatografija.....	61

3.3.4 Povzetek s preverjanjem znanja	64
3.4 ELEKTROFOREZA	66
3.4.1 Papirna elektroforeza.....	67
3.4.2 Gelska elektroforeza.....	68
3.4.3 Povzetek s preverjanjem znanja	70
3.5 LITERATURA IN DODATNO BRANJE.....	71
3.6 VPRAŠANJA ZA SAMOEVALVACIJO ZNANJA.....	74
4 ANALIZA ŽIVIL.....	75
4.1 DOLOČANJE KOLIČINE VODE	76
4.1.1 Določanje vode s sušenjem	77
4.1.2 Določanje vode z destilacijo	78
4.1.3 Kemijske metode določanja vode	79
4.1.4 Fizikalne metode	80
4.1.5 Povzetek s preverjanjem znanja	80
4.2 MINERALNE SNOVI	81
4.2.1 Suhi sežig.....	81
4.2.2 Moker sežig	83
4.2.3 Določanje posameznih mineralnih snovi	84
4.2.4 Povzetek s preverjanjem znanja	85
4.3 BELJAKOVINE IN AMINOKISLINE	86
4.3.1 Indirektne metode – metoda po Kjeldahlu.....	87
4.3.2 Značilne barvne reakcije s proteini.....	90
4.3.3 Formolna titracija.....	90
4.3.4 Ostale metode določanja beljakovin	91
4.3.5 Določanje aminokislin.....	91
4.3.6 Povzetek s preverjanjem znanja	92
4.4 MAŠČOBE.....	94
4.4.1 Določanje količine maščob	94
4.4.2 Določanje kvara maščobe	96
4.4.3 Določanje kemijskih in fizikalnih konstant.....	98
4.4.4 Določanje sestave maščobe.....	99
4.4.5 Določanje pristnosti maščob.....	99
4.4.6 Holesterol.....	100
4.4.7 Povzetek s preverjanjem znanja	101
4.5 OGLJIKOVI HIDRATI.....	102
4.5.1 Priprava vzorca.....	103
4.5.2 Določanje monosaharidov in oligosaharidov	103
4.5.3 Dokazovanje in določanje polisaharidov.....	106
4.5.4 Pektinske snovi.....	108
4.5.5 Povzetek s preverjanjem znanja	108
4.6 ADITIVI.....	110
4.6.1 Določanje konzervansov	111
4.6.2 Določanje barvil.....	112
4.6.3 Določanje umetnih sladil	112
4.6.4 Natrijev glutaminat	112
4.6.5 Ostali aditivi.....	113
4.6.6 Povzetek s preverjanjem znanja	113
4.7 LITERATURA IN DODATNO BRANJE.....	114
4.8 EVALVACIJA ZNANJA.....	116

PREDGOVOR

Pred vami je gradivo Analiza živil, namenjeno kot študijsko gradivo 1. letnika pri predmetu Živilska kemija z analizo živil in 2. letnika za izbirni modul Analiza živil. Posamezna podpoglavja so primerna tudi kot dopolnilno študijsko gradivo pri predmetu Sestava in kakovost živil s tehnologijami v živilstvu. Z izdanim gradivom želim, da študentje spoznate teoretična znanja, ki vam bodo omogočala spoznati, razumeti in izvesti različne laboratorijske tehnike kemijske in instrumentalne analize. Pričakujem, da boste pridobili ustrezna znanja, da se boste kot diplomanti višje strokovne šole lahko vključevali k zagotavljanju kakovosti živil in varne prehrane.

Gradivo je razdeljeno na štiri osnovna poglavja:

V prvem delu (poglavji ena in dva) so teoretično obdelane osnove klasičnih analiznih metod. Gravimetrične in volumetrične analizne metode, kljub silovitemu razvoju instrumentalnih metod in laboratorijski avtomatizaciji, ostajajo v laboratorijih v svoji prvotni obliki ali pa so posodobljene z večjo občutljivostjo. Klasične analizne metode pogosto služijo za umerjanje sodobnih instrumentalnih metod.

Instrumentalne analizne metode so opisane v tretjem poglavju. Poleg kemijskih principov pri instrumentalnih metodah izkoriščamo še spremembe fizikalnih lastnosti določenega merjenega sistema. Tako se od uporabnikov instrumentalnih metod, razen osnovnega znanja iz kemije, zahteva še znanje iz fizike, z vedno večjo avtomatizacijo, pa tudi poznavanje osnov elektronike in računalništva. V gradivu so podane osnove instrumentalnih analiznih metod, ki se najpogosteje uporabljajo v analizi živil.

V zadnjem delu gradiva (poglavje štiri) so opisane analizne metode za posamezne sestavine živila. Kemijsko je živilo zmes organskih in anorganskih sestavin. Pri živilu govorimo o hranilni sestavi, ki je večinoma zmes različnih hranilnih sestavin. Iz količine, vrste in razmerja posameznih hranilnih sestavin pa lahko sklepamo na biološko in energijsko vrednost živila. Zraven hranilnih snovi so v živilu še številne druge sestavine bodisi naravno prisotne ali dodane med pridelavo ali med tehnološkim postopkom. Z natančno analizo živil želimo zagotoviti ustreznost živila v smislu varovanja potrošnika, zagotavljanja kakovosti živil kot tudi za kontrolo procesa proizvodnje s čim manjšim izmetom.

Vprašanja na koncu poglavja naj vam služijo kot pomoč, da izluščite bistvo; dodatna navedena literatura pa, da z njeno pomočjo poglobite znanja, kjer je vaš interes po znanju večji, kot vam ga lahko ponudi višješolsko gradivo.

Želim vam uspešen študij!

Alenka Hmelak Gorenjak

1 GRAVIMETRIČNA ANALIZA

Gravimetrična analiza je ena izmed najbolj točnih in natančnih metod makro kvantitativne analize. Osnova metode je, da analit izločimo iz vzorca in ga stehtamo. V analizi živil pogosto uporabljamo gravimetrične metode (določanje vode – indirektno s sušenjem, mineralnih snovi – s sežigom, maščob – z ekstrakcijo z organskim topilom ...).

V analizi kemiji je med gravimetričnimi metodami gotovo najpomembnejša gravimetrična obarjalna metoda. Pri tej metodi analit selektivno izločimo v obliki netopne oborine in ga po sušenju oz. žarenju tehtamo.

1.1 POTEK GRAVIMETRIČNE ANALIZE

Za izvedbo kvantitativne obarjalne gravimetrične metode niso primerne vse kemijske reakcije, pri katerih nastanejo težko topne oborine. Izpolnjeni morajo biti naslednji pogoji:

- kvantitativna in selektivna reakcija obarjanja,
- netopnost oborine v reakcijski zmesi in raztopini za izpiranje,
- oborina je konstantne, točno definirane sestave in
- onečiščenje oborine z drugimi ioni mora biti čim manjše oz. poznano.

Točnost metode je v veliki meri odvisna od pravilnega postopka obarjanja in ravnanja z oborino.

Gravimetrična analiza poteka v naslednjih korakih:

1. Priprava raztopine
2. Obarjanje
3. Rast kristalov
4. Filtracija
5. Izpiranje oborine
6. Sušenje ali (in) žarenje
7. Tehtanje
8. Izračun

1. Priprava raztopine

Pri pripravi raztopine upoštevamo pogoje, ki morajo biti izpolnjeni za kvantitativno analizo. Raztopina mora biti ustrezno razredčena, da se zmanjša pojav soobarjanja. V nekaterih primerih uravnavamo tudi pH raztopine, saj se lahko topnost oborine v raztopinah z večjo koncentracijo vodikovih ali hidroksidnih ionov poveča zaradi reakcije kationa ali aniona z H^+ in OH^- ioni iz raztopine.

2. Obarjanje

Potek obarjanja mora biti takšen, da se tvorijo čim večji kristali, ki se hitro filtrirajo in dobro izpirajo. Reagent za obarjanje zato dodajamo počasi in reakcijsko zmes mešamo tako, da se reagent enakomerno porazdeli po raztopini, nastane le malo jeder in se oborina izloči v obliki večjih kristalčkov. Na velikost delcev oborine vplivata še temperatura raztopine in hitrost

mešanja.

3. Rast kristalov

Po začetni fazi obarjanja sledi faza rasti kristalov. Iz majhnih kristalov zrastejo veliki kristali. Pri nepravilnem obarjanju pa imamo v raztopini veliko manjših kristalov (velikosti od 1 do 100 μm), ki jih zelo težko ločimo z običajnimi filternimi sredstvi iz oborine.

4. Filtracija

Poteka hitro in enostavno, če je oborina izločena v obliki velikih kristalov.

5. Soobarjanje in izpiranje oborine

Proces nastajanja oborine spremljajo pojavi soobarjanja, ki povzročajo onečiščenje oborine z drugimi ioni iz raztopine. Vzrok za soobarjanje je lahko **adsorpcija** topnih primesi na oborino ali **okluzija** – vključevanje drugih ionov v oborino. Adsorpcijo preprečimo z izpiranjem oborine, običajno z destilirano vodo. Okluzijo pa preprečimo z obarjanjem iz razredčenih raztopin.

6. Sušenje in žarenje oborine

Če se pri reakciji izloči oborina znane in stehiometrične sestave, jo po filtraciji samo osušimo in stehtamo. Če pa sestava ni znana ali obstojna (veže vlago ali ogljikov dioksid iz ozračja), jo po sušenju še prežarimo.

1.2 GRAVIMETRIČNI IZRAČUN

Pri gravimetričnem izračunu moramo upoštevati, da analit ni identičen tehtani oborini. Izračunati moramo maso iskanega analita iz mase oborine. Pri tem si pomagamo z **gravimetričnim faktorjem**, ki predstavlja razmerje med molsko maso analita in molsko maso oborine, pri katerem izenačimo število molov analita in oborine:

$$F = \frac{M \text{ analita (g/mol)} \cdot a}{M \text{ oborine (g/mol)} \cdot b}$$

Primer:

Če določamo Cl_2 v vzorcu in ga oborimo kot AgCl , je teža Cl_2 , ki jo dobimo iz 1 g AgCl , enaka:

$$g \text{ Cl}_2 = m \text{ AgCl} \cdot (M \text{ Cl}_2 / M \text{ AgCl}) \cdot (1/2)$$

$$g \text{ Cl}_2 = m \text{ AgCl} \cdot \frac{M(\text{Cl}_2) \text{ (g/mol)}}{M(\text{AgCl}) \text{ (g/mol)}} \cdot \frac{1}{2}$$

$$= m \text{ AgCl} \cdot f$$

$$= 1 \text{ g AgCl} \cdot 0.2473 \text{ g} \cdot \frac{\text{g Cl}_2}{\text{g AgCl}}$$

Pogosto nas pri gravimetrični analizi zanima odstotek analita v zatehtanem vzorcu:

$$\% \text{ analita} = \frac{m \text{ analita}}{m \text{ vzorca}} \cdot 100\%$$

Maso analita dobimo iz mase zatehtane oborine in gravimetričnega faktorja:

$$m \text{ analita} = m \text{ oborine} \cdot f \quad \text{iz tega sledi, da je}$$

$$\% \text{ analita} = \frac{m \text{ oborine} \cdot f}{m \text{ vzorca}} \cdot 100\%$$

Primer:

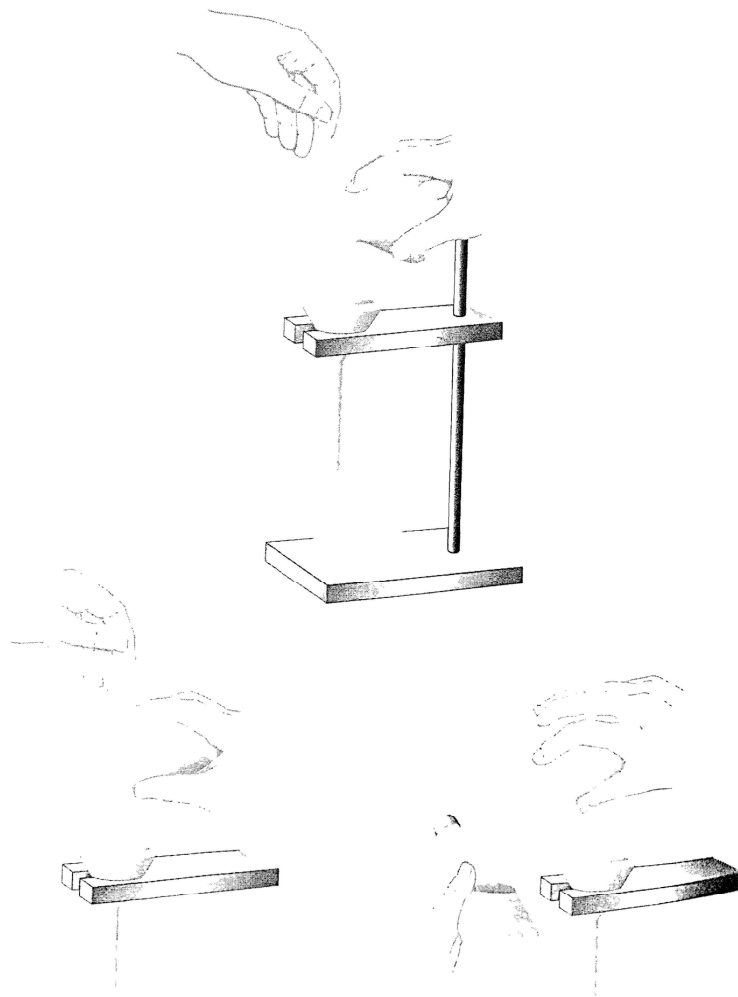
Zatehtamo 1.52 g vzorca in v njem določamo % Mn in Mn₂O₃. Masa tehtane oborine Mn₃O₄ je 0.126 g.

$$\% \text{ Mn}_2\text{O}_3 = 0.126 \text{ g} \cdot \frac{M(\text{Mn}_2\text{O}_3)}{M(\text{Mn}_3\text{O}_4)} \cdot \frac{3}{1} \cdot 100\%$$

$$= 0.126 \text{ g} \cdot \frac{157.9}{228.8 \cdot 1.52 \text{ g}} \cdot \frac{3}{1} \cdot 100\% = 8.58 \%$$

$$\% \text{ Mn} = 0.126 \text{ g} \cdot \frac{M(\text{Mn})}{M(\text{Mn}_3\text{O}_4)} \cdot \frac{3}{1} \cdot 100\%$$

$$= 0.126 \text{ g} \cdot \frac{54.94}{228.8 \cdot 1.52 \text{ g}} \cdot \frac{3}{1} \cdot 100\% = 5.97 \%$$



Slika 1: Tehnika prenašanja oborine na filter papir
Vir: Gary, 1994, 666



Slika 2: Analizna tehtnica
Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Gravimetric_analysis (2. 6. 2009)

1.3 LITERATURA IN DODATNO BRANJE

Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. Fourth Edition. New York: W.H. Freeman and company, 1996.

Gary, D. C. *Analytical Chemistry*. Fifth Edition. New York: John Wiley & Sons, 1994.

Gorenc, D., et al. *Analizna kemija: gravimetrična in volumetrična analiza*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1994.

Skoog, D.A., et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Thomson Brooks Cole, 2004.

Gravimetric analysis (online). (citirano 2. 6. 2010). Dostopno na naslovu:
http://en.wikipedia.org/wiki/Gravimetric_analysis

1.4 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA SAMOEVALVACIJO ZNANJA

Osnova gravimetrične metode je, da analit, ki ga določamo, izločimo iz vzorca (raztopine) in ga stehtamo. Princip gravimetrične obarjalne metode je obarjanje analita s pomočjo obarjalnega reagenta in tehtanje izločene oborine. Metoda poteka v več korakih. Masa tehtane oborine ni identična masi analita. Masa analita dobimo s pomočjo gravimetričnega izračuna.

- Navedite pogoje, ki morajo biti izpolnjeni za izvedbo gravimetrične obarjalne metode.
- Naštejte faze dela gravimetrične obarjalne metode.
- Navedite možne napake metod in kako jih preprečimo.
- Izračunajte maso analita, če smo določali železo s pomočjo gravimetrične obarjalne metode in stehtali oborino Fe_2O_3 , ki je znašala 0,5452g. Koliko % Fe se nahaja v vzorcu, če smo ga za analizo zatehtali 3,4125 g?
- Računske primere kemijskega računanja (gravimetrična analiza) poiščite v naslednji literaturi:
- Sodja Božič, J. *Kemijsko računanje: učbenik*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1990.
- Sodja Božič, J. *Kemijsko računanje: zbirka nalog*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1991.

2 VOLUMETRIJA

Osnovni postopek pri volumetrični analizi imenujemo **titracija**. Titracija je nepogrešljiva metoda tudi pri analizi živil. V živilih pogostokrat določamo s titracijo vsebnost kislin, kislinsko stopnjo, kvar maščob, vsebnost vitamina C, trdoto vode ...

Spada med najbolj pogosto uporabljene analitične metode, predvsem zaradi hitrosti in enostavnosti analitičnega postopka. Danes se v laboratorijih z velikim številom analiz uporablja avtomatska titracija. Titracija je avtomatizirana pri določanju konca titracije (ekvivalentne točke), ki se lahko določa na različne načine (tudi s pH-metrom). Kadar se dopolnjuje z občutljivimi instrumentalnimi tehnikami, je primerna tudi za določanje nižjih količin vsebnosti analitov v vzorcu.

2.1 OSNOVNI PRINCIP TITRACIJE

Med titracijo poteka kemijska reakcija med našim vzorcem (analitom) in raztopino, katere koncentracija ja znana – imenujemo jo **standardna raztopina**, pogosto tudi **titrant**. Standardno raztopino običajno nalijemo v bireto. Poznati moramo stehiometrično razmerje (kemijsko reakcijo) med analitom in titrantom in po končani titraciji (imamo znan volumen titranta in analita) lahko izračunamo koncentracijo našega analita.

2.1.1 Pogoji za izvedbo titracije

1. Reakcija med analitom in titrantom mora biti **definirana in poznana**.
2. Reakcija mora biti **hitra**. Večina ionskih reakcij poteka zelo hitro.
3. Ne smejo potekati stranske reakcije.
4. Konec reakcije mora biti **jasno zaznaven** (s pomočjo indikatorja, spremembo barve standardne raztopine, merjenjem pH-vrednosti ...)
5. **Ekvivalentna točka** je takrat, ko v reakciji dodamo ekvivalentno (stehiometrično) količino titranta – to je obenem konec kemijske reakcije. **Končna točka** titracije pa je takrat, ko detektiramo konec titracije. Končna točka titracije se mora ujemati z ekvivalentno točko titracije.
6. Reakcija mora potekati **kvantitativno**.

2.1.2 Standardna raztopina

Standardne raztopine pripravljamo z raztapljanjem natančno zatehtanih izredno čistih substanc, ki jih imenujemo **primarni standard**. Kadar nimamo na razpolago čiste substance, pripravimo približno koncentracijo raztopine in jo standardiziramo v postopku titracije z zatehtanim primarnim standardom (Primer standardizacija HCl z Na_2CO_3).

1. Primarni standard mora biti **100 % čist**, čeprav se dopušča od 0,01 do 0,02 % nečistoč.
2. Primarni standard mora biti **stabilen** pri temperaturi sušenja in neomejen čas na sobni temperaturi. Pred tehtanjem ga moramo vedno posušiti.
3. Vedno mora biti **dosegljiv**.
4. Priporočljivo je, da ima **visoko molsko maso**.
5. Če želimo primarni standard uporabiti pri titraciji, mora izpolnjevati vse **zahteve**, ki smo jih navedli **za titracijo**.

2.1.3 Razdelitev volumetričnih metod

1. NEVTRALIZACIJSKA TITRACIJA

Številne spojine tako organske kot anorganske, kisle ali bazične lahko titriramo s standardno raztopino močne kisline ali močne baze. Končno točko titracije lahko enostavno zaznamo z ustreznim indikatorjem ali z merjenjem spremembe pH vrednosti. Kislost in bazičnost mnogih organskih spojin je ojačana s titracijo v brezvodnih raztopinah. Tako lahko dobimo bolj jasno končno točko titracije in je možno titrirati tudi šibkejške kisline in baze.

2. OBARJALNA TITRACIJA

Pri obarjalni titraciji tvori titrant netopen produkt (oborino) z analitom. Primer je titracija kloridnega iona s standardno raztopino srebrovega nitrata. Končno točko lahko ugotovimo s pomočjo indikatorja ali pa z merjenjem potenciala raztopine.

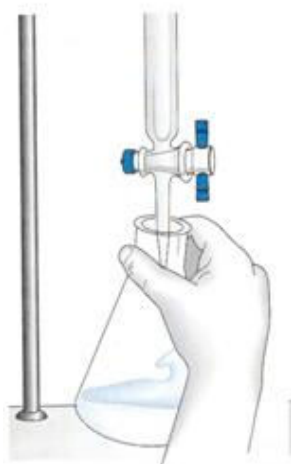
3. KOMPLEKSOMETRIČNA TITRACIJA

Pri kompleksometrični titraciji uporabimo kot titrant kompleksno spojino, ki tvori z analitom (kovinskimi ioni) v vodi topne komplekse. Titrant je pogosto kelat. Pogosto se uporablja kot standardna raztopina etilendiamintetraocetna kislina (EDTA). Reagira z številnimi elementi, reakcijo lahko spremljamo z merjenjem pH. Kot indikatorji se uporabljajo spojine, ki tvorijo s kovinskimi ioni obarvan kompleks.

4. OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKA TITRACIJA (REDOKS TITRACIJA)

Osnova je reakcija med oksidanti, ki v reakciji sprejemajo elektrone in reducenti, ki jih oddajajo. Titrant je reducent, kadar titriramo vzorec oksidanta in obratno oksidant, kadar titriramo vzorec reducenta. Za jasno detektirano končno točko titracije je pogoj, da je velika razlika med potencialom oksidanta in reducenta - to pomeni, da ima oksidant veliko afiniteto po sprejemanju elektronov, reducent pa po oddajanju. Končno točko detektiramo

z uporabo indikatorja ali elektrometrično.



Slika 3: Volumetrijo uvrščamo med klasične analizne metode

Vir: <http://www.chem.bg.ac.yu/hf/katedre/analitika/index.html> (2. 10. 2009)

2.2 VOLUMETRIČNI IZRAČUN

Osnovna dejavnost v vseh analitskih laboratorijih je kvantitativno določanje različnih analitov. Rezultate meritev podajamo v različnih koncentracijah. Meritve koncentracije posameznih sestavin v vzorcu lahko opravimo z merjenjem volumna raztopin s točno določeno koncentracijo, ki jih moramo predhodno pripraviti, izračunamo maso produkta, izhajajoč iz mase reaktanta, ali pa iz mase produkta izračunamo količino vzorca ... Pri vseh analitskih postopkih je torej nujno poznavanje stehiometričnega računanja.

Množinska koncentracija (c)

je definirana kot množina topljenca na volumsko enoto raztopine, v kateri se topljenec nahaja:

$$c(A) = \frac{n(A)}{V_r} \quad \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \text{ ali } \left[\frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \right]$$

Izrazimo količine še drugače !

$$n = c \cdot V_r \quad \left[\text{mol} = \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot \text{L} \text{ ali } \text{mmol} = \frac{\text{mmol}}{\text{mL}} \cdot \text{mL} \right]$$

$$m = n \cdot M \quad \left[\text{g} = \text{mol} \cdot \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] \quad \text{ali}$$

$$m = c \cdot V_r \cdot M \quad \left[\text{g} = \frac{\text{mol}}{\text{L}} \cdot \text{L} \cdot \frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]$$

n – množina snovi [mol]

m – masa snovi [g]

V_r – volumen raztopine [L]

M – molska masa $[\frac{g}{mol}]$

Masni delež (w)

- v tekočini: je definiran kot masa topljenca v 100 g raztopine;
- v trdni zmesi: je definiran kot masa posamezne komponente v 100 g zmesi.

Masni delež analita v raztopini:

$$w(a) = \frac{m(a)}{m_{\text{razt.}}} \cdot 100\% \quad [\%] \quad \text{ali}$$

$$w(a) = \frac{n(a) \cdot M(a)}{m_{\text{razt.}}} \cdot 100\% \quad [\%]$$

Masni delež analita v zmesi:

$$w(a) = \frac{m(a)}{m_{\text{zmesi}}} \cdot 100\% \quad [\%] \quad \text{ali}$$

$$w(a) = \frac{n(a) \cdot M(a)}{m_{\text{zmesi}}} \cdot 100\% \quad [\%]$$

Masna koncentracija (γ)

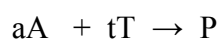
Je definirana kot masa topljenca na enoto prostornine raztopine.

$$\gamma(a) = \frac{m(a)}{V_r} \quad [\frac{g}{L}] \quad \text{ali}$$

$$\gamma(a) = \frac{n(a) \cdot M(a)}{V_r} \quad [\frac{g}{L} = \frac{mol \cdot g}{L \cdot mol}]$$

2.2.1 Splošni izračun volumetrične analize

Stehiometrično razmerje med vzorcem (analitom) in standardno raztopino (titrantom) ni vedno 1 : 1. Splošno lahko zapišemo kemijsko reakcijo, ki poteka med titracijo:



kjer je A analit, T titrant in P produkt kemijske reakcije.

$$n_A = n_T \cdot \frac{a}{t} \left(\frac{\text{molA}}{\text{molT}} \right)$$

$$n_A = c_T \cdot V_T \cdot \frac{a}{t} \left(\frac{\text{molA}}{\text{molT}} \right)$$

$$m_A = n_A \cdot M_A$$

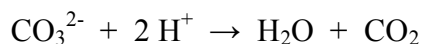
$$m_A = c_T \cdot V_T \cdot \frac{a}{t} \left(\frac{\text{molA}}{\text{molT}} \right) \cdot M_A$$

Tako lahko po končani titraciji **izračunamo katerokoli koncentracijo** (masni delež, množinsko in masno koncentracijo) analita **iz podatkov o standardni raztopini** (volumen, koncentracija) in **volumna analita**.

Primer 1 :

0,2638 g vzorca analiziramo na vsebnost Na₂CO₃ s titracijo s HCl. Pri titraciji porabimo 38.27 mL standardne raztopine z množinsko koncentracijo 0.1288 mol/L. Vsebnost Na₂CO₃ v vzorcu izrazimo v %.

Kemijska reakcija, ki poteka:



$$n_A = n_T \cdot \frac{a}{t} \left(\frac{\text{molA}}{\text{molT}} \right)$$

$$n_{\text{CO}_3^{2-}} = n_{\text{HCl}} \cdot \frac{1}{2}$$

$$n_{\text{CO}_3^{2-}} = c_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}} \cdot \frac{1}{2}$$

$$m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = c_{\text{HCl}} \cdot V_{\text{HCl}} \cdot \frac{1}{2} \cdot M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}$$

$$m_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0.1288 \text{ mol/L} \cdot 0.03827 \text{ L} \cdot \frac{1}{2} \cdot 105.99 \text{ g/mol} = 0.2612 \text{ g}$$

$$\% \text{Na}_2\text{CO}_3 = \frac{m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{m_{\text{vzorca}}} \cdot 100\%$$

$$\% \text{Na}_2\text{CO}_3 = \frac{0.2612 \text{ g}}{0.2638 \text{ g}} \cdot 100\% = 99.02 \%$$

2.2.2 Volumetrični izračun pri standardizaciji

Pogosto pripravimo v laboratoriju raztopine s približno koncentracijo, ki jim potem v postopku standardizacije določimo s pomočjo primarnih standardov točno koncentracijo.

$$n_{p.\text{stand.}} = \frac{m_{p.\text{stand.}}}{M_{p.\text{stand.}}}$$

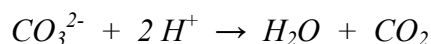
$$n_t = n_{p.\text{stand.}} \cdot \frac{t}{a}$$

$$c_t = \frac{n_{p.\text{stand.}} \cdot \frac{t}{a}}{V_t}$$

Primer 2:

Pripravimo raztopino HCl s približno koncentracijo 0,1 mol/L. V postopku standardizacije ji določimo točno koncentracijo s titracijo 0,1876 g posušenega Na₂CO₃. Poraba HCl pri titraciji je 35,86 mL.

Kemijska reakcija:



$$n_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = \frac{m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}$$

$$n_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = \frac{0.1876 \text{ g}}{105.99 \text{ (g / mol)}} = 1.7699 \text{ mmol}$$

$$n_{\text{HCl}} = n_{\text{Na}_2\text{CO}_3} \cdot 2$$

$$c_{\text{HCl}} = \frac{1.7699 \text{ mmol} \cdot 2}{35.86 \text{ mL}} = 0.09871 \text{ mol / L}$$

ali kombiniramo vse korake:

$$c_t = \frac{\frac{m_{\text{Na}_2\text{CO}_3}}{M_{\text{Na}_2\text{CO}_3}} \cdot 2}{V_{\text{HCl}}} \quad \text{sledi:} \quad c_t = \frac{0.1876 \text{ g} \cdot 2}{105.99 \cdot 1} \cdot \frac{1}{35.86 \text{ mL}} = 0.09871 \text{ mol / L}$$

2.2.3 Volumetrični izračun pri povratni titraciji

Kadar kemijska reakcija med standardno raztopino in našim analitom poteka počasi in končna točka ni jasna, uporabimo povratno titracijo. Pri tej tehniki dodamo našemu vzorcu ustrezen reagent v presežku, ki ga potem titriramo s standardno raztopino. Izvedemo še titracijo količine celotnega reakcijskega reagenta, tako da dobimo znano množino snovi, ki smo jo dodali našemu vzorcu. Iz razlike celotne množine snovi dodanega reagenta in množine snovi presežka reagenta dobimo množino snovi reagenta, ki je reagiral z našim vzorcem - reakcijskega reagenta.

$$n_{\text{reakcijski reagent}} = n_{\text{celotne}} - n_{\text{povratne titracije}}$$

$$m_a = n_{\text{reakcijski reagent}} \cdot \frac{a}{r} \cdot M_a$$

$\frac{a}{r}$ - stehiometrično razmerje analit/reagent

Primer 3:

Kromov(III) ion reagira počasi z EDTA, zato ga določamo s povratno titracijo. Zatehtamo 2.63 g vzorca, ki vsebuje Cr^{3+} ione in mu dodamo 5.00 mL EDTA s koncentracijo 0.0103 mol/L. Izvedemo povratno titracijo s standardno raztopino Zn^{2+} s koncentracijo 0.0112 mol/l in ga porabimo 1.32 mL. Kolikšen % kromovega klorida (CrCl_3) vsebuje vzorec?

Stehiometrično razmerje med Cr^{3+} in Zn^{2+} ioni z EDTA je 1 : 1

$$n_{\text{celotne EDTA}} = c_{\text{EDTA}} \cdot V_{\text{EDTA}} = 0.0103 \text{ mol/L} \cdot 0.005 \text{ L} = 0.0515 \text{ mmol}$$

količina nezreagiranega EDTA je naslednja:

$$n_{\text{prebitni}} = n_{\text{Zn}} = c_{\text{Zn}} \cdot V_{\text{Zn}} = 0.0112 \text{ mol/L} \cdot 0.00132 \text{ L} = 0.0148 \text{ mmol}$$

množina snovi zreagiranega EDTA je torej:

$$n_{\text{celotne EDTA}} - n_{\text{prebitni}} = 0.0367 \text{ mmol EDTA} = n_{\text{Cr}^{3+}}$$

$$\% \text{CrCl}_3 = \left(\frac{m_{\text{CrCl}_3}}{m_{\text{vzorca}}} \right) \cdot 100 \%$$

$$\% \text{CrCl}_3 = \left(\frac{n_{\text{CrCl}_3} M_{\text{CrCl}_3}}{m_{\text{vzorca}}} \right) \cdot 100 \%$$

$$\% \text{CrCl}_3 = \frac{0.0367 \text{ mola} \cdot 158.4 \text{ g/mol}}{2.63 \text{ g}} \cdot 100 \% = 0.221 \%$$

2.3 NEVTRALIZACIJSKA TITRACIJA

Osnova nevtralizacijske titracije so kemijske reakcije med kisljinami in bazami. Naš analit je lahko močna kislina, močna baza, šibka kislina ali šibka baza. Za standardno raztopino pa vedno uporabimo le **močno kislino**, če titriramo baze, in **močno bazo**, če titriramo kislino. Če med nevtralizacijsko titracijo merimo pH vrednost in narišemo spreminjanje pH vrednosti v odvisnosti od dodane standardne raztopine, dobimo **titracijsko krivuljo**. S pomočjo titracijskih krivulj si tudi lažje predstavljamo detekcijo končne točke titracije.

V analizi živil pogostokrat uporabljamo nevtralizacijsko titracijo: pri določanju vsebnosti skupnih kislin, kislinske stopnje, hidrolitičnega kvara maščob ...

2.3.1 Titracija močne kisline z močno bazo

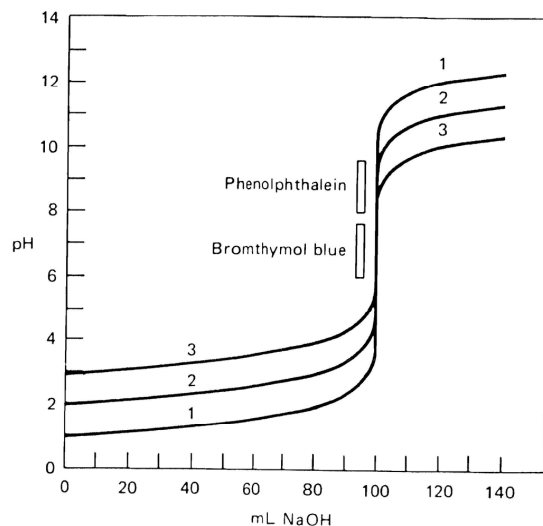
Obe, močna kislina in močna baza, (titrant in analit) popolnoma disociirata v raztopini.

Primer:

Titracija klorovodikove kisline z natrijevim hidroksidom



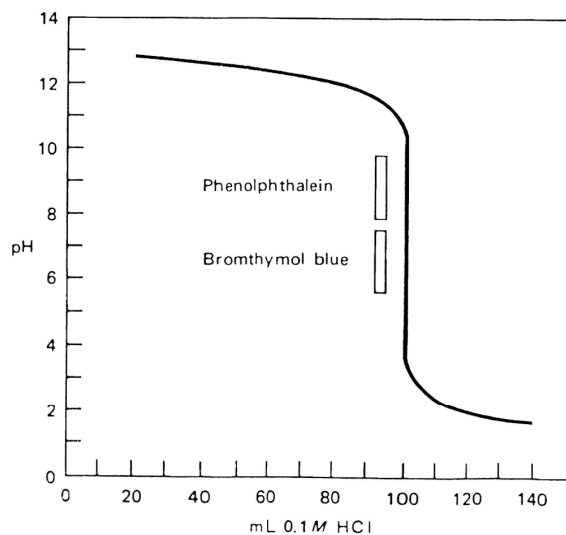
H^+ in OH^- tvorita H_2O , ostala dva iona ostaneta nespremenjena ($\text{Na}^+ + \text{Cl}^-$) – rezultat kemijske reakcije je nevtralizacija. Končna točka titracije je v nevtralnem območju pH- skale. Na sliki so prikazane nevtralizacijske krivulje klorovodikove kisline z različnimi koncentracijami (0.1, 0.01 in 0.001 mol/L) z raztopino natrijevega hidroksida enake koncentracije.



Slika 4: Titracija HCl (1-0.1, 2-0.01, 3-0.001 mol/L) z NaOH (1-0.1, 2-0.01, 3-0.001 mol/L)
Vir: Gary, 1994, 224

Iz slike je jasno razvidno, da je krivulja simetrična: v začetku poteka položno, v neposredni bližini ekvivalentne točke se strmo dvigne in nato poteka zopet položno. Bolj ko je razredčena raztopina, krajši je strmi del krivulje, oz. manjša je sprememba pH v neposredni bližini ekvivalentne točke. S pomočjo titrationske krivulje izberemo tudi ustrezen indikator. Za izbiro indikatorja je odločilen strmi del krivulje.

Titracijska krivulja močne baze (0.1 mol/L NaOH) z močno kislino (0.1 mol/L HCl) poteka, kot prikazuje slika 5 :

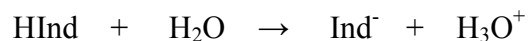


Slika 5: Titracija NaOH z HCl
Vir: Gary, 1994, 224

2.3.2 Indikatorji

Indikatorji, s katerimi ugotavljamo končno točko titracije, so šibke organske kisline ali baze, ki spremenijo barvo v določenem delu pH skale.

Indikatorji disociirajo podobno kot druge kisline in baze v ustrezne anione in katione:



barva 1

barva 2

Nedisociiran indikator je drugačne barve kot disociirana oblika. Katera oblika prevladuje, je odvisno od koncentracije vodikovih ionov oziroma pH raztopine. Zaznamo le tiste spremembe barve, če se razmerje koncentracij obeh indikatorskih zvrsti spreminja v območju od 1 : 10 do 10 : 1.

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{in}} + \log ([\text{Ind}^-] / [\text{HInd}])$$

$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{a}} + \log 1/10 = \text{pK}_{\text{a}} - 1$$

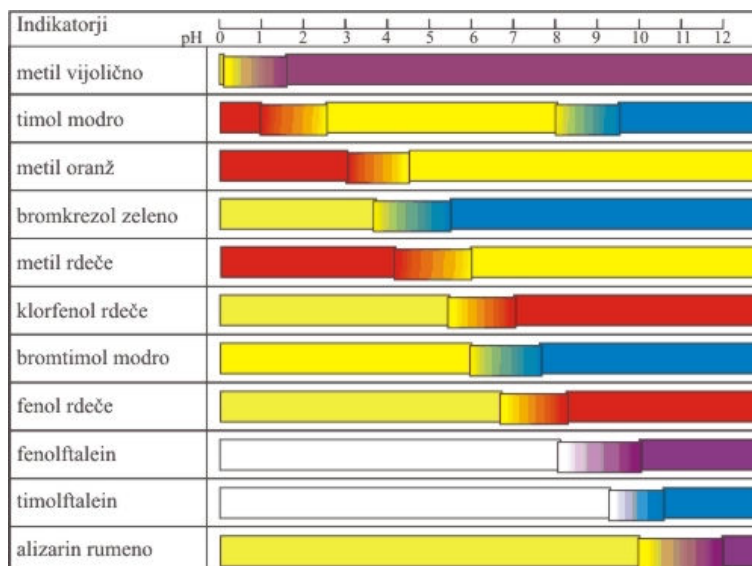
$$\text{pH} = \text{pK}_{\text{a}} + \log 10/1 = \text{pK}_{\text{a}} + 1$$

Do spremembe barve pride torej v območju $\text{pK}_{\text{a}} - 1$ do $\text{pK}_{\text{a}} + 1$.

Ko je koncentracija obeh oblik indikatorjev enaka, je $\text{pH} = \text{pK}_{\text{a}}$.

pK_{a} indikatorja mora biti enak pH vrednosti ekvivalentne točke.

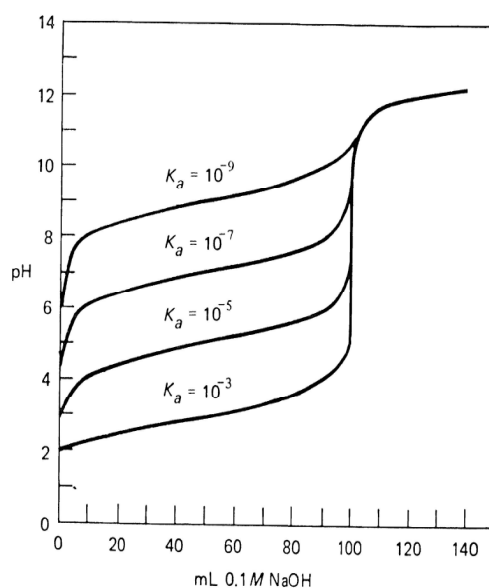
Območje pH skale, kjer se pričinja in končuje vidna sprememba indikatorja, imenujemo **interval indikatorja**. (glej sliko 6)



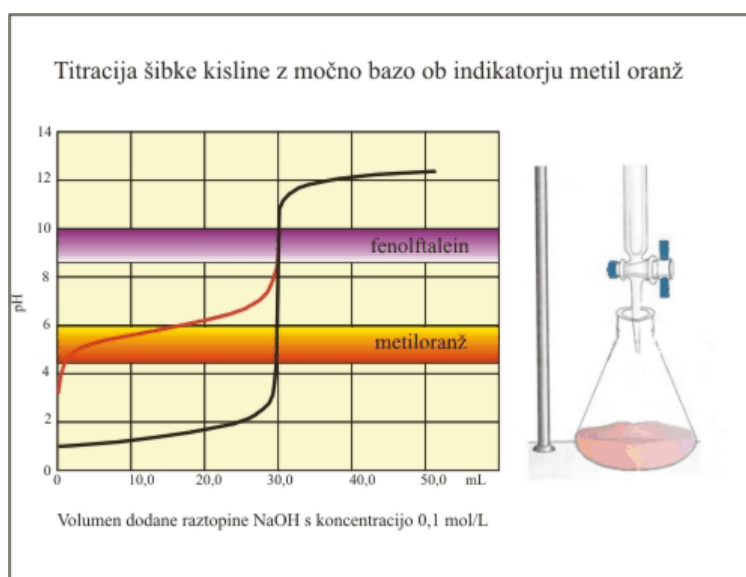
Slika 6: Indikatorji nevtralizacijske titracije z intervalom indikatorja
 Vir: <http://www.kii2.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/Titracija/index.html> (2. 10. 2009)

2.3.3 Titracije šibke kisline z močno bazo

Titracijske krivulje različnih šibkih kislin koncentracije 0.1 mol/L z raztopino NaOH enake koncentracije so prikazane na sliki 7. Višina strmega dela krivulje se spreminja v odvisnosti od jakosti kisline. Čim manjša je disociacijska konstanta, tem manjša je sprememba pH raztopine v bližini ekvivalentna točke. Vodne raztopine kisline z disociacijskimi konstantami reda velikosti $1 \cdot 10^{-8}$ mol/L in manj ne moremo več titrirati na ta način, ker sprememba pH ni dovolj izrazita.



Slika 7: Titracijska krivulja 100 mL 0.1 M šibke kisline z različnimi vrednostmi K_a z 0.1 M NaOH
 Vir: Gary, 1994, 231

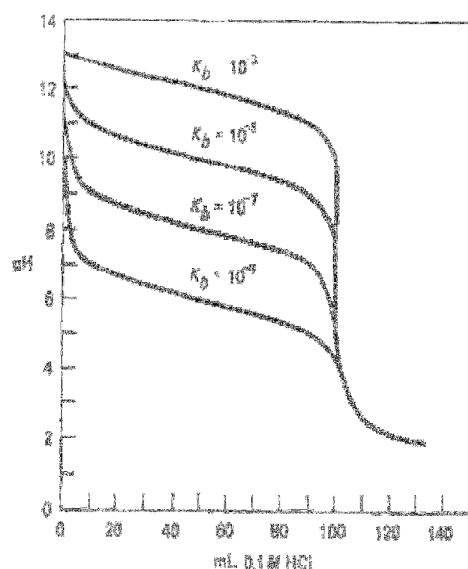


Slika 8: Prikaz pomena pravilno izbranega indikatorja (metiloranž ali fenolftalein?).

Vir: <http://www.kii2.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/> (2. 10. 2009)

2.3.4 Titracije šibke baze z močno kislino

Titracijske krivulje šibkih baz so prikazane na sliki 9. Posamezne krivulje predstavljajo titracijo šibkih baz z različnimi disociacijskimi konstantami - koncentracija baz in kisline je 0.1 mol/L. Čim šibkejša je baza, tem krajši je strmi del krivulje.



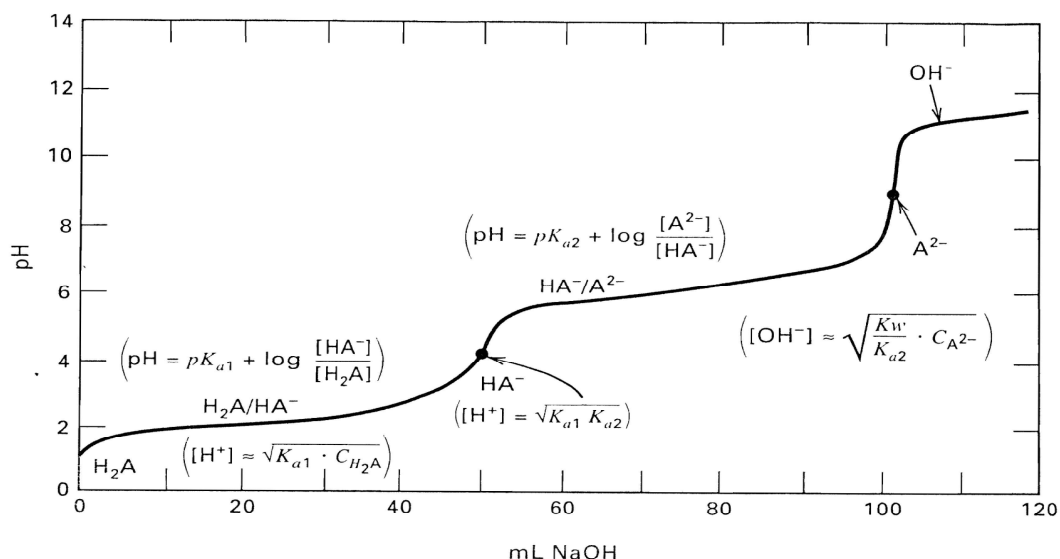
Slika 9: Titracijska krivulja 100 mL 0.1 M šibke baze z različnimi K_b vrednostmi z 0.1 M HCl.

Vir: Gary, 1994, 233

Pri titracijah šibkih kislin z močno bazo in šibkih baz z močno kislino do ekvivalentne točke nastane prehodna raztopina s puferskimi lastnostmi. Z množino dodanega reagenta se spreminja razmerje med kislino oz. bazo in njeno soljo, ki nastaja pri reakciji. V ekvivalentni točki je v raztopini sol šibke kisline (oz. šibke baze) z močno bazo (oz. močno kislino), katere pH je v alkalnem (oz. kislem) delu pH skale. Za določitev pH raztopine po ekvivalentni točki upoštevamo koncentracijo prebitnih hidroksidnih ali vodikovih ionov.

2.3.5 Titracije poliprotičnih kislin

Poliprotične kisline so kisline, ki imajo v svoji molekuli več vodikovih ionov. Baze, ki imajo več hidroksidnih ionov, imenujemo polifunkcionalne baze. Tako poliprotične kisline kot polifunkcionalne baze v vodni raztopini disociirajo v več stopnjah. Če se disociacijske konstante med sabo dovolj razlikujejo, lahko titriramo vsako stopnjo posebej. Glej sliko 10.



Slika 10: Titracija diprotične kisline (H_2A) z natrijevim hidroksidom.
Vir: Gary, 1994, 236

2.3.6 Nevtralizacijska titracija v nevodnem mediju

Šibke kisline in šibke baze, ki imajo disociacijske konstante manjše od 10^{-8} , ne moremo titrirati v vodni raztopini, ker imajo prešibko določene bazične oz. kisle lastnosti. Moč takih kislin in baz lahko povečamo z nevodnimi topili: alkoholi, etilendiaminom, brezvodno očetno kislino..

Topila so lahko:

- amfiprotična (amfoterna) – lahko reagirajo kot kisline ali kot baze,

- aprotična ali inertna – ne vežejo niti ne oddajajo protonov.

2.4 OKSIDACIJSKO-REDUKCIJSKA TITRACIJA

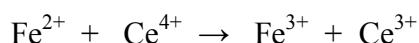
Volumetrična analiza, ki ima za osnovo titracijo reductentov ali oksidantov, je zelo razširjena. Končno točko titracije ugotavljamo vizualno s pomočjo indikatorjev ali z merjenjem potenciala.

Med standardno raztopino in analitom poteka kemijska reakcija oksidacije in redukcije – **oksidacijsko-redukcijska reakcija**. Kemijsko reakcijo zapišemo običajno v dveh delnih reakcijah :

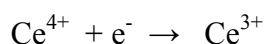
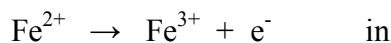
- oksidacija (oddajanje elektronov),
- redukcija (prejemanje elektronov).

Celotna reakcija je vsota delnih reakcij. Število oddanih elektronov (reducent odda elektrone – oksidacijsko število se mu zviša) je enako številu sprejetih elektronov (oksidant sprejme elektrone – oksidacijsko število se mu zniža).

Primer:



Fe^{2+} je reducent – odda en elektron, oksidacijsko število se mu zviša, Ce^{4+} je oksidant – sprejme en elektron, oksidacijsko število se mu zniža:



Moč oksidanta ali reducenta je določena s **standardnim elektrodnim potencialom**. V opazovani redoks reakciji bo kot oksidant deloval tisti ion, ki ima višji redoks potencial. Reducent ima vedno nižji redoks potencial.

Močni oksidanti imajo velike pozitivne vrednosti elektrodnega potenciala (E^0), reducenti pa imajo velike vrednosti negativnih elektrodnih potencialov.

Primer: Manganatni (VII) ion je močan oksidant z E^0 je 1.51 V.
Kadmij je močan reducent z E^0 je - 0.403 V.

Volumetrično določanje vitamina C spada med redoks titracije. Razmisli: katero standardno raztopino lahko uporabimo: oksidant ali reducent!

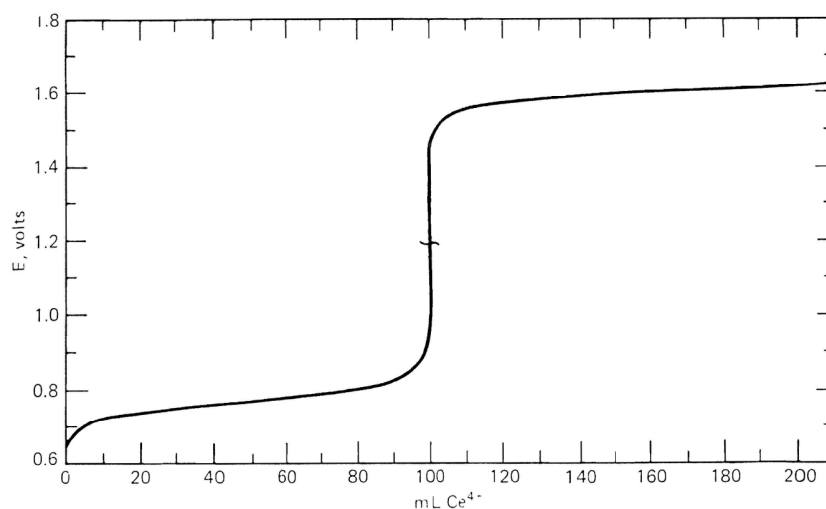
2.4.1 Titracijska krivulja

Znanje o redoks ravnotežjih lahko uporabimo za opis titracijske krivulje redoks titracije. Obliko titracijske krivulje lahko napovemo iz E^0 vrednosti delne reakcije analita in titranta.

Med titracijo se spreminja potencial. Ob vsakem dodatku titranta se vzpostavi ravnotežje. Reakcija vedno poteka v desno preko ravnotežnih stanj. Pri tem se spreminja potencial redoks parov.

Pri titraciji Fe^{2+} s Ce^{4+} se z vsakim dodatkom Ce^{4+} vzpostavi kemijsko ravnotežje. Zaradi vzpostavitve ravnotežja sta potenciala obeh redoks parov enaka in sta enaka potencialu sistema.

Končna točka je določena z razliko E^0 vrednosti analita in titranta. Ta razlika mora biti **minimalno 0.2 V** za določitev jasne končne točke titracije.



Slika 11: Titracijska krivulja 100 mL 0.1 M Fe^{2+} z 0.1 M Ce^{4+}
Vir: Gary, 1994, 355

2.4.2 Indikatorji redoks titracije

Najpogosteje se uporabljajo indikatorji, ki jih imenujemo redoks indikatorji. To so močno obarvana snovi, ki so slabi reducenti ali oksidanti. Značilno zanje je, da je barva oksidirane stanja različna od njene reducirane oblike.



barva 1 barva 2

n – število elektronov

Potencial indikatorja (E_{ind}^0) mora biti v bližini potenciala ekvivalentne točke. Potrebna je minimalno 120 mV spremembe potenciala, da se spremeni barva pri $n = 1$ in minimalno 60 mV za $n = 2$.

Redoks indikatorji morajo imeti prehod iz ene oblike v drugo v ekvivalentni točki. Reakcija redoks indikatorjev mora biti hitra in reverzibilna.

Žal ne obstaja mnogo dobrih redoks indikatorjev. Med pomembnejšimi je **1,10-fenantrolin-Fe (II) kompleks** ter **difenilamin** in njegovi derivati.

2.4.3 Standardne raztopine oksidantov

Najpomembnejše standardne raztopine oksidantov so:

- kalijev permanganat (KMnO₄),
- kalijev dikromat (K₂Cr₂O₇),
- cerijev (IV) sulfat (Ce(SO₄)₂),
- kalijev bromat (KBrO₃),
- jodova (VII) kislina (H₅IO₆) in
- raztopina joda.

KALIJEV PERMANGANAT (KMnO₄)

Je močan oksidant. Uporablja se za titracijo številnih ionov v kislem, nevtralnem in bazičnem mediju. Od vrste medija je odvisna tudi oksidacijska stopnja mangana:

- **kisel medij**



V močno kislih raztopinah sprejme mangan pet elektronov in se reducira od Mn⁷⁺ do Mn²⁺. Titriramo ione železa(II), oksalno kislino, oksalate, vodikov peroksid ...

- **šibko kisel, nevtralen ali šibko bazičen medij**



Mangan sprejme tri elektrone in se reducira od Mn⁷⁺ do Mn⁴⁺. V teh medijih titriramo cianidne in sulfidne ione.

- **alkalni medij**

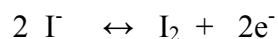


Mangan sprejme en elektron in se reducira od Mn⁷⁺ do Mn⁶⁺. V alkalnem mediju titriramo nekatere organske spojine, kot so: metanol, formaldehid, glikol.

Pri titraciji s kalijevim permanganatom **ne potrebujemo indikatorja**, ker se raztopina po končani reakciji obarva s prebitkom standardne raztopine.

JOD

Je srednje močan oksidant, ki reagira z zmernimi reducenti. Jodidni ion pa je reducent, ki reagira tudi z močnimi oksidanti.



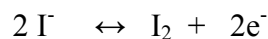
Titracije z jodom so lahko direktne ali indirektne:

- direktna titracija:
Titriramo spojine z nižjim oksidacijskim potencialom (kositer(II), sulfiti, tiosulfati ...),
- indirektna titracija:
Raztopini oksidanta dodamo jodid v presežku, sprosti se ekvivalentna množina joda, ki ga titriramo s standardno raztopino natrijevega tiosulfata (reducent). Določamo bromate (BrO_3^-), nitrate (NO_3^-), raztopino bakra.

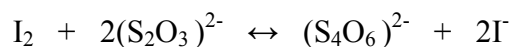
Končno točko titracije ugotavljamo s pomočjo škroba. Jod se absorbira na površino koloidnih delcev škroba – pojavi se modra barva, ki izgine, ko se ves jod reducira do jodidnega iona.

2.4.4 Standardne raztopine reductentov

Najpomembnejša standardna raztopina reductentov je natrijev tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Osnovna reakcija je oksidacija jodida do elementarnega joda:



in redukcija nastalega joda z natrijevim tiosulfatom:



Primeri določitev so navedeni pri indirektni titraciji z jodom.



Slika 12: Prikaz določitve Cu^{2+} z indirektno titracijo.

Vir: <http://www.chem.ualberta.ca/~iip/chem211irc/Copper.html> (2. 10. 2009)

2.5 OBARJALNA TITRACIJA

Obarjalna titracija je volumetrična metoda, pri kateri je osnova kemijska reakcija med standardno raztopino in analitom, pri kateri nastanejo težko topne oborine. Pogoj za izvedbo titracije je, da se ioni, ki jih določamo, obarjajo s titrantom **hitro, kvantitativno** in da je **oborina** skoraj **netopna**.

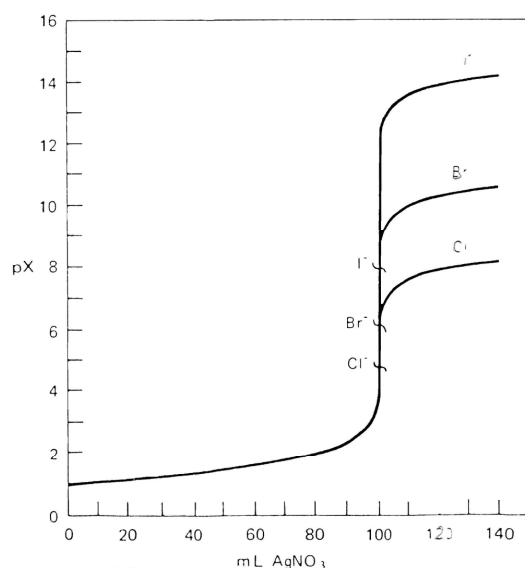
Standardne raztopine:

- srebrov nitrat (AgNO_3), določamo: klorid, bromid, jodid,
- kalijev tiocianat (KSCN), amonijev tiocianat (NH_4SCN), določamo: srebrove spojine,
- kalijev heksacianoferrat(II) ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), določamo: cink.

V analizi živil se najpogosteje izvaja obarjalna titracija za določitev kloridnih ionov oz. za določanje kuhinjske soli.

2.5.1 Titracijska krivulja

Primer titracijske krivulje kloridnega iona, ki ga titriramo s standardno raztopino AgNO_3 : Na Y-os nanašamo pCl (negativen logaritem koncentracije kloridnih ionov), na X-os pa volumen (mL) dodane standardne raztopine AgNO_3 .



Slika 13: Titracijska krivulja 100 mL raztopine klorida, bromida in jodida s konc. 0.1 mol/L s standardno raztopino AgNO_3 ($c = 0.1 \text{ M}$)

Vir: Gary, 1994, 277

Na začetku titracije imamo 0.1 M kloridni ion in pCl je 1. Z nadaljevanjem titracije se kloridni ioni odstranjujejo iz raztopine z obarjanjem v obliki AgCl ; in pCl se, odvisno od preostale koncentracije kloridnih ionov, manjša. Prispevek kloridnih ionov kot rezultat disociacije oborine lahko zanemarimo, razen v bližini ekvivalentne točke. V ekvivalentni točki imamo nasičeno raztopino AgCl , pCl je 5 in koncentracijo kloridnih ionov 10^{-5} mola/L.

Za ekvivalentno točko je presežek Ag^+ odvisen od koncentracije Ag^+ in K_{sp} (konstanta disociacije oborine).

Manjši kot je K_{sp} , večji je preskok v ekvivalentni točki. Iz slike je razvidno, da ima AgI majhno topnost, tako je koncentracija jodidnih ionov po ekvivalentni točki majhna in preskok večji.

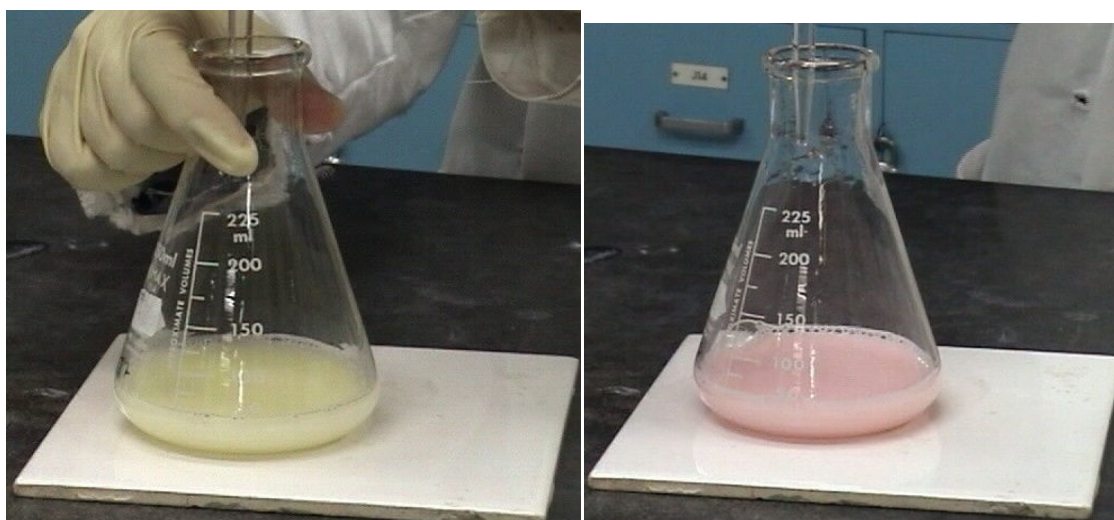
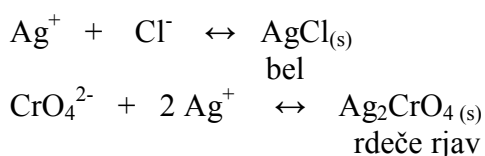
2.5.2 Indikatorji

Končno točko titracije ugotavljamo s pomočjo indikatorjev na več načinov:

- z nastankom oborine po kemijski reakciji med indikatorjem in titrantom, ki se razlikuje po barvi od oborine, nastale po kemijski reakciji med analitom in titrantom.

Primer: **Določitev klorida po Mohru:**

Indikator je kalijev kromat (K_2CrO_4): do ekvivalentne točke se obarja srebrov klorid, oborina bele barve, nato se tvori oborina med titrantom in indikatorjem – srebrov kromat, ki obarva raztopino rdeče rjavo. Reakcija poteka v nevtralni ali šibko alkalni raztopini v območju pH 7 do 9.



Slika 14: Prikaz določitve klorida po Mohru.

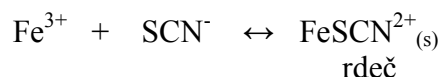
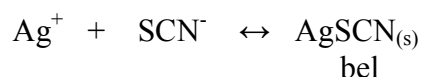
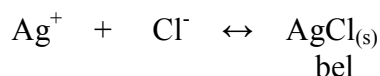
Vir: <http://www.chem.ualberta.ca/~iip/chem211irc/Chloride.html> (2. 10. 2009)

- z nastankom obarvanega kompleksa:

Primer: **Določitev klorida po Volhardovi metodi:**

Kisli raztopini klorida dodamo srebrov nitrat v presežku. Izloči se ekvivalentna množina

srebrovega klorida. Presežno množino srebrovega nitrata nato titriramo s standardno raztopino amonijevega tiocianata v navzočnosti železovih (III) ionov. Tiocianat se najprej porabi za reakcijo s srebrovimi ioni, ki so v presežku. Ko je titracija končana, tiocianat reagira z železovimi (III) ioni – nastane rdeče obarvan tiocianato-železov (III) ion.



- z adsorpcijskimi indikatorji

To so organska barvila, ki v vodni raztopini disociirajo, tako da dobimo negativne ione indikatorja. Oborina, nastala po reakciji med analitom in titrantom, se po doseženi ekvivalentni točki pozitivno nabije zaradi prebitka titranta, ki se veže na oborino. Pozitivno nabita oborina veže nase negativno nabite ione indikatorja – tako se spremeni barva oborine. Primer adsorpcijskih indikatorjev: **fluorescenin** (za titracijo klorida, bromida in jodida s srebrovim nitratom) in **eožin** (za titracijo bromida, jodida in tiocianata s srebrovim nitratom).

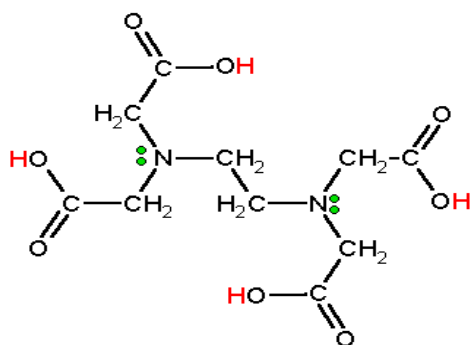
2.6 KOMPLEKSOMETRIČNA TITRACIJA

Kompleksometrična titracija je titracija, katere osnova so kemijske reakcije med ioni kovin in ioni tistih organskih spojin, ki v atomu kovine zasedejo več koordinativnih valenc, pri čemer nastanejo obstojne kompleksne spojine – kelati. Pri reakcijah med kovinskimi ioni, ki lahko sprejmejo elektronske pare (akceptorji elektronskih parov) in spojinami, ki lahko oddajajo elektronske pare (donorji elektronskih parov), nastanejo koordinacijske spojine ali kompleksi. Spojine, ki dajejo elektronske pare za nastanek vezi, imenujemo ligande. S kompleksometrično titracijo lahko določimo trdoto vode z določitvijo vsebnosti Ca^{2+} in Mg^{2+} ionov.

2.6.1 Standardne raztopine

Najpogosteje se kot standardne raztopine uporabljajo aminopolikarboksilne kisline, ki z eno molekulo zasedejo vse koordinativne valence nekega kovinskega iona.

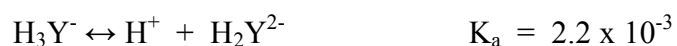
Najpomembnejša med njimi je **etilendiamintetraocetna kislina – EDTA**. Zaradi boljše topnosti se uporablja njena dinatrijeva sol, pogosto znana pod imenom komplekson ali titripleks.



Slika 15: Prikaz strukturne formule EDTA

Vir: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edtah.htm> (2. 10. 2009)

EDTA je šibka tetraprotična kislina in disociira v štirih stopnjah:



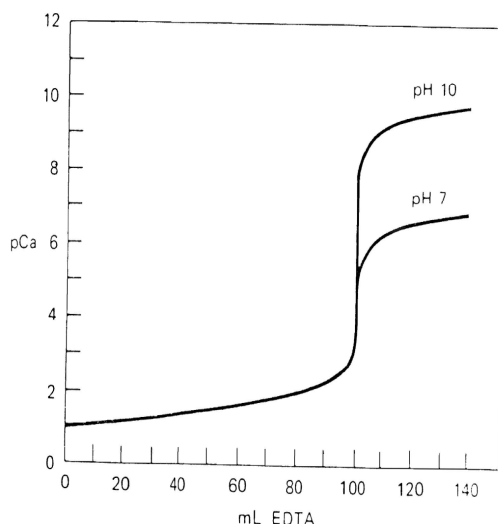
Za več informacij o uporabi EDTA v analizi živil glejte spletni vir:

<http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edta.htm> (2. 10. 2009)

(Najdete tudi zanimive naslove za analizo živil.)

2.6.2 Titracijska krivulja

Kot je prikazano na sliki 2.14, je preskok v končni točki titracije odvisen od pH vrednosti raztopine – višja je pH vrednost, bolj jasen je preskok v ekvivalentni točki titracije. Pri kemijski reakciji se tvorijo kelati in od njihove stabilnosti je odvisen preskok v končni točki. Zelo malo kovinskih kelatov je stabilnih v kislem mediju, večina jih titriramo v alkalnem mediju.



Slika 16: Titracijska krivulja 100 mL 0.1 M Ca^{2+} z 0.1 M dinatrijevo soljo EDTA pri pH 7 in pH 10.

Vir: Gary, 1994, 260

Pri reakcijah med kovinskimi ioni in EDTA je stehiometrično razmerje vedno 1 : 1, ne glede na valenco kationa.

2.6.3 Indikatorji

Indikatorji so organske spojine, ki reagirajo s kovinskimi ioni in dajejo obarvane kelate. Ti kelati so slabše obstojni kot kelati kovine z EDTA. Torej se z dodatkom standardne raztopine sprošča indikator in po ekvivalentni točki, ko so vsi ioni kovine vezani na EDTA, dobimo barvo prostega indikatorja.

Najbolj znani indikatorji:

- eriokromčno T (določamo Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+}),
- PAN (1,2-piridilazo-2-naftol),
- mureksid (amonijev purpurat).

Indikatorje uporabljamo kot vodne ali alkoholne raztopine. Zaradi slabe obstojnosti pa jih hranimo v trdni obliki v zmesi z natrijevim kloridom.

2.7 LITERATURA IN DODATNO BRANJE

Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. Fourth Edition. New York: W.H. Freeman and company, 1996.

Gary, D. C. *Analytical Chemistry*. Fifth Edition. New York: John Wiley & Sons, 1994.

Gorenc, D., et al. *Analizna kemija: gravimetrična in volumetrična analiza*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1994.

Harris, D. C. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Wiesbaden: Vieweg, 1997.

Skoog, D.A., et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Thomson Brooks Cole, 2004.

Chloride. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu:

<http://www.chem.ualberta.ca/~iip/chem211irc/Copper.html>

Cooper. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu:

<http://www.chem.ualberta.ca/~iip/chem211irc/Copper.html>

Scott, A. *EDTA - A Molecule with a Complex Story*. (online). (datum dostopa 2. 6. 2009).

Dostopno na naslovu: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/edta/edtah.htm>

Titracija. (online). (citirano 2.6.2009). Dostopno na naslovu: <http://www.kii2.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/Titracija/index.html>

Titracija. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.kii2.ntf.uni-lj.si/e-kemija/file.php/1/output/>

<http://www.chem.bg.ac.yu/hf/katedre/analitika/index.html> (citirano 2. 10. 2009)

2.8 POVZETEK IN VPRAŠANJA ZA SAMOEVALVACIJO

Osnovna metoda volumetrične analize je titracija. Pri titraciji merimo volumen raztopine s točno določeno koncentracijo (standardna raztopina), da lahko določimo koncentracijo našega analita z znanim volumnom. Med titracijo potekajo kemijske reakcije med analitom in standardno raztopino (direktna titracija) ali med analitom in dodanim reagentom v presežku (indirektna titracija). Glede na vrsto kemijske reakcije, ki poteka med analitom in standardno raztopino poznamo več vrst titracij. Potek titracije prikažemo s titracijskimi krivuljami. Konec titracije zaznamo, odvisno od vrste titracij, s pomočjo različnih indikatorjev, merjenjem potenciala raztopine analita, spremembe barve zaradi dodane standardne raztopine v presežku ...

- Kaj je titracija?
- Razložite osnovne pojme titracije: standardna raztopina, primarni standard, indikator.
- Pojasnite razliko med ekvivalentno točko titracije in končno točko titracije.
- Navedite pogoje za izvedbo titracije.
- Naštejte vrste titracije in navedite bistveno razliko med njimi.
- Grafično prikažite s pomočjo titracijske krivulje razliko med titracijo močne kisline s šibko bazo in titracijo šibke kisline z močno bazo.
- Narišite in razložite titracijsko krivuljo obarjalne titracije.
- Navedite indikatorje in standardne raztopine pri posamezni vrsti titracije.
- Razmislite, kateri indikator in katero standardno raztopino bi uporabili pri naslednjih titracijah: določanje NaCl v živilu, določanje kislinske stopnje mleka, določanje trdote vode, določanje SO₂.

Odgovorite s pomočjo opravljenih laboratorijskih vaj:

- Navedite pripomočke za izvedbo volumetrične analizne metode.
- Katero zaščitno opremo uporabljamo pri laboratorijskih vajah?
- Razmislite, kako ravnamo z odpadki pri volumetričnih analiznih metodah. Katere odpadne snovi so manj škodljive za okolje in katere bolj? Kako jih prepoznamo v laboratoriju?
- Razmislite o možnostih za zmanjšanje količine odpadnih reagentov pri volumetričnih metodah.

Računske primere kemijskega računanja (volumetrija) poiščite v naslednji literaturi:

- Sodja Božič, Jelka. *Kemijsko računanje: učbenik*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1990.
- Sodja Božič, Jelka. *Kemijsko računanje: zbirka nalog*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1991.

3 INSTRUMENTALNA ANALIZA

Glavna razlika med klasičnimi in instrumentalnimi metodami je v tehniki dela. Pri instrumentalnih metodah uporabljamo različne aparature – instrumente. Zaradi tega je subjektivna napaka analitika izključena. Razen kemijske reakcije, ki je osnova klasične analize metode, pri instrumentalnih metodah izkoriščamo za določitev analita tudi spremembo neke fizikalne lastnosti merjenega sistema. S tem tudi, običajno, povečamo občutljivost in selektivnost analize metode.

Glej tabelo 1.

Instrumentalne metode delimo na elektrokemijske in optične.

Pri elektrokemijskih metodah merimo elektrodni potencial, elektroprevodnost raztopine, difuzijski tok (polarografske metode).

Pri optičnih metodah pa izkoriščamo določene optične lastnosti merjenega sistema (absorpcijo svetlobe določene valovne dolžine, emisijo svetlobe določene valovne dolžine ...).

Za katero od navedenih analiznih metod se bomo odločili je odvisno od:

- vrste preiskav, ki jih bomo opravljali,
- od merilnega območja, ki ga preiskava zahteva,
- števila preiskav in
- cene (Gary, 1994).

Tabela 1: Primerjava posameznih analiznih metod

METODA	OBMOČ. DELOV. mol/L	Natančnost %	Selektivnost	Hitrost	Cena	Uporaba
Gravimetrija	10^{-1} - 10^{-2}	0,1	SLABA-SREDNJA	POČASNA	NIZKA	ANORG.
Volumetrija	10^{-1} - 10^{-4}	0,1-1	SLABA-SREDNJA	SREDNJA	NIZKA	ANORG.-ORGAN.
Potenciometrija	10^{-1} - 10^{-6}	2	DOBRA	HITRA	NIZKA	ANORG.
Elektrogravimetrija	10^{-1} - 10^{-4}	0,01-2	SREDNJA	POČASNA-SREDNJA	SREDNJA	ANORG.-ORGAN.
Spektrofotometrija	10^{-3} - 10^{-6}	2	DOBRA-SREDNJA	HITRA-SREDNJA	NIZKA-SREDNJA	ANORG.-ORGAN.
Fluorometrija	10^{-6} - 10^{-9}	2-5	SREDNJA	SREDNJA	SREDNJA	ORGAN.
Atomska spektroskopija	10^{-3} - 10^{-9}	2-10	DOBRA	HITRA	SREDNJA-VISOKA	ANORG.-MULTIEL.
Kromatografija	10^{-3} - 10^{-9}	2-5	DOBRA	HITRA-SREDNJA	SREDNJA-VISOKA	ORGAN.-VEČKOMP
Kinetične metode	10^{-2} - 10^{-10}	2-10	DOBRA-SREDNJA	HITRA-SREDNJA	SREDNJA	ANORG.-ORGAN.-ENCIMI

Vir: Gary, 1994

3.1 ELEKTROKEMIJSKE METODE

Elektrokemijske metode potekajo v galvanskem členu ali elektrolizni celici. V galvanskem členu v zaprtem krogu nastaja s spontano kemijsko reakcijo električni tok. Napetost celice (npr. baterije) je določena z razliko potencialov dveh polovičnih reakcij. Po izteku reakcije (izenačitvi potencialov) je napetost celice enaka nič – baterija je "mrtva". Za elektrolizno celico je značilno, da kemijska reakcija ne steče spontano, pač pa je posledica dovajanja električnega toka. Kemijska reakcija poteče v nasprotni smeri, kot pa bi potekala v galvanskem členu.

Princip:

Osnova so reakcije oksidacije in redukcije – redoks reakcije, ki potekajo med reducentom in oksidantom.

Oksidacija pomeni oddajanje elektronov, redukcija pa sprejemanje elektronov.

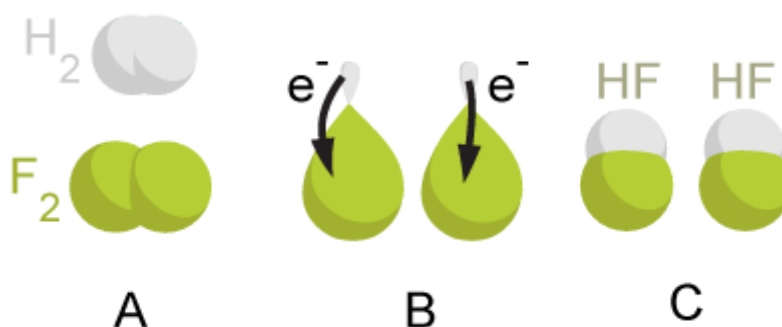
Oksidanti so snovi, ki druge snovi oksidirajo, sami pa se pri tem reducirajo. Obratno velja za reducente: druge reducirajo, sami se pri tem oksidirajo.



Oksidant 1 se reducira v reducent 1 in reducent 2 se oksidira v oksidant 2.

Tendenca redukcije ali oksidacije neke snovi je odvisna od njenega redukcijskega potenciala.

Oksidanti imajo težnjo sprejemati elektrone, oksidacijski potencial se jim zniža, reducenti pa imajo težnjo oddajati elektrone, oksidacijski potencial se jim zviša.



Slika 17: Primer redoks reakcije

Vir: <http://en.wikipedia.org/wiki/Oxidation> (7. 11. 2009)

Poglejte na spletnem viru še ostale primere.

3.1.1 Elektrokemijska celica

Uporaba elektrokemijske celice in elektrodnega potenciala služi za razumevanje težnje neke substance za oksidacijo ali redukcijo.

Sestavljena je iz dveh elektrod: **katode in anode**.

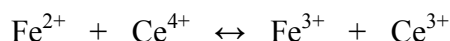
Na anodi poteka **oksidacija**, na katodi pa **redukcija**.

Če imamo npr. raztopino Fe²⁺ in Ce⁴⁺ ionov ločeno v dveh posodah, ki sta med sabo povezani samo z elektrolitskim mostom, ki omogoča prehod ionov, ne omogoča pa kemijske reakcije,

obstaja težnja po prehodu ionov. Če potopimo v oba člena platinasto žico in jo povežemo, nastane **galvanska celica** (Slika 18).

Železovi ioni se oksidirajo, cerijevi ioni pa se reducirajo:

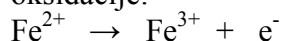
Kemijska reakcija:



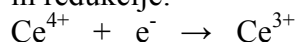
Sestavljena je iz dveh delnih reakcij:

(Po Gibbs-Stockholmskem dogovoru delno reakcijo vedno zapišemo kot redukcijo).

oksidacije:



in redukcije:



To se zgodi zaradi težnje ionov za prenos elektronov. Platinasto žico lahko smatramo kot elektrodo. Vsaka ima električni potencial, ki ga določa težnja ionov za oddajo ali sprejem elektronov in ga imenujemo elektrodni potencial. Voltmeter nameščen med dvema elektrodama kaže razliko potencialov med dvema elektrodama. Večja kot je razlika potencialov, večja je tendenca za reakcijo med železovimi in cerijevimi ioni (Gary, 1994).

Tabela 2: Nekateri standardni potenciali

	E°, V
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^{-} = 2\text{H}_2\text{O}$	1.77
$\text{MnO}_4^{-} - 4\text{H}^+ + 3e^{-} = \text{MnO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	1.695
$\text{Ce}^{4+} + e^{-} = \text{Ce}^{3+}$	1.61
$\text{MnO}_4^{-} - 8\text{H}^+ + 5e^{-} = \text{Mn}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O}$	1.51
$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} - 14\text{H}^+ + 6e^{-} = 2\text{Cr}^{3+} + 7\text{H}_2\text{O}$	1.33
$\text{MnO}_2 + 4\text{H}^+ + 2e^{-} = \text{Mn}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O}$	1.23
$2\text{IO}_3^{-} + 12\text{H}^+ + 10e^{-} = \text{I}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$	1.20
$\text{H}_2\text{O}_2 + 2e^{-} = 2\text{OH}^{-}$	0.88
$\text{Cu}^{2+} + \text{I}^{-} + e^{-} = \text{CuI}$	0.86
$\text{Fe}^{3+} + e^{-} = \text{Fe}^{2+}$	0.771
$\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2e^{-} = \text{H}_2\text{O}_2$	0.682
$\text{I}_2(\text{aq}) + 2e^{-} = 2\text{I}^{-}$	0.6197
$\text{H}_3\text{AsO}_4 + 2\text{H}^+ + 2e^{-} = \text{HAsO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	0.559
$\text{I}_3^{-} + 2e^{-} = 3\text{I}^{-}$	0.5355
$\text{Sn}^{4+} + 2e^{-} = \text{Sn}^{2+}$	0.154
$\text{S}_4\text{O}_6^{2-} - 2e^{-} = 2\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	0.08
$2\text{H}^+ + 2e^{-} = \text{H}_2$	0.000
$\text{Zn}^{2+} + 2e^{-} = \text{Zn}$	-0.763
$2\text{H}_2\text{O} + 2e^{-} = \text{H}_2 + 2\text{OH}^{-}$	-0.828

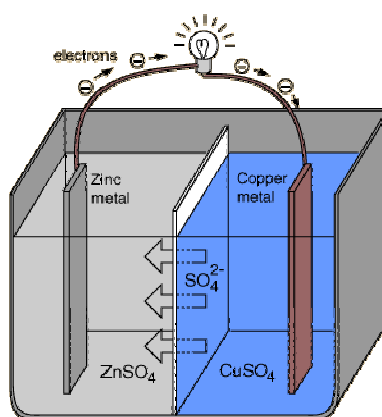
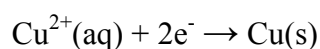
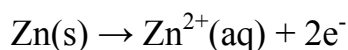
Vir: Gary, 1994

V tabeli 2 so prikazani standardni potenciali nekaterih snovi polovičnih reakcij. Glede na višino standardnega potenciala lahko sklepamo, ali bo neka snov reagirala kot reducent ali oksidant. Vidimo, da imajo cerijevi ioni – Ce^{4+} visok redukcijski potencial, torej imajo

lastnosti oksidanta – Ce^{3+} , ioni pa spadajo med slabe reducente. Cink je zaradi nizkega redukcijskega potenciala dober reducent, Zn^{2+} ioni pa spadajo med slabe oksidante.

Primer: Delovanje baterije

Rezultat kemijske reakcije (razlike dveh potencialov) se uporablja npr. kot izvor električne energije za žarnico (baterije). Na sliki je prikaz delovanja baterije s cinkovo in bakreno elektrodo. V celici potekata reakciji oksidacije in redukcije:



Slika 18: Primer elektrokemijske celice z cinkovo in bakreno elektrodo

Vir: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/Hbase/chemical/electrochem.html#c2> (7. 11. 2009)

Na spletnem viru si pogledajte natančnejši prikaz delovanja.



Galvanski člen je najbolj znan električni generator. Ohranjena sta dva galvanska člena:

- Voltov člen je zgrajen iz posode, v kateri so razredčena žveplena kislina ter dve plošči, ena iz cinka in druga iz bakra. Plošči se ne smeta nikjer dotikati. Če med plošči priključimo primerno žarnico, ta sveti.
- Daniellov člen je galvanski člen z bakreno elektrodo v raztopini bakrovega sulfata in cinkovo elektrodo v raztopini cinkovega sulfata. Obe raztopini sta med seboj ločeni z glineno diafragmo.

Slika 19: Voltov in Daniellov člen – učila iz Idrijske realke leta 1902

Vir: http://www.gimidrija.si/slo/projekti/sfucila/elek/Elek_11/galvanski_clen.htm (7. 11. 2009)

Pri **elektrolizi** je proces prisiljen. Na katodo in anodo od zunaj delujemo z napetostjo tako, da se redukcija vrši na negativno nabiti elektrodi – katodi.

Elektrolizne celice so uporabne v elektrokemičnih metodah - **elektrogravimetriji** – maso analita merimo s pomočjo tehtanja elektrode pred in po elektrolizi.

3.1.2 Potenciometrija

Pri potenciometrični analizi merimo potencial elektrokemijskega člena, ki ga sestavljata indikatorna in referenčna elektroda. Potential merimo pri ničelnem toku: od zunaj pritismo na elektrodi obratno usmerjeno napetost, ki jo povečujemo, dokler tok ne neha teči.

Indikatorna elektroda: potencial se ji spreminja s spreminjanjem koncentracije analita.

Referenčna elektroda: ima stalen elektrodni potencial.

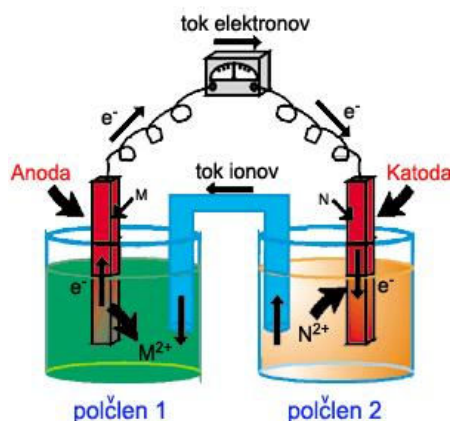
Člen zapišemo v obliki:

Referenčna elektroda || indikatorna elektroda

Dve navpični črti predstavljata elektrolitski ključ (solni most).

Napetost galvanskega člena je enaka razliki elektrodnih potencialov desne (**katoda – poteka redukcija**) in leve elektrode (**anoda - poteka oksidacija**):

$$E(\text{člen}) = E(\text{katoda}) - E(\text{anoda})$$



Slika 20: Primer galvanskega člena

Vir: <http://www.minet.si/thumbail/phpThumb.php?bg=&h=300&src=/gradivo/sola/lekcije>
(7. 11. 2009)

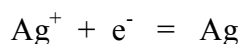
Pri potenciometriji je napetost člena:

$$E(\text{člena}) = E(\text{indikatorna elektroda}) - E(\text{referenčna elektroda})$$

Poznamo štiri vrste kovinskih indikatorskih elektrod:

Elektrode 1. vrste:

Potencial elektrod je odvisen od koncentracije njihovih kationov v raztopini. S splošnim obrazcem jih lahko zapišemo kot $M | M^{n+}$. Primer te elektrode je $Ag | Ag^+$, ki ima sledečo polovično reakcijo:



Potencial te elektrode je definiran z Nernstovo enačbo:

$$E = E^0_{Ag^+,Ag} - 2.303RT/F \cdot \log(c_{Ag}/c_{Ag^+})$$

E – elektrodni potencial pri določeni temperaturi in koncentraciji

E^0 - standardni redoks potencial

$2.303 RT/F$ – konstanta, odvisna od temperature, R - plinska konstanta,

F - Faradayeva konstanta, ($2,303 RT/F$) = 0.059 V pri 298 K.

Elektrode 1. vrste so še $Hg^{2+} | Hg$, $Cu^{2+} | Cu$, $Pb^{2+} | Pb$...

Potencial teh elektrod je odvisen od koncentracije in temperature.

Elektrode 2. vrste:

So kovinske elektrode, ki tvorijo z anioni elektrolita, v katerega so potopljene, težko topno spojino. Elektrodni potencial je odvisen od topnosti spojine in od koncentracije anionov v raztopini.

Splošni zapis: $M | MX | X^-_{aq}$

Primer elektrode: $Ag | AgCl | Cl^-$

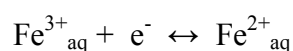
Redoks elektrode:

Izdelane so iz plemenitih kovin: platina, zlato, paladij.

Elektrode potopimo v raztopino, ki vsebuje katione, anione ali molekule dveh oksidacijskih stanj.

Primer elektrode:

Platinasto elektrodo, ki služi le za prenos elektronov (je inertna) potopimo v raztopino železovih (II) in železovih (III) ionov:



Ionoselektivne elektrode:

Osnovni element vsake ionoselektivne elektrode je membrana, katere potencial je odvisen od koncentracije določenega iona v raztopini. V to skupino elektrod spada tudi steklena elektrode za merjenje aktivnosti vodikovih ionov v raztopini.

Vsaka ionoselektivna elektroda je sestavljena iz membrane (steklena, trdna ali tekoča), notranje referenčne elektrode in notranje referenčne raztopine, ki je med referenčno elektrodo in membrano.

Primer uporabe: POTENCIOMETRIČNO MERJENJE pH

pH – je negativen dekadični logaritem koncentracije oksonijevih ionov.

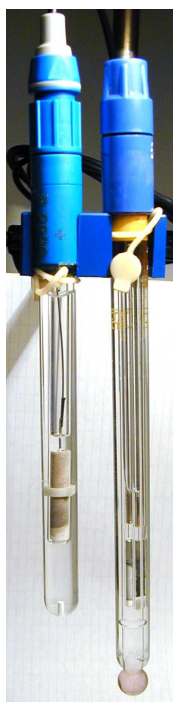
$$\text{pH} = -\log c[\text{H}_3\text{O}^+]$$

Za merjenje pH vrednosti lahko uporabimo:

indikatorska elektroda – steklena elektroda in referenčna elektroda – nasičena kalomelova elektroda.

Potencial nasičene kalomelove elektrode (NKE) je pri določeni temperaturi stalen in znaša pri $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 0.246 V.

Potencial steklene elektrode se spreminja s koncentracijo oksonijevih ionov v raztopini. Napetost člena merimo s pH- metrom. Merilna skala je v pH- enotah.

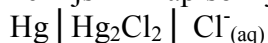


Steklena elektroda:

Sestavljena je iz steklene cevke, ki je na koncu izpihana v bučko. Debelina steklene membrane je 0.06 do 0.1 mm. V bučki je raztopina klorovodikove kisline s stalno točno določeno koncentracijo oksonijevih ionov H_3O^+ in notranja referenčna elektroda $\text{Ag} | \text{AgCl}_{(s)} | \text{Cl}^-_{(aq)}$. Ko potopimo elektrodo v merjeno raztopino, nastane razlika potencialov zaradi različne koncentracije oksonijevih ionov na eni in drugi strani steklene membrane.

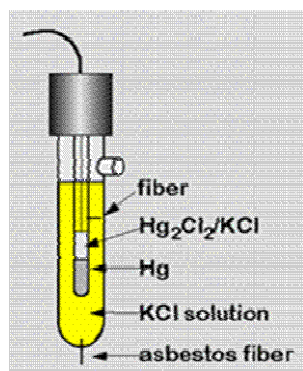
Kalomelova elektroda:

Je sestavljena iz živega srebra, prekritega z zmesjo živosrebrovega (I) klorida Hg_2Cl_2 (kalomela) in živega srebra ter raztopino kalijevega klorida $\text{KCl}_{(aq)}$. S kemijskim zapisom jo predstavimo:

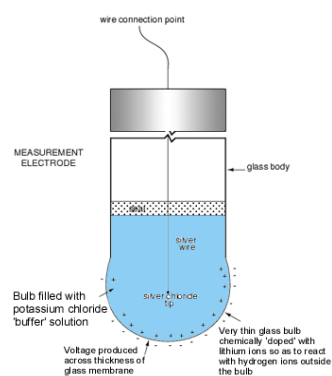


Slika 21: Kalomelova in steklena elektroda

Vir: <http://nl.wikipedia.org/wiki/Referentie-elektrode> (7. 11. 2009)



Slika 22: Kalomelova elektroda, Vir: <http://elchem.kaist.ac.kr/jhkwak/AnalChem/07/01/gif2.htm>
(7. 11. 2009)

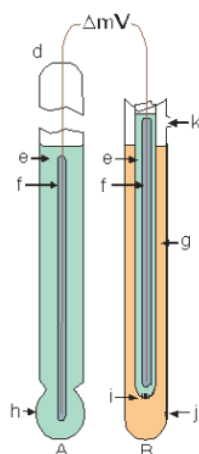


Slika 23: Steklena elektroda, Vir: <http://www.sensorland.com/HowPage037.html>
(7. 11. 2009)

Pogosto uporabljamo za merjenje pH vrednosti **kombinirano elektrodo**:

V kombinirani elektrodi sta združeni referenčna in indikatorska elektroda.

Notranja referenčna elektroda je sestavljena iz Ag | AgCl z raztopino HCl, zunanja referenčna elektroda je sestavljena iz Ag | AgCl z raztopino KCl. Notranja referenčna elektroda je del steklene elektrode s stekleno membrano, ki zaznava različno koncentracijo oksidnih ionov.



Slika 24: Prikaz združitve indikatorske (steklene elektrode - A) in referenčne elektrode (B) v kombinirano elektrodo (C)

Vir: <http://stu.inonu.edu.tr/~e982527/> (7. 11. 2009)

pH-meter pred uporabo vedno umerimo s standardnimi puferскими raztopinami.

3.1.3 Povzetek s preverjanjem znanja

Med instrumentalnimi metodami so zelo razširjene elektrokemijske metode. Potekajo v galvanskem členu ali elektrolizni celici. Osnova so kemijske reakcije oksidacije (oddajanje elektronov) in redukcije (sprejemanje elektronov). Merimo potencial elektrokemijskega člana pri ničelnem toku. Člen sestavljata indikatorska in referenčna elektroda. V analizi živil se najpogosteje uporabljajo potenciometrične metode za merjenje pH vrednosti živil. Glavna

delo pH – metra sta indikatorska elektroda (steklena elektroda) in referenčna elektroda (kalomelova elektroda), danes pogosto združeni v kombinirani elektrodi.

- Razložite pojma oksidacija in redukcija.
- Kaj so oksidanti in kaj reducenti?
- S pomočjo česa lahko napovemo oksidacijsko-redukcijske lastnosti določene spojine?
- Kako je sestavljen galvanski člen?
- Opišite sestavo ionselektivne elektrode.
- Kaj je referenčne in kaj indikatorska elektroda?
- Narišite in opišite kalomelovo in stekleno elektrodo.
- Zakaj uporabljamo kombinirano elektrodo in kako je sestavljena?
- Razmislite kakšne so prednosti instrumentalnih metod pred klasičnimi kemijskimi analiznimi metodami? Katere metode so manj obremenilne za okolje in zakaj?

3.2 SPEKTROMETRIJA

Spektrometrija spada med optične metode. Je ena izmed najpogosteje uporabljenih metod v analitiki (v klinični kemiji, analitiki okolja, analizi živil).

Med spektrometrične (spektrofotometrične) metode prištevamo vse metode, kjer izkoriščamo svetlobo za določanje kemijskih koncentracij snovi.

Instrumentalna oprema ni predraga. Uporaba je enostavna.

Spektrometrične meritve lahko izvajamo v infrardečem, vidnem in ultravijoličnem spektru svetlobe. Izbira valovne dolžine je odvisna od številnih faktorjev:

inštrumentov, ki so na razpolago,

- obarvanosti analita ali možnosti, da ga prevedemo v obarvan derivat,
- vsebnosti funkcijskih skupin, ki absorbirajo v UV ali IR spektru in
- prisotnosti drugih snovi, ki absorbirajo v raztopini.

IR spektrometrija je manj primerna za kvantitativna določanja in je bolj uporabna za kvalitativne meritve v primerjavi z UV in vidno spektrometrijo. Spektrometri v vidnem delu svetlobe so na splošno cenejši in pogostejši od UV-spektrometrov.

3.2.1 Elektromagnetno valovanje

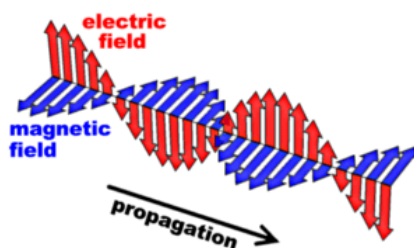
Svetlobo opišemo kot elektromagnetno valovanje. Svetlobne valove sestavljajo oscilirajoča električna in magnetna polja.

Osnova spektrometrične metode je, da vzorec raztopine absorbira elektromagnetno valovanje iz izvora energije. Količina absorbirane energije je sorazmerna koncentraciji analita v raztopini.

Primer:

Raztopina, ki vsebuje bakrove ione, je modre barve, ker absorbira komplementarno rumeno svetlobo iz vidnega spektra ter prepušča modro svetlobo. Več ko je bakrovih ionov v raztopini, več rumene svetlobe se absorbira in več je prepuščene modre svetlobe. Zato je raztopina bolj intenzivno modre barve. **V spektrometriji merimo količino absorbirane svetlobe v obarvani raztopini, ki je proporcionalna koncentraciji te snovi v raztopini.**

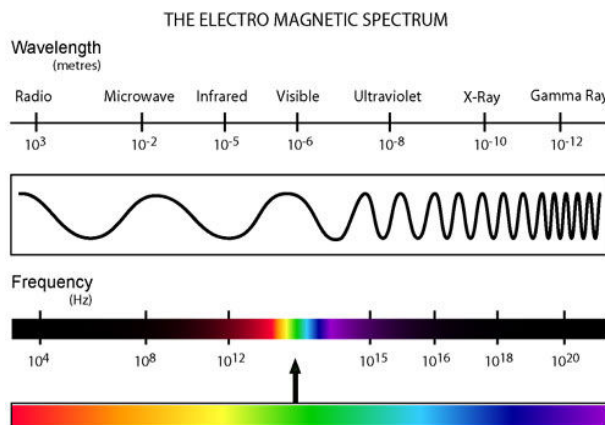
Za boljše razumevanje spektrometrije moramo poznati osnovne značilnosti elektromagnetnega valovanja.



Slika 25: Prikaz elektromagnetnega valovanja

Vir: <http://www.molphys.leidenuniv.nl/monos/smo/index.html?basics/spectroscopy.htm> (7. 11. 2009)

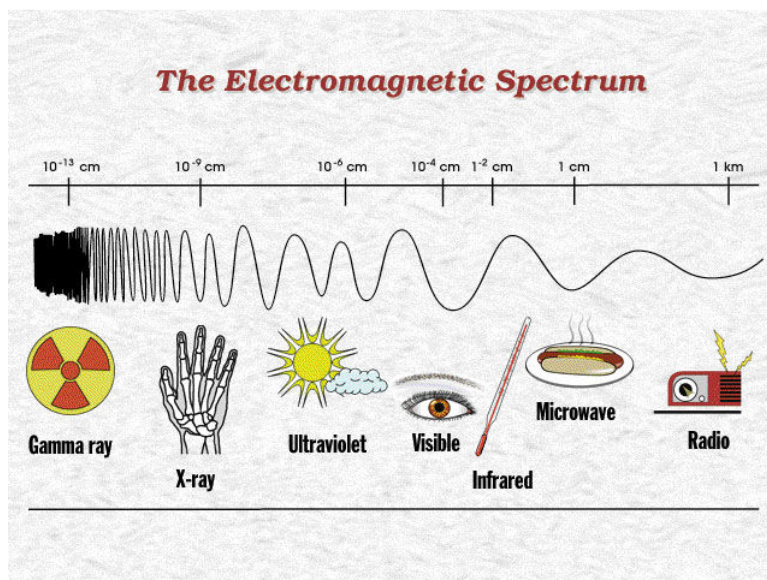
Za elektromagnetno valovanje je značilna **valovna dolžina** (λ), ki opredeljuje razdaljo celotnega cikla valovanja in **frekvenca** (ν), ki predstavlja število prehodov skozi fiksno točko v določenem času.



Slika 26: Prikaz elektromagnetnega spektra

Vir: http://www.colourtherapyhealing.com/colour/electromagnetic_spectrum.php (7. 11. 2009)

ali:



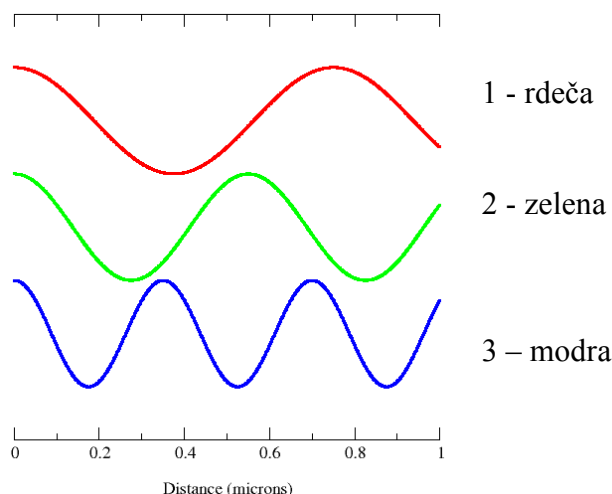
Slika 27: Elektromagnetni spekter v našem življenju

Vir: <http://cassini-huygens.jpl.nasa.gov/mission/nav-uplink.cfm> (7. 11. 2009)

Tabela 3: Barve različnih območij vidnega spektra

valovna dolžina (nm)	absorbirana barva	prepuščena barva
380–450	vijolična	rumena-zelena
450–495	modra	rumena
495–570	zelena	vijolična
570–590	rumena	modra
590–620	oranžna	zelena-modra
620–750	rdeča	modra-zelena

Vir: Gary, 1994



Slika 28: Prikaz elektromagnetnega valovanja rdeče, zelene in modre svetlobe (vidni del svetlobe) z označeno valovno dolžino (na X-osi)

Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation (7. 11. 2009)

Razmerje med valovno dolžino in frekvenco lahko opišemo kot

$$\lambda = c / \nu$$

kjer je λ valovna dolžina v centimetrih, ν je frekvenca v številu na sekundo (ali hercih Hz) in c je hitrost svetlobe (3×10^{10} cm/s).

Valovna dolžina elektromagnetnega valovanja se razteza od nekaj ångstromov do nekaj metrov ($\text{Å} = 10^{-10}$ m).

Valovno dolžino vidne in UV-svetlobe merimo v nanometrih (nm; $1 \text{ nm} = 10 \text{ Å}$).

Elektromagnetno valovanje lahko opišemo tudi kot valovanje določene količine energije. Energija enote valovanja, ki jo imenujemo *foton*, je sorazmerna frekvenci ali valovni dolžini:

$$E = h \nu = hc/\lambda$$

Kjer je E energija fotona (v ergih) in h je Planckova konstanta ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Js). Iz tega izhaja: energija je tem večja, čim krajša je valovna dolžina in čim večja je frekvenca.

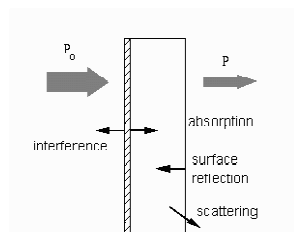
Absorbcija valovanja:

Kvalitativno predstavo o absorpciji valovanja dobimo pri opazovanju vidne svetlobe. Mi "vidimo" stvar obarvano zato, ker prepušča ali reflektira le del svetlobe. Ob prehodu polikromatske svetlobe (bela svetloba, ki je sestavljena iz celotnega spektra valovnih dolžin), skozi neko snov, ta, del svetlobe absorbira, neabsorbirano svetlobo pa prepušča. Prepuščena svetloba je dejansko "vidna" in njena barva je komplementarna absorbirani (glej tabelo 3).

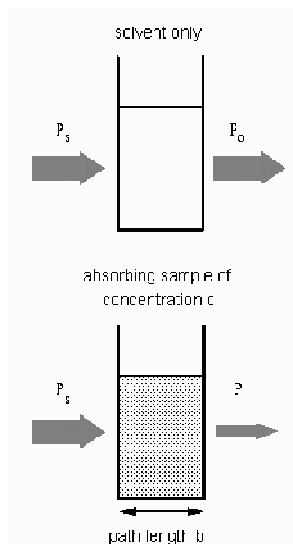
Na podoben način motne snovi absorbirajo določen del svetlobe, ostali del pa reflektirajo kot "vidno" barvo. Npr. raztopina kalijevega permanganata absorbira zeleno svetlobo z maksimumom pri 525 nm in prepušča rdečo svetlobo. Zato vidimo raztopino rdeče obarvano.

3.2.2 Kvantitativno vrednotenje

Del valovanja, ki ga absorbira neki analit v raztopini, lahko povežemo s koncentracijo tega analita v raztopini.



Slika 29: Prikaz vzrokov za zmanjšanje I_0 (P_0) do I (P)



Slika 30: Umerjanje s slepim vzorcem

Vir: <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/spec/beerslaw.html> (7. 11. 2009)

Skozi raztopino vodimo svetlobo točno določene valovne dolžine z intenziteto I_0 (P_0). Del svetlobe se v raztopini absorbira. Ker pri prehodu svetlobe skozi raztopino prihaja, razen do absorpcije svetlobe, še do drugih fizikalnih pojavov, umerimo intenziteto vhodnega žarka (I_0) s pomočjo slepega vzorca.

Za homogeni vzorec velja, da je del prepuščene svetlobe, ki jo imenujemo **transmitanca** (T), enaka razmerju med intenziteto **izhodnega** žarka (I) in **vhodnega** žarka (I_0).

$$T = I / I_0 = 10^{-kl}$$

- k je konstanta in l je dolžina poti svetlobe v raztopini.

V logaritemski obliki lahko zapišemo to enačbo kot

$$\text{Log } T = \log (I / I_0) = -kl$$

Leta 1852 sta Beer in Bernard ugotovila, da podobna odvisnost velja tudi ob upoštevanju **koncentracije** (c).

S kombiniranjem obeh zakonov dobimo Beerov zakon, ki opisuje povezavo transmitance s koncentracijo raztopine in dolžino poti:

$$\text{Log } T = \log (I / I_0) = -acl$$

V kemijski praksi niso zaželenne eksponentne zveze med merjeno fizikalno količino in koncentracijo. Za praktično uporabo so najprimernejše linearne zveze.

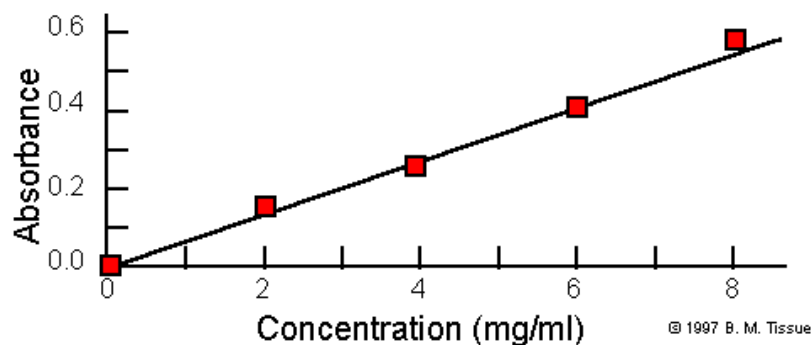
EkspONENTNO zvezo $T = e^{-\epsilon cl}$ lahko prevedemo v linearno tako, da jo logaritmiramo in uvedemo pojem absorbanca (A). Dobljeno zvezo imenujemo **Beer-Lambertov zakon**:

$$A = \epsilon cl$$

Beer-Lambertov zakon je osnova za spektrometrično določanje koncentracije neke snovi v vzorcu. Absorbanca je v linearni zvezi s koncentracijo snovi. Molarni absorpcijski koeficient ϵ [$\text{cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$] in dolžina poti svetlobe skozi raztopino sta pri določanju koncentracije neke snovi konstantna. Dolžina poti v vidni in UV-spektrometriji je običajno 1 cm. Beerov zakon velja samo za monokromatsko svetlobo, ker je absorptivnost različna pri različnih valovnih dolžinah.

Absorbanca je s transmitanco povezana:

$$A = -\log T$$



Slika 31: Prikaz linearne zveze med absorbanco in koncentracijo nekega analita.

Vir: <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/data/wcurve.html> (7. 11. 2009)

Sam podatek o absorbanci nekega analita v vzorčni raztopini nam še ne da podatka o koncentraciji te raztopine. Pripraviti si moramo standardne raztopine, narisati umeritveno krivuljo in iz nje odčitamo koncentracijo našega analita.

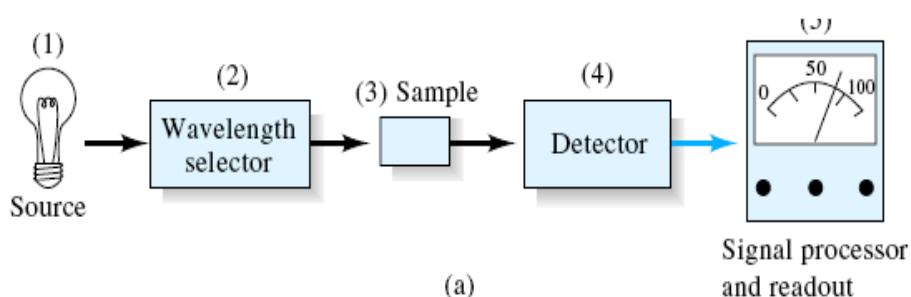
Potek dela:

- priprava vzorčnih raztopin,
- priprava standardnih raztopin za umeritveno krivuljo (običajno pet),
- merjenje absorbance standardnih raztopin pri maksimalni absorbanci (proti slepemu vzorcu),
- izris umeritvene krivulje,
- merjenje absorbance vzorčnih raztopin (proti slepemu vzorcu),
- odčitavanje koncentracije analita v vzorcu iz umeritvene krivulje.

3.2.3 Spektrometer

Spektrometer je sestavljen iz naslednjih elementov:

- izvor svetlobe (žarnica) (1),
- monokromator (naprava, ki omogoča izbor ozkega območja svetlobe) (2),
- kiveta z vzorcem (3),
- detektor (naprava, ki pretvarja svetlobno energijo v električno) (4) in
- registrator (5) (naprava, ki omogoča vrednotenje signala).



Slika 32: Sestavni deli absorpcijskega spektrometra

Vir: <http://employees.oneonta.edu/schaumjc/chem362/components.ppt#2> (7. 11. 2009)

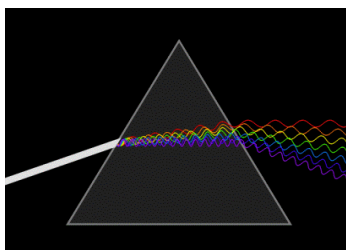
Izvor:

Za izvor vidne svetlobe se običajno uporablja volframova žarnica. Za UV-območje se uporablja nizkotlačna vodikova ali devterijeva žarnica. Uporablja se za območje med 185 in 375 nm. Pri uporabi UV-svetlobe je pomembna uporaba kvarčnih kivet, ker steklene ne prepuščajo UV-svetlobe. Pogosto je tak izvor svetlobe hlajen zaradi pregrevanja.

Monokromator:

Monokromatorji so priprave, ki s pomočjo ogledal ali leč fokusirajo žarek, s pomočjo izhodne rešetke pa preprečujejo neželenemu spektru svetlobe prehod skozi merilno območje. Obstajata 2 tipa monokromatorjev: **optična prizma** in **rešetka**.

Za izolacijo določenega dela svetlobe lahko uporabljamo tudi **optične filtre**. Delujejo na principu absorpcije določenega spektra svetlobe zaradi posebnega nanosa kemikalij na stekleno ploščo. Nekatere izvedbe prepuščajo le spekter svetlobe nad določeno valovno dolžino. Poseben tip filtrov so **interferenčni filtri**, sestavljeni iz dveh plasti stekla, ki je prevlečena s posebnim semitransparentnim filmom (iz kovine) ter notranje plasti transparentnega materiala kot sta kvarc ali kalcijev fluorid. Filter omogoča, zaradi izbora plasti, prepuščanje le ozkega spektra svetlobe.

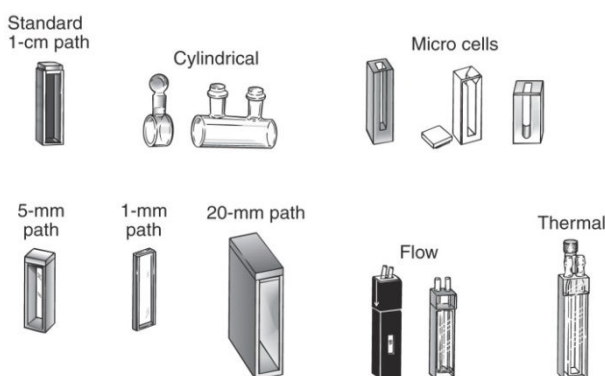


Slika 33: Optična prizma: iz polikromatske svetlobe (bela svetloba) dobimo monokromatsko svetlobo

Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation (7. 11. 2009)

Kiveta:

Ker se meritve izvajajo praviloma v raztopinah, potrebujemo za merjenje posebne, transparentne celice, ki jih imenujemo **kivete**. Največkrat so steklene (lahko tudi iz kvarčnega stekla), širine 1 cm, tako, da je pot svetlobe skozi kiveto dolga vedno 1 cm. Raztopina, ki jo merimo, ne sme reagirati s sestavo kivete. V zadnjem času se pogosto uporabljajo plastične kivete za enkratno uporabo.

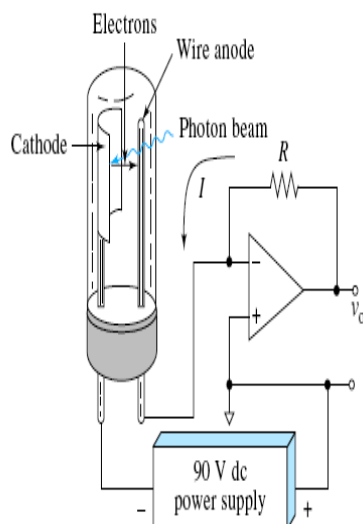


Slika 34: Različne kivete za merjenje absorbanse svetlobe v raztopini vzorca

Vir: <http://employees.oneonta.edu/schaumjc/chem362/components.ppt#16> (7. 11. 2009)

Detektorji:

Najpomembnejši del detektorjev v spektrometriji je **fotocelica**, ki vsebuje fotoemisivno katodo in anodo, med katerima je velika napetost. Prehod enega fotona v fotocelico povzroči sprostitvev enega elektrona s katode ter njegov prehod na anodo. Tak tok elektronov lahko ojačamo in merimo. Fotocelice se razlikujejo, odvisno od valovnih dolžin, za katere jih uporabljamo.



Slika 35: Prikaz fotoelektričnega efekta

Vir: <http://employees.oneonta.edu/schaumjc/chem362/components.ppt#16> (7. 11. 2009)

Fotopomnoževalka je prav tako sestavni del detektorja, ki ojača prej opisani signal. Predstavlja večje število fotocelic v enem elementu.

Diode array detektorji (DAD) se uporabljajo v spektrometrih, ki merijo v celotnem spektru svetlobe hkrati. Diode array predstavlja silikonski kristal ali čip, na katerem je nameščena vrsta nekaj sto silikonskih fotodiod. Vsak tak element ima vgrajen poseben pomnilnik, ki zbira in integrira tok elektronov. Ko svetloba, razpršena v različna valovna območja, pade na tak element, se lahko meri celoten spekter valovnih dolžin. Spekter, ki ga pokriva tak silikonski element je od 180 do 1100 nm - od UV do IR območja.

Spektrometer, ki uporablja kot detektor fotocelico ali DAD, imenujemo spektrofotometer. Glede na tehnično izvedbo ločimo **spektrometre z enim žarkom** in **dvojnimi žarkom**. Prvi so enostavnejši in cenejši. Vsebujejo volframovo žarnico in rešetko ali prizmo. Spektrometri z dvojnimi žarkom so dražji in se redko uporabljajo v rutinskem delu. Imajo dve optični poti. Ena je za žarek, ki potuje skozi kiveto in druga za referenčni žarek ("slepa naprava"). Njihova velika prednost je v pokrivanju celotnega spektra svetlobe in kompenzacije sprememb v občutljivosti detektorja oz. sprememb izvora svetlobe.

Če zapremo pot žarku svetlobe, detektor zaznava vseeno neki minimalni tok elektronov, ki ga imenujemo "dark current". Razlog za to je termična emisija elektronov s katode na fotocelico. Pri vsaki meritvi (valovni dolžini) je potrebno opraviti meritev "dark current" in 100 % T (ničelno absorbanco) za nastavitve spektrometra.



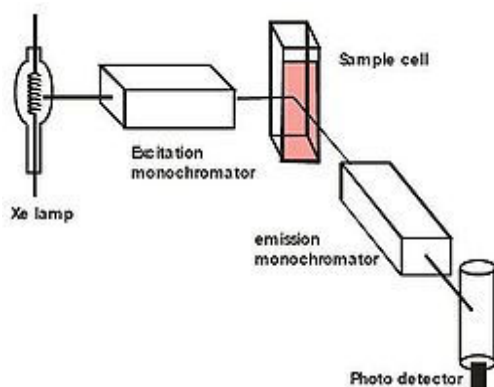
Slika 36: Prikaz dela na spektrofotometru
Vir: A. Hmelak Gorenjak

3.2.4 Spektrofluorometrija

Fluorescenca je značilnost nekaterih molekulah, ko te po absorpciji svetlobe, oddajajo svetlobo daljše valovne dolžine.

Pri sobni temperaturi je večina organskih molekul v osnovnem stanju. Absorpcija **fotona** dvigne elektron, v času manj kot 10^{-15} s, na višji energetski nivo. Po absorpciji se energija hitro zopet sprostí. Posledica tega je nižja vibracijska energija in nižje energijsko stanje elektrona. **Energija (svetloba), ki se sprošča pri tem, je daljše valovne dolžine. Kljub poznavanju strukture organske molekule in njenih absorpcijskih spektrov, strukturna informacija ni zagotovilo, da bo molekula res fluorescirala.**

Glavna prednost spektrofluorometrije je njena izjemna občutljivost. Za nekatere analite je za razred tisočkrat večja kot pri spektrofotometričnih metodah. Bistvena pomanjkljivost spektrofluorometrije pa je t. i. quenching efekt, ko se energija (ki naj bi se oddala kot fluorescenca) absorbira v drugih molekulah.



Slika 37: Shematski prikaz spektrofluorometra

Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_spectroscopy (7. 11. 2009)

3.2.5 Atomska spektrometrija

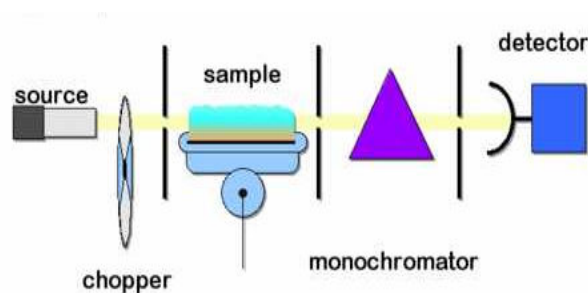
Uparjanje oz. uplinjanje atomov v plamenu omogoča absorbiranje ali emitiranje svetlobe značilne valovne dolžine. V glavnem so valovne dolžine absorbirane ali emitirane svetlobe v tistem delu spektra, kjer je sprememba energije minimalna. Ker je energetski prehod za vsak atom značilen, so značilni tudi atomski spektri, ki jih na ta način dobimo. Tako lahko teoretično za enostaven atom sklepamo na njegovo elektronsko zgradbo iz njegovega spektra. Količina sevanja, ki se oddaja, je proporcionalna številu vzbujenih atomov, kar pa je odvisno od temperature in sestave plamena.

Pri določanju se vedno strogo držimo predpisov in, če je le mogoče, uporabljamo interni standard. V ta namen se uporablja največ litij.

ATOMSKA ABSORBCIJSKA SPEKTROMETRIJA

Analit iz raztopine razpršimo v plamen. Atomi zaradi delovanja energije plamena prehajajo v vzbujeno stanje, ter pri tem absorbirajo žarek določene valovne dolžine (glej sliko 38). Merimo absorbcijo žarka monokromatske svetlobe v plamenu. Absorbirana energija je proporcionalna številu atomov na optični poti.

V ta namen uporabljamo posebne izvore svetlobe. Možna je uporaba izvora bele svetlobe in dveh monokromatorjev, vendar se je najbolj uveljavila uporaba **votle katodne cevi**. Te cevi ali žarnice so značilne za posamezne elemente. Sestavljene so iz elementa, ki se določa, volframove anode in nosilnega plina (argona), pri nizkem pritisku in visoki napetosti.



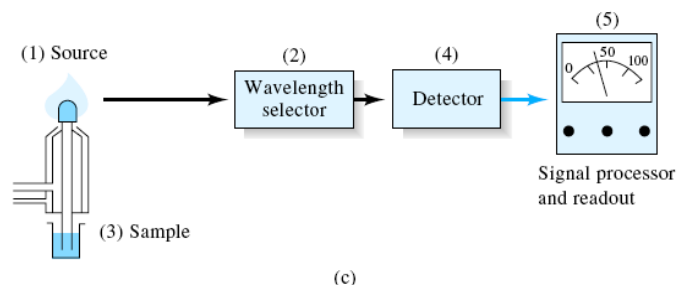
Slika 38: Enožarkovni atomski spektrofotometer

Vir: http://ull.chemistry.uakron.edu/Analytical/Atomic_spec/ (7. 11. 2009)

PLAMENSKA EMISIJSKA SPEKTROMETRIJA

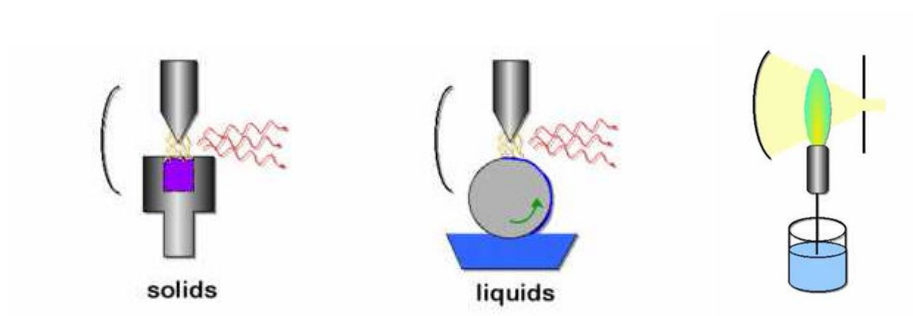
V klinični kemiji se pogosto uporablja plamenska emisijska spektrometrija, ki so jo včasih imenovali plamenska fotometrija. Ker se uporablja plamen nižje energije, so tudi emisijski spektri enostavnejši. Vzorec se v plamen vnaša v obliki raztopine – v obliki spreja, kar delo zelo poenostavi. Plamenski gorilniki so lahko zelo različni. Raztopina se upari, ostane le dehidrirana sol, ki v plamenu disociira v proste atome v osnovnem stanju. Del teh atomov lahko absorbira energijo plamena in prehaja v vzbujeno elektronsko stanje. Ob vračanju v osnovno stanje emitirajo (oddajajo) fotone značilne valovne dolžine, kar lahko merimo z osnovno monokromator-detektorsko enoto. Ker je sevana svetloba enostavne sestave, ni potrebe po vrhunskih monokromatorjih, ampak zadostujejo tudi enostavni interferenčni filtri.

Intenziteta sevanja je direktno proporcionalna koncentraciji analita v raztopini. Danes s to tehniko določamo v glavnem le alkalijske kovine: natrij, kalij in litij. Z uporabo posebne sestave plamena pa je možno določiti tudi 60 različnih elementov.



Slika 39: Shematski prikaz emisijske spektroskopije

Vir: <http://employees.oneonta.edu/schaumjc/chem362/components.ppt#16> (7. 11. 2009)



Slika 40: Prikaz izvedbe elektrode (odvisna je od agregatnega stanja vzorca) in razprševanje vzorca v plamen

Vir: http://ull.chemistry.uakron.edu/Analytical/Atomic_spec/ (7.11.2009)

3.2.6 Povzetek s preverjanjem znanja

Spektrometrične metode izkoriščajo lastnosti raztopin (posameznih sestavin v njej), da absorbirajo iz spektra svetlobe, elektromagnetno valovanje točno določene valovne dolžine. Merimo zmanjšanje intenzitete svetlobe proti slepemu vzorcu. Beer-Lambertov zakon je osnova za spektrometrično določanje koncentracije neke snovi v vzorcu. Absorbanca je v linearni zvezi s koncentracijo snovi. Izmerimo absorbanco pripravljenih standardnih raztopin in iz umeritvene krivulje odčitamo koncentracijo našega analita.

- Kaj je svetloba?
- Opišite spekter elektromagnetnega valovanja.
- Kateri del spektra predstavlja vidno svetlobo?
- Razmislite, zakaj so nekatere raztopine obarvane druge pa brezbarvne.
- Razložite pojma absorbanca in transmitanca.
- Izračunajte absorbanco raztopine, če transmitanca znaša 75 %.
- Kako je povezana absorbanca določene valovne dolžine z obarvanostjo raztopine?
- Od katerih parametrov je odvisna absorbanca analita v vzorcu?

- S formulo zapišite Beerov zakon.
- Grafično prikažite odvisnost absorbance od koncentracije raztopine.
- Kako poteka spekrometrično določanje koncentracije nekega analita?
- Naštejte in opišite sestavne dele spektrofotometra.
- Katere vrste spektrometrije poznate in v čem se razlikujejo?
- Primerjajte klasične analizne metode s spektrometrijo (hitrost, natančnost, cena, potrebno znanje, onesnaževanje okolja).

3.3 KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je skupen izraz za vrsto separacijskih fizikalnih tehnik, ki temeljijo na različnem zadrževanju topljencev, ki se gibljejo v toku tekočine ali plina (**mobilna faza**) preko mirujoče podlage (**stacionarna faza**). Kromatografske metode se v analizi živil pogosto uporabljajo kot kvalitativne, semikvantitativne in kvantitativne metode za določanje aminokislin, aditivov, maščobnih kislin ... Kromatografske tehnike lahko uvrščamo med zelo enostavne in hitre analizne metode, ki ne zahtevajo drage opreme (primer papirna in tankoplastna kromatografija). Z razvojem sodobne instrumentalne opreme, pa so bile razvite tudi zelo zahtevne kromatografske tehnike (tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti – HPLC, plinska kromatografija – GC), ki zahtevajo drago opremo, ustrezno znanje za interpretacijo rezultatov in se uporabljajo kot najzahtevnejše analitične metode.

Cilji kromatografskih metod so:

- razstavljanje zmesi na posamezne komponente,
- kvalitativno določanje posameznih komponent (identifikacija),
- kvantitativno določanje in
- čiščenje snovi iz raztopin (Prošek, 1991).

Glede na agregatno stanje mobilne in stacionarne faze, geometrijo sistema, osnovno silo, ki povzroča gibanje mobilne faze ter glede na osnovni mehanizem retenzije topljencev, ločimo več osnovnih kromatografskih tehnik (glej tabelo 4).

Tabela 4: Osnovne razlike med kromatografskimi tehnikami

Mobilna faza	Plin Tekočina	
Mehanizem retenzije	Adsorbcija Porazdelitev Hidrofobne interakcije Ionska izmenjava	
Geometrija sistema	Valj (kolona) (kolonska) ravnina (planarna)	- polnjena kolona - kapilara - tanka plast - papir

Vir: Prošek, 1991

3.3.1 Tankoplastna kromatografija

Tankoplastna kromatografija (TLC) je planarna separacijska tehnika. Ločevanje komponent vzorca poteka med potovanjem mobilne faze po tanki plasti sorbenta (stacionarna faza), ki je nanešen na tanke ploščice (steklene, redkeje aluminijaste).

TLC-analiza poteka v naslednjih fazah:

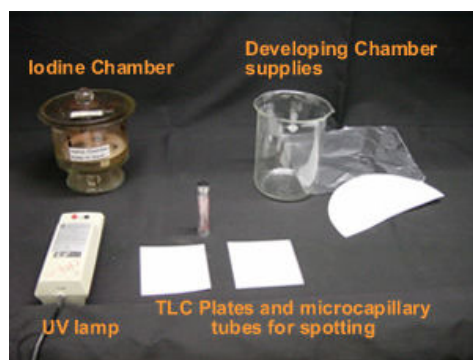
1. Izbira TLC-plošče z ustreznim nanosom,
2. priprava vzorca,
3. nanašanje vzorca,
4. razvijanje kromatograma,
5. detekcija in
6. vrednotenje (Prošek, 1991).

1. Izbira TLC- plošče z ustreznim nanosm

Pred analizo izberemo TLC-ploščo z ustreznim nanosom sorbenta. Danes se dobijo na tržišču industrijsko pripravljene plošče. Običajno so velikosti 10 x 20 ali 20 x 20 cm. Na njih je nanešena 0.20 mm ali 0.25 mm debela plast sorbenta (stacionarna faza) z velikostjo delcev cca. 12 μm . Sorbenti na ploščah so najpogosteje silikagel, aluminijev oksid, poliamid ali mikrokristalična celuloza. Plasti sorbenta lahko pred uporabo pripravimo z različnimi solmi in pufri, tako da dobimo sorbente z boljšo ločljivostjo.

2. Nanašanje vzorca

Vzorec lahko nanašamo ročno ali avtomatsko. Nanašamo jih v točko ali v črto. Ročno nanašamo vzorce s pomočjo kapilar. Oddaljenost vzorca od spodnjega roba plošče je konstantna – običajno 1 do 2 cm. Razdalja med posameznimi nanosi je od 10 do 20 mm. S kapilarami nanašamo od 0.2 do 10 μL vzorca.



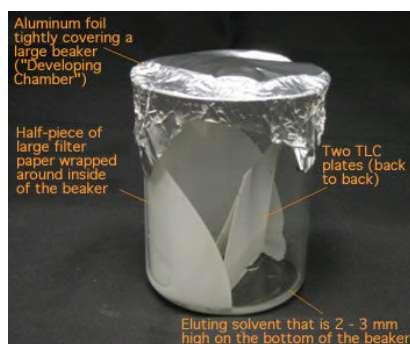
Slika 41: Pripomočki za TLC kromatografijo

Vir:

http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/TLC/thin_layer_chrom.html (7. 11. 2009)

3. Razvijanje kromatograma

Spada med najpomembnejša opravila TLC. Poteka v posebnih kromatografskih kadeh, ki so lahko nasičene ali nenasičene. Nasičeno kad pripravimo tako da steno kadi prevlečemo s filter papirjem in nalijemo razvijalec, ki potuje po filter papirju. Ob izhlapevanju razvijalca iz filter papirja se prostor nasiči z njegovimi parami. Potek razvijanja: Na dno kadi se nalije razvijalec, tako, da je TLC-plošča za 0.5 cm potopljena v njega. Zaradi kapilarnih sil potuje razvijalec (mobilna faza) po plošči navzgor in s seboj nosi molekule komponent vzorca. Te se zaradi različnih interakcij med molekulami vzorca sorbenta (stacionarna faza) in topila ločijo. Ko mobilna faza doseže zgornji rob plošče, ploščo vzamemo iz kadi in jo posušimo s tokom toplega zraka.



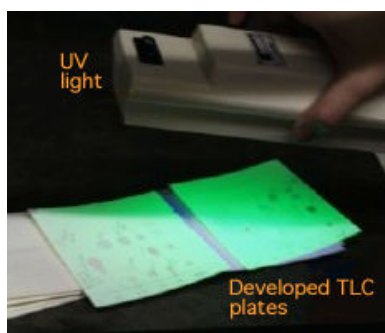
Slika 42: Razvijanje TLC plošč lahko poteka tudi enostavno v laboratorijski čaši

Vir:

http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/TLC/thin_layer_chrom.html (7. 11. 2009)

4. Detekcija

Večina substanc po razvijanju nima svoje lastne barve, zato je potrebno po razvitju kromatograma opraviti vizualizacijo. UV-detekcija - uporabna je za substance, ki posedujejo lastno fluorescenco. Takšne substance lahko opazujemo v posebni komori, če jih obsevamo z UV-svetlobo 254 ali 366 nm. Rosenje (prskanje) - posamezne substance so vidne na kromatogramu šele po izvedbi kemijske reakcije z določenim reagentom. Zaradi nastanka strupenih aerosolov to opravljamo vedno samo v digestoriju.



Slika 43: Nekatere snovi lahko detektiramo s pomočjo UV-svetlobe

Vir:

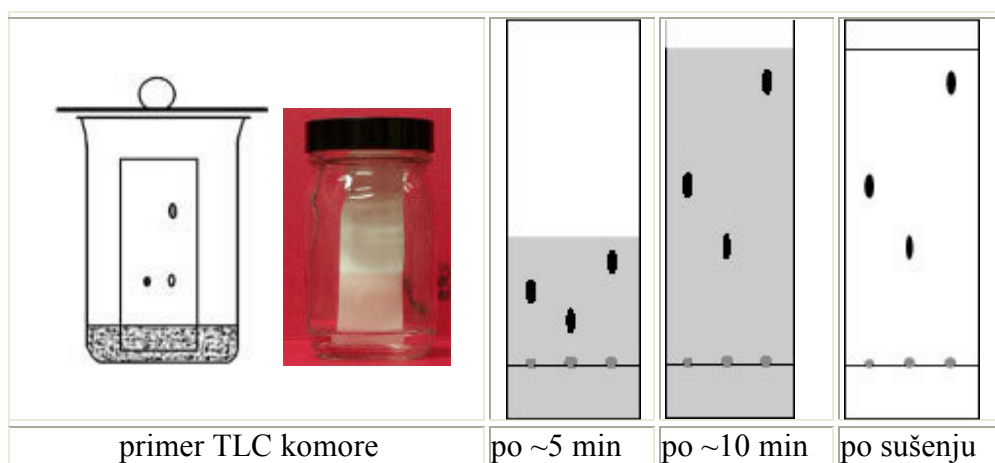
http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/TLC/thin_layer_chrom.html (7. 11. 2009)

5. Vrednotenje

Ločene posamezne komponente vzorca so v obliki madeža na plošči. Razvrščene so od nanosa vzorca do meje, do katere je pripotovalo topilo. Dolžina poti, ki jo je pripotovala posamezna komponenta vzorca v razmerju z dolžino poti topila (retenzijski faktor), nam da informacijo o tem, kaj imamo v vzorcu – kvalitativna analiza (glej sliko 44).

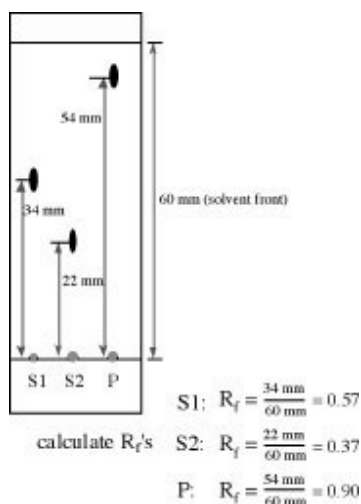
$$\text{retenzijski faktor} = \frac{\text{dolžina poti substance}}{\text{dolžina poti topila}}$$

Kvantitativno ovrednotimo kromatogram s pomočjo denzitometrov – merjenja reflektirane svetlobe. Večinoma se tankoplastna kromatografija uporablja za kvalitativno ali semikvantitativno analizo. Pri slednji primerjamo površine lis vzorcev s površinami lis standardov in iz poznanih koncentracij standardov sklepamo na količino posamezne substance v vzorcu.



Slika 44: Prikaz kromatografske komore in razvijanje kromatograma

Vir: <http://www.chem.ucla.edu/~bacher/General/30BL/tips/TLC1.html> (7. 11. 2009)



Slika 45: Kvalitativno vrednotenje kromatograma Vir:
<http://www.chem.ucla.edu/~bacher/General/30BL/tips/TLC1.html> (7. 11. 2009)

3.3.2 Tekočinska kromatografija

Kot pri ostalih kromatografskih tehnikah se tudi pri tekočinski kromatografiji ločijo posamezne komponente v vzorcu s porazdeljevanjem med dve fazi, stacionarno in mobilno fazo. Mobilna faza pronica skozi stacionarno fazo v določeni smeri (glej sliko 46). Kromatografski proces, ki pri tem nastaja, je rezultat ponavljajočega se dejanja sorpcije in desorpcije s stacionarno fazo med potovanjem komponent vzdolž kolone. Do separacije pride zaradi razlik v porazdelitvenih konstantah posameznih komponent vzorca.

Mobilna faza pri tekočinski kromatografiji je tekočina nizke viskoznosti. Stacionarne faze so porozni mikrodelci iz različnih substanc, najpomembnejši so silika gel, hidro oksidi, porozni organski polimeri, lasersko obdelan aluminij in v zadnjem času tudi porozni grafit.

Podobno kot pri ostalih kromatografskih tehnikah tudi pri tej analizni tehniki dobimo informacije o:

- kompleksnosti vzorca (število pikov),
- kvalitativni sestavi vzorca (položaj pikov),
- količini posamezne komponente v vzorcu (površina pikov).



Slika 46: Enostaven primer kolonske kromatografije
 Vir:

http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/ColumnChrom/column_chrom.html (7. 11. 2009)

Cilj kromatografije je učinkovita separacija. Kvalitetna separacija je definirana z ločljivostjo dveh pikov.

Stacionarna faza v tekočinski kromatografiji:

Tekočinska kromatografija ima zelo široko območje izbora mobilnih in stacionarnih faz, zato tudi spada med bolj selektivne metode kot plinska kromatografija. Za čim boljše selektivnost

je potrebno ustrezno izbrati separacijski način, strukturo stacionarne faze in sestavo mobilne faze.

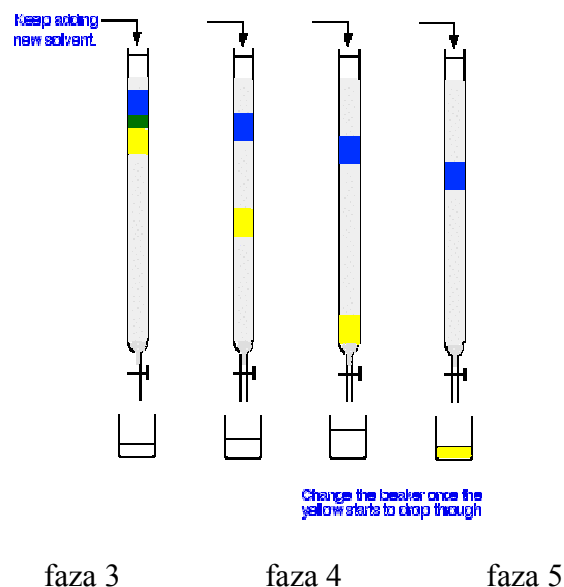
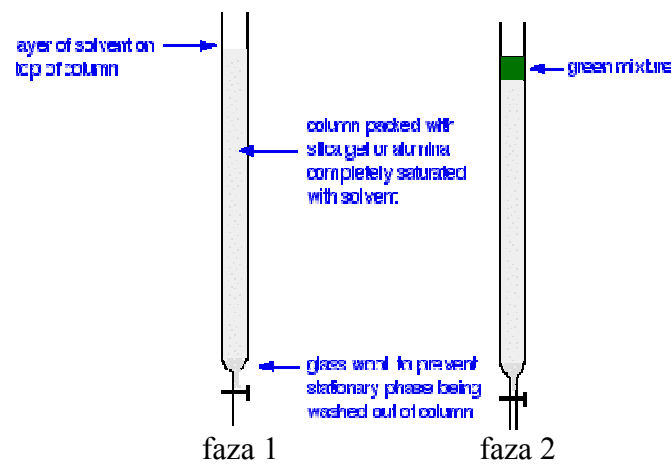
Polnila

V tekočinski kromatografiji nizkih pritiskov se uporabljajo kot polnila popolnoma porozni delci velikih premerov, ki dajejo slabe učinkovitosti in zahtevajo dolge separacijske čase. Popolnoma porozna polnila s silika mikrodenci s premeri manj kot 10 μm omogočajo večjo učinkovitost kolon, večje kapacitete vzorca in krajše separacijske čase. Kot surovina za izdelavo polnil lahko služijo: silika gel, hidro oksidi, lasersko obdelan aluminij, porozni organski polimeri in porozni grafit.

Mobilna faza

Kot mobilna faza se največ uporabljata organski topila metanol in acetonitril. Sama voda nima elucijske moči, zato ji dodajamo ustrezna topila.

Enostaven grafičen prikaz o delovanju kolonske kromatografije:



Slika 47: Prikaz polnjene kolone (1), dodatek zelenega barvila -vzorca, ki ga želimo ločiti (2), dodajanje mobilne faze (3) in potek ločevanja (4) s končnim eluatom (rumenim barvilom) (5)

Vir: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/column.html> (7. 11. 2009)

Več o kolonski kromatografiji tudi na spletu:

http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/ColumnChrom/column_chrom.html (6.12.2009)

<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/column.html> (6.12.2009)

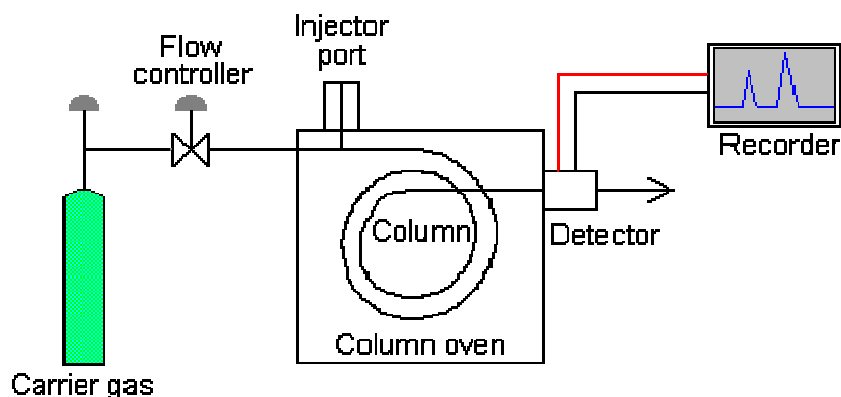
<http://www.chem.ubc.ca/courseware/154/tutorials/exp3A/columnchrom/> (6.12.2009)

<http://www.wfu.edu/academics/chemistry/courses/CC/index.htm> (6.12.2009)

3.3.3 Plinska kromatografija

Se prav tako pogosto uporablja za ločbo substanc v analitične namene. Izvaja se praviloma na aparatih - plinskih kromatografih. Aparati so sestavljeni iz:

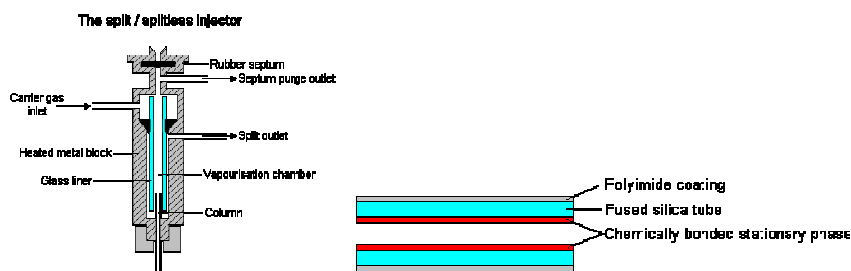
analitične kolone (steklena, keramična ali kovinska), katera notranjost je prevlečena s stacionarno fazo. Snov, ki jo želimo ločiti vnašamo skozi **injektor**, kjer zaradi visokih temperatur injektorja prehajajo snovi v plinasto stanje. Pretok **mobilne faze** (plina) skozi kolono omogoča prenos uplinjenih snovi po koloni do **detektorja**, občutljive naprave, ki beleži prehod snovi iz kolone. Signal detektorja se poveča in prenaša na **rekorder**.



Slika 48: Shematski prikaz plinskega kromatografa

Vir: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrn.htm> (6. 12. 2009)

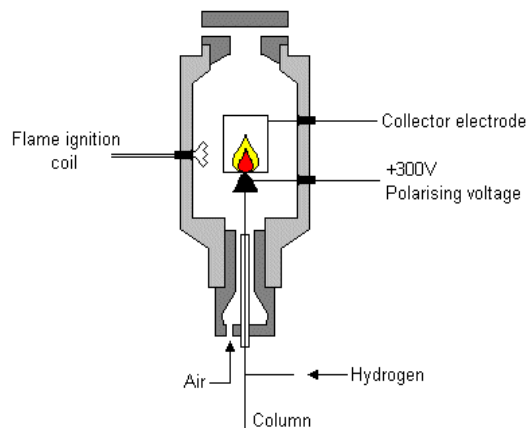
Injektor in kolona se nahajata v pečici kromatografa. V plinskih kromatografih imamo lahko različne detektorje. Med pomembnejša sodita plamensko ionizacijski in masni spektrometer.



Slika 49: Primer injektorja

Slika 50: Prikaz sestave kolone

Vir: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm> (6. 12. 2009)



Slika 51: Shematski prikaz plamensko ionizacijskega detektorja

Vir: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm> (6. 12. 2009)

Mobilna faza

V plinskih kromatografih predstavlja mobilno fazo **inerten plin**. Največ se v te namene uporablja helij, manj pogosto dušik. Mobilna faza praktično nima vpliva na samo kromatografsko ločitev. V analitično kolono prihaja segret na temperaturo injektorja. Mobilna faza prenaša uparjene snovi vzdolž kolone, kjer se te zaradi različnih fizikalno-kemijskih vplivov zadržujejo krajši ali daljši čas na stacionarni fazi kolone.

Uspešnost kromatografske ločbe je odvisna od številnih faktorjev in kromatografskih pogojev. Vsekakor sta najpomembnejša faktorja **pomožni material in stacionarna faza analitične kolone**. Za pomožni material je zaželeno, da nima adsorpcijskih lastnosti in da je kemično inerten. Uporabljamo steklene in keramične pomožne materiale.

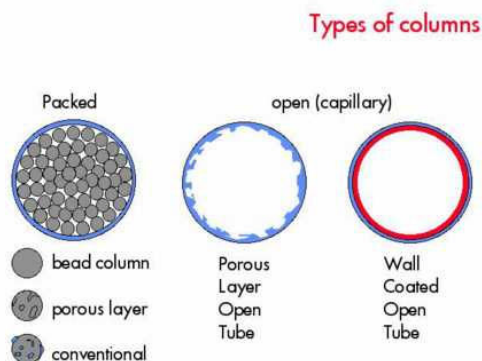
Dolžina kolon in njihov premer sta lahko zelo različna. Kapilarne kolone imajo majhen notranji premer, običajno 0.25 mm in dolžino nad 20 m. Stacionarna faza je nanešena v notranjosti v zelo tankih nanosih. Zaradi velike dolžine imajo kapilarne kolone veliko sposobnost ločbe snovi.

Stacionarna faza

Pri izbiri stacionarne faze za ločbo določenih snovi je pomembno, da izberemo stacionarno fazo s približno takšno polarnostjo, kot jo ima analit.

Stacionarne faze imajo temperaturne omejitve. Spodnji limit predstavlja temperatura, pri kateri ni željene vezave, zgornji limit pa predstavlja temperatura, pri kateri prične prehajati stacionarna faza iz kolone v detektor. Na ta način kolona "spušča" in izgubljammo stacionarno fazo.

Pred uporabo je potrebno vse kolone dalj časa kondicionirati.



Slika 52: Prerez različnih tipov kolon

Vir: <http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/gc/> (6. 12. 2009)

Slika 53: Vrste kolon, ki se uporabljajo v GC - tehniki

Vir: <http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/gc/> (6. 12. 2009)**Kvalitativna in kvantitativna določitev**

Komponente mešanice, ki jih ločimo v procesu kromatografske ločbe, lahko identificiramo s pomočjo primerjave časa zadrževanja v koloni (retencijski čas), ki ga primerjamo z retencijskim časom standardnih substanc pod enakimi pogoji. Retencijski čas predstavlja čas, ki je potreben, da določena substanca prispe od injektorja do detektorja. Ker ima lahko več substanc pod določenimi pogoji kromatografske ločbe podoben retencijski čas, se za identifikacijo lahko uporablja dve ali več stacionarnih faz različne polarosti.

Kvantitativno določitev izvedemo z integriranjem površine pika (glej primer kromatograma plinske kromatografije, slika 54).

Več na spletu:

<http://www.chromatography-online.org/index.html> (6. 12. 2009)

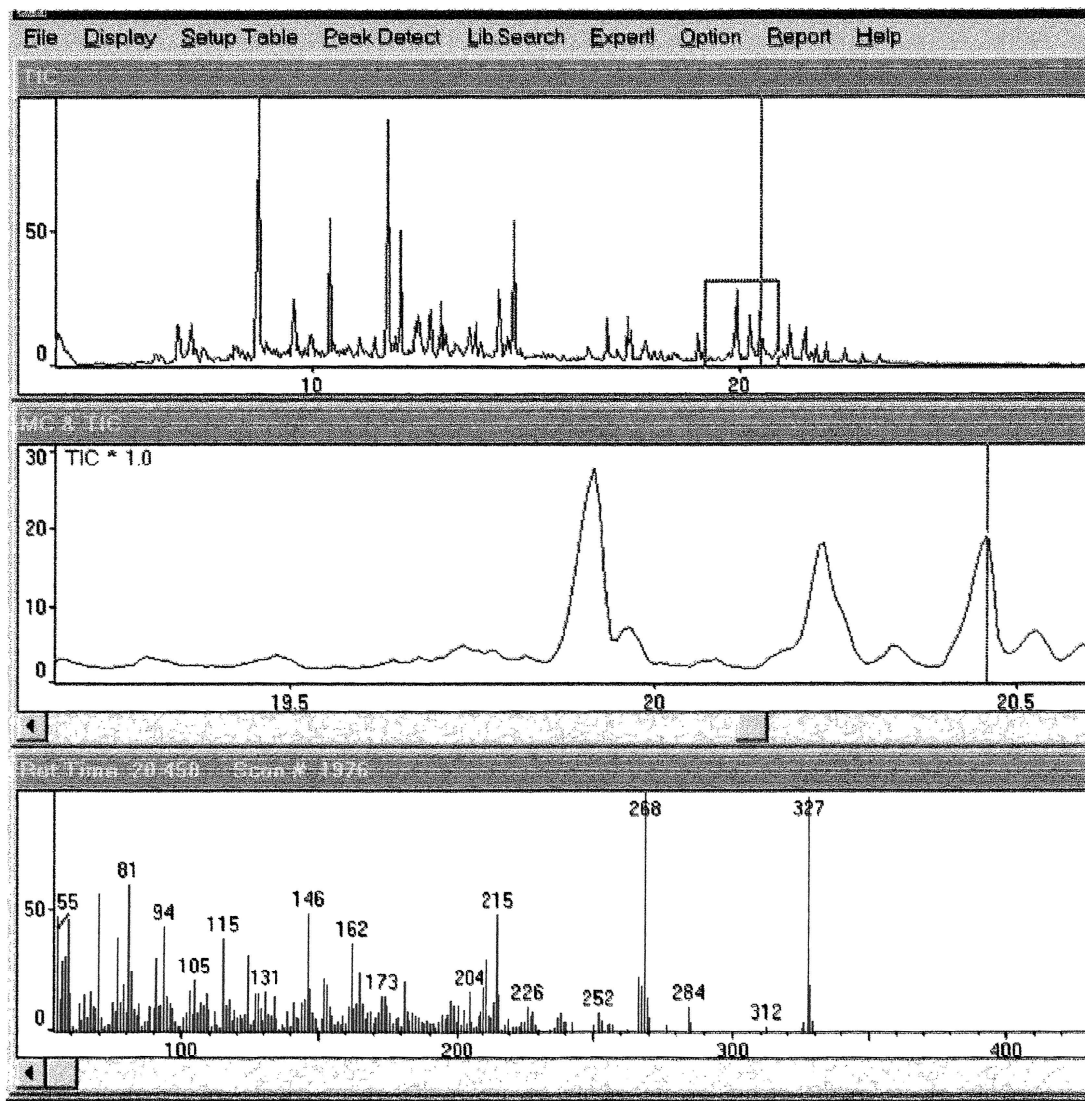
Preizkusite se tudi v e-učilnici:

<http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/> (6. 12. 2009)

3.3.4 Povzetek s preverjanjem znanja

Kromatografija spada med separacijske – ločitvene metode. Vzorec ločimo na posamezne komponente, sledi identifikacija komponent vzorca s pomočjo dodatka standardnih raztopin ali (in) z določitvijo retenzijskega faktorja. Papirna in tankoplastna kromatografija se pogosto uporabljata le za kvalitativno in semikvantitativno določitev, tekočinska kromatografija in plinska kromatografija pa tudi za kvantitativno določitev. Posamezne kromatografske tehnike se med sabo razlikujejo po vrsti stacionarne in mobilne faze in izvedbi dela. Kot stacionarna faza se uporabljajo papir (pri papirni kromatografiji), različni nanosi (npr. silikagel pri tankoplastni, tekočinski kromatografiji), kot mobilna faza pa različna organska topila (pri papirni, tankoplastni in tekočinski kromatografiji) in inerten plin (pri plinski kromatografiji).

- Razložite osnovo delovanja kromatografskih metod.
- Kaj je stacionarna in kaj mobilna faza?
- Naštejte cilje kromatografije.
- Zakaj prištevamo kromatografske metode med separacijske metode?
- Naštejte faze dela tankoplastne kromatografije (TLC).
- Kaj je stacionarna faza in kaj mobilna faza TLC tehnike?
- Kako poteka kvalitativna in kako kvantitativna določitev pri TLC tehniki?
- Izračunajte retenzijski faktor, če je pot topila znašala 16,5 cm, pot komponente vzorca pa 4,7 cm.
- Opišite kolonsko kromatografijo in potek dela.
- Razmislite, kdaj se odločamo za kolonsko kromatografijo?
- Kaj je stacionarna faza in kaj mobilna faza kolonske kromatografije?
- Naštejte sestavne dele plinskega kromatografa.
- Kaj uporabljamo kot mobilno fazo pri plinski kromatografiji (GC)?
- Navedite bistveno razliko mobilne faze tekočinske kromatografije in plinske kromatografije (GC) in kakšen je njun pomen?
- Opišite kolono plinskega kromatografa in čemu je namenjena?
- Razmislite, katera vrste kromatografij je za okolje manj obremenilna in zakaj?

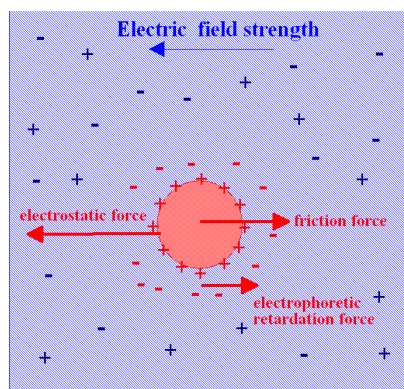


Slika 54: Primer plinskega kromatograma
Vir: Splošna bolnišnica Maribor, Oddelek za laboratorijsko diagnostiko

3.4 ELEKTROFOREZA

Elektroforeza spada med ločitvene metode in je definirana kot potovanje nabitih delcev v električnem polju. Glavni poudarek uporabe je v analitiki vseh vrst proteinov - v biokemiji, biologiji, analizi živil, klinični kemiji, farmacevtski analitiki. V analizi živil lahko s pomočjo elektroforeze določamo beljakovine v živilih, katerih beljakovinska sestava se med skladiščenjem ali tehnološkem procesu spreminja. Sodobne elektroforezne tehnike nam omogočajo tudi izvedbo občutljivih testov na ponarejena živila: določimo lahko 5 % svinjskega mesa ali 20 % konjskega mesa v govejih izdelkih. V izdelkih lahko ugotovimo že dodatek mleka v količini pod 1 %, v testeninah, kjer uporabljamo durum pšenico, lahko z uporabo elektroforeze ugotovimo dodatek mehke moke (do 3 %) (Golc-Wondra, 1995).

Z elektroforeznimi metodami **ločujemo nabite molekule**. Večina separacij poteka v električnem polju na nosilcih, ki so nasičeni s pufrom. Molekule lahko ločujemo ne samo glede na razlike v nabojih, temveč tudi glede na velikost molekul, njihovo izoelektrično točko...



Slika 55: Potovanje molekule v električnem polju
Vir: <http://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis> (20. 12. 2009)

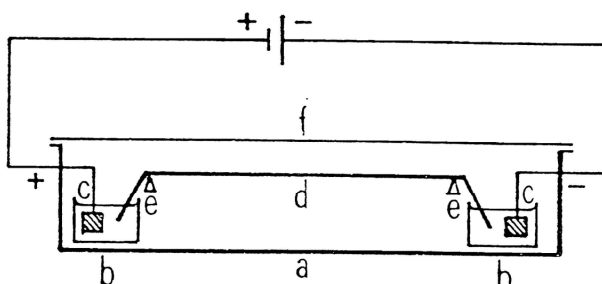
Kot nosilec za elektroforezo najpogosteje uporabljamo poliakrilamide in agarozne gele, pa tudi celulozni acetat in kromatografski papir. Pufer je potreben za prevajanje električnega toka in tudi za vzdrževanje konstantnega ionizacijskega stanja polielektrolitov.

Elektroforetsko potovanje je odvisno od številnih parametrov:

- velikosti delca,
- oblike delca,
- koncentracije spojine,
- električnega naboja,
- stopnje disociacije in hidratacije delcev,
- viskoznosti,
- pH vrednosti,
- temperature,
- ionske moči medija,
- poljske jakosti in
- časa potovanja in razdalje med elektrodama (Golc-Wondra, 1995).

3.4.1 Papirna elektroforeza

Papir za elektroforezo je podobno kot za kromatografijo posebno obdelan, odvisno od zahtev vzorca, ki ga preiskujemo. Tudi vrsta puferske raztopine je odvisna od vrste vzorca. Na sliki 56 je prikazana aparatura za elektroforezo v vlažni komori.

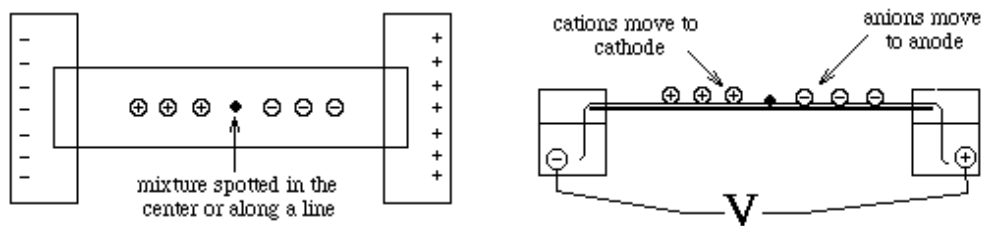


Slika 56: Aparatura za elektroforezo v vlažni komori
Vir: Sodja Božič, 1998, 34

V ploščati kadički iz umetne snovi (a) sta prekata a in b za pufersko raztopino. V prekatih sta nameščeni elektrodi (c). Na nosilec (najlonske niti, e) položimo trakove filter papirja (d). Aparaturo pokrijemo s stekleno poščo (f). Elektrodi vežemo preko usmernika na omrežno napetost.

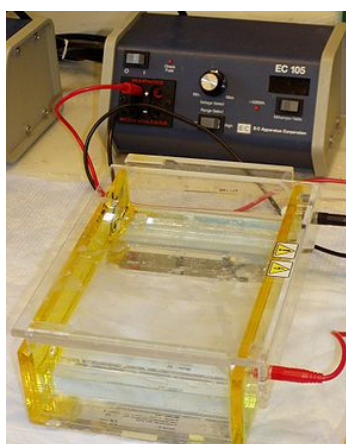
Potek dela:

- Na enem izmed koncev traku narišemo startno črto.
- Vzorec nanašamo v obliki kapljice ali v črto. Za kvantitativno določitev volumen točno odmerimo (npr. 10 μL)
- Posušimo vzorec in omočimo trak v pufersko raztopino ter ga položimo na nosilec tako, da je startna črta na nasprotni strani elektrode, proti kateri delci potujejo in da konca segata v pufersko raztopino.
- Kadičko pokrijemo s stekleno ploščo tako, da se komora nasiti z vlago.
- Elektrodi povežemo z usmernikom in vklopimo omrežno napetost - odvisno od vrste vzorca od 150 do 500 V.
- Opazujemo potovanje madežev oz. trakov. Ko je ločitev potekla, elektroforezo prekinemo.
- Papirne trakove osušimo s tokom toplega zraka, določimo oddaljenost od startne črte in zapišemo smer gibanja delcev.
- Pri kvantitativni analizi določimo koncentracijo posameznih komponent na različne načine. Papir z madežem odrežemo in madež raztopimo v primernem topilu ter koncentracijo določimo spektrofotometrično. Lahko pa liso na papirju direktno fotometriramo (Sodja Božič, 1998).



Slika 57: Prikaz potovanja delcev ob izvedbi papirne elektroforeze
 Vir: <http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Bio750/Electrophoresis.html> (20. 12. 2009)

3.4.2 Gelska elektroforeza



Komercialne aparature, ki so na voljo v najrazličnejših izvedbah, so sestavljene iz **stabilnega usmernika** in **elektroforezne enote**, v kateri sta rezervoarja za pufer z elektrodama. Gel, na katerem poteka separacija, se nahaja med steklenima ali plastičnima ploščama ali v cevki (vertikalna izvedba), lahko pa leži na podpornem delu (horizontalna izvedba) in mora biti povezan z rezervoarji za pufer.

Po separaciji barvamo proteine na gelu z različnimi barvili in jih tako napravimo vidne. Vrednotimo jih z denzitometrom ob uporabi standardnih mešanic proteinov.

Slika 58: Horizontalna izvedba gelske elektroforeze
 Vir: <http://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis> (20. 12. 2009)

Kako lahko sami izvedemo gelsko elektroforezo?
 Vir: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/electrophoresis/> (20. 12. 2009)



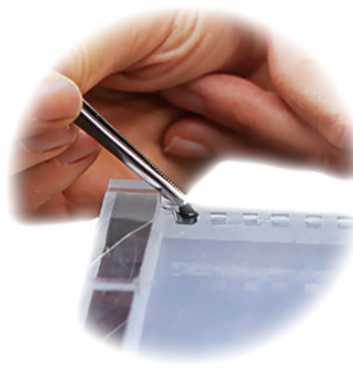
Slika 59: Pripravimo si ves pribor in kemikalije.



Slika 60: Agar raztopimo v vodi in segrevamo v mikrovalovni pečici dokler se ne raztopi.



Slika 61: V model prilijemo ohlajen – mlačen gel ter ga z rahlim obračanjem razporedimo po celotni površini.



Slika 62: Ko je ohlajen, pazljivo odstranimo mesta, ki so namenjena za nanos vzorca. Gel prenesemo na temno, najbolje črno podlago in v mesta za vzorce pazljivo naneseemo živilska barvila.



Slika 63: V elektroforezno kadičko vstavimo gel tako, da so mesta z vzorci bliže črni (negativni) elektrodi. Prilijemo pufer in zapremo kadičko s pokrovom ter opišemo spremembe.



Slika 64: Napetost nastavimo na 50–100 V ter pustimo približno 5 - 10 min. Ko prične barvilo potovati skozi gel, izključimo električni tok in priključimo električni tok.

Uporabljamo različne izvedbe elektroforeze glede na specifičnost preiskovanega materiala in prednosti, ki jih nudi posamezna metoda. Metode, ki omogočajo ločitev proteinov na posamezne frakcije (sestavne dele), so posebnega pomena, ker omogočajo razumevanje poteka najenostavnejših kot tudi najzahtevnejših procesov.

Poglejte si tudi virtualno učilnico o gelski elektroforezi:

<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/> (20. 12. 2009)

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/electrophoresis.html> (20. 12. 2009)

3.4.3 Povzetek s preverjanjem znanja

Z elektroforeznimi metodami ločujemo nabite molekule v električnem polju (najpogosteje proteine) in jih kvalitativno in kvantitativno določamo. Molekule ločujemo glede na razlike v nabojih, velikosti molekul, njihovo izoelektrično točko ... Poznamo papirno in gelsko elektroforezo. V obeh primerih je aparatura sestavljena iz stabilnega usmernika in elektroforezne enote, v kateri sta rezervoarja za pufer z elektrodama. Pri papirni elektroforezi poteka separacija na papirju, pri gelski elektroforezi pa na gelu, oba nosilca morata biti povezana s pufersko enoto.

- Razložite princip delovanja elektroforeze.
- Za katere snovi se najpogosteje uporablja elektroforeza?
- Od česa je odvisna hitrost potovanja nabitih molekul v električnem polju?
- Naštejte inventar, ki ga potrebujemo za izvedbo papirne elektroforeze.
- Navedite prednost gelske elektroforeze pred papirno.
- Razložite princip kvalitativnega in kvantitativnega določanja snovi pri papirni elektroforezi.
- Razmislite o razlikah in podobnostih med kromatografijo in elektroforezo.
- V virtualni učilnici izvedite gelsko elektroforezo in določite dolžino DNA molekul.
<http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/> (6. 6. 2010)
- Kaj bi potrebovali, če bi želeli sami izvesti gelsko elektroforezo? Opišite, kako bi jo izvedli?

3.5 LITERATURA IN DODATNO BRANJE

Bryan, L. Williams. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. London: Edward Arnold, 1984.

Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. Fourth Edition. New York: W.H. Freeman and company, 1996.

Gary, D. C. *Analytical Chemistry*. Fifth Edition. New York: John Wiley & Sons, 1994.

Golc-Wondra, A. *Elektroforeza*. Sodobne separacijske tehnike. Ljubljana: Kemijski inštitut Ljubljana, 1995.

Gottwald, W. *GC für Anwender*. Weinheim: VCH, 1995.

Harris, D. C. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Wiesbaden: Vieweg, 1997.

Prošek, M., in Pukl, M. *Kvantitativna planarna kromatografija*. Ljubljana: Kemijski inštitut Boris Kidrič, 1991.

Skoog, D.A., et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Thomson Brooks Cole, 2004.

Sodja Božič, J. *Vaje iz instrumentalne analize*. Trzin: Izolit, 1998.

Atomic spectroscopy. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu:
http://ull.chemistry.uakron.edu/Analytical/Atomic_spec/

California Institute of Tecnologie. Jet Propulsion Laboratory. *The Electromagnetic Spectrum*. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu:
<http://cassini-huygens.jpl.nasa.gov/mission/nav-uplink.cfm>

Calomel reference electrode. (online). (citirano 3.6.2010). Dostopno na naslovu:
<http://elchem.kaist.ac.kr/jhkwak/AnalChem/07/01/gif2.htm>

Clark J. *Column Chromatography*. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu:
<http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/column.html>

Column Chromatography. (online). (citirano 2.6.2009). Dostopno na naslovu:
http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/ColumnChrom/column_chrom.html

Column Chromatography Tutorial. (online). (citirano 3. 10. 2009). Dostopno na naslovu:
<http://www.chem.ubc.ca/courseware/154/tutorials/exp3A/columnchrom/>

Components of Instruments for Molecular and Atomic Spectroscopy. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu:
<http://employees.oneonta.edu/schaumjc/chem362/components.ppt#2>

Dolan DNA Learning Center. *Gel Electrophoresis*. (online). (citirano 7. 11. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/electrophoresis.html>

Electrophoresis. (online). (citirano 7. 11. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/Bio750/Electrophoresis.html>

Galvanski člen. (online). (citirano 3. 6. 2010). Dostopno na naslovu: <http://www.minet.si/thumbnail/phpThumb.php?bg=&h=300&src=/gradivo/sola/lekcije>

Gas Chromatography. (online). (citirano 3. 10. 2009). Dostopno na naslovu: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschr.htm>

Gas Chromatography. (online). (citirano 3. 10. 2009). Dostopno na naslovu: <http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/gc/>

Kombinirana elektroda. (online). (citirano 3. 9. 2009). Dostopno na naslovu: <http://stu.inonu.edu.tr/~e982527/>

Nave R. *Electrochemical Cells*. (online). (citirano 3. 6. 2010). Dostopno na naslovu: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/Hbase/chemical/electrochem.html#c2>

The Colour Therapy Professionals & Colour information resource. *The Electromagnetic Spectrum*. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu: http://www.colourtherapyhealing.com/colour/electromagnetic_spectrum.php

The University of Utah. Genetic science learning Center. *Colorful Electrophoresis*. (online). (citirano 7. 11. 2009). Dostopno na naslovu: <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/gel/>

Thin Layer Chromatography. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu: http://www.wellesley.edu/Chemistry/chem211lab/Orgo_Lab_Manual/Appendix/Techniques/TLC/thin_layer_chrom.html

Thin-layer chromatography. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.chem.ucla.edu/~bacher/General/30BL/tips/TLC1.html>

Tissue B.M. *Beer-Lambert Law*. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/spec/beerslaw.html>

Tissue B.M. *Workig Curve*. (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.chem.vt.edu/chem-ed/data/wcurve.html>

Scott P.W. *Chromatography*. (online). (citirano 2. 10. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.chromatography-online.org/index.html>

Sheffield Hallam University. Faculty of Health and Wellbeing. Biosciences Division. On line learning. *Resources for Analytical Science*. (online). (citirano 2. 10. 2009). Dostopno na naslovu: <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/>

[Stara fizikalna učila in pripomočki idrijske realke. Galvanski člen.](http://www.gimidrija.si/slo/projekti/sfucila/elek/Elek_11/galvanski_clen.htm) (online). (citirano 3. 6. 2010). Dostopno na naslovu:
http://www.gimidrija.si/slo/projekti/sfucila/elek/Elek_11/galvanski_clen.htm

Understanding pH measurement. (online). (citirano 3. 6. 2010). Dostopno na naslovu:
<http://www.sensorland.com/HowPage037.html>

Universiteit Leiden. *Basics of optical spectroscopy.* (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu:
<http://www.molphys.leidenuniv.nl/monos/smo/index.html?basics/spectroscopy.htm>

Wake Forest College. Department of Chemistry. *Column Chromatography.* (online). (citirano 3. 10. 2009). Dostopno na naslovu:
<http://www.wfu.edu/academics/chemistry/courses/CC/index.htm>

Wikipedia. *Redox.* (online). (citirano 3. 6. 2010). Dostopno na naslovu:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Oxidation>

Wikipedia. *Referentie-elektrode.* (online). (citirano 3. 6. 2010). Dostopno na naslovu:
<http://nl.wikipedia.org/wiki/Referentie-elektrode>

Wikipedia. *Electromagnetic radiation.* (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu:
http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation

Wikipedia. *Electromagnetic radiation.* (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu:
http://en.wikipedia.org/wiki/Electromagnetic_radiation

Wikipedia. *Fluorescence spectroscopy.* (online). (citirano 2. 9. 2009). Dostopno na naslovu:
http://en.wikipedia.org/wiki/Fluorescence_spectroscopy

Wikipedia. *Electrophoresis.* (online). (citirano 7. 11. 2009). Dostopno na naslovu:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Electrophoresis>

3.6 VPRAŠANJA ZA SAMOEVALVACIJO ZNANJA

- Razmislite o primerjavi med instrumentalnimi in klasičnimi kemijskimi metodami.
- Navedite osnove elektrokemijskih metod.
- Katere vrste elektrod poznamo in kako se razlikujejo med sabo?
- Opišite elektrode, ki jih uporabljamo za merjenje pH vrednosti.
- Kateri pojav elektromagnetnega valovanja izkoriščamo v kvantitativni analitiki?
- Grafično in s formulo prikažite Beerov zakon.
- Navedite sestavne dele spektrometra in princip delovanja.
- Navedite bistvene razlike med posameznimi spektroskopskimi metodami.
- Katere ločitvene metode poznate?
- V katere namene lahko uporabljamo kromatografske metode?
- Katere vrste kromatografij poznamo in kakšne so bistvene razlike med njimi?
- Navedite faze dela pri tankoplastni kromatografiji in kvalitativno in kvantitativno vrednotenje.
- Naredite primerjavo med tekočinsko in plinsko kromatografijo.
- Katere vrste stacionarnih faz poznate pri posamezni vrsti kromatografije?
- Kaj je elektroforeza in kako poteka elektroforezna ločitev?
- Za katere sestavine živil je primerna elektroforeza in razmislite o možnostih uporabe v kontroli kakovosti živil?
- Razmislite o vlogi klasičnih instrumentalnih metod pri skokovitem razvoju instrumentalnih analiznih metod.
- Kaj menite, kateri faktorji so odločilni pri nabavi laboratorijske opreme?
- Na podlagi opravljenih laboratorijskih vaj odgovorite:
Pri katerih analiznih metodah je zahtevnejša izvedba analizne metode in pri katerih vrednotenje rezultatov?
Katere analizne metode so bolj obremenilne za okolje: klasične ali instrumentalne?
Katere analizne metode so primernejše z vidika varovanja zdravja človeka?

4 ANALIZA ŽIVIL

Prvi podatki o analizi živil izvirajo iz leta 1606, ko je A. Libaviusa objavil v svojem delu *De Judico Aquarum Mineralium* metode analiziranja mineralne vode. Iz tega obdobja so tudi prvi podatki o kvarjenju hrane in mikroskopskem analiziranju mleka, kisa, kave in čaja. V 18. stol. je A. Marggraf prvič razkril prisotnost saharoze v sladkorni repi, ki se začne izkoriščati kot surovina za sladkor šele po Napoleonu.

Prve kvantitativne analize živil so se omejevale zgolj na analizo beljakovin, maščob, ogljikovih hidratov in vode. Takrat so tudi veljale samo te sestavine za pomembne v živilu. Z odkritjem fiziološkega pomena vitaminov, makro - in mikro - elementov pa so se začele razvijati tudi metode določanja teh sestavin. Danes obstaja veliko vrst metod, ki so se z razvojem inteligentnih instrumentov in laboratorijske avtomatizacije ter robotike v zadnjih letih izpopolnile, postale hitrejše, selektivnejše. Analizna kemija, na kateri temelji analiza živil, je danes postala sodobna informacijska znanost. Izbira in smotrna uporaba primerne metode pa zahteva natančno poznavanje principov analiznih metod.

Kemijsko predstavlja živilo zmes organskih in anorganskih sestavin. Za vsako živilo je značilna naravna kemijska sestava tako v kvalitativnem kot v kvantitativnem pomenu. Za živila je značilna različna vsebnost hranilnih snovi. Večina živil vsebuje zmes različnih hranilnih snovi in le malo je živil, ki so samo iz ene sestavine (npr. saharoza, sol, voda). Od količine, vrste in razmerja posameznih hranilnih sestavin v živilu je odvisna energijska in biološka vrednost živila. Razen hranilnih sestavin živila vsebujejo še številne druge ne hranilne sestavine, ki pa dajo živilu značilne organoleptične in tudi druge fiziološke lastnosti. To so npr. organske kisline, aldehidi, fenoli, alkoholi, estri, pigmenti, alkaloidi ...

Na sestavo živila vpliva več dejavnikov, ki lahko povzročijo, da ima ena vrsta živil različno sestavo (npr. ekološki pogoji, različna agrotehnika, stopnja zrelosti, način prehrane in stopnja prehranjenosti živali ...).

V hrani pa so razen naravnih sestavin pogosto prisotne tudi druge sestavine, ki so v hrani kot posledica proizvodnje in predelave (tuje primesi, pesticidi, kontaminanti) ali pa so bile dodane živilu kot aditivi za izboljšanje organoleptičnih lastnosti, izboljšanje tehnoloških lastnosti, podaljšanje obstojnosti ...

Analiza živil je nujna za ocenjevanje hranilne vrednosti živil, kakor tudi za kontroliranje procesa proizvodnje. Ne nazadnje se analiza živil izvaja tudi za kontrolo kakovosti živil kot zahteva zakonodaja.

4.1 DOLOČANJE KOLIČINE VODE

Obstaja zelo veliko metod določanja vsebnosti vode v živilih. Čeprav so metode dokaj enostavne, je prav točno določanje vode v živilih eden največjih problemov v analizi živil.

Voda v živilih je v obliki **proste vode** ali **vezane**. Običajno je v živilih več proste vode in jo je lahko določati. Vezana voda je v živilih vezana kot kristalna voda v hidratih ali vezana z molekulami beljakovin in saharidov, ali pa je absorbirana na površini koloidnih delcev. Vezano vodo v živilih je težavneje določati, zato so potrebne posebne metode. V procesu predelave in skladiščenja živil prihaja do spremembe količine vode v živilih.

Praktično vsa živila vsebujejo vodo, zato je **kvalitativno** dokazovanje vode v živilih brez pomena. **Kvantitativno** določanje vsebnosti vode v živilih pa je izrednega pomena, ker je od vsebnosti vode odvisna tudi kakovost živila, možnost konzerviranja in skladiščenja. **Pravilniki o kakovosti živil** predpisujejo maksimalno dovoljeno količino vode v vrsti živil (primer maslo, klobase, potvorbe mleka ...) Z ozirom na količino vode v živilih se živila klasificirajo v različne kakovostne skupine (maslo, med).

Pri mnogih analizah se rezultat podaja na količino suhe snovi, ker se s tem dobi realnejša slika o spremembi hranilnih snovi med skladiščenjem.

Vsebnost vode v živilih je zelo različna. Glej tabelo 5.

Tabela 5: Vsebnost vode v nekaterih živilih (Belitz, Grosch, 1992)

ŽIVILO	% VODE
sveže sadje in zelenjava	70 – 90
meso in ribe	65 – 75
žitarice	10 – 15
orehi, lešniki	5 – 10
mleko	87
kruh	35
med	20
maslo, margarina	16 – 18
mleko v prahu	4
olja	0

Metode določanja vode delimo v tri skupine:

1. **Ločevanje vode od suhe snovi:**
 - z izparevanjem
 - z destilacijo
2. **Kemijske metode** (s Karl Fischerjevim reagentom, s kalcijevim karbidom)
3. **Fizikalne metode** (indeks refrakcije, gostota, električna prevodnost)

4.1.1 Določanje vode s sušenjem

Osnova teh metod je sušenje živila do konstantne teže v različnih tipih sušilnikov:

Sušenje pri normalnem zračnem tlaku

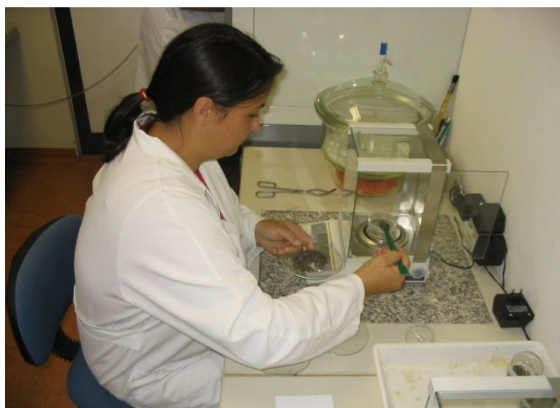
poteka v sušilniku pri atmosferskem pritisku na predpisani temperaturi – običajno 105 °C do konstantne teže. Med sušenjem lahko pride pri živilih, ki vsebujejo velike količine maščobe, tudi do povečanja teže – vzamemo težo pred povečanjem.

Odstotek vode izračunamo po obrazcu:

$$\% \text{ vode} = \left(\frac{m_1 - m_2}{m_1} \right) \cdot 100 \%$$

m_1 - masa vzorca pred sušenjem

m_2 – masa vzorca po sušenju



Slika 65: Zatehta vzorcev za določanje vode v živilih s sušenjem

Vir: Hmelak Gorenjak, 2007

Sušenje v vakuumskem sušilniku

poteka na nižji temperaturi od 50 do 70 °C. Postopek je primeren za živila, ki se težje sušijo (med, sirupi, marmelada) oz. za živila, ki vsebujejo termolabilne snovi (primer D-fruktoza). Metoda je primerna tudi za živila, ki vsebujejo veliko beljakovin (jajca v prahu, meso z veliko količino maščob).

Sušenje z dodatkom etanola in peska

Z dodatkom kvarčnega peska povečamo površino vzorca in s tem hitrost sušenja živil. Dodatek etanola pa omogoča izparevanje kapilarno vezane vode. Takšen način sušenja je primeren za živila, ki vsebujejo večje količine sladkorja in beljakovin.

Sušenje v vakuumskem eksikatorju na sobni temperaturi

Metoda je primerna za sušenje termolabilnih substanc, predvsem za določanje vode v rastlinskih vzorcih hrane. Sušimo nad koncentrirano žvepleno kislino.

Pri metodah določanja vode s sušenjem moramo še upoštevati:

- ustrezno pripravo vzorca
Pazimo pri živilih, v katerih voda ni enakomerno razporejena.
Pri tekočih živilih del vode uparimo pred sušenjem na vodni kopeli.
- temperaturo in čas sušenja
Upoštevamo predpisano temperaturo za ustrezno živilo, splošno pravilo ne obstaja.
- možne vire napak
izparevanje drugih hlapnih snovi, adsorpcijo ogljikovega dioksida iz zraka, proces oksidacije, Maillardovo reakcijo ...
- ostale faktorje
kvaliteta sušilnika, relativna vlažnost zraka, velikost posode za sušenje, število vzorcev in položaj v sušilniku, primeren eksikator za hlajenje ...



Slika 66: Sušilnik za indirektno določanje vode v živilih

Vir: http://www.orbit-lab.si/slo/Prodajni%20program/MEMMERT/6_Susilniki.htm (2. 6. 2009)

4.1.2 Določanje vode z destilacijo

Primerna je predvsem za živila, ki vsebujejo termolabilne in lahko hlapne substance. Uporabljamo jo za določanje vode v maščobah, mleku v prahu, v žitih in mlevskih proizvodih. Poznana je destilacija po Deanu in Starku.

Osnova metode je destilacija vode s pomočjo topil, ki se ne mešajo z vodo, kondenzacija vodne pare in merjenja volumna predestilirane vode.

Kot topila uporabljamo:

- organska topila lažja od vode (benzol, toluol, ksilol) in
- organska topila težja od vode (tetraklorogljik, trikloretilen, tetrakloreten).

Upoštevajmo, da je:

- metoda zelo enostavna, hitra in se odvija pri konstantni temperaturi,
- paziti moramo pri izbiri ustreznega topila (za termolabilne snovi je primeren benzol) in

- da je metoda neuporabna pri živilih, ki vsebujejo tekočine, ki se mešajo z vodo (etanol, glicerol, aceton).

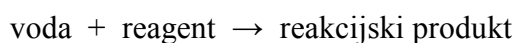
Pri metodi lahko pride do sledečih napak:

- netočno graduiran del aparature,
- nečistoče v aparaturi in
- nepopolna destilacija.

4.1.3 Kemijske metode določanja vode

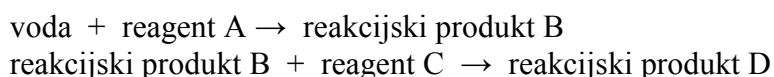
Delimo jih v dve skupini:

- V prvo skupino spadajo metode, pri katerih se odvija sledeča kemijska reakcija:



Primer te metode je metoda s Karl Fischerjevim reagentom in metoda s kalcijevim karbidom.

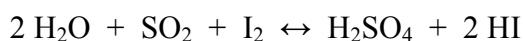
- V drugo skupino spadajo metode, pri katerih kemijska reakcija poteka v dveh stopnjah:



Primer je metoda z acetil kloridom. Določamo količino reagenta C.

Metoda s Karl Fischer-jevim reagentom

Osnova metode je redoks titracija. Določamo žveplov dioksid v prisotnosti vode s titracijo z jodom. Oksidacija žveplovega dioksida z jodom je možna samo v prisotnosti vode po reakciji:



Množino vode določimo iz množine zreagirane joda. Poskusi so pokazali, da reakcija poteka z leve proti desni strani samo v prisotnosti piridina in metanola.

Titracija poteka s Karl Fischerjevim reagentom –KFR (žveplov dioksid : piridin : raztopina joda : metanol = 1:3:1:1) do nastanka prostega joda, ki pomeni konec titracije.

Metoda ni primerna za živila, ki vsebujejo močne oksidante ali reducente, ki lahko reagirajo s KFR.



Slika 67: Aparatura (titrator) za določanje vsebnosti vode po Karl Fischer-ju

Vir: http://analytik-jena.com/frontend/itid_330/st_id_330/?gclid=CICP37uQh5cCFSXIXgodfz269w
(2. 6. 2009)

4.1.4 Fizikalne metode

Od fizikalnih metod se uporabljajo:

- elektrokemijske metode (merimo električni upor, električno prevodnost ali dielektrično konstanto) se uporabljajo za hitro določevanje vode v živilih (za žita, moko, čaj ...),
- refraktometrijsko določanje se uporablja za indirektno odčitavanje vode, z določanjem količine suhe snovi (v sadnih sokovih, sirupih, medu),
- različne specifične metode za posamezna živila.

Več poiščite tudi na spletu:

http://en.wikipedia.org/wiki/Water_content#Direct_methods (2. 6. 2009)

<http://www.edusatis.si/wiki/tiki->

<index.php?page=SOP%20Dolo%C4%8Danje%20vode%20Karl%20Fisher> (2. 6. 2009)

4.1.5 Povzetek s preverjanjem znanja

Določanje vsebnosti vode je pomemben pokazatelj kakovosti živil. Med najpomembnejše metode spada fizikalna indirektna metoda, pri kateri s pomočjo sušenja določimo odstotek suhe snovi in posredno izračunamo odstotek vode v živilu. Kljub možnim napakam metode (izparevanje drugih hlapnih snovi, adsorpcija ogljikovega dioksida iz zraka, proces oksidacije ...), velja metoda določanja vode s sušenjem za referenčno metodo.

Pravilnik predpisuje za določeno vrsto in kakovost živila maksimalno dovoljeno vsebnost vode in metode, s katerimi jo določamo. Pogosto so v uporabi tudi sodobne instrumentalne metode, s pomočjo katerih pridemo hitreje do rezultata.

- Razložite pomen določanja količine vode v živilih.
- Naštejte metode določanja vode v živilih in navedi bistveno razliko med njimi.
- Opišite indirektno metodo določanja vode s sušenjem in navedi napake metode.
- Katere faktorje moramo upoštevati pri metodi določanja vode s sušenjem?
- Katere vzorce za določanje vode sušimo z etanolom in peskom?
- Razložite osnove metode določanja količine vode z destilacijo. Kdaj jo uporabljamo?
- Navedite princip določanja vode s titracijo po Karl Fischer-ju.
- Naštejte najpomembnejše instrumentalne metode določanja količine vode in navedite primere uporabe.
- Koliko % vode je v vzorcu živila, če je masa praznega tehtiča znašala 50,5400 g, masa tehtiča z vzorcem živila pa 54,0505 g? Po sušenju smo ponovno tehtali - masa tehtiča s posušenim vzorcem je znašala 51,9465 g.

4.2 MINERALNE SNOVI

Vsa živila, tako rastlinskega kot živalskega porekla, vsebujejo mineralne snovi, ki so sestavni del življenjskih tkiv.

Mineralne snovi v analitičnem pogledu razumemo kot ostanek pepela po sežigu. Sestava pepela ni odvisna samo od vrste živila, pač pa tudi od poteka sežiga. Torej sestava pepela ni identična sestavi posameznih mineralov v živilu, pač pa se lahko s sežigom spremeni. Pri visokih temperaturah prihaja do različnih kemijskih reakcijah med minerali in tudi med minerali in organskimi snovmi, ki vsebujejo žveplo in fosfor.

Pepel vsebuje v **večjih količinah**: kalij, natrij, kalcij, magnezij (v obliki odgovarjajočih kationov), fosfor, žveplo, klor (v obliki fosfata, sulfata, klorida) in silicij (kot silicijev dioksid). V manjših količinah ali le v **sledih** so prisotni še drugi elementi v ionski obliki: Fe, Sb, Cu, Mn, Co, Ni, Ag, Zn, Sn, Se, Al.

V pepelu so prisotni tudi karbonati kot posledica sežiga soli vinske, jabolčne, citronske in drugih organskih kislin.

Pogosto pa se nahajajo v pepelu tudi minerali, ki niso naravno prisotni v živilu, pač pa so prispeli v živilo kot posledica pridelave (različni pesticidi) in predelave živil (aditivi, kontaminanti).

Določanje mineralnih snovi v živilu je zelo pomembno, ker količina mineralnih snovi služi kot merilo za biološko vrednost živila, kot tudi za določanje kakovosti živila in njegove zdravstvene neoporečnosti.

Pepel v živilu določamo kot:

- skupni pepel,
- čisti pepel (skupni pepel topen v 10 % HCl),
- pepel netopen v klorovodikovi kislini (pesek),
- pepel topen v vodi,
- pepel netopen v vodi,
- pepel brez kuhinjske soli in
- sulfatni pepel.

Mineralne snovi lahko določamo:

- s suhim sežigom,
- z mokrim sežigom.

4.2.1 Suhi sežig

Živilo sežgemo na visoki temperaturi – ostanek po sežigu je pepel.

Pred sežigom je pomembna pravilna **priprava vzorca**:

- trdna živila zdrobimo in homogeniziramo,
- tekoča živila posušimo, najprej nad vodno kopeljo, nato še v sušilniku na 105 °C,

- pazimo na homogenost vzorca (mastna tkiva praktično ne vsebujejo mineralov),
- sveže sadje in zelenjavo pred analizo operemo (odstranimo pesek, zemljo).

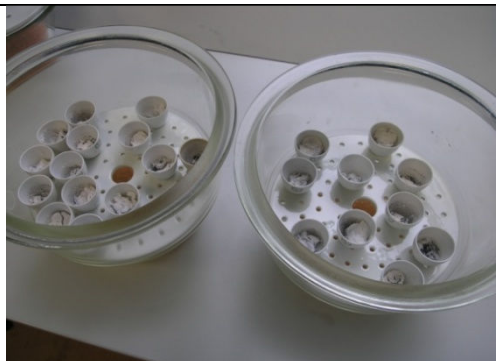
Lončki za sežig so lahko iz različnih materialov:

porcelan (primeren za vsa živila, občutljivi na hitre spremembe temperature), platine, zlata ali zmesi platina in zlato.

Postopek:

- očiščen in na temperaturi sežiga prežarjen lonček (najmanj 45 min), ohlajen v eksikatorju (15 do 30 min), stehtamo na štiri decimalna mesta natančno,
- natehtamo določeno količino vzorca in po potrebi dodamo dodatke, da bi pospešili hitrost sežiga:
vodikov peroksid, dušikova kislina, magnezijev acetat.
- sežig določene količine vzorca poteka po navodilih odvisno od vrste živila na temperaturi od 450 do 1000 °C. Temperatura sežiga je najpogosteje **od 500 do 550 °C**.
- sežig traja do konstantne teže, oziroma dokler ni pepel enakomerne barve (brezbarven, oziroma obarvan odvisno od vsebnosti mineralov, primer: zelenkast, če vsebuje mangan),
- po končanem sežigu sledi hlajenje v eksikatorju, tehtanje in izračun.

$$\% \text{ pepela} = \frac{m_{\text{vzorca po žarenju}}}{m_{\text{vzorca pred žarenjem}}} \cdot 100$$



Slika 68: Pepel žarimo do enakomerne barve
Vir: Hmelak Gorenjak, 2007

Napaka metode:

Pri visokih temperaturah sežiga prihaja do določenih izgub:

Nad 650 °C se izgubijo večje količine kalcijevega karbonata, podobno so nestabilni še drugi karbonati (Mg-, K- in Na-karbonat). Na temperaturah nad 500-550 °C se izgubijo tudi alkalni kloridi, primer natrijev klorid.

Druge metode sežiga:

Sežig z ekstrakcijo z vodo

Primeren je za vzorce, ki vsebujejo večje količine alkalnih kloridov (mleko, maslo, meso, kava, pekarski kvas ...) Živilo sežgemo do pooglenitve, nakar sledi ekstrakcija z vročo vodo in ponovno žarenje.

Sežig z dodatkom magnezijevega acetata

Primeren je za živila, ki počasi izgorevajo. Pri izračunu moramo upoštevati dodan magnezijev acetat, ki ga odštejemo kot magnezijev oksid.

Določanje v vodi topnega pepela

Pravilniki o kakovosti živil določajo to metodo za določanje kakovosti nekaterih živil (primer čaja, kave) in ugotavljanje porabljene količine sadja v marmeladi, sokovih.

Določanje v vodi netopnega pepela

Metoda služi za ugotavljanje alkalnosti.

Določanje v klorovodikovi kislini netopnega pepela

Metoda se uporablja za določanje peska v vzorcih živila.

Določanje pepela brez kuhinjske soli

Določimo skupni pepel in v njem kvantitativno določimo NaCl, ki ga odštejemo od količine pepela.

Metoda je primerna za živila, pri katerih se dodaja kuhinjska sol (sir, kruh, pecivo).

Določanje sulfatnega pepela

Pri živilih, ki vsebujejo večje količine termo-labilnih sestavin (sladkor, sirupi), dodamo žvepleno kislino in tako dobimo sulfatni pepel.

4.2.2 Moker sežig

Moker sežig poteka z dodatkom ustreznih kislin, ki kot močno oksidacijsko sredstvo razgrajujejo organsko snov.

Metoda mokrega sežiga se pogosteje uporablja, kadar določamo posamezne elemente v živilu, posebno elemente v sledih ali nedovoljene vsebnosti elementov. Prednost mokrega sežiga pred suhim sežigom je, da pri mokrem sežigu ni izgub posameznih mineralnih snovi zaradi izgorevanja.

Za moker sežig lahko uporabimo naslednje kisline:

- zmes dušikove in žveplene kisline,
- zmes dušikove in klorove (VII) kisline,
- zmes dušikove, klorove (VII) in žveplene kisline.

Izbira ustreznega oksidacijskega sredstva je odvisna od vrste živila in vrste analize, ki jo želimo izvesti.



Slika 69: Sodobna aparatura za moker sežig z enoto za nevtralizacijo strupenih plinov
Vir: <http://www.speciation.net/Appl/Techniques/technique.html?id=2477> (3. 9. 2009)

4.2.3 Določanje posameznih mineralnih snovi

Kvantitativno določanje mineralnih snovi se v analizi živil zelo pogosto izvaja, na razpolago so številne fizikalno-kemijske metode, ki smo jih spoznali v predhodnih poglavjih.

Določanje kationov: K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} in Fe^{2+}

Katione lahko določamo iz raztopine pepela, ali pa jih predhodno ločimo s pomočjo ionskih izmenjevalcev.

Metode določanja so različne:

- K^+ in Na^+ lahko določamo gravimetrično ali s plamensko spektrofotometrijo.
- Ca^{2+} in Mg^{2+} določamo z gravimetrično obarjalno metodo ali volumetrično s kompleksometrično titracijo.

Določanje anionov: kloridi, sulfati in fosfati

- Kloride določamo najpogosteje z obarjalnimi metodami – po Mohru in po Volhardu.
- Sulfate določamo po gravimetrični obarjalni metodi (obarjanje z barijevim kloridom).
- Fosfate določamo gravimetrično, volumetrično ali kolorimetrično.

Dokazovanje in določanje težkih metalov

Ob kvalitativni analizi težkih metalov izvajamo še kvantitativno analizo.

Določamo: baker (v živila prihaja največkrat iz posode), svinec (v živilih se nahaja zaradi tretiranja živil z insekticidi kot tudi zaradi uporabe neprimerne posode), železo, arzen ...

Metode določanja so različne. Za določanje težkih metalov pogosto uporabljamo spektrofotometrične metode.



Slika 70: Posamezne elemente določamo s sodobnimi instrumentalnimi metodami

Vir:

http://analytikjena.com/frontend/itid_330/st_id_330/?gclid=CICP37uQh5cCFSXIXgodfz269w

(3. 9. 2009)

Več poiščite tudi na spletu:

<http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Ash&Minerals.html> (3. 9. 2009)

4.2.4 Povzetek s preverjanjem znanja

Mineralne snovi določamo kot skupne mineralne snovi (pepel) ali posamezne elemente. Določanje mineralnih snovi je pomembno za oceno kakovosti živil in tudi za ugotavljanje morebitne kemijske onesnaženosti živil. Skupne mineralne snovi najpogosteje določamo s pomočjo suhega sežiga, za določitev posameznih mineralnih snovi pa lahko uporabimo tudi moker sežig. Pri suhem sežigu služi kot oksidacijsko sredstvo kisik in visoka temperatura, pri mokrem sežigu pa uporabljamo močne kisline (žveplova (VI) kislina, dušikova kislina). Najpogostejše napake metode so nehomogen vzorec in izgube mineralnih snovi zaradi previsokih temperatur pri suhem sežigu.

- Razložite pomen določanja mineralnih snovi.
- Kako bi izvedel suhi sežig?
- Navedite napake metode suhega sežiga?
- Kako določamo pesek v živilu?
- Kdaj uporabljamo moker sežig?
- Navedite ustrezne reagente za določanje mokrega sežiga.
- Kako bi določil posamezne elemente v živilu: kalij, natrij, kalcij?
- Katera metoda se vam zdi najprimernejša za določanje kloridov?
- Izračunajte količino mineralnih snovi v vzorcu živila, če smo v stehšan žarilni lonček (z maso 28,3425 g) zatehtali 3,4672 g vzorca živila, ga žarili 90 minut na 550 °C in po ohladitvi v eksikatorju ponovno tehtali – teža je znašala 28,3788 g.
- Primerjajte metodi suhi in moker sežig glede na varovanje okolja in varovanja zdravja ljudi. Na kaj moramo biti še posebej pozorni pri izvedbi mokrega sežiga?

4.3 BELJAKOVINE IN AMINOKISLINE

Živila vsebujejo različne količine in različne vrste beljakovin. Najpogosteje analiziramo skupno količino beljakovin, redkeje posamezne beljakovine kot npr. vsebnost kolagena v raznih vrstah mesa.

Analitika vsebnosti beljakovin ima pomembno vlogo v analizi živil:

- od vsebnosti količine beljakovin in vsebnosti esencialnih aminokislin je odvisna njihova biološka vrednost (BW oz. NPU),
- beljakovine vplivajo na proces porjavenja (Maillardova reakcija),
- vsebnost beljakovin v pivu, vinu in v sadnih sokovih vpliva na tehnološki postopek in stabilnost proizvodov,
- zelo pomembna je količina v vodi netopnih beljakovin (gliadina in glutenina) v pšenični moki za ugotavljanje tehnoloških lastnosti moke,
- vsebnost beljakovin kontroliramo tudi zaradi kontrole kakovosti živil.

Tabela 6: Približna vsebnost beljakovin v nekaterih živilih

ŽIVILO	Vsebnost beljakovin (%)
Meso	18.5
Jajca	13.5
Mleko	3.4
Soja	36.0
Fižol	23.0
Moka	10.0
Kruh	7.0
Krompir	2.0
Sadje	0.3 – 1.5

Vir: Trajkovič, 1983

Tabela 7: Biološka vrednost beljakovin in limitirajoča aminokislina v živilih

Beljakovina	¹ *BW	¹ *NPU	² *Limitirajoča aminokislina
Jajca	94	93	
Mleko	84	81	metionin
Riba	76	80	treonin
Goveje meso	74	67	metionin
Krompir	73	60	metionin
Soja	73	61	metionin
Riž	64	57	lizin, triptofan
Fižol	58	38	metionin
Bela pšenična moka	52	57	lizin, triptofan

Vir: Belitz, Grosch 1992

¹*BW in NPU – biološka vrednost določena po različnih metodah²*Limitirajoča aminokislina (esencialna aminokislina, ki je ni v živilu oz. se nahaja v njem v najmanjši količini) pogojuje biološko vrednost živila.

Poznamo več vrst metod kvantitativnega določanja. Najpogosteje uporabljamo naslednje:

- Določitev vsebnosti dušika-indirektna metoda.
- Kemijska reakcija s peptidno vezjo in fotometrična meritev (primer Biuretska reakcija).
- Kemijska reakcija z določeno aminokislino in fotometriiranje (primer: Folin-Ciocalteu reagent na tirozin).
- Merjenje UV-absorpcije (za aromatske aminokisliline: triptofan, tirozin, fenilalanin).
- Merjenje motnosti po izkosmičenju topnih beljakovin.

4.3.1 Indirektne metode – metoda po Kjeldahlu

Beljakovine iz živila zelo težko izoliramo, čistimo in sušimo. Pri tem nas ovirajo lastnosti beljakovin, kot so: amfoternost, velika sposobnost adsorpcije, hidratacije in občutljivost na elektrolite. Zaradi tega vsebnosti beljakovin v glavnem ne določamo direktno, ampak indirektno glede na vsebnost dušika v beljakovinah.

Beljakovine vsebujejo naslednje elemente:

C	51 – 55 %
O	20 – 25 %
H	6 – 7 %
N	15 – 18.5 %
S, P	

Dušika je v beljakovinah v povprečju 16 %. Tako dobimo faktor za preračunavanje količine beljakovin iz količine dušika:

$$\frac{100}{16} = 6.25$$

Ker se vsebnost dušika v beljakovinah razlikuje v posameznih živilih, moramo pri izračunu to tudi upoštevati.

Tabela 8: Proteinski faktor nekaterih živil

Vzorec	Proteinski faktor
Jajca	6.25
Meso	6.25
Mleko	6.37
Pšenica	5.70
Oluščen ječmen	5.83
Soja	5.72
Riž	5.95
Zelenjava	6.25
Čokolada	6.25

Vir: Chiplunkar, 1999

Poznani sta dve indirektni metodi: metoda po Dumasu in metoda po Kjeldahlu:

DUMASOVA METODA

Klasična Dumasova metoda poteka s pomočjo suhega sežiga – dušik iz amino skupin se reducira do elementarnega dušika, ki ga določimo volumetrično. Metoda je seveda doživela številne spremembe v izvedbi sežiga (dodatek katalizatorjev) in vrednotenju količine dušika – uporaba plinske kromatografije. Skrajšal se je čas potreben za analizo in povečala natančnost metode.



Slika 71: Sistem za določanje beljakovin po Dumasovi metodi

Vir: <http://www.labsynergy.com/nitrogen-combustion.htm> (11. 11. 2009)

METODA PO KJELDAHLU

Danes se pogosteje uporablja metoda po Kjeldahlu.

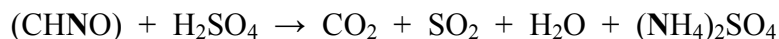
Bistvo metode je moker sežig vzorca v koncentrirani žvepleni kislini ob prisotnosti katalizatorja pri povišani temperaturi do popolne oksidacije ogljika in vodika in redukciji organskega dušika do amonijevega sulfata.

Z dodatkom koncentriranega natrijevega hidroksida se iz amonijevega sulfata sprosti amoniak, ki ga predestiliramo v nasičeno raztopino borove kisline. Sledi titracija amonijevega borata s standardno raztopino kisline.

Metoda poteka v treh stopnjah:

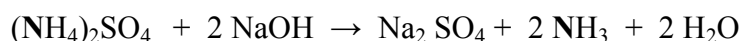
MOKRI SEŽIG:

Vzorec sežgemo, organski dušik se reducira do amonijevega sulfata.



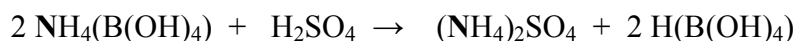
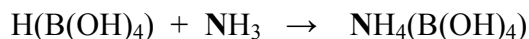
DESTILACIJA:

Ob dodatku koncentriranega natrijevega hidroksida se sprosti amoniak, ki ga predestiliramo v nasičeno raztopino borove kisline.



TITRACIJA:

Ob uvajanju amoniaka v borovo kislino dobimo amonijev borat, ki ga titriramo s standardno raztopino žveplove (VI) kisline. Končno točko titracije ugotavljamo potenciometrično ali pa z dodatkom ustreznega indikatorja.



Slika 72: Sodobna destilacijska naprava za določanje beljakovin po Kjeldahlu

Vir: Hmelak Gorenjak, 2007

Napaka metode:

Z določanjem beljakovin posredno preko organskega dušika prihaja do manjše ali večje napake, odvisno od tega, koliko organskega dušika je prisotnega v živilu, ki nima beljakovinskega izvora. Nebeljakovinski dušik predstavljajo: proste aminokisljine, nukleinske kisline, amonijeve soli, aromatske snovi, kot so pirazin, ciklopentapirazin, piroli, oksazoli, vitamini B₁, B₂ in nikotinska kislina. Delež nebeljakovinskega dušika v primerjavi z beljakovinskim dušikom je majhen, tako da ga lahko zanemarimo.

Pri indirektni metodi govorimo torej, da določamo **surove beljakovine**, kadar pa s primerno metodo določimo le beljakovinski dušik, so to **čiste beljakovine** (primer metoda po Barnsteinu). **Do napak lahko pride tudi zaradi izgube dušika pri previsokih temperaturah mokrega sežiga in prekomernega dodajanja katalizatorjev.**

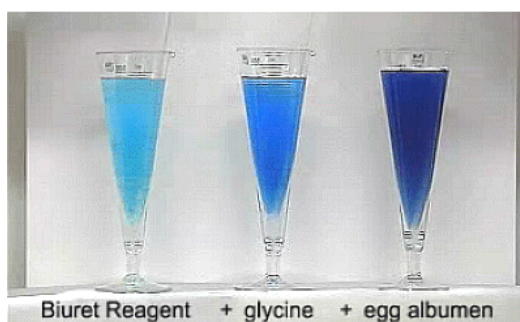
Priporočena temperatura mokrega sežiga je med 370 °C in 410 °C.

4.3.2 Značilne barvne reakcije s proteini

Pri analitiki proteinov pogosto izkoriščamo značilne barvne reakcije, ki jih dajo posamezni proteini z določenimi reagenti:

Biuret:

Polipeptidi reagirajo z razredčeno raztopino bakrovega sulfata v močno alkalnem mediju z značilno modro barvo.



Slika 73: Prikaz biuretske reakcije - kliknite in si poglejte tudi video posnetek:

Vir : http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Biuret-e.htm

(11. 11. 2009)

Ksantoproteinska reakcija: beljakovine dajo z dušikovo kislino ob prisotnosti aromatskih aminokislin rumeno obarvane nitroderivate.

Ninhidrinska reakcija:

Prolin in hidroksiprolin dajeta z ninhidrinom rumenordečo barvo.

Rekcija s svinčevim sulfidom:

Beljakovine, ki vsebujejo žveplo dajo v močno alkalnem mediju z dodatkom raztopine svinčevega acetata črno barvo.

Prednost kolorimetričnih metod je v hitrosti izvedbe. Umeritveno krivuljo izvajamo vedno s pomočjo standardne Kjeldahlove metode.

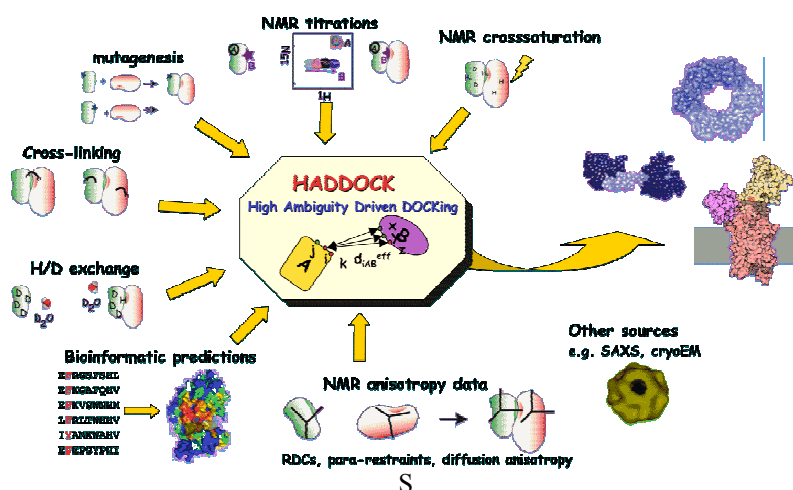
4.3.3 Formolna titracija

V mleku in sladoledu ugotavljamo skupno količino beljakovin tudi s **formolno titracijo**. Izvedemo reakcijo amino skupine beljakovin ali aminokislin s formaldehidom, tako pride do izraza kislost ekvivalentne množine karboksilnih skupin, ki jih določimo volumetrično s titracijo z dodatkom ustreznega indikatorja.

Formolna titracija se uporablja tudi za določitev formolnega števila pri sadnih in zelenjavnih sokovih ter koncentratih.

4.3.4 Ostale metode določanja beljakovin

Za določanje količine beljakovin obstajajo še številne instrumentalne metode, kot so IR spektroskopija, NIR refleksna spektroskopija, elektroforeza, nevtronska oz. protonska aktivacijska analiza, ki nam omogočajo, da beljakovine kvalitativno in kvantitativno ovrednotimo. V proizvodnih obratih in kontrolnih ustanovah pogosto zadostuje samo podatek o skupni količini beljakovin, ki ga lahko dobimo z razmeroma preprostejšo analitiko.



Slika 74: Primer prikaza sodobnih tehnik določanj beljakovin

Vir: http://biowulf.nih.gov/apps/haddock_biowulf.html (11. 11. 2009)

4.3.5 Določanje aminokislin

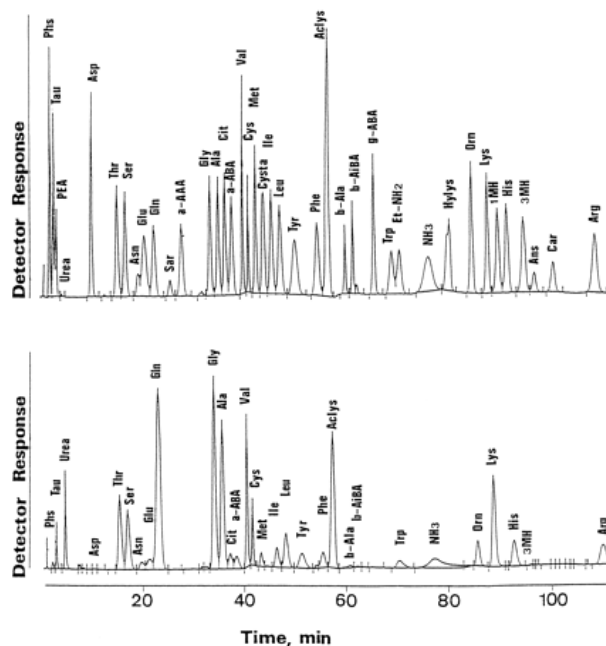
Za identifikacijo in določanje aminokislin so najprimernejše kromatografske metode. Zelo hitra in enostavna metoda sta papirna in tankoplastna kromatografija. Uporablja pa se tudi zahtevnejša HPLC kromatografija.

S formolno titracijo ugotavljamo proste aminokislino v sadnih in zelenjavnih sokovih. Za določitev aminokislin pa uporabljamo tudi kemijske barvne reakcije in fotometriiranje nastalih produktov.

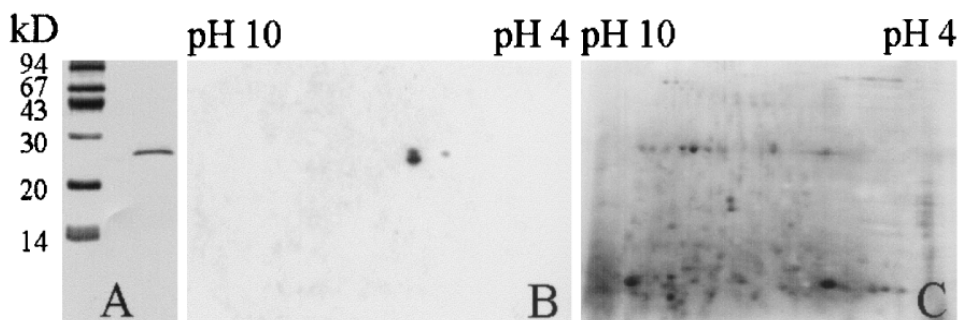


Slika 75: Sodobni analizator aminokislin

Vir: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=514511 (11. 11. 2009)



Slika 76: Prikaz kromatograma določitve aminokislin s plinsko kromatografijo
Vir: <http://www.clinchem.org/cgi/content/full/43/8/1421> (11. 11. 2009)



Slika 77: Rezultat analize aminokislin s pomočjo elektroforeze
Vir: <http://www.biochemj.org/bj/376/0433/bj3760433.htm> (11. 11. 2009)

Več poiščite tudi na spletu:

http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Biuret-e.htm
(11. 11. 2009)

4.3.6 Povzetek s preverjanjem znanja

Beljakovine v živilih določamo za ugotavljanje biološke vrednosti hrane kot tudi za spremljanje in nadzor tehnološkega procesa. Med klasične metode določanja beljakovin spadajo indirektna metoda – med njimi ima zelo pomembno vlogo metoda po Kjeldahlu. Poteka v treh stopnjah: moker sežig, destilacija in titracija in nam da informacijo o vsebnosti (organskega) dušika. Iz vsebnosti dušika določimo vsebnost skupnih beljakovin. Pomembno

mesto v analitiki beljakovin imajo tudi metode, ki temeljijo na barvnih reakcijah s specifično skupino v beljakovinah oz. aminokislinah. Za določanje posameznih aminokislin se najpogosteje uporabljajo različne kromatografske tehnike.

- Razložite pomen določanja beljakovin.
- Navedite metode določanja beljakovin.
- Razložite osnove indirektnih metode določanja beljakovin.
- Kaj menite, katera od indirektnih metod je za okolje bolj prijazna?
- Navedite potek dela po Kjeldahlu. Katera faza dela je za okolje najbolj obremenilna?
- Katere barvne reakcije za določanje beljakovin poznate?
- Kako poteka Biuret reakcija? Poglejte video na spletu.
- Katere instrumentalne metode so primerne za določanje beljakovin in katere za aminokislino?
- Navedite pomen določanja aminokislin.
- Kaj je kromatogram?

4.4 MAŠČOBE

Količina maščob v živilih je zelo različna od manj kot 0.1 % (v zelenjavi) pa vse do skoraj 100 % (v masteh in oljih). Večje količine maščob vsebujejo živila živalskega izvora (svinjska mast, loj), maslo (84 %), polnomastni sir (65 %), mleko (3.5 %). V zelenjavi in v večini sadja je količina maščob neznatna od 0.1 do 1 %. Večje količine maščob so v semenih in v nekaterih plodovih, kot so olive (19 %), suhi lešniki (62 %), suhi orehi (58 %) ...

V analitičnem pogledu je definicija za maščobe sledeča:

Maščobe so snovi, ki jih iz živila ekstrahiramo z brezvodnim etrom in, ki po enournem sušenju na 100 °C ne izparijo.

Za ekstrakcijo maščob uporabljamo naslednja topila: eter, petroleter, kloroform, trikloretilen. Ker so v teh topilih razen maščob topne še druge snovi (voski, steroli, vitamini, pigmenti, eterična olja, proste maščobne kisline) imenujemo dobljen ekstrakt – eterski ekstrakt ali **surove maščobe**. Pri večini živil je količina nemaščobnega dela surovih maščob neznatna in jo lahko pri analitiki zanemarimo. Kjer pa je ta vsebnost večja, jih lahko ločimo s pomočjo umiljenja maščob. Neumiljive snovi so nemaščobna sestava maščob.

Določanje količine maščob v živilu je pomembno za ocenjevanje energijske vrednosti živil in za živila, ki jih razvrščamo v razrede glede na količino maščob (primer maslo, sir).

Analitika maščob zavzema:

- Določanje količine maščobe.
- Identifikacija vrste maščob – sestava maščob.
- Karakteristična števila.
- Določitev dodatkov, antioksidantov, tuje snovi.
- Določanje kvara maščob.

4.4.1 Določanje količine maščob

Princip vseh metod je ekstrakcija maščob iz živila z organskim topilom. Katero topilo in metodo določanja bomo izbrali je odvisno od vrste živila. Obstaja veliko metod, ki jih delimo glede na osnovni princip ekstrakcije:

1. Metode ekstrakcije z neodmerjeno količino topila (metoda po Soxhletu, po Rosenfeldu, po Winterju)
2. Metoda ekstrakcije z določeno količino topila (metoda po Grossfeldu)
3. Metoda ekstrakcije z odmerjeno ali neodmerjeno količino topila po predhodni obdelavi vzorca s kislino, bazo ali površinsko aktivno snovjo (metoda po Weibull-Stoldtu, po Grossfeldu, acidobutirometrična metoda in po Rose-Gottliebu).

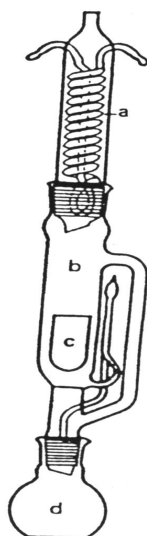


Slika 78: Butirometer za določanje maščob po Gerber-ju v mleku in mlečnih izdelkih
Vir: Hmelak Gorenjak, 2007

DOLOČANJE MAŠČOB PO SOXHLETU

Vzorec pred ekstrakcijo posušimo (na 105 °C, dve uri). Suh, homogeniziran vzorec prenesemo v poseben patron, ki ga namestimo v ekstraktor Soxhletove aparature. Bučko (predhodno jo sušimo na 105 °C, eno uro) napolnimo do $\frac{3}{4}$ volumna s topilom in sestavimo aparaturo s hladilnikom. Ekstrakcija poteka 3 do 6 ur, odvisno od vrste vzorca, v klasični aparaturi po Soxhletu. V novejših modificiranih izvedbah se je čas ekstrakcije zmanjšal tudi za polovico.

Količino maščobe, ki jo dobimo v bučki, po končani ekstrakciji in po enournem sušenju na 105 °C, lahko preračunamo na zatehto vzorca ali na suho snov.



Slika 79: Sestavni deli klasične in sodobne aparature za določanje maščob po Soxhletu (a – hladilnik, b – ekstraktor, c - tulec z vzorcem, d – bučka)
Vir: Hmelak Gorenjak, 2007

METODA PO M. WEIBULLU in W. STOLDTU

Pri metodi po M. Weibullu in W. Stoldtu vzorec predhodno razklopimo s klorovodikovo kislino, pri čemer prihaja do hidrolize beljakovin in škroba. Izločeno mast prefiltriramo in ekstrahiramo po Soxhletovi metodi. Metoda je primerna za živila, pri katerih sama ekstrakcija z etrom ne daje dobrih rezultatov, bodisi zaradi prepočasnega pronicanja etra v celice, ali ker se mast nahaja vezana na beljakovine in ogljikove hidrate.

POSTOPEK DOLOČANJA:

REAGENTI:

*klorovodikova kislina, konc.
eter, brezvodni ali petroleter*

Vzorec (5 do 10 g) segrevamo 15 min. v čaši s 100 mL vode in 60 mL konc. HCl na vreli vodni kopeli z občasnim mešanjem. Nato segrevamo z mešanjem še nad plinskim gorilnikom do vrenja. Čašo pokrijemo z urnim steklom in pustimo, da počasi vre (cca. pol ure,) dokler ne dobimo raztopine. Še vročo raztopino razredčimo z dvojno količino vroče vode, s katerim tudi speremo urno steklo in takoj filtriramo skozi navlažen, naguban filter papir. Po dobrem spiranju čaše s toplo vodo, in ko se je vsa voda odcedila s filter papirja, prenesemo filter papir skupaj z maščobo na urno steklo, sušimo 2-3 ure na 105 °C in zatem prenesemo direktno v ekstraktor po Soxhletu.

Ekstrakcijo po Soxhletovi metodi lahko izvedemo v avtomatski aparaturi po Soxhletu:

Suho bučko stehamo, v patron vstavimo filter papir z maščobo in izvajamo ekstrakcijo po ustreznem programu. Po končani ekstrakciji bučko sušimo 1 uro na 100 °C, jo ohladimo in izračunamo % maščobe.

4.4.2 Določanje kvara maščobe

DOLOČANJE HIDROLITIČNEGA KVARA

Masti in olja niso nikoli nevtralna, ker vedno vsebujejo še določeno količino prostih maščobnih kislin. S staranjem se količina prostih maščobnih kislin v maščobah poveča (hidrolitičen kvar maščob). Pravilnik o kakovosti živil predpisuje maksimalno količino dovoljenih prostih maščobnih kislin, izraženo v % oleinske kisline.

Kislota maščob izražamo s kislinskim številom, kislinsko stopnjo in % oleinske kisline:

- **Kislinsko število:** se izraža kot število mg KOH potrebnih za nevtralizacijo prostih maščobnih kislin v 1 g vzorca.
- **Kislinska stopnja:** se izraža v številu mL 1 M KOH ali NaOH potrebnih za nevtralizacijo 100 g vzorca.
- **% oleinske kisline** dobimo, če kislinsko stopnjo pomnožimo s faktorjem 0.2823.

DOLOČANJE OKSIDATIVNEGA KVARA

Na nenasičenih maščobnih kislinah prihaja v procesu staranja do oksidativnih sprememb kot posledica delovanja kisika, svetlobe, temperature in prisotnosti težkih metalov (Fe, Cu, Mn, Co ...). Tvorijo se peroksidi. Autokatalizna reakcija je v prvi fazi počasna, produkte ne moremo zaznati organoleptično, potem se hitrost reakcije eksponentno poveča. Vrste oksidativnih sprememb so odvisne od višine temperature. Pri temperaturah nad 130 °C peroksidi začenejo razpadati – nastajajo **sekundarni produkti oksidacije**. Ti produkti nastajajo tudi pri nižjih temperaturah, hitrost nastajanja je tem večja, čim hitreje nastajajo sami peroksidi. Sekundarne proizvode oksidacije razvrstimo v tri skupine:

- aldehidi, ketoni, mravljična kislina (značilen vonj po žarkem),
- oksidacijske kisline,
- produkti polimerizacije.

Peroksidno število

Z njim določamo stopnjo oksidativnega kvara. Določanje peroksidnega števila je zelo delikatno, ponovljivost analize je slaba. Z napredovanjem kvara (nastajanjem sekundarnih produktov oksidacije) peroksidno število pada. Zato se moramo nujno posluževati tudi ostalih metod določanja kvara maščobe.

Peroksidno število se izraža na dva načina:

- kot število mg aktivnega kisika v 1 g maščobe ali
- kot število milimolov peroksida izraženega v 1 kg maščobe.



Slika 80: Določanje peroksidnega števila tudi s sodobnim titratorjem

Vir: www.radiometer-analytical.com (10. 12. 2009)

Kreissova reakcija

Z njo dokazujemo drugo fazo oksidativnega kvara – nastanek epihidrialdehida, ki ga dokažemo z barvno reakcijo z rezorcinom v benzolu ali floroglucinom v etru. Epihidrin je nosilec pozitivne reakcije v Kreissovi reakciji, značilen vonj žarkih maščob pa izhaja od heptilaldehida.

Število tiobarbiturne kisline (TBK)

S TBK testom ugotavljamo stopnjo oksidativnega kvara. Izraža se v miligramih malonaldehida v 1 kg maščobe. Določamo ga spektrofotometrično. Tiobarbiturna kislina daje rdeče obarvanje s sekundarnimi produkti oksidativnega kvara.

4.4.3 Določanje kemijskih in fizikalnih konstant

Število umiljenja

Je število mg KOH potrebnega za popolno umiljenje prostih in estersko vezanih maščobnih kislin v 1 g masti. Je značilna konstanta za posamezna olja in masti. Vrednost je odvisna od molekulske mase maščobnih kislin.

Estersko število

Je število mg KOH potrebnega za umiljenje estersko vezanih maščobnih kislin. Pri nevtralnih maščobah sta estersko število in število umiljenja enaka.

Določanje neumljivih snovi

So nemaščobna sestava maščob. V vseh naravnih maščobah je količina neumljivih snovi majhna od 0.2 do 2 %.

Jodno število

Izraža se s številom g joda, ki se veže na nenasičene maščobne kisline v 100 g masti ali olja. Proste ali vezane nenasičene maščobne kisline imajo lastnost, da adirajo molekulo halogena na dvojno vez. Ker prosti klor in brom razen adicije vstopata še v reakcijo substitucije, uporabljamo za določanje jodnega števila jodov monoklorid (ali monobromid) v ustreznem topilu.



Slika 81: Avtomatski titrator za določanje jodnega števila

Vir: www.metrohm.co.uk (10. 12. 2009)

Iodine Number		Iodine Number	
<p>The degree of unsaturation of a fat or oil can be measured in terms of the Iodine Number which is the number of grams of iodine that will be consumed in a reaction with 100 g of fat or oil.</p>			
$\begin{array}{c} & \\ -\text{C} & = & \text{C}- \\ & \end{array} + \text{I}_2 \rightarrow \begin{array}{c} & \\ -\text{C} & - & \text{C}- \\ & \\ \text{I} & \text{I} \end{array}$			
		Coconut Oil	8-10
		Butter	25-40
		Beef Tallow	30-45
		Palm Oil	37-54
		Lard	45-70
		Olive Oil	75-95
		Peanut Oil	85-100
		Cottonseed Oil	100-117
		Corn Oil	115-130
		Fish Oil	120-180
		Soybean Oil	125-140
		Safflower Oil	130-140
		Sunflower Oil	130-145
		Linseed Oil	170-205

Slika 82: Prikaz vezave joda na proste vezi v maščobnih kislinah in vrednosti jodnega števila za posamezne vrste maščob

Vir: http://www.hcc.mnscu.edu/chem/V.26/page_id_21002.html (10. 12. 2009)

Določanje indeksa refrakcije

Določamo ga refraktometrično. Z njim lahko dokažemo identiteto masti in olja.

4.4.4 Določanje sestave maščobe

Rastlinska olja in maščobe živalskega porekla imajo značilno sestavo maščobnih kislin in steroidov. Pri analizi maščob zato pogosto določamo maščobne kisline. Najprimernejši metodi za določanje sestave maščob sta plinska kromatografija in tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti. Z njima lahko določimo sestavo vseh pomembnih živalskih in rastlinskih maščob od dveh do pet utežnih odstotkov natančno. Obe metodi sta uporabni tudi za ugotavljanje potvorb maščob.

4.4.5 Določanje pristnosti maščob

Za dokazovanje pristnosti maščob oz. ugotavljanje njihovih potvorb poznamo več metod:

- Ugotavljanje značilnih primesi v maščobah. Primer: holesterin se nahaja le v živalskih maščobah, α -/ γ -tokoferol v sončničnem olju, α -/ δ -tokoferol v sojinem olju.
- Dodatek rafiniranih olj naravnemu rastlinskemu olju dokažemo s snovmi, ki nastajajo pri rafinaciji. Primer: pri beljenju olj nastaja disterileter, med postopkom dezodoriranja pa dimeri in oligomeri triacilglicerolov in izomerna struktura linolne kisline.
- Določanje E-faktorja:
Določimo maščobno kislino na drugi poziciji in izračunamo razmerje le-te proti celotni molekuli. Določanje E-faktorja je primerno za ugotavljanje pristnosti oljčnega olja. Je neodvisen od geografskega izvora olja.

4.4.6 Holesterol

Spada med lipide. Kemično je sterol. V našem organizmu ima pomembne funkcije: iz njega nastajajo steroidni hormoni, vitamin D₃ in žolčne kisline. Holesterol je tudi pomembna gradbena sestavina vsake celične membrane, ki se nahaja v lipofilnem delu dvojnega fosfolipidnega sloja. Sodeluje tudi pri vzdrževanju viskoznosti membran. Za razliko od trigliceridov in sfingolipidov se sterolni obroč v organizmu ne more razgraditi. Zato je za njegovo odstranitev iz organizma potrebna presnova v žolč in žolčne kisline, ki se izločajo v črevesju.

Holesterol se veže z beljakovinami – nastanejo lipoproteini, ki prenašajo holesterol in druge trigliceride v krvi po telesu:

Večina se ga veže v LDL (low density lipoproteins) – lipoproteini nizke gostote (vsebujejo veliko holesterola), ostanek pa v HDL (high density lipoproteins) – lipoproteini visoke gostote (vsebujejo večinoma beljakovine) in VLDL (very low density lipoproteins).

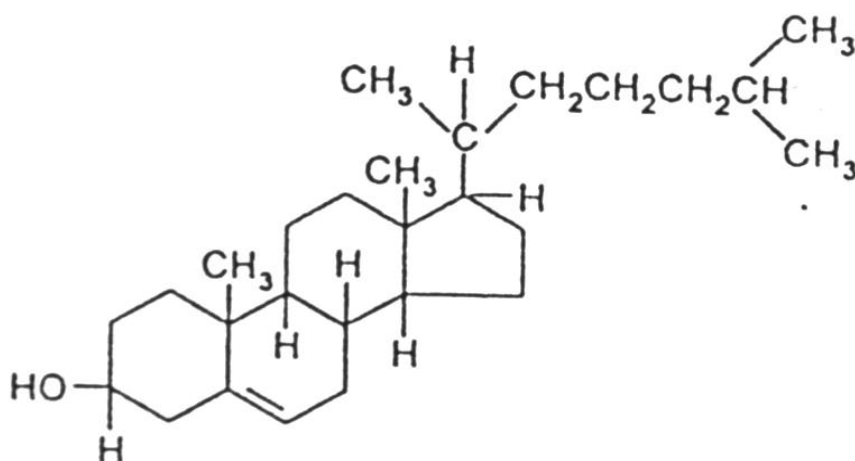
Holesterol je za organizem nujno potreben, vendar so prevelike količine holesterola v krvi škodljive, saj pospešujejo natanek ateroskleroze. Pri tem imata LDL in HDL holesterol različni vloge. HDL holesterol imenujemo tudi “dobri” holesterol in ima zaščitno vlogo pri aterosklerotičnih procesih v nasprotju z LDL holesterolom, ki te procese pospešuje.

Vsebnost holesterola v živilu je zato pomemben podatek, posebno če gre za dietetično prehrano.

Poznane so številne metode določanja, ki se razlikujejo po načinu priprave vzorca in po kvantitativni meritvi pri določanju (kolorimetrične, kromatografske in encimske). Kolorimetrične metode se razlikujejo po reagentu za razvijanje barve.

Za hitro določanje holesterola v mleku glej spletno stran:

<http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/81/11/2833>



Slika 83: Strukturna formula holesterola

Vir: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/81/11/2833> (10. 12. 2009)

Več poiščite tudi na spletu:

http://www.hcc.mnscu.edu/chem/V.26/page_id_21002.html (10. 12. 2009)

4.4.7 Povzetek s preverjanjem znanja

Analitika maščob je zelo kompleksna in zavzema določanje količine, kvara, karakterističnih števil, vrste maščobnih kislin in pristnosti maščob. Klasična metoda za določanje količine maščob v živilu je ekstrakcija maščob z organskim topilom, med njimi je najpomembnejša metoda določanje količine maščob po Soxhletu. Pri maščobah določamo hidrolitičen kvar maščob (izražamo ga s kislinskim številom, kislinsko stopnjo in % oleinske kisline) in oksidativen kvar maščob (določamo ga kot peroksidno število ali s TBK testom). Med pomembnejša značilna števila pri analitiki maščob sodi še jodno število (z njim izražamo nasičenost oz. nenasičenost maščobnih kislin) in število umiljenja (je pokazatelj dolžine verig maščobnih kislin oz. molske mase maščobe). Za ugotavljanje vrste maščobnih kislin in pristnosti maščob se najpogosteje uporabljajo sodobne kromatografske tehnike (HPLC in GC kromatografija).

- Razložite pomen določanja maščob.
- Kaj so surove maščobe?
- Navedite topila za določanje maščob. Razmislite, na kaj vse moramo biti pozorni pri izbiri topila za ekstrakcijo maščobe?
- S katero metodo in kako bi določil količino maščob v čipsu?
- Kakšen kvar maščob poznate in kako ga določamo?
- Kaj nam pove jodno število in kaj število umiljenja?
- Zakaj je pomembno znanje o sestavi maščob in kako jo določamo?
- S katerimi metodami bi lahko določil pristnost rastlinskih maščob?
- Ali je smiselno določati količino holesterola v živalskih maščobah?

4.5 OGLJIKOVI HIDRATI

Ogljikovi hidrati: monosaharidi, oligosaharidi in polisaharidi so zelo razširjeni v živilih rastlinskega porekla. V živilih živalskega izvora se nahajajo v znatno manjših količinah (razen v mleku, ki vsebuje 4.5 % laktoze).

Od monosaharidov določamo v živilih predvsem glukozo in fruktozo, ki se nahajata v sadju in medu. V sadnih proizvodih, ki vsebujejo veliko kisline, se lahko pojavita oba sladkorja tudi kot proizvod hidrolize dodane saharoze. Glukozo v obliki sirupa dodajamo pri proizvodnji bonbonov, mas za polnjenje in nekaterim sadnim proizvodom. Fruktozo pa uporabljamo za dietične proizvode.

Ostale monosaharide (galaktozo, manozo, ksilozo, arabinozo), ki se nahajajo v neznatnih količinah v prostem stanju v živilih, običajno ne določamo.

Od disaharidov so z analitičnega stališča najpomembnejši saharoza, laktoza in maltoza. Saharoze je v sadju in zelenjavi zelo malo v obliki naravne sestavine, mnogo več jo je dodane (10 do 70 %) v sadnih proizvodih. Laktozo določamo v mleku, mlečnih izdelkih in v živilih, ki jim dodamo mleko. Maltoza se v živilih nahaja kot produkt hidrolize škroba, njeno določanje je pomembno v moki.

Od polisaharidov je v živilih najbolj razširjen škrob (70–77 % ga je v žitih, 50–55 % v stročnicah, 20 % v krompirju, 8–19 % v sadju). Vsebnost škroba kot naravne sestavine ali v obliki dovoljenega aditiva določamo zelo pogosto. Če sumimo na potvorbo, je včasih že dovolj samo kvalitativen dokaz.

Od ostalih polisaharidov določamo pektinske snovi v posameznem sadju (jabolka, limone), v žitih pa pentozane. Celulozo in hemicelulozo določamo običajno skupno kot surove vlaknine.

Posamezne ogljikove hidrate določamo v smislu ugotavljanja kemijske sestave živila, ugotavljanja kakovosti in zaradi ugotavljanja ustreznosti po pravilnikih o kakovosti živil.

4.5.1 Priprava vzorca

Pri določanju sladkorjev (monosaharidov in disaharidov) moramo pred analizo ustrezno pripraviti vzorec: iz vzorca ekstrahiramo sladkor in iz ekstrakta odstranimo vse komponente, ki bi lahko motile analizo. Pred ekstrakcijo vzorec živila ustrezno zdrobimo (v terilnici, mlinu, sekljalniku), da omogočimo popolno ekstrakcijo sladkorja iz živila. Ekstrahiramo z vodo na temperaturi 40 do 50 °C, običajno na vodni kopeli. Temperature ne smemo prekoračiti, ker se lahko spremeni topnost nekaterih kolooidov, pri vzorcih z večjimi količinami škroba pa lahko pri višjih temperaturah pride do zaklejitve škroba. Sledi bistrenje ekstrakta: iz njega moramo odstraniti vse v vodi topne komponente in koloide (beljakovine, pektine, tanine, barve, razne katione in anione), ki sicer motijo določanje sladkorjev. Večino teh komponent odstranimo iz ekstrakta s pomočjo dodatkov za bistrenje. Pri kromatografskih metodah določanja sladkorjev pa moramo odstraniti še aminokislino, katione in anione s pomočjo ionskih izmenjevalcev. Kot sredstvo za bistrenje najpogosteje uporabljamo nevtralno ali bazično raztopino svinčevega acetata in reagent po Carrezu (raztopina I – $K_4Fe(CN)_6$, raztopina II – soli cinkovega acetata in sulfata).

4.5.2 Določanje monosaharidov in oligosaharidov

Določanje je lahko kvalitativno v smislu identifikacije mono- in oligosaharidov ali kvantitativno. Osnova obeh postopkov je običajno enaka.

Kvalitativno določanje:

- z barvnimi reakcijami,
- z reakcijami, ki bazirajo na redukcijskih lastnostih sladkorjev,
- z reakcijami, ki bazirajo na optični aktivnosti sladkorjev,
- reakcija s fenilhidrazinom,
- fermentacijske lastnosti,
- kromatografsko ločevanje in identifikacija (z barvnimi reakcijami).

Barvne reakcije s fenolom in aromatičnimi amini



Osnova vseh barvnih reakcij je dehidracija sladkorja zaradi delovanja kisline (žveplove (VI), klorovodikove ...) in nastanek **furfurola** iz pentoz oz. **hidroksimetilfurfurola** iz heksoz. Nastali produkti dajo značilno obarvanje s fenoli in aromatičnimi amini. Najpogosteje uporabljamo naslednje fenolne skupine in aromatične amine:

- α -naftol (preizkus po Molischu),
- rezorcin (Seliwanoffova reakcija),
- naftorezorcin (preizkus po Tollensu),
- difenilamin.

Slika 84: Dokaz s Tollens-ovim reagentom

Vir: http://online.sfsu.edu/~meden/COURSES/Chem_336/c336expts/7f3f.html (5. 1. 2010)

Izkoriščanje redukcijskih sposobnosti sladkorjev

Za dokazovanje monosaharidov in disaharida maltoze in laktoze izkoriščamo njihovo lastnost, da reducirajo ione kovin (bakra, bizmuta, srebra) iz alkalne raztopine njihovih soli. Po redukciji dobimo ustrezne okside kovin ali elementarno kovino. Saharozo lahko določimo na tak način po njeni hidrolizi. Najpogosteje uporabljamo za določanje sladkorjev po tem principu redukcijo alkalne raztopine kompleksa CuSO_4 – Fehlingove raztopine. Natančneje je opisana metoda pri kvantitativnem določanju ogljikovih hidratov.



Slika 85: Fehlingov test na glukozo (levo) in saharozo (desno) pred hidrolizo
Vir: <http://www.scienceinschool.org/2007/issue4/enzymes/> (5.1.2010)

Vsi mono- in oligosaharidi so **optično aktivni** – to dejstvo izkoriščamo za njihovo identifikacijo.

Reakcija s fenilhidrazinom

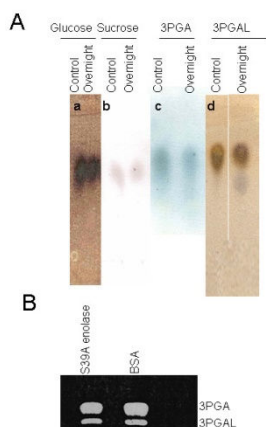
Po reakciji monosaharidov s fenilhidrazinom dobimo ustrezne **fenilhidrazone**, za katere je značilna različna temperatura topnosti.

Primer:

2,4-dinitrofenilhidrazon glukoze se topi na 122 do 124 °C, fruktoze 176 do 178 °C, manoze 180 do 181 °C ...

Izkoriščanje fermentacijskih lastnosti (D-glukoze, D-manoze, D-fruktoze, maltoze in saharoze) zaradi delovanja *Saccharomyces cerevisiae* nekaterih sladkorjev za ločevanje od nefermentacijskih sladkorjev (D-galaktoze, laktoze in pentoze).

Kromatografsko ločevanje – uporabimo lahko različne kromatografske tehnike, sledi identifikacija z ustreznim barvilom.



Slika 86: Prikaz določanja sladkorjev oz. njihovih metabolitov s papirno kromatografijo
Vir: <http://www.microbialcellfactories.com/content/4/1/5/figure/F3?highres=y> (5. 1. 2010)

Kvantitativno določanje

Osnove metod so enake kot pri kvalitativnih metodah. Razdelimo jih v naslednje skupine:

- redukcijske,
- polarimetrijske,
- fotometrične,
- kromatografske,
- biokemijske.

Metoda po Fehlingu

Med najpogosteje uporabljene redukcijske metode spada metoda s **Fehlingovimi raztopinami**. Fehlingova raztopina je sestavljena iz dveh raztopin:

Fehling I - raztopina CuSO_4

Fehling II – alkalna raztopina K-Na-tartrat

Pri mešanju obeh raztopin nastane kompleksen ion bakra (II).

V reakciji med raztopino sladkorja in Fehlingove raztopine poteka redukcija Cu^{2+} iona do Cu^+ , nastane bakrov hidroksid (rumena oborina), ki pri segrevanju preide v bakrov (I) oksid (rdeča oborina). Sladkorji pa se v alkalni sredini oksidirajo v različne kisline.

Količino nastalega Cu_2O merimo na različne načine:

- gravimetrično (filtracija, spiranje, sušenje, tehtanje),
- titracija s kalijevim permanganatom.

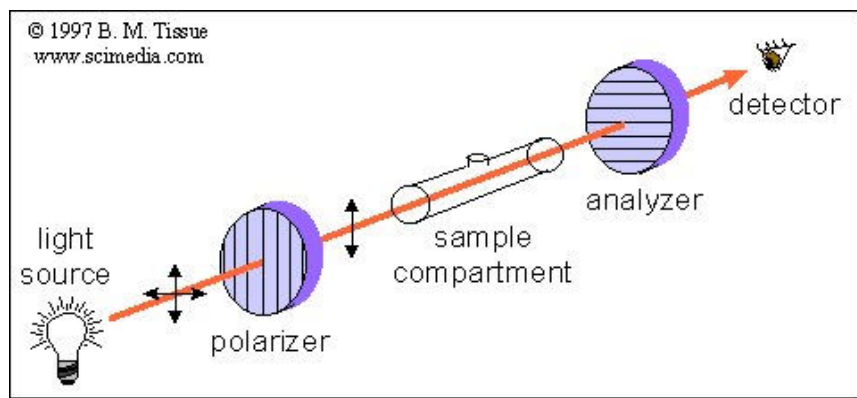
Količino sladkorja dobimo iz količine bakrovega oksida iz ustreznih tabel.

Za določanje skupnega sladkorja izvedemo hidrolizo s klorovodikovo kislino.

Polarimetrično določanje sladkorjev

Spadajo med hitre instrumentalne metode. Izkoriščamo lastnost sladkorjev, da so v raztopini optično aktivni, to pomeni, da premikajo raven polarizirane svetlobe (desno ali levo). Velikost kota rotacije je odvisna od vrste in koncentracije sladkorja, temperature in dolžine cevi polarimetra.

Metoda se uporablja za določanje večjih količin sladkorjev, npr. v jedilnem sladkorju, sirupih, čokoladi, dietetskih proizvodih in tudi za določanje laktoze v mleku.



Slika 87: Shematski prikaz delovanja polarimetra

Vir: <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/polarim.htm> (5. 1. 2010)

Fotometrične metode določanja sladkorjev

Se zelo pogosto uporabljajo zaradi enostavnosti pri serijskem določanju sladkorjev.

Kromatografske metode

Uporabljamo različne tehnike: papirno, tankoplastno in plinsko kromatografijo. Za uspešno ločitev je potrebno pravilno pripraviti ekstrakt vzorca z ustrežno koncentracijo sladkorja in izbrati ustrezno topilo.

Biokemijske metode

Delimo jih v mikrobiološke in encimske metode.

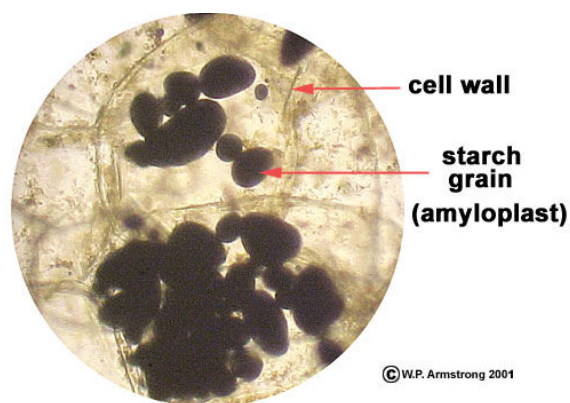
Pri mikrobioloških metodah ločujemo sladkorje glede na razlike v fermentacijski sposobnosti kvasovk – glukoza in fruktoza; po hidrolizi pa še maltoza in saharoza fermentirajo pod vplivom njihovega delovanja, pentoze in laktoze pa ne.

Encimske metode so zaradi visoke selektivnosti zelo uporabne za določanje glukoze, fruktoze, galaktoze, sorbita, saharoze, laktoze, maltoze in škroba v mnogih živilih. Za določanje uporabimo ustrezne encimske preparate.

4.5.3 Dokazovanje in določanje polisaharidov

Od vseh polisaharidov se najpogosteje analizira škrob. Analiziramo še pektinske snovi in celulozo z hemicelulozo in ligninom.

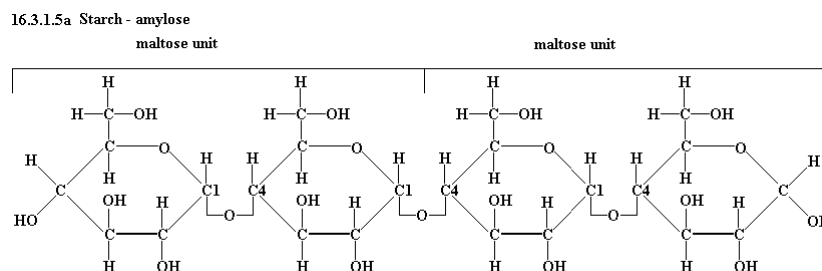
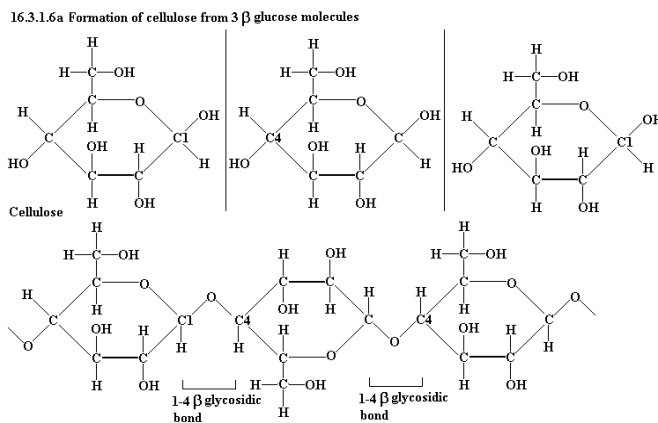
Za dokazovanje škroba se uporablja reakcija z raztopino joda (modra barva) – dokazujemo potvorbo (umetni med, marcipan, mesni izdelki).



Slika 88: Dokaz škroba z obarvanjem z raztopino joda
Vir: <http://waynesword.palomar.edu/vege1.htm> (5. 1. 2010)

Kvantitativno določamo škrob na različne načine:

- hidroliza škroba in njegova določitev preko glukoze,
- obarjanje škroba in gravimetrično ali volumetrično določanje in
- izkoriščanje optične aktivnosti škroba.



Slika 89: Primerjava molekule škroba in celuloze
Vir: http://www.uq.edu.au/School_Science_Lessons/UNBiology6.html (5. 1. 2010)

4.5.4 Pektinske snovi

Pektinske snovi so naravne sestavine sadja in tudi nekatere zelenjave, najdemo jih tudi v nekaterih prehrabnih izdelkih kot aditive. Uporabljamo jih zaradi njihovih specifičnih lastnosti, da nabrekajo in tvorijo stabilne gele, dodajamo jih kot sredstva za želiranje, kot emulgator in stabilizator.

Večje količine pektinskih snovi (tudi do 20 %) vsebujejo citrusi, jabolka, ribez, sladkorna repa in od zelenjave korenje (do 7 % na s. s.)

K pektinskim snovem spadajo:

- pektinske kisline in njihove soli pektati,
- pektin in soli pektinati,
- protopektin (v vodi netopen) in
- derivati pektina.

Njihove fizikalno kemijske lastnosti so odvisne od njihove kemijske narave. Pri pektinu so odvisne od stopnje esterifikacije. Stopnja esterifikacije pa je odvisna od samega postopka ekstrakcije pektina iz surovine (od časa ekstrakcije in pH medija). Tako lahko dobimo viskoesterificirane ali nizkoesterificirane pektine, ki se med sabo razlikujejo po topnosti v vodi, po moči želiranja, po različnem obarvanju itd.

Za določanje pektinskih snovi moramo pektine predhodno ekstrahirati iz vzorca in jih nato določamo s pomočjo metod, ki so osnovane na koagulaciji in flokulaciji koloidnih delcev pektina, na obarvanju pektina z različnimi agensi in na barvnih reakcijah.

Več poiščite tudi na spletu:

http://online.sfsu.edu/~meden/COURSES/Chem_336/c336expts/7f3f.html (5. 1. 2010)

<http://www.scienceinschool.org/2007/issue4/enzymes/> (5. 1. 2010)

<http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/polarim.htm> (5. 1. 2010)

4.5.5 Povzetek s preverjanjem znanja

Ogljikove hidrate določamo za ugotavljanje kemijske sestave živila, kakovosti in zaradi ugotavljanja ustreznosti po pravilnikih o kakovosti živil. Pri kvalitativnih metodah določamo vrsto ogljikovih hidratov – oligosaharidov, pri čemer izkoriščamo njihove lastnosti (redukcijske, optično aktivnost, fermentacijske, barvne reakcije ...). Kvantitativne metode imajo enak princip kot kvalitativne, le, da sledi kvantitativno ovrednotenje. Na primer: pri metodi po Fehlingu z določitvijo reducirane metala (bakrovega oksida), pri barvnih reakcijah fotometrično določanje obarvanega kompleksa, pri kromatografskih kvantitativno ovrednotenje kromatografa ... Od polisaharidov najpogosteje analiziramo škrob (značilna reakcija z jodovico), katerega vsebnost je lahko tudi pokazatelj potvorb živila. Količino škroba analiziramo s klasičnimi kemijskimi metodami: gravimetrično, volumetrično ali instrumentalno s polarimetrijo.

- Razmislite o pomenu določanja ogljikovih hidratov.
- Navedite metode kvalitativnega določanja sladkorjev.
- Navedite osnovo metode določanja ogljikovih hidratov po Fehlingu.
- Na kakšen način lahko določimo saharozo po Fehlingu?
- Katere lastnosti sladkorjev izkoriščamo pri polarimetriji?
- Navedite osnove biokemijskih metod določanja sladkorjev.

- S katero barvno reakcijo lahko dokažemo škrob?
- Navedite metode kvantitativnega določanja škroba.
- Kakšna je razlika med molekulami škroba in celuloze?
- Navedite uporabo pektina in njegovo določanje.

4.6 ADITIVI

Do konca 18. stol. se je živilom dodajalo le malo dodatkov: sol, kis, dišave, sladkor, kvas in žveplovo (IV) kislino. Močno se je povečalo število dodatkov z industrijsko revolucijo in s tem z industrijsko pripravo obstojne hrane. Nekateri dodatki, ki so se uporabljali v 19. stol., so se ohranili vse do danes. Za 20. stol. je značilen hiter nadaljnji razvoj dodatkov ter znatno izboljšanje prehrambenih izdelkov. V tem času so uvedli nove vrste dodatkov: emulgatorje, sredstva za želiranje, kelatne reagente, antioksidante ... Tako so postali dodatki nepogrešljivi za mnoga področja predelave živil. Brez uporabe nekaterih dodatkov ne bi bila možna racionalna predelava živil, ne bi bila dosežena obstojnost živil in njihova atraktivnost.

Dodatki so snovi ali mešanica snovi, ki jih dodamo živilom tekom tehnološkega procesa, pakiranja in shranjevanja. Dodatki ali njihovi razkrojni produkti v splošnem ostanejo v živilu, vendar jih lahko v nekaterih primerih iz živila med tehnološkim postopkom odstranimo.

Razdelitev dodatkov glede na njihovo namembnost:

1. **Dodatki s prehransko in dietetično funkcijo**

- vitamini in provitamini
- aminokisliline
- minerali in elementi v sledih
- polnila

2. **Dodatki za stabilizacijo**

- konzervansi
- antioksidanti
- sinergisti in kompleksanti
- zaščitni plini
- emulgatorji
- zgoščevalci in želirne snovi
- posebni stabilizatorji

3. **Dodatki s senzoričnimi lastnostmi**

- barvila
- dodatki za izboljšanje okusa
- arome

4. **Dodatki pri predelavi živil in dodatki kot delovna pomagala**

- pH regulatorji
- encimi
- kulture mikroorganizmov
- topila
- nosilni plini
- dodatki za bistrenje
- dodatki za filtriranje
- dodatki proti penjenju
- belilna sredstva

Število dodatkov iz leta v leto narašča. Danes je že zavedenih nekaj tisoč različnih vrst dodatkov.

Osnovni pogoj za njihovo uporabo je, da so razvrščeni v **Pozitivni seznam aditivov** (Pravilnik o kakovosti živil) – kar pomeni, da so popolnoma preverjeni za trajno in varno uporabo v živilskih izdelkih (skupina A1), ali da doslej še niso imeli škodljivih posledic, čeprav za trajno in varno uporabo v živilskih izdelkih še niso popolnoma preverjeni (skupina A2). Izjemoma so v pozitivni seznam uvrščeni tudi aditivi, ki niso popolnoma preverjeni, je pa njihova uporaba v živilskih izdelkih tehnološko upravičena (skupina B).

Za analitiko to pomeni, da mora s kvalitativnimi testi dokazati, da nedovoljeni aditivi niso prisotni in s kvantitativno analizo zagotoviti, da koncentracija uporabljenih aditivov ne presega dovoljene meje.

Analitika aditivov je glede na raznovrstnost substanc, ki se uporabljajo kot aditivi zelo kompleksna, tako lahko naredimo le pregled najpogosteje uporabljenih metod za analizo nekaterih skupin aditivov:

4.6.1 Določanje konzervansov

Konzervansi se uporabljajo zaradi podaljšanja obstojnosti živil in zaradi zaščite pred mikotoksini.

Najpogosteje uporabljamo benzojsko kislino in njene soli (benzoate) ter sorbično kislino in njene soli (sorbate).

Kvalitativen dokaz:

- z barvno reakcijo s FeCl_3 (za benzojsko kislino),
- s tankoplastno kromatografijo (TLC).

Kvantitativno določevanje:

- spektrofotometrično z merjenjem absorbance,
- volumetrično s titracijo z NaOH,
- s tekočinsko kromatografijo velike zmogljivosti (HPLC) in
- s plinsko kromatografijo (primerna za benzojsko in sorbično kislino, enako kot pri tekočinski kromatografiji je tudi tukaj predhodno potrebna ekstrakcija).



Slika 90: Za določanje aditivov se pogosto uporablja tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Vir: <http://www.polymersolutions.com/additives.html> (13. 1. 2010)

4.6.2 Določanje barvil

Z dodajanjem barv živilom korigiramo izgubo ali spremembe barve med postopki pri predelavi.

V rutinski analizi živilskih barvil običajno zadostuje kvalitativna analiza, s katero potrdimo ali izključimo prisotnost določenih barvil. Izvedemo jo s papirno ali tankoplastno kromatografijo. Tekočinsko kromatografijo uporabljamo samo za kvantitativno določevanje – kadar je uporaba določenega barvila količinsko omejena.

4.6.3 Določanje umetnih sladil

Hrani jih pogosto dodajajo zaradi prijetnega sladkega okusa in nizke kalorične vrednosti. Za identifikacijo umetnih sladil uporabljamo TLC tehniko. Za kvantitativno določitev pa uporabljamo tekočinsko kromatografijo (HPLC). Kadar določamo čista umetna sladila ali sladila v brezalkoholnih pijačah, ni potrebna posebna priprava vzorca. Iz drugih živil predhodno ekstrahiramo umetna sladila z vodo ali etanolom, sledi čiščenje ekstrakta s filtriranjem.

Na tržišču obstajajo različna umetna sladila: saharin, aspartam, ciklambat, acesulfam-k. Analitika posameznih umetnih sladil se razlikuje (uporaba različnih topil). Ciklambat lahko določamo tudi gravimetrično. V kislem mediju odcepljajo ioni nitrita od molekule ciklamata SO_4 skupino, ki jo s pomočjo barijevih ionov določimo gravimetrično.

4.6.4 Natrijev glutaminat

Spada med najbolj razširjene ojačevalce arome in okusa. To so substance, ki nadomestijo, modificirajo ali ojačajo aromo in okus živila, na da bi pri tem prizadeli njegov osnovni okus in aromo. Na-glutaminat intenzivira in pospešuje senzorične zaznave posebno mesnih arom in se uporablja kot aditiv za pripravo zamrznjene in dehidrirane hrane, konzerviranih rib in mesa. V živilu je prisotna tudi kot naravna sestavina – natrijeva sol glutaminske kisline, to je aminokislina, ki je lahko vezana v proteinih ali prosta. Negativen odnos do uporabe Na-glutaminata se je povečal zaradi pojava bolezni "sindrom kitajske kuhinje" (otrplost, napetost in bolečine v glavi, vratu, prsnem košu in ramenih), po zmanjšanem vnosu Na-glutaminata znaki bolezni izginejo. Zaradi varovanja zdravja ljudi in kontrole kvalitete prehrambenih izdelkov, ko prevelika količina dodatka Na-glutaminata lahko prekrije uporabo slabše ali celo neprimerne surovine, je maksimalno dovoljena vsebnost glutaminske kisline in njenih soli v prehrambenih izdelkih določena z ustreznimi predpisi.

Metode določanja so lahko encimske in neencimske. Encimske metode temeljijo na uporabi specifičnih encimov, ko nastanejo barvni kompleksi in jih nato merimo spektrofotometrično. V nekaterih primerih, ko se sprošča kislina ali plin, tudi potenciometrično. Neencimske tehnike temeljijo na uporabi različnih kromatografskih tehnikah, kot so: papirna in tankoplastna kromatografija, tekočinska kromatografija pod visokim pritiskom (HPLC), ionsko izmenjevalna kromatografija, plinska kromatografija in v zadnjem času kapilarna elektroforeza.

4.6.5 Ostali aditivi

Konzervansi, antioksidanti, barvila in delno tudi sladila so aditivi, ki se v predelavi živil največ uporabljajo. Drugi aditivi, to so gostila, stabilizatorji, emulgatorji in drugi, so večinoma snovi, ki niso toksične, zato njihova prisotnost in količina z zdravstvenega vidika ni tako zelo pomembna. Za vsak aditiv je razvita specifična tehnika določanja.

Več poiščite tudi na spletu:

<http://www.najdi.si/search.jsp?q=aditivi+v+prehrani&hpage=my&offset=0&selfid=2&acnum=10&foxsbar=ac&searchProvider=najdisi> (7. 5. 2010)

http://www.hzjz.hr/zdr_ekologija/preh.htm (13. 1. 2010)

4.6.6 Povzetek s preverjanjem znanja

Analitika aditivov je glede na njihovo raznovrstnost in številčnost zelo kompleksna. Njen poglobitni pomen je v zagotavljanju, da nedovoljeni aditivi niso prisotni v živilih in da koncentracija uporabljenih aditivov ne presega zakonsko dovoljene zgornje meje. Najpogosteje se analizirajo različni konzervansi, barvila, umetna sladila. Za vsak aditiv se uporablja ustrezna metoda določanja. Med najbolj uporabne instrumentalne metode sodijo kromatografske tehnike (TLC, HPLC in GC) in spektrometrija, ki pa niso v celoti izpodrinile gravimetričnih in volumetričnih analiznih metod.

- Naštejte vrste aditivov in razložite pomen.
- Ali lahko govorimo o enotni metodi za določanje aditivov in zakaj ne?
- S katerimi metodami bi določil konzervanse?
- Katere metode se vam zdijo najprimernejše za določanje barvil?
- Katera umetna sladila poznate in kako jih lahko določamo?
- Prisotnost katerih aditivov v živilu ni problematična z vidika našega zdravja?
- Kateri je osnovni pogoj za uporabo aditivov?
- Kakšna je naloga analitike pri preverjanju neoporečnosti živil na policah naših trgovin?

4.7 LITERATURA IN DODATNO BRANJE

Belitz, Grosch. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

Bryan, L. Williams. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. London: Edward Arnold, 1984.

Abram, V. Antioksidativno delovanje flavonoidov. 20. *Bitenčevi živilski dnevi*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2000, str. 23-32.

Chiplunkar, M. *Nitrogen – Information*. Flawil: Buchi Laboratoriums-Technik AG, 1999.

Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. Fourth Edition. New York: W.H. Freeman and company, 1996.

Gary, D. C. *Analytical Chemistry*. Fifth Edition. New York: John Wiley & Sons, 1994.

Golc-Wondra, A. *Elektroforeza*. Sodobne separacijske tehnike. Ljubljana: Kemijski inštitut Ljubljana, 1995.

Gottwald, W. *GC für Anwender*. Weinheim: VCH, 1995.

Harris, D. C. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Wiesbaden: Vieweg, 1997.

Klofutar, C. Pregled dodatkov v živilstvu – definicija in uporaba. *Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevov*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 1994. str. 3-10.

Plestenjak, A. Določanje aditivov v živilih. *Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevov*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 1994. str. 155-160.

Skoog, D.A., et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Thomson Brooks Cole, 2004.

Trajkovič, J., et al. *Analize životnih namirnica*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet, 1983.

Additives Analysis. High Performance Liquid Chromatography (HPLC). (online). (citirano 13. 1. 2010). Dostopno na naslovu: <http://www.polymersolutions.com/additives.html>.

Amino Acid Analysis. (online). (citirano 11. 11. 2009). Dostopno na naslovu: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=514511.

Analysis of Ash and Minerals. (online). (citirano 3. 9. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www-unix.oit.umass.edu/~mcclemen/581Ash&Minerals.html>.

Analytik Jena. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu: http://analytik-jena.com/frontend/itid_330/st_id_330/?gclid=CICP37uQh5cCFSXIXgodfz269w.

Bonvin A. Haddock on Biowulf. (online). (citirano 11. 11. 2009). Dostopno na naslovu: http://biowulf.nih.gov/apps/haddock_biowulf.html.

Chem Cards. *Lipids*. (online). (citirano 10. 12. 2009). Dostopno na naslovu: http://www.hcc.mnscu.edu/chem/V.26/page_id_21002.html.

De et al. *Microbial Cell Factories*. 2005. (online). (citirano 5. 1. 2010). Dostopno na naslovu: <http://www.microbialcellfactories.com/content/4/1/5/figure/F3?highres=y>.

Edusatis Wiki. *SOP Določanje vode Karl Fisher*. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.edusatis.si/wiki/tikiindex.php?page=SOP%20Dolo%C4%8Danje%20vode%20Karl%20Fisher>.

Evisa. *Büchi Labortechnik AG - Wet Digester System B-440*. (online). (citirano 3. 9. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.speciation.net/App/Techniques/technique.html?id=2477>.

Fletouris D.J. *Rapid Determination of Cholesterol in Milk and Milk Products by Direct Saponification and Capillary Gas Chromatography*. *Journal of Dairy Science*. (online). (citirano 10. 12. 2009). Dostopno na naslovu: <http://jds.fass.org/cgi/content/abstract/81/11/2833>.

Keusch P. *Biuret Reaction - Protein in Egg Albumen*. (online). (citirano 11. 11. 2009). Dostopno na naslovu: http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Biuret-e.htm.

Lab Synergy. *Nitrogen Combustion*. (online). (citirano 11. 11. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.labsynergy.com/nitrogen-combustion.htm>.

Le Boucher J. Et al. *Amino acid determination in biological fluids*. *American Association for Clinical Chemistry*. (online). (citirano 11. 11. 2009). Dostopno na naslovu: <http://www.clinchem.org/cgi/content/full/43/8/1421>.

Marini I. *Two hydrolytic enzymes and an epistemological–historical approach*. (online). (citirano 5. 1. 2010). Dostopno na naslovu: <http://www.scienceinschool.org/2007/issue4/enzymes/>.

Memmert Univerzalni sušilniki. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu: http://www.orbit-lab.si/slo/Prodajni%20program/MEMMERT/6_Susilniki.htm.

School Science Lessons. *Biology experiments*. (online). (citirano 5. 1. 2010). Dostopno na naslovu: http://www.uq.edu.au/School_Science_Lessons/UNBiology6.html.

Služba za zdravstveno ekologiju. *Zdravstvena ispravnost namirnica, predmeta opče uporabe i vode*. (online). (citirano 13. 1. 2010). Dostopno na naslovu: http://www.hzjz.hr/zdr_ekologija/preh.htm.

Šporar I. in Naneh R. *Toksičnost aditivov v prehrani*. (online). (citirano 7. 5. 2010). Dostopno na naslovu: <http://www.najdi.si/search.jsp?q=aditivi+v+prehrani&hpage=my&offset=0&selfld=2&acnum=10&foxsbar=ac&searchProvider=najdisi>.

The University of Adelaide. *Polarimetry*. (online). (citirano 5. 1. 2010). Dostopno na naslovu: <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/polarim.htm>.

Qualitative Organic Analysis. *Aldehydes*. (online). (citirano 5. 1. 2010). Dostopno na naslovu: http://online.sfsu.edu/~meden/COURSES/Chem_336/c336expts/7f3f.html.

Vegetables From Underground. (online). (citirano 5. 1. 2010). Dostopno na naslovu: <http://waynesword.palomar.edu/vege1.htm>.

Wikipedia. *Water content*. (online). (citirano 2. 6. 2009). Dostopno na naslovu: http://en.wikipedia.org/wiki/Water_content#Direct_methods.

4.8 EVALVACIJA ZNANJA

- Razložite pomen določanja posameznih hranilnih snovi v živilu.
- Razložite pomen senzorične analize živil.
- Katere teste senzorične analize poznate?
- Kaj je deskriptivna senzorična analiza?
- Navedite metode za določanje vode v živilih.
- Katere klasične metode določanja vode v živilih poznate? Navedite napake metode.
- Primerjajte klasične in instrumentalne metode določanja vode v živilih.
- Razložite princip metode določanja vode s titracijo po Karl Fisherju.
- Kako določamo mineralne snovi s suhim in kako z mokrim sežigom? Kdaj bomo izbrali določeno metodo?
- Navedite potek dela in napake metode določanja mineralnih snovi s suhim sežigom.
- Kaj je osnova indirektnih metod določanja beljakovin?
- Navedite faze dela določanja beljakovin po Kjeldahlu in razložite kemizem.
- Katere barvne metode za določanje beljakovin poznate? Kako jih lahko uporabimo za kvantifikacijo?
- Kaj vse lahko določamo z analizo maščob?
- Kakšen kvar maščob poznamo in kako ga določamo?
- Kaj nam pove kislinsko število?
- Kaj določamo z jodnim številom?
- Kaj je osnova določanja količine maščob?
- Opišite metodo določanja količine maščob po Soxhletu.
- Kako določamo sestavo maščob in kako potvorbo?
- Naštejte kvalitativne analize metode za določanje mono- in oligosaharidov.
- Kaj je osnova metode določanja sladkorjev po Fehlingu? Na kakšen način lahko po Fehlingu določimo tudi saharozo?
- Kaj je osnova polarimetričnega določanja sladkorjev?
- Kako lahko kvantitativno določamo vsebnost sladkorjev v živilih?
- Navedite metode za kvalitativno in kvantitativno določanje škroba.
- Katere so najpogostejše metode za določanje aditivov?
- Kateri pogoji morajo biti izpolnjeni za uporabo aditivov?

5 LITERATURA

- Belitz, Grosch. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
- Bryan, L. Williams. *Principles and Techniques of Practical Biochemistry*. London: Edward Arnold, 1984.
- Abram, V., in Zelenik-Blatnik, M. *Vaje iz živilske kemije za študente živilske tehnologije*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 1996.
- Chiplunkar, M. *Nitrogen – Information*. Flawil: Buchi Laboratoriums-Technik AG, 1999.
- Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*. Fourth Edition. New York: W.H. Freeman and company, 1996.
- Gary, D. C. *Analytical Chemistry*. Fifth Edition. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- Golc-Wondra, A. *Elektroforeza*. Sodobne separacijske tehnike. Ljubljana: Kemijski inštitut Ljubljana, 1995.
- Gorenc, D., et al. *Analizna kemija: gravimetrična in volumetrična analiza*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 1994.
- Gottwald, W. *GC für Anwender*. Weinheim: VCH, 1995.
- Harris, D. C. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. Wiesbaden: Vieweg, 1997.
- Klofutar, C. Pregled dodatkov v živilstvu – definicija in uporaba. *Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevov*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 1994. str. 3-10.
- Plestenjak, A. Določanje aditivov v živilih. *Zbornik 16. Bitenčevih živilskih dnevov*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 1994. str. 155-160.
- Prošek, M., in Pukl, M. *Kvantitativna planarna kromatografija*. Ljubljana: Kemijski inštitut Boris Kidrič, 1991.
- Rudan-Tasič, D. Vitamini C, E in Q10. *20. Bitenčevi živilski dnevi*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, 2000. str. 39-51.
- Sodja Božič, J. *Vaje iz instrumentalne analize*. Trzin: Izolit, 1998.
- Skoog, D. A., et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Thomson Brooks Cole, 2004.
- Trajkovič, J., et al. *Analize životnih namirnica*. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet, 1983.

Projekt **Impletum**

Uvajanje novih izobraževalnih programov na področju višjega strokovnega izobraževanja v obdobju 2008–11

Konzorcijski partnerji:



Operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo RS za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, razvojne prioritete Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja in prednostne usmeritve Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja.