

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo
Katedra za analizno kemijo

NAVODILA ZA VAJE PRI PREDMETU KEMIJSKA ANALIZA ŽIVIL

Helena Prosen in Irena Kralj Cigić

Ljubljana, 2006

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

663/664:543.06(075.8)(076.5)

PROSEN, Helena

Navodila za vaje pri predmetu Kemijska analiza živil/ Helena Prosen in Irena Kralj Cigić.
- 1. izd., 2. Natis. – Ljubljana : Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za analizo kemijo, 2012

ISBN 978-961-6286-64-0

1. Kralj Cigić, Irena
262132992

NAVODILA ZA VAJE PRI PREDMETU KEMIJSKA ANALIZA ŽIVIL: zbirka vaj

Napisali Helena Prosen, Irena Kralj Cigić

Strokovni pregled prof. dr. Lucija Zupančič-Kralj in prof. dr. Milica Kač

Jezikovni pregled Mojca Bajc, prof.

Oblikovanje in prelom Vinko Volk

Naslovnica Vinko Volk

Tiskala Tiskarna Pleško d.o.o

Urednik prof. dr. Darko Dolenc

© (2012) Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Za založbo prof. dr. Anton Meden

Ljubljana, 2012.

Prva izdaja, drugi natis

Naklada 100 izvodov

Cena 4,00 Eur

Vse pravice pridržane. Brez pisnega dovoljenja UL-FKKT je prepovedano reproduciranje, distribuiranje, dajanje v najem, javna priobčitev, predelava in druga uporaba tega avtorskega dela ali njegovih delov v kakršnem koli obsegu ali postopku, vključno s fotokopiranjem, tiskanjem ali objavo na elektronskem mediju.

Pričujoča *Navodila za vaje pri predmetu Kemijska analiza živil* so nastala kot najino skupno delo v sodelovanju z drugimi sodelavci Katedre za analizo kemijo. Pri tem se zlasti zahvaljujeva tehničnim sodelavkam Mojci Žitko, Jolandi Furlan in Zdenki Držaj za laboratorijski preizkus vaj in tehnične izboljšave. Za natančen pregled končnega besedila in prijazne sugestije pa gre zahvala recenzentkama prof. dr. Milici Kač in prof. dr. Luciji Zupančič-Kralj.

Helena Prosen in Irena Kralj Cigić

Ljubljana, februar 2006

KAZALO

1	Uvod	7
2	Statistična obdelava podatkov in vrednotenje analiznih metod	9
2.1	Statistična obdelava podatkov	9
2.2	Vrednotenje analiznih metod	11
3	Vzorčenje in predpriprava vzorca	15
3.1	Vzorčenje	15
3.2	Priprava laboratorijskega vzorca	15
3.3	Določitev paralelk vzorca	16
3.4	Priprava raztopine vzorca	16
4	Priprava vzorca in odstranjevanje interferenc	19
4.1	Obarjanje motečih komponent vzorca	19
4.2	Destilacija	19
4.3	Ekstrakcija	19
5	Osnove analiznih metod	21
5.1	Gravimetrija	21
5.2	Volumetrija	21
5.3	Spektroskopske metode	23
5.4	Masna spektroskopija	25
5.5	Kromatografske metode	25
6	Navodila za izvajanje vaj	27
6.1	Določitev laktoze v mleku z gravimetrično metodo	29
6.2	Določitev skupne vsebnosti beljakovin v jajcih s Kjeldahlovo metodo	31
6.3	Določitev prostega in skupnega SO ₂ v vinu z redoks titracijo	33
6.4	Določitev Ca ²⁺ in Mg ²⁺ v mleku in jogurtu s kompleksometrično titracijo	37
6.5	Določitev vsebnosti NaCl v slanici in konzervirani zelenjavi z obarjalno titracijo	39
6.6	Določitev etanola v vinu z molekulsko absorpcijsko spektrometrijo	41
6.7	Določitev holesterola v mleku in jajcih z molekulsko absorpcijsko spektrometrijo	43
6.8	Določitev skupnih kovinskih ionov v jajcih z atomsko absorpcijsko spektroskopijo	45
6.9	Določitev hlapnih spojin v čaju (arome čaja) z GC-MS	49
6.10	Določitev ostankov pesticidov v zelenjavi s plinsko kromatografijo	51

6.11	Določitev antibiotika kloramfenikola v medu s tekočinsko kromatografijo	55
6.12	Določitev organskih kislin in vitaminov v sadju s tekočinsko kromatografijo	59
7	Uporabljena literatura	61

1 UVOD

Analizno kemijo ponavadi delimo na kvalitativni in kvantitativni del. Kvalitativna analizna kemija se ukvarja predvsem z vprašanjem, kaj je v vzorcu, kvantitativna pa s tem, koliko je neke snovi v njem. V sklopu vaj pri predmetu Kemijska analiza živil se bomo ukvarjali predvsem s slednjo vejo analize kemije.

Različnih analiznih metod, ki so bile doslej razvite in se jih da uporabiti tudi pri kemijski analizi živil, je precej in jih bomo pri pričujočih vajah spoznali le nekaj. V splošnem delimo analizne metode na:

- *klasične*: gravimetrija, volumetrija idr.
- *inštrumentalne*: spektroskopije, elektrokemijske metode, separacijske metode idr.

Katero metodo bomo izbrali za analizo nekega vzorca, je odvisno od odgovorov na naslednja vprašanja:

- koliko vzorca imamo na razpolago,
- v kakšnem koncentracijskem območju se v vzorcu nahaja določevana sestavina,
- s kakšno natančnostjo moramo določiti vsebnost te sestavine,
- katere druge sestavine vzorca nas lahko motijo pri določevanju,
- kakšne so fizikalne in kemijske lastnosti vzorca,
- koliko vzorcev bomo analizirali.

Vendar pa je zaključna meritev (analiza) na repu dolge vrste postopkov, skozi katere mora vzorec, da je pravilno pripravljen. Ti postopki so:

- vzorčenje,
- predpriprava laboratorijskega vzorca,
- določitev paralelk vzorca,
- priprava raztopine vzorca,
- odstranjevanje motečih snovi (interferenc),
- analiza,
- izračun rezultatov in ocena njihove zanesljivosti.

Omenjene postopke si bomo na kratko ogledali v naslednjem vrstnem redu: najprej oceno zanesljivosti rezultatov v poglavju o statistični obdelavi podatkov in vrednotenju analiznih metod (drugo poglavje), nato prve štiri od zgoraj naštetih postopkov v tretjem poglavju o vzorčenju in predpripravi, zatem odstranjevanje interferenc v četrtem poglavju o pripravi vzorca in končno še pregled in osnove analiznih metod, s katerimi boste delali pri vajah, v petem poglavju. Šesto poglavje predstavljajo praktična navodila za določitev različnih snovi v raznih vzorcih živil – vaje, ki jih boste dejansko izvajali.

2 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV IN VREDNOTENJE ANALIZNIH METOD

Analizirano spojino oz. zvrst, torej tisto komponento, ki jo v vzorcu določamo, bomo v nadaljnjem besedilu imenovali *analit* (angl. *analyte*).

2.1 Statistična obdelava podatkov

Pri statistični obdelavi podatkov se ukvarjamo predvsem z vrednotenjem analiznih rezultatov, torej z vprašanjem, kako napaka pri meritvi neke količine vpliva na končni rezultat. Ko govorimo o napakah neke meritve, ločimo naključne in sistematične napake.

Naključne napake izvirajo iz nenatančnosti merjenja. Zaradi njih pride do porazdelitve merskih rezultatov okrog neke vrednosti (*sipanje rezultatov*). To porazdelitev lahko za zelo veliko število meritev opišemo z Gaussovo krivuljo, za manjše število meritev (manj kot 20) pa podajamo sipanje rezultatov z naslednjimi parametri:

Povprečje ali aritmetična sredina meritev je najboljši približek za *pravo povprečno vrednost* (μ), ki bi jo dobili z zelo velikim številom meritev ($N \rightarrow \infty$):

N ...število meritev, x_i ...rezultat posamezne meritve

$$\bar{x} = \sum_{i=0}^N x_i / N$$

Standardni odmik (s oz. σ za zelo veliko število meritev; angl. *standard deviation*, *SD*) je merilo za natančnost rezultata. Ima enako mersko enoto kot merjena količina.

$$s = \sqrt{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 / (N-1)}$$

V območju $\bar{x} \pm s$ leži 68,3 % rezultatov, v območju $\bar{x} \pm 2s$ 95,5 % rezultatov in v območju $\bar{x} \pm 3s$ 99,7 % rezultatov. Podajamo tudi relativni standardni odmik (s_r oz. σ_r ; angl. *relative standard deviation*, *RSD*) kot delež ali v odstotkih:

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}}$$

Nekateri rezultati preveč odstopajo od povprečne vrednosti, da bi jih lahko upoštevali. Imenujemo jih *osamelci* (angl. *outlier*). Da ugotovimo, kateri rezultati so

to, lahko uporabimo različne statistične teste, najpogosteje se rabi naslednji: rezultate meritev razvrstimo po velikosti ter izračunamo razliko med največjo in najmanjšo vrednostjo (označimo z w). Zatem izračunamo razliko med sumljivim rezultatom in po velikosti najbližjo vrednostjo (označimo z Δ) ter izračunamo kvocient: $Q_e = \Delta/w$. Ta kvocient primerjamo z vrednostjo Q_{krit} , ki je podana v tabelah in je odvisna od števila meritev. Če je $Q_e \geq Q_{\text{krit}}$, sumljivi rezultat zavržemo, sicer pa ne.

Tabela 2.1: Vrednosti Q_{krit} za 95 % verjetnost.

Število meritev	3	4	5	6	7	8	9	10	∞
Q_{krit}	0,97	0,83	0,71	0,63	0,57	0,53	0,49	0,47	0,0

Zanima nas še, koliko je izračunana povprečna vrednost iz manjšega števila meritev blizu pravi povprečni vrednosti (μ). Izračunamo *interval zaupanja oz. zanesljivosti*, ki nam podaja območje okrog vrednosti \bar{x} , kjer lahko z neko verjetnostjo pričakujemo vrednost μ :

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$$

t je statistični Studentov faktor (angl. *Student factor*), ki je odvisen od števila meritev (N) in stopnje verjetnosti (P), s katero naj bi se vrednost μ nahajala v tem intervalu.

Tabela 2.2: Vrednosti Studentovega faktorja t .

$N-1$	1	2	3	5	7	9	10	20	∞
$P = 90\%$	6,31	2,92	2,35	2,02	1,90	1,83	1,81	1,72	1,64
$P = 95\%$	12,71	4,30	3,18	2,57	2,36	2,29	2,23	2,09	1,96
$P = 99\%$	63,66	9,92	5,84	4,03	3,50	3,25	3,17	2,84	2,58

V zvezi z naključnimi napakami je tudi pojem *natančnost* (tudi: *preciznost*; angl. *precision*), ki pomeni ujemanje ali ponovljivost rezultatov neodvisnih meritev.

Sistematske napake povzročajo previsok ali prenizek rezultat analize glede na pravo vrednost, ponavadi zaradi napake v sami metodi (npr. napačen izbor barvnega indikatorja pri titraciji). Govorimo o *pravilnosti* (angl. *trueness*) rezultata, odstopanje od prave vrednosti izrazimo z *absolutno napako*, E_a (angl. *absolute error*), ali z *relativno napako*, E_r (angl. *relative error*), ki imata pozitiven ali negativen predznak:

$$E_a = \bar{x} - T \quad , \quad E_r = E_a / T \quad (\times 100\%) \quad T \dots \text{prava vrednost}$$

Pravilnost analizne metode določamo ponavadi z analizo standardnih ali certificiranih referenčnih materialov (angl. *certified reference material*, CRM).

Točnost rezultata (angl. *accuracy*) je ujemanje dobljenega rezultata s pravo vrednostjo; točen rezultat je hkrati pravilen in natančen.

Zapis rezultata:

Rezultat podajamo s povprečno vrednostjo meritev in standardnim odmikom tako, da je zadnja številka tista, na kateri se pričinja nenatančnost meritve, ki je določena s standardnim odmikom (s).

Kolikšen standardni odmik dopuščamo pri rezultatu, je odvisno od vsebnosti analita v vzorcu. Če v vzorcu prevladuje analit (10–100 %), dopuščamo $s_r \cong 0,1$ %, v koncentracijskem območju ppb–ppm (10^{-9} – 10^{-6}) pa že $s_r \cong 20$ %, pri še nižjih koncentracijah celo do 100 %.

2.2 Vrednotenje analiznih metod

Pri uvedbi in vrednotenju analiznih metod za merjenje vsebnosti nekega analita v vzorcu je potrebno opredeliti precej parametrov – tu bomo našli le najvažnejše.

Naj najprej opredelimo bistvene razlike med klasičnimi (gravimetrija, volumetrija) in inštrumentalnimi metodami analize kemije. Prve so *absolutne*, kar pomeni, da merimo neko količino, ki jo direktno (računsko) prevedemo v vsebnost analita v vzorcu, ponavadi s pomočjo točno definirane stehiometrične razmerja. Primera: pri gravimetriji tehtamo maso oborine, pri volumetriji odčitamo volumen titrirnega reagenta.

Za razliko od klasičnih analiznih metod so inštrumentalne metode z redkimi izjemami *relativne*, torej je merjeni odziv inštrumenta v neki relativni, ne vnaprej poznani zvezi z vsebnostjo analita. Kaj torej opažamo pri merjenju z inštrumenti:

Signal (S) je neposreden merljiv odgovor oziroma odziv inštrumenta na analit v vzorcu.

Šum (angl. *noise*, N) je nezaželen del odgovora inštrumenta, ki pa je prisoten pri vsaki meritvi. Zmanjšuje natančnost in pravilnost meritve ter neposredno določa najmanjšo količino analita, ki jo lahko zaznamo. Poznamo kemijski in inštrumentalni šum.

Zvezo med signalom inštrumenta in vsebnostjo analita moramo določiti pred merjenjem vsebnosti analita v vzorcu, kar storimo z *umerjanjem* ali *kalibracijo* inštrumenta. Poznamo več načinov umerjanja:

Metoda umeritvene krivulje je eksperimentalno dobljena zveza med signalom in vsebnostjo analita. Zaželeno je, da je ta zveza linearna. Dobimo jo tako, da pripravimo

več standardov s točno znano koncentracijo analita. Ti *standardni vzorci* so lahko sintetski, torej iz čistih kemikalij. Običajno jih pripravimo sami, vsebnost analita nam je točno znana. Drugi tip standardnih vzorcev so t. i. *standardni (certificirani) referenčni vzorci*, ki jih pripravljajo nekatere ustanove in so v bistvu realni vzorci (okoljski, biološki) z znano vsebnostjo analita, določeno z več neodvisnimi analiznimi metodami. Pripravljene standardne vzorce uvedemo v inštrument in si zabeležimo odgovor inštrumenta. Običajno od dobljenega signala za standardne vzorce odštejemo signal, dobljen za *slepi vzorec*, ki naj bi vseboval vse sestavine vzorca, razen analita. Zvezo med odgovorom inštrumenta in vsebnostjo analita imenujemo *umeritvena krivulja* oz. *premica* (angl. *calibration curve*); izračunamo jo z *metodo najmanjših kvadratov* ali določimo grafično.

Računske zveze za izračun umeritvene premice po metodi najmanjših kvadratov:

$$y = a + b \cdot x$$

$$b = \frac{\sum_i (x_i y_i) - \bar{x} \sum_i y_i}{\sum_i x_i^2 - \bar{x} \sum_i x_i}$$

ysignal inštrumenta

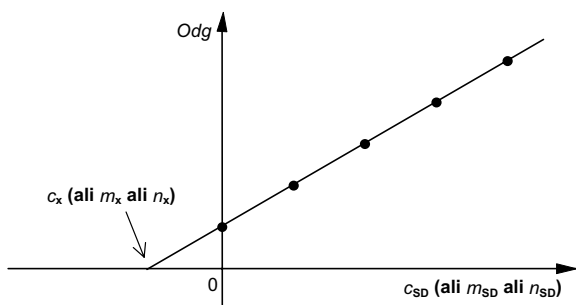
xkoncentracija analita

aodsek na ordinati

bsmerni koeficient (naklon)

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

Metoda standardnih dodatkov. Na rezultat analize lahko vplivajo tudi druge sestavine vzorca – matrica (angl. *matrix*). Da bi te vplive minimizirali, določamo vsebnost analita tako, da v vzorec dodajamo znano količino analita (*standardni dodatek* – enega ali več) in merimo odgovor inštrumenta (slika 2.1).



Slika 2.1: Odvisnost odgovora inštrumenta od koncentracije (ali mase ali množine) analita v standardnih dodatkih vzorcu. Prikazana je določitev vsebnosti analita v vzorcu z ekstrapolacijo premice na absciso.

Če je zveza med signalom inštrumenta in vsebnostjo analita v standardnih dodatkih linearna, lahko njegovo vsebnost v vzorcu določimo grafično z ekstrapolacijo dobljene premice na absciso (glejte sliko 2.1). Ta premica seka ordinatno os v točki, ki pomeni odgovor za analit v vzorcu brez standardnega dodatka.

Drugi način je računski:

– Če smo meritev opravili na vzorcu s samo enim standardnim dodatkom, izenačimo razmerje odgovorov inštrumenta za vzorec (x) in za vzorec s standardnim dodatkom (SD) z razmerjem koncentracij (ali mas ali množin) analita v obeh primerih.

$$\frac{Odg_x}{Odg_{SD}} = \frac{c_x}{c_{SD}} = \frac{m_x}{m_{SD}} = \frac{n_x}{n_{SD}}$$

– Če smo meritev opravili na vzorcu z več standardnimi dodatki (slika 2.1), po metodi najmanjših kvadratov izračunamo enačbo premice za odvisnost odgovora inštrumenta od vsebnosti analita v standardnih dodatkih vzorcu. Vsebnost analita nato izračunamo kot kvocient odseka in smernega koeficienta:

$$Odg = a + b \cdot c_{SD} \text{ (ali } m_{SD} \text{ ali } n_{SD}), \quad c_x \text{ (ali } m_x \text{ ali } n_x) = \frac{a}{b}$$

Metoda z internim standardom. Interni standard je snov, ki jo damo v vzorec, standarde za umeritveno krivuljo in slepi vzorec v enaki količini. Pri merjenju si zapisujemo tako signal za analit kot signal za interni standard, nato pa določimo zvezo med razmerjem odgovorov inštrumenta za analit in za interni standard ter vsebnostjo analita. Pravilno izbran interni standard kompenzira tako naključne kot sistematične napake, a paziti je treba, da ni že pred dodatkom prisoten v vzorcu kot njegova sestavina. Druga možnost je, da za interni standard izberemo neko komponento vzorca, ki je prisotna v dovolj visoki koncentraciji, da jo lahko vzamemo kot stalno v vseh primerih.

Pri naštetih načinih umerjenja inštrumenta torej dobimo neko računsko oz. grafično zvezo med signalom inštrumenta in vsebnostjo analita. Ujemanje izračunane zveze z dejanskimi meritvami nam podaja *korelacijski koeficient* (r) z vrednostmi 0–1 brez enote. Ujemanje je tem boljše, kolikor bliže enici je vrednost r .

$$r = \frac{N \sum_i x_i y_i - \sum_i x_i \sum_i y_i}{\sqrt{\left(N \sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i \right)^2 \right)} \sqrt{\left(N \sum_i y_i^2 - \left(\sum_i y_i \right)^2 \right)}}$$

Še nekaj pojmov:

Meja zaznavnosti (angl. *limit of detection, LOD*) je običajno opredeljena kot tista količina analita, ki jo še lahko izmerimo z neko statistično gotovostjo. V običajni rabi je to količina, ki pri meritvi daje trikrat večji signal od šuma ($S/N = 3$). *Meja določanja* (angl. *limit of determination* ali *limit of quantitation, LOQ*) pa je definirana kot najnižja količina analita, ki jo lahko določimo s sprejemljivo natančnostjo in točnostjo. Običajno jo postavimo kot desetkratno vrednost šuma ($S/N = 10$).

Linearno območje (angl. *linear range*) metode je tisto območje vsebnosti analita, kjer je merjeni signal linearno odvisen od te vsebnosti. Širši pojem je *dinamično območje metode* – bistvena je jasno opredeljena, a ne nujno linearna zveza med merjenim signalom in količino analita. Spodnja meja tega območja je meja določanja.

Občutljivost metode (angl. *sensitivity*) je zmožnost ločevanja med majhnimi razlikami v vsebnosti analita. Odvisna je od natančnosti meritev in smernega koeficienta umeritvene premice.

Ločljivost inštrumenta (angl. *discrimination*) je zmožnost le-tega, da s spremembo signala odgovori na majhne razlike v vsebnosti analita. Predvsem je odvisna od karakteristik inštrumenta.

3 VZORČENJE IN PREDPRIPRAVA VZORCA

Kot smo omenili že v uvodu, bodo v tem poglavju zajeti vsi postopki, ki so za dejansko analizo sicer zelo pomembni, pri laboratorijskih vajah pa jih običajno ne spoznate, saj so dokaj zamudni: vzorčenje, priprava laboratorijskega vzorca, določitev paralelk vzorca, priprava raztopine vzorca.

3.1 Vzorcevanje

Da bi bil končni rezultat analize sploh smiseln, mora biti vzorec, ki ga analiziramo, *represntativen* za glavnino tistega, kar predstavlja. Ta cilj je razmeroma enostavno doseči, če gre za neko homogeno snov (npr. dobro premešana cisterna mleka), težje je pri nehomogenih snoveh (npr. jajca, ribe). Napak, ki jih zagrešimo pri vzorcevanju, še tako natančna in pravilno izvedena analiza ne more odpraviti.

Vzorcevanje poteka v treh korakih:

- identifikacija snovi (v rabi je tudi izraz *populacija*), iz katere naj bi vzeli vzorec;
- odvzem reprezentativnega vzorca na debelo iz te populacije – ta naj bi bil po kemijski sestavi in porazdelitvi velikosti delcev enak originalni populaciji: za homogene raztopine, tekočine in pline je lahko relativno majhen, pri razsutih trdnih snoveh ali kosovnih materialih pa naj bo večji in naj zajema material vseh velikosti;
- zmanjšanje vzorca na debelo na manjši, homogeni *laboratorijski vzorec*.

3.2 Priprava laboratorijskega vzorca

Ta postopek lahko štejemo še med vzorcevanje kot njegov tretji korak. Potreben je zlasti pri razsutih in kosovnih materialih. V pripravo štejemo mečkanje/trenje, mletje, sejanje, mešanje in delitev homogeniziranega vzorca na manjše podvzorce. Tudi pri tem postopku so možne mnoge napake, do katerih pride zaradi segrevanja materiala med mletjem, izgube ali adsorpcije vlage, izgube nekaterih materialov v obliki prahu ipd. V tej fazi običajno vzorec posušimo in mu hkrati določimo vsebnost vlage.

V vzorcu je lahko prisotna kemijsko vezana (esencialna) voda – sem štejemo predvsem vodo v kristalohidratih. Vsebnost vlage (neesencialna voda) v vzorcu je v ravnotežju z zračno vlago, zato se s časom spreminja. Tej variabilnosti se izognemo na dva načina:

- vzorec posušimo tik pred tehtanjem;
- vzorcu določimo vsebnost vode tik pred analizo.

Koliko vode bo vzorec izgubil med sušenjem, je odvisno od temperature in časa sušenja. Običajno segrevamo vzorec na 100–110 °C in ga sušimo do konstantne

mase. Iz razlike mas pred sušenjem in po njem določimo vsebnost vlage (v %), pri podajanju vedno specificiramo, pri kateri temperaturi je bil vzorec sušen. Do večjih napak pri tem postopku lahko pride, če vzorec pri povišani temperaturi razpada in pri tem nastajajo plinasti produkti.

3.3 Določitev paralelk vzorca

Z analizo več paralelk nekega vzorca zagotovimo večjo zanesljivost določitve analita. Posamične paralelke homogenega laboratorijskega vzorca določimo s tehtanjem ali odmerjanjem volumna, pri tem pa moramo paziti na izvore napak: neprimerna temperatura vzorca, zelo higroskopni ali zelo vlažni vzorec, neprimerna uporaba naprav za tehtanje in odmerjanje volumna ipd.

3.4 Priprava raztopine vzorca

Večino analiz izvajamo na raztopinah. Če je izhodiščni vzorec tekočina, ga je morda treba le razredčiti s primernim topilom. Za trdni vzorec poiščemo topilo, ki ga hitro in pod milimi pogoji povsem raztopi. Za pomoč pri raztapljanju uporabimo mešanje, segrevanje na vodni kopeli, ultrazvočno kopel ipd.

Kjer preprosto raztapljanje ni mogoče, bodisi *razklopimo* vzorec ali pa na nek način selektivno izvlečemo želene analite iz vzorca. Slednje se uporablja predvsem za organske spojine, ki bi med razklopom razpadle. O teh postopkih bo več govora v naslednjem poglavju.

Razklop vzorca imenujemo agresivne postopke, ki jih uporabimo, da sicer netopen vzorec prevedemo v raztopino. Pri tem se večji del vzorca kemijsko spremeni: se oksidira, se reducira ali pa se upari. Bistveno je, da analit ostane v raztopini. Čeprav je bil morda analit pred razklopom v vzorcu prisoten v več zvrsteh (oksidacijskih stanjih, vezan na druge spojine in podobno), se med razklopom običajno pretvori v eno samo zvrst. Če torej vzorec pred analizo razklopimo, lahko določimo le skupno vsebnost analita v njem, ne pa tudi deleža posameznih zvrsti, v katerih se je nahajal v izhodiščnem vzorcu.

Zaradi agresivnih kemikalij in segrevanja je razklop za analitika potencialno najnevarnejši del določitve nekega analita. Oglejmo si nekaj postopkov:

Mokri razklop poteka z anorganskimi kisljinami (HCl, HNO₃, H₂SO₄, HClO₄), včasih z alkalijami. Redko se uporablja fluorovodikova kislina, predvsem za raztapljanje silikatov. Kisline se uporabljajo same ali v mešanicah (npr. zlatotopka), za hitrejšo oksidacijo vzorca dodajamo še H₂O₂ ali Br₂. Vedno je potrebno tudi segrevanje – zlasti pazljivi moramo biti pri uporabi klorove(VII) kisline, ki je eksplozivna. Namesto s segrevanjem lahko razklop izvajamo v zaprtih posodah pri visokem tlaku ali s pomočjo mikrovalov.

Razklop v talini je rezerviran za najbolj trdovratne vzorce. Talino dobimo s segrevanjem soli alkalij do zelo visokih temperatur (300–1000 °C).

Sežig ali pirolizo vzorca v prisotnosti kisika uporabljamo za določitev skupne vsebnosti žvepla, dušika, ogljika, vodika, halogenov pretežno v organskih snoveh. Kisik določamo z metodo pirolize nad ogljem. Navedene elemente s sežigom prevedemo v plinaste produkte, ki jih nato analiziramo.

4 PRIPRAVA VZORCA IN ODSTRANJEVANJE INTERFERENC

Del priprave vzorca za analizo je opisan že v prejšnjem poglavju – razklop, s katerim iz trdnega vzorca dobimo bistro raztopino. Ta postopek kajpada ni primeren za organske spojine, saj se med razklopom *mineralizirajo* – pretvorijo v H_2O , CO_2 , NH_3 ali NO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} itd. Zlasti kadar želimo v vzorcu določati nespremenjene organske spojine, uporabljamo postopke, s katerimi iz vzorca izvlečemo želeni analit ali pa iz vzorca odstranimo snovi, ki bi motile njegovo določitev. Najbolj pogosto se v ta namen uporabljajo obarjanje, destilacija in ekstrakcija.

4.1 Obarjanje motečih komponent vzorca

Ta pristop se precej uporablja pri separaciji anorganskih zvrsti, v okviru analizne kemije živil pa je verjetno najpomembnejše obarjanje beljakovin. Slednje lahko oborimo z znižanjem ali zvišanjem pH vrednosti raztopine (s kislinami ali bazami), z dodajanjem anorganskih soli, kar poveča ionsko jakost raztopine (t. i. *izsoljevanje*), z dodajanjem organskih topil, ki se mešajo z vodo (*i*-propanol, aceton, acetonitril). V vseh teh primerih dosežemo, da beljakovine koagulirajo in se sesedejo na dno posode. Zatem jih lahko odstranimo s centrifugiranjem ali s filtracijo. Vir napak pri tem postopku je lahko soobarjanje analitov (okluzija v oborjene beljakovine) ali reakcija analita z obarjalnim reagentom, zato moramo biti pazljivi pri njegovem izboru.

4.2 Destilacija

Destilacija kot metoda priprave vzorca je primerna, če je analit dovolj hlapna in termično stabilna spojina, medtem ko so moteče komponente vzorca manj hlapne ali pa nehlapne. V nekaterih postopkih pa analite stehiometrično pretvorimo v hlapne spojine, ki jih nato oddestiliramo. Najbolj preprosta aparaturna za destilacijo je sestavljena iz grelca, destilacijske bučke, hladilnika s plaščem, skozi katerega teče hladna vodovodna voda, in erlenmajerice, v katero lovimo destilat. V destilacijsko bučko damo vzorec in ustrezne reagentne ter jo segrevamo na primerni temperaturi toliko časa, da ves analit odhlapi. Uparjeni analit v hladilniku destilacijske naprave kondenzira, nato ga “lovimo” v primerno topilo – po navadi je to raztopina spojine, ki z analitom tvori nehlapne produkte. Glavne napake pri destilaciji so posledica izgube hlapnega analita zaradi slabega tesnenja aparature ali površno izvedenih postopkov.

4.3 Ekstrakcija

Osnova ekstrakcije je porazdeljevanje analita med dve fazi – prva je vzorec, druga pa je lahko topilo, ki se z vzorcem ne meša, ali trdna snov, ki adsorbira analit. Glede na to drugo fazo ločimo več tipov ekstrakcije, najpomembnejše so: ekstrakcija s topili, ekstrakcija na trdno fazo, mikroekstrakcija na trdno fazo. Učinkovitost ekstrakcije

opredelimo z *izkoristkom* (angl. *recovery*, simbol η), ki pove, kolikšen delež analita se je dejansko ekstrahiralo iz vzorca: vrednosti so torej 0–1 oz. 0–100 %.

Ekstrakcija s topili (angl. *solvent extraction* ali *liquid-liquid extraction*, *LLE*) je najstarejša in najbolj znana vrsta ekstrakcije. Topilo izberemo tako, da se slabo ali sploh ne meša z vzorcem. Če je torej vzorec trdna snov, se v topilu ne sme raztapljati; če je tekočina, se topilo z njo ne sme mešati. V analitiki živil imamo opravka pretežno z “vodnimi” vzorci, zato ekstrahiramo z nepolarnimi organskimi topili: heksanom, cikloheksanom, etilacetatom ipd. Kloriranim topilom, ki so sicer zelo učinkovita, se izogibamo zaradi njihovega kvarnega učinka na okolje. Za trdne vzorce se precej uporabljata še aceton in metanol, ki se mešata z vodo. Vsa naštetá topila so manj polarna od vode in so primerna za ekstrakcijo malo polarnih ali nepolarnih analitov, medtem ko se za polarne analite uporabljajo vodne raztopine. Učinkovitost ekstrakcije še povečamo, če zmanjšamo topnost analitov v vzorcu, npr. s spremembo pH ali z dodatkom nevtrálnih soli (izsoljevanje). Ekstrakcijo s topili izvajamo v posebnih zaprtih posodah (npr. *lij ločnik*), za trdne vzorce pa se uporablja t. i. *Soxhletov aparat*. Pričakovani izkoristki ekstrakcije so 80–100 %.

Ekstrakcija na trdno fazo (angl. *solid-phase extraction*, *SPE*) je primerna samo za tekoče vzorce. Trdne faze so sorbenti različnih polarnosti, bodisi v obliki drobnih zrn, polnjenih v kolonice – *ekstrakcijske kolonice*, bodisi nanešeni na membrane – *ekstrakcijski diski*. Pred uporabo je treba te sorbente ustrezno pripraviti (*kondicioniranje*), nato skoznje potisnemo ali prečrpamo vzorec in analit ostane selektivno vezan na sorbent. Slednjega lahko še spiramo, da odstranimo morebitne nečistote, nato pa speremo z njega še analit z uporabo primerne topila (*eluent*). Ta postopek imenujemo *elucija*, topilo z analitom po spiranju pa *eluat*. Učinkovitost ekstrakcije povečamo na enak način kot pri ekstrakciji s topili. Pričakovani izkoristki ekstrakcije so 80–100 %.

Mikroekstrakcija na trdno fazo (angl. *solid-phase microextraction*, *SPME*) je primerna za tekoče in trdne vzorce. Trdne faze so različnih polarnosti, nanešene so na kratko vlakno (≈ 1 cm), pritrjeno na kovinsko iglo. Vlakno spustimo v vzorec ali v plinsko fazo nad njim in počakamo ustrezen čas, da se analit veže nanj. Analit nato desorbiramo s segrevanjem ali spiranjem vlakna s topili. Učinkovitost ekstrakcije povečamo na enak način kot pri drugih ekstrakcijskih postopkih, poleg tega pa še z mešanjem vzorca in s segrevanjem, če ekstrahiramo iz plinske faze nad vzorcem. Za razliko od drugih dveh postopkov ekstrakcije pa so pri SPME izkoristki zelo majhni, običajno manj kot 10 %, zato lahko tudi večkrat ekstrahiramo isti vzorec.

5 OSNOVE ANALIZNIH METOD

Kot smo že večkrat omenili, analizne metode delimo na klasične in inštrumentalne. Od klasičnih bomo spoznali gravimetrijo in volumetrijo, od inštrumentalnih pa nekatere spektroskopske in kromatografske metode, čeprav obstaja še mnogo drugih. Medtem ko klasične metode uporabljamo za analizo glavnih sestavin nekega vzorca, so inštrumentalne primerne predvsem za analite, ki so v vzorcu prisotni v majhnih količinah ali celo v sledovih.

5.1 Gravimetrija

Gravimetrija ali *gravimetrična analiza* je osnovana na ločevanju analita od preostalega vzorca in tehtanju bodisi analita bodisi spojine, ki je po neki reakciji nastala iz analita, ali celo preostalega vzorca (slednji primer je določitev vlage v vzorcu, str. 15-16). Najpogosteje se uporablja *obarjanje* analita iz raztopine vzorca z ustreznim reagentom, pri tem nastane slabo topna *oborina*, ki jo s filtracijo ločimo od preostale raztopine, sušimo v laboratorijskem sušilniku ali žgemo v pečici, nato pa ohlajeno oborino stehamo. Izberemo tak obarjalni reagent, da obarjanje poteče kvantitativno in da je stehiometrično razmerje med analitom in spojino, ki jo na koncu tehtamo, dobro poznano. Pri gravimetričnih postopkih se vselej natančno držimo navodil, saj sicer lahko pride do mnogih napak, kot so nepopolno obarjanje analita, predrobna oborina, ki uhaja skozi filtrirno sredstvo, soobarjanje drugih komponent vzorca ipd. Omenimo še pojem *homogenega obarjanja*, kjer obarjalni reagent nastaja v raztopini, s čimer se izognemo mnogim napakam gravimetrije.

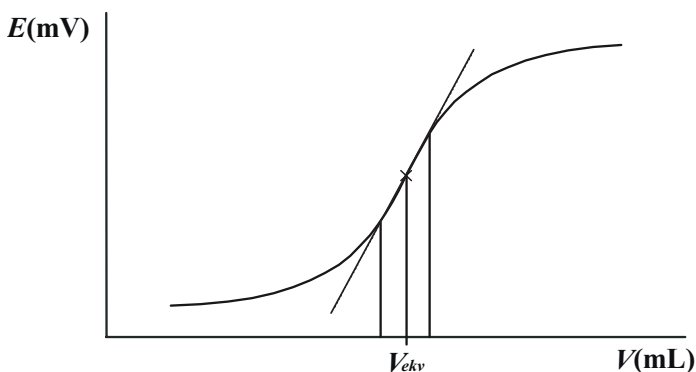
5.2 Volumetrija

Volumetrijo imenujemo tudi *volumetrična oz. titrimetrična analiza*. Raztopini vzorca dodajamo titrirni reagent, ki stehiometrično reagira z analitom. Običajno merimo volumen raztopine reagenta s točno poznano koncentracijo, ki ga porabimo, da dosežemo *ekvivalentno točko* titracije, to je točka, v kateri je zreagirala ves analit. Ekvivalentna točka je sicer teoretični pojem, v praksi določamo *končno točko* titracije, ki pa naj bi sovpadala z ekvivalentno. Končno točko najpogosteje določimo z *barvnimi indikatorji* ali *potenciometrično*. Delovanje prvih temelji na spremembi barve v končni točki; zakaj pride do nje, bomo podrobneje opisali pri posameznih tipih titracij.

Pri potenciometrični detekciji z milivoltmetrom v titrirani raztopini merimo *razliko potencialov* (razliko v napetosti) med *indikatorsko* in *referenčno elektrodo*. Referenčni elektrodi se potencial med titracijo ne spreminja, indikatorski pa se glede na koncentracijo analita ali titrirnega reagenta potencial spreminja. V praksi taka titracija poteka tako, da v raztopino vzorca potopimo obe elektrodi, povezani preko milivoltmetra. Po vsakem dodatku titrirnega reagenta odčitamo potencialno razliko med elektrodama, ki jo kaže milivoltmeter. Končno točko titracije določimo naknadno iz *titracijske krivulje*, to je odvisnost potencialne razlike od volumna titrirnega reagenta (primer je na sliki 5.1). Titracijska krivulja je lahko obrnjena tudi obratno

kot na sliki (začetek pri višjem potencialu in konec pri nižjem). Kako določimo ekvivalentni volumen iz najbolj strmega dela krivulje, je prikazano na isti sliki, še bolj natančno pa to lahko storimo, če narišemo njen prvi diskretni odvod (odvisnost $\Delta E/\Delta V$ od V) ali drugi diskretni odvod – odvisnost $\Delta(\Delta E/\Delta V)/\Delta V$ od V . Ekvivalentni volumen določimo iz maksimuma ali minimuma krivulje prvega odvoda oziroma iz presečišča krivulje drugega odvoda z absciso.

Glede na vrsto reakcije, ki poteka med analitom in titrirnim reagentom, ločimo več skupin titracij: nevtralizacijske, oksidacijsko-redukcijske (redoks), kompleksometrične in obarjalne.



Slika 5.1: Titracijska krivulja pri potenciometrični detekciji – odvisnost potenciala med elektrodama od volumna titrirnega reagenta. Prikazana je določitev ekvivalentnega volumna reagenta.

Pri *nevtralizacijskih titracijah* gre za reakcijo med oksonijevimi in hidroksidnimi ioni, kar vodi do nastanka vode. Kisle vzorce titriramo z raztopinami baz in obratno. Končno točko titracije določimo potenciometrično z merjenjem pH raztopine (torej potenciala steklene elektrode) ali z barvnimi indikatorji – to so šibke kisline ali baze, katerih disociirana in nedisociirana oblika sta različno obarvani. Barvo spremenijo (*barvni preskok*) v ozkem območju pH. Najpogosteje se uporabljata metiloranž (pH ob spremembi barve 3,1–4,4) in fenolftalein (pH ob spremembi barve 8,0–9,8).

Oksidacijsko-redukcijske (redoks) titracije temeljijo na oksidaciji ali redukciji analita s titrirnim reagentom. Najbolj uporabljeni reagenti so kalijev manganat(VII) (KMnO_4 , oksidant) in jodid (I^- , reducent). Pri slednjem nastaja elementarni jod, ki ga določimo s titracijo z natrijevim tiosulfatom, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Barvni indikator pri tem je vodna raztopina škroba (škrobovica), ki z elementarnim jodom tvori moder kompleks. Pri titracijah s KMnO_4 pa je indikator kar sam titrirni reagent, ki je vijoličasto obarvan. Seveda pa je primerna tudi potenciometrična detekcija.

Pri *kompleksometričnih titracijah* gre za tvorbo koordinacijske spojine ali kompleksa med analitom (pretežno kovinskimi kationi) in titrirnim reagentom. V ta namen se najpogosteje uporablja etilendiaminotetraocetna kislina (EDTA) oz. njena natrijeva sol, ki ne glede na naboj kationa vedno tvori z njim koordinacijsko spojino v razmerju 1 : 1. Nastali kompleksi so zelo stabilni, selektivnost pa največkrat dosežemo z uravnavanjem pH vrednosti raztopine. Barvni indikatorji so organske spojine, ki tudi tvorijo komplekse z določevanimi kationi, a so le-ti manj stabilni kot kompleksi z EDTA. Prosti indikator in kompleks s kationi sta različno obarvana. Najbolj znana indikatorja sta eriochrom črno T ter mureksid. Potenciometrične detekcije pri teh titracijah ne uporabljamo.

Pri *obarjalnih titracijah* analit oborimo s titrirnim reagentom. Končno točko določimo potenciometrično ali z barvnimi indikatorji, ki se bodisi obarjajo s titrirnim reagentom, ko je ves analit porabljen (primer: K_2CrO_4 pri titracijah Cl^- z $AgNO_3$), bodisi se adsorbirajo na oborino (primer: eozin, fluorescein) in pri tem opazimo spremembo barve.

Ni odveč omeniti, da se pri titracijah na široko uporabljata dva pristopa:

- *neposredna titracija*, kjer v raztopino analita neposredno dodajamo titrorni reagent;
- *posredna (povratna) titracija*, kjer raztopini analita dodamo presežek reagenta, tega pa nato povratno titriramo in ugotavljamo, kolikšen del je zreagiriral z analitom.

5.3 Spektroskopske metode

Spektroskopske metode so tiste, pri katerih na različne načine izkoriščamo interakcijo med svetlobo ter atomi ali molekulami. Pri svetlobi govorimo o njeni dvojni naravi: *korpuskularna narava* – svetloba kot snop delcev energije (fotonov) ter *valovna narava* – svetloba kot elektromagnetno valovanje. Kot valovanje ima svetloba določeno *valovno dolžino* (λ/nm) in *frekvenco* (ν/s^{-1}), ki sta obratno sorazmerni:

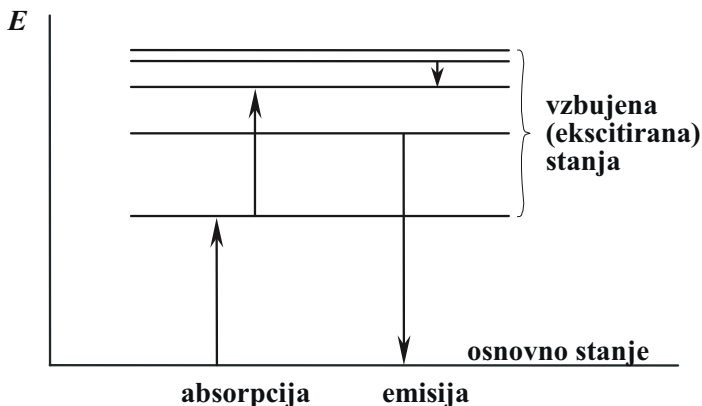
$$c = \nu \cdot \lambda \quad c \dots \text{hitrost svetlobe } (3 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1})$$

Pri večji valovni dolžini je frekvenca manjša, s tem pa je manjša tudi energija svetlobnega kvanta (fotona), kar sledi iz zveze:

$$E = h \cdot \nu \quad h \dots \text{Planckova konstanta } (6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s})$$

Elektroni v atomih ali molekulah imajo različne energetske nivoje: osnovne in vzbujene (slika 5.2). Na vzbujene energetske nivoje lahko pridejo elektroni z absorpcijo energije, ki jo dobijo npr. od fotonov svetlobe (*absorpcija svetlobe*), zaradi

gretja (termično vzbujanje) ipd. Stanje elektronov na višjih energetskih nivojih pa ni stabilno, zato težijo k vrnitvi na osnovnega, pri tem pa morajo višek energije oddati in pogosto se to zgodi z oddajanjem fotonov. Govorimo o *emisiji svetlobe*.



Slika 5.2: Shematska predstavitev absorpcije in emisije svetlobe v atomu.

Glede na območje valovnih dolžin, ki se pri meritvah uporablja, poznamo veliko tipov spektroskopije; omejili se bomo na molekulsko absorpcijsko spektrometrijo (MAS) ter na atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS).

Pri *molekulski absorpcijski spektrometriji (MAS)* merimo prepustnost svetlobe skozi neko raztopino v ultravijoličnem (UV) in vidnem delu spektra svetlobe. Aparat, ki se imenuje spektrofotometer, je sestavljen iz vira svetlobe, monokromatorja za izbiro primerne valovne dolžine, prostora za vzorec (*kiveta*, pretočna celica) in detektorja. Kiveta je steklena posodica znanih dimenzij (širina b v cm), kamor nalijemo vzorec. Pri prehodu svetlobe skozi raztopino se je del absorbira, z detektorjem izmerimo intenziteto prepuščene svetlobe (I). Začetno intenziteto (I_0) ponavadi določimo tako, da merimo prepustnost slepega vzorca in pri tem nastavimo transmitanco na 100 %. *Transmitanca (T)* ali prepustnost je razmerje I/I_0 in ima vrednosti 0–1 oz. 0–100 %. Delež absorbirane svetlobe je torej $1-T$. Za praktično delo je zelo pomemben *Beerov zakon*, ki podaja zvezo med transmitanco oz. *absorbanco (A)*, ki jo običajno odčitavamo pri merjenju, ter koncentracijo analita (c , v mol L^{-1}), velja pa le v razredčenih raztopinah:

$$A = -\log T = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad \varepsilon \dots \text{molarna absorptivnost, enota } \text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

MAS je zelo uporabna metoda za določevanje vsebnosti mnogih anorganskih in organskih molekul ter zvrsti. Če spojina sama po sebi ne absorbira svetlobe, pogosto z

reakcijo derivatizacije tvorimo (običajno) obarvan produkt. Bistveno je, da je nastali produkt stabilen v času, dokler merimo. Seveda je to primerjalna tehnika, zato vedno delamo z metodo umeritvene krivulje ali standardnih dodatkov.

Pri *atomske absorpcijske spektroskopiji (AAS)* merimo intenziteto svetlobe, ki jo prepuščajo atomi elementov v plinastem stanju. Najbolj pogosto se za atomizacijo in uplinjanje analitov (kationov kovin) uporablja plamen, v katerega razpršujemo raztopino vzorca. Bolj učinkovito atomizacijo dosežemo v grafitni celici in z induktivno sklopljeno plazmo. Drugi deli aparature za AAS so žarnica z votlo katodo (vir svetlobe), monokromator, detektor. Osnova merjenja je enaka kot pri MAS: s slepim vzorcem nastavimo T na 100 % (oziroma absorbanco na 0) in merimo absorbanco standardnim raztopinam in vzorcu. Velja Beerov zakon:

$$A = k \cdot c$$

kjer je k konstanta, ki jo določimo iz umeritvene premice.

Atomska absorpcijska spektroskopija se uporablja za določanje večine kovin, če je njihova koncentracija v vzorcu manj kot 10 mg L^{-1} . Metoda daje natančne rezultate ($s_r < 2 \%$).

5.4 Masna spektrometrija

Čeprav po imenu spominja nanje, pa ima ta metoda povsem drugačne osnove kot druge spektroskopije. Pri masni spektrometriji (MS) molekule ali atome analita ioniziramo, torej pozitivno ali negativno nabijemo, nato pa jih ločimo na podlagi razmerja med maso, m , in nabojem, z (m/z). Pri ionizaciji lahko pride tudi do razpada nabitih molekul, nastale dele imenujemo *fragmente*. Vsaka spojina ima značilen vzorec fragmentov (*masni spekter*), na podlagi katerega jo lahko identificiramo. Masna spektrometrija se največ uporablja v povezavi s plinsko ali tekočinsko kromatografijo (GC/MS, LC/MS) kot zelo občutljiv in specifičen detektor.

5.5 Kromatografske metode

Pri kromatografskih metodah posamezne komponente neke mešanice ločimo na podlagi različne porazdelitve le-teh med dve osnovni fazi: *stacionarno* in *mobilno*. Stacionarna faza je v *kromatografski koloni* oz. je nanešena na nosilec v njej, med kromatografskim procesom se ne premika. Mobilna faza je plin ali tekočina, ki se pomika skozi kolono. Poglavitne lastnosti, ki vplivajo na to, kako se bo neka komponenta v mešanici porazdeljevala med obe fazi, so njena polarnost in vsebnost določenih funkcionalnih skupin, pri nekaterih vrstah kromatografije pa še njena hlapnost in velikost molekul. Ločene komponente mešanice zazna detektor, signal z detektorja v odvisnosti od časa analize je *kromatogram*. Posamezne komponente se v njem kažejo kot *kromatografski vrhovi* (angl. *chromatographic peak*), katerih glavni karakteristiki sta *retencijski čas* (t_R) in ploščina vrha. Medtem ko je prvi kvalitativna lastnost za

identifikacijo spojin, je drugi kvantitativna lastnost – sorazmerna količini spojine. V okviru pričujočih vaj boste spoznali plinsko in tekočinsko kromatografijo.

Pri *plinski kromatografiji* (angl. *gas chromatography, GC*) se kot mobilna faza uporablja inertni plin (N_2 , He, H_2), stacionarna faza pa je običajno v tanki plasti (do nekaj μm) nanešena na notranjo steno kapilar iz staljenega kremenčevega (kvarčnega) stekla. Stacionarne faze se razlikujejo po polarnosti, mobilna faza – plin pa samo prenaša komponente mešanice naprej po koloni. Spojine se absorbirajo na stacionarno fazo zaradi topnosti v njej, desorbirajo pa se zaradi svoje hlapnosti, kajti kolono razen pri najbolj hlapnih analitih grejemo. Delamo lahko ves čas pri isti temperaturi – *izotermno* ali pa se temperatura pečiče, v kateri je kolona, med analizo zvišuje – *temperaturno programiranje*, kar je bolj primerno za mešanice spojin z različno hlapnostjo. Ker delamo pri temperaturah do $350\text{ }^\circ C$, je metoda primerna le za hlapne in termično stabilne snovi. Glavni deli plinskega kromatografa so jeklenka z nosilnim plinom, injektor za vzorec, termostatisirana pečica s kromatografsko kolono, detektor.

Pri *tekočinski kromatografiji* (angl. *liquid chromatography, LC, HPLC*) se kot mobilna faza uporablja tekočina, stacionarna faza je nanešena ali kemično vezana na delce polnila (premer 3–20 μm) v kovinskih kolonah. Osnova stacionarnih faz je najpogosteje silikagel (t. i. “normalna faza”), ki je lahko kemično modificiran, da postane bolj nepolaren (t. i. “reverzna faza”, *RP*); pri “normalni fazi” uporabljamo kot mobilno fazo mešanico organskih topil, pri “reverzni fazi” pa mešanico deionizirane vode ali pufrnih raztopin s topili, ki se z vodo mešajo (npr. metanol, acetonitril). Mobilna faza ima lahko ves čas analize enako sestavo – *izokratska elucija*, lahko pa jo med analizo spreminjamo – *gradientna elucija*, kar je zlasti primerno za mešanice spojin z različno polarnostjo. Tekočinska kromatografija je primerna za analizo večine spojin, tudi za termično nestabilne in nehlapne. Glavni deli tekočinskega kromatografa: rezervoar za mobilno fazo, črpalka za črpanje mobilne faze skozi kolono, injektor za vzorec, kromatografska kolona, detektor.

6 NAVODILA ZA IZVAJANJE VAJ

Praktične vaje boste izvajali na različnih vzorcih živil, pri čemer boste spoznali skoraj vse faze priprave vzorca, analize in obdelave podatkov z izjemo vzorčenja. Večina navodil za vaje pred vami je prirejena po standardnih metodah, ki se uporabljajo v živilskih laboratorijih. Sestavljene so tako, da boste med izvajanjem praktično spoznali vse postopke, ki so opisani v prejšnjih poglavjih, hkrati pa boste z njimi določevali vse komponente živil:

- beljakovine (vaja 6.2)
- ogljikove hidrate (vaja 6.1)
- lipide (vaja 6.7)
- alkohole (vaja 6.6)
- snovi, ki vplivajo na okus in vonj živil (vaji 6.9 in 6.12)
- vitamine (vaja 6.12)
- minerale (vaji 6.4 in 6.8)
- konzervanse (vaji 6.3 in 6.5)
- neželene snovi – onesnaževalce (vaji 6.10 in 6.11).

Pri posamičnih navodilih so najprej na kratko razložene osnove postopka in, kjer je potrebno, napisane tudi reakcije, ki potečejo med določitvijo. Sledi specifikacija vaše naloge pri vaji, reagenti in inštrumentacija, potrebni za izvedbo, posamični postopki pri določitvi, končno pa še prostor za vaše meritve in zahteva, kaj morate podati kot rezultat določitve.

Še nekaj besed o izrazih, ki se nanašajo na reagente. Raztopine reagentov so pretežno pripravljene iz trdnih kemikalij *p.a.* čistote (za analizo), raztopljenih v prečiščeni vodi, razen kjer je topilo posebej navedeno. Izraz prečiščena voda se nanaša na dvakrat deionizirano vodo (z ionskimi izmenjevalci). Za določitev zelo nizkih vsebnosti analitov uporabljamo reagente večje čistote: kromatografsko čista organska topila, dodatno prečiščeno vodo (poseben sistem deionizacije, t. i. "Milli Q" voda).

Vsebnost reagentov v pripravljenih raztopinah je povečini podana kot množinska koncentracija (v mol L⁻¹), masna koncentracija (v g L⁻¹) ali utežni delež (v %). Vsebnost reagenta v raztopini je točno poznana le pri standardnih raztopinah, pripravljenih iz primarnih standardov. Pri drugih raztopinah vemo le približno vsebnost, vendar jo lahko s postopkom standardizacije natančneje določimo – to so t. i. standardizirane raztopine.

Opozorilo:

Pri vajah boste delali z agresivnimi kemikalijami in z odprtim plamenom – obvezna je zaščitna oprema: halja, zaščitna očala, zaščitne (lateks) rokavice, nastavek za pipetiranje, krpa iz blaga!

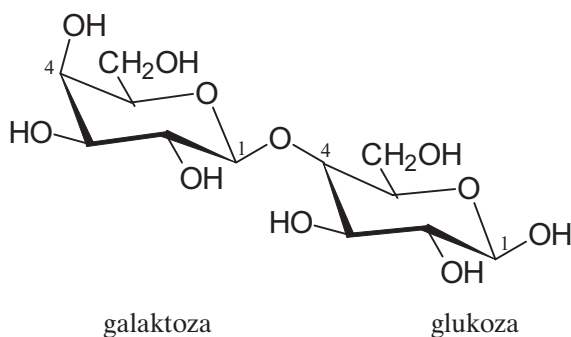
6.1 Določitev laktoze v mleku z gravimetrično metodo

Osnove:

Laktoza ali mlečni sladkor je sestavina mleka. Kravje mleko vsebuje 4–5 % laktoze, kozje nekoliko manj (do 4 %), človeško mleko pa 5,5–7,5 %. Pri kisanju mleka nastaja iz mlečnega sladkorja pod vplivom bakterij mlečna kislina.

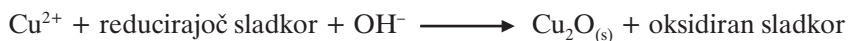
Z laktozo je povezana ena najpogostejših presnovnih motenj, to je hipolaktazija ali intoleranca na laktozo. Bolezen nastane zaradi zmanjšane aktivnosti ali celo pomanjkanja encima laktaze; ta cepi laktozo do glukoze in galaktoze, ki ju telo lahko presnavlja.

Laktoza je disaharid, ki nastane iz β -D-galaktoze in β -D-glukoze po odcepu vode.



Strukturna formula laktoze.

Zaradi proste glikozidne hidroksilne skupine na glukoznem delu (atom C_1 glukoze) je laktoza reducirajoč sladkor. To njeno lastnost izkoristimo pri določitvi vsebnosti laktoze z redukcijo bakrovih ionov (Cu^{2+}), kjer gravimetrično določamo nastali Cu_2O .



Zmožnost za redukcijo bakrovih ionov je pri različnih sladkorjih različna.

Naloga:

- S pomočjo umeritvene krivulje za laktozo v koncentracijskem območju od 30 g L^{-1} do 60 g L^{-1} določite stopnjo redukcije za laktozo (molsko razmerje med Cu_2O in laktozo).
- Določite masni delež (v %) laktoze v mleku in v tekočem kislem mleku.

Reagenti:*i*-propanolRaztopina CuSO₄ (35 g CuSO₄ · 5H₂O na 500 mL).

Raztopina NaOH + tartrat (173 g natrijevega kalijevega tartrata in 50 g NaOH na 500 mL).

Postopki:**A. Priprava standardnih raztopin:**

Za pripravo standardnih raztopin laktoze v območju od 30 g L⁻¹ do 60 g L⁻¹ natehtajte ustrezne mase laktoze monohidrata v 50 mL merilne bučke in do oznake dopolnite s prečiščeno vodo. Po 25 mL posamezne standardne raztopine razredčite v 500 mL bučah do oznake s prečiščeno vodo.

B. Priprava vzorca:

K 50 mL vzorca dodajte 50 mL *i*-propanola in premešajte. Nato zmes centrifugirajte 10 min pri 3000 r min⁻¹. Od bistrre raztopine po centrifugiranju odpipetirajte 25 mL v 250 mL merilno bučko in dopolnite do oznake s prečiščeno vodo.

C. Določitev laktoze:

V 400 mL čaši pripravite vodno kopel.

V 250 mL čašo hitro odpipetirajte 25 mL raztopine CuSO₄ in 25 mL raztopine NaOH s tartratom. Nato dodajte 50 mL razredčene raztopine vzorca ali razredčene standardne raztopine. Na vroči vodni kopeli mešanico segrevajte točno 10 min, nato jo takoj ohladite v ledeni kopeli. Pustite stati 5–10 min in nato prefiltrirajte skozi steklen lonček. Oborino nekajkrat (4–5-krat) spirajte z malo prečiščene vode. Sušite 45 min pri 120 °C.

Meritve:

	<i>m</i> (lončka)	<i>m</i> (lončka z oborino)
standard laktoze 30 g L ⁻¹		
standard laktoze 40 g L ⁻¹		
standard laktoze 50 g L ⁻¹		
standard laktoze 60 g L ⁻¹		
vzorec 1		
vzorec 2		

Rezultat:

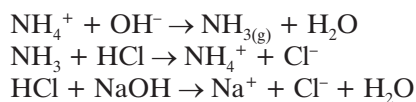
Podajte stopnjo redukcije za laktozo in masne deleže laktoze v vzorcih.

6.2 Določitev skupne vsebnosti beljakovin v jajcih s Kjeldahlovo metodo

Osnove:

Kjeldahlova metoda temelji na razklopu kompleksnega vzorca (str. 16–17), pri čemer se dušik – pri jajcih pretežno vezan v beljakovinah – pretvori v amonijeve ione, ki jih predestiliramo (str. 19) v presežek standardizirane raztopine kisline. Preostalo kislino določimo z nevtralizacijsko titracijo (str. 22). Delež dušika v vzorcu preračunamo na delež beljakovin.

Reakcije:



Naloga:

- Izračunajte točno koncentracijo raztopine NaOH kot povprečno vrednost treh določitev (str. 9).
- Določite množino dušika v vzorcu in izračunajte delež dušika v vzorcu (v %), ki ga preračunajte na delež beljakovin v jajcu (v %). Beljakovine v jajcih vsebujejo 14,97 % dušika ($M(\text{N}) = 14,0 \text{ g mol}^{-1}$).

Reagenti:

HgO, trden.

K_2SO_4 , brezvodni, trden.

H_2SO_4 , koncentrirana.

Raztopina NaOH (40 %) in $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ($0,2 \text{ mol L}^{-1}$).

Raztopina HCl, $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, standardizirana.

Raztopina NaOH, približno $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Raztopina indikatorja metiloranža v etanolu.

Postopki:

A. Razklop vzorca:

Jajce (rumenjaki in beljak) dobro homogenizirajte s stepanjem. V tehtalno posodico natehtajte 0,4–0,6 g homogeniziranega jajca in si maso vzorca zapišite na $\pm 1 \text{ mg}$ natančno. Natehtani vzorec prenesite v bučko za razklop tako, da posodico sperete z nekaj mililitri prečiščene vode. Dodajte steklene vrelnice. V bučko za razklop dodajte 7 g K_2SO_4 , 0,3 g HgO ter previdno še 12 mL koncentrirane H_2SO_4 . Počasi segrevajte, dokler se mešanica ne neha peniti, nato naj enakomerno vre. Vrenje naj

traja, dokler se raztopina ne zbistri (~ 40 min), nato pa še 30 min. Pustite, da se bučka ohladi vsaj na 50 °C.

B. Destilacija:

Sestavite Kjeldahlovo aparaturo. Na konec destilacijske cevi postavite 500 mL erlenmajerico, v katero ste odpipetirali 25 mL raztopine HCl in dodali 2–3 kapljice raztopine indikatorja. Konica cevi naj bo potopljena v raztopino. Vsebino bučke za razklop skupaj z vrelnimi kroglicami prenesite v Kjeldahlovo bučo (500 mL) in nato sperite s prečiščeno vodo – približno 200 mL. Pod tekočo vodo ohladite raztopino na temperaturo pod 25 °C in priključite bučo na aparaturo. Skozi dozirni lij previdno dodajte 100 mL raztopine NaOH in $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, premešajte in segrevajte, dokler ne predestilirate vsega amoniaka, kar pomeni vsaj 150 mL destilata. Ko je destilacija končana, oplaknite konico destilacijske cevi v erlenmajerico s prečiščeno vodo in – če je potrebno – raztopino ohladite pod tekočo vodo.

C. Določitev amoniaka:

Presežek raztopine HCl v erlenmajerici, kamor ste lovili destilat, titrirajte z raztopino NaOH (približno $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) do preskoka barve iz rdeče v oranžnordečo (“čebulna”). Točno koncentracijo raztopine NaOH določite tako, da v 250 mL erlenmajerico odpipetirate 20 mL raztopine HCl, razredčite na približno 100 mL s prečiščeno vodo, dodate 1–2 kapljici indikatorja in titirate z raztopino NaOH (približno $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) do barvnega preskoka. Postopek ponovite v še dveh paralelkah.

Meritve:

$m(\text{vzorca}) =$	Določitev koncentracije razt. NaOH:
$V(\text{NaOH, destilat}) =$	$V_1(\text{NaOH}) =$
	$V_2(\text{NaOH}) =$
	$V_3(\text{NaOH}) =$

Rezultat:

Podajte delež dušika in beljakovin v vzorcu.

6.3 Določitev prostega in skupnega žveplovega dioksida v vinu z redoks titracijo

Osnove:

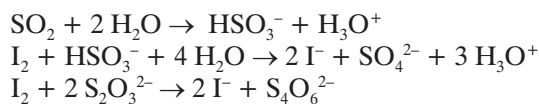
Žveplanje se v vinarstvu uporablja za preprečevanje oksidacije in razvoja neželenih mikroorganizmov. Žveplov dioksid se v vodni raztopini nahaja kot nevtralna molekula ali kot sulfat(IV) (oziroma sulfit), del se ga med alkoholnim vrenjem oksidira do sulfata(VI), preostali pa je bodisi prost ali vezan na razne organske spojine v vinu. Vsebnost v litru vina naj ne bi presežala 35 mg prostega SO₂ in 260 mg skupnega SO₂.

Prosti SO₂ lahko določamo z direktno titracijo, vezanega pa moramo predhodno sprostiti (hidroliza z NaOH, kislidroliza z destilacijo). Uporabljajo se oksidacijsko-redukcijske titracije (str. 22):

- direktna titracija s standardizirano raztopino joda – jodovico (metoda po Ripperju);
- redukcija jodata(V) do prostega joda in titracija le-tega s standardizirano raztopino tiosulfata (metoda po Rebeleinu). Pred tem je treba predestilirati SO₂ (str. 19) v raztopino KIO₃.

Pri pričujoči vaji boste spoznali modificirano metodo po Ripperju: namesto direktne titracije z jodovico boste preostali jod po reakciji z SO₂ povratno titrirali z raztopino natrijevega tiosulfata.

Reakcije:



Naloga:

Izračunajte masno koncentracijo prostega, skupnega in vezanega (iz razlike med skupnim in prostim) SO₂ v vzorcu vina in jo podajte v mg L⁻¹.
(M(S) = 32,1 g mol⁻¹, M(O) = 16,0 g mol⁻¹)

Reagenti:

- Raztopina I₂ (jodovica), približno 0,01 mol L⁻¹, stabilizirana s KI.
- Raztopina H₂SO₄, 1 : 4.
- Raztopina Na₂S₂O₃, 0,1 mol L⁻¹, standardizirana.
- Škrob, 1 % raztopina (škrobovica).
- Raztopina NaOH, 1 mol L⁻¹.
- Raztopina H₃PO₄, 80 %.

Postopki:

A. Določitev prostega SO₂:

V 250 mL erlenmajerico odpipetirajte 100 mL vzorca vina, dodajte 10 mL raztopine H₂SO₄ ter 25 mL jodovice. Premešajte in titrirajte s standardizirano raztopino Na₂S₂O₃. Ko preide barva raztopine iz rjave v rumeno, dodajte nekaj mililitrov škrobovice (ena kapalka) in titrirajte dalje do popolnega razbarvanja modre raztopine. Določitev še enkrat ponovite. Na enak način titrirajte slepi vzorec, kjer namesto vina odmerite 100 mL prečiščene vode.

B. Določitev skupnega SO₂:

V 250 mL erlenmajerico z brusom odpipetirajte 25 mL raztopine NaOH, nato pa še 50 mL vzorca vina. Slednjega dodajte tako, da je konica pipete potopljena v raztopino NaOH. Dobro premešajte, zamašite in pustite reagirati 20 min pri sobni temperaturi. Zatem v erlenmajerico dodajte 10 mL raztopine H₂SO₄, 50 mL jodovice in premešajte. Raztopino titrirajte s standardizirano raztopino Na₂S₂O₃. Ko preide barva iz rjave v rumeno, dodajte nekaj mililitrov škrobovice (ena kapalka) in titrirajte dalje do popolnega razbarvanja modre raztopine. Določitev še enkrat ponovite. Na enak način titrirajte slepi vzorec, kjer namesto vina odmerite 50 mL prečiščene vode.

C. Določitev skupnega SO₂ v zelo temnih vinih:

Pri zelo temnih vinih zaradi obarvanosti ni dobro viden barvni preskok iz modre v brezbarvno pri titraciji prostega joda z natrijevim tiosulfatom. Da se tej motnji izognete, najprej s kislom hidrolizirano sprostite vezani SO₂ iz vzorca in ga nato predestilirajte.

Destilacijsko aparaturo ogrejte s predestiliranjem prečiščene vode (10–20 mL). V 250 mL erlenmajerico odpipetirajte 25 mL raztopine NaOH in jo postavite tako, da sega konec cevi za destilacijo do dna erlenmajerice. V destilacijsko bučko (100 mL) odpipetirajte 50 mL vzorca vina, dodajte 10 mL raztopine H₃PO₄ in 25 mL prečiščene vode. Premešajte in bučko pritrдите na zamašek na začetku cevi za destilacijo, nato jo postavite na ogret grelec in destilirajte, dokler se ne predestilira približno 2/3 vsebine bučke. Dvignite cev za destilacijo in njen konec sperite s prečiščeno vodo v erlenmajerico, nato snemite še destilacijsko bučko. Erlenmajerico ohladite pod tekočo vodo, nato vanjo dodajte 15 mL raztopine H₂SO₄ in 50 mL jodovice. Premešajte in titrirajte s standardizirano raztopino Na₂S₂O₃. Ko preide barva raztopine iz rjave v rumeno, dodajte nekaj mililitrov škrobovice (ena kapalka) in titrirajte dalje do popolnega razbarvanja modre raztopine. Za slepi vzorec ne potrebujete destilacije, zato sledite postopku pod točko B s 50 mL prečiščene vode.

Meritve:

Prosti SO ₂ :	Skupni SO ₂ :
V(vzorca) =	V(vzorca) =
V ₁ (Na ₂ S ₂ O ₃ , vzorec) =	V ₁ (Na ₂ S ₂ O ₃ , vzorec) =
V ₂ (Na ₂ S ₂ O ₃ , vzorec) =	V ₂ (Na ₂ S ₂ O ₃ , vzorec) =
V(Na ₂ S ₂ O ₃ , slepi vz.) =	V(Na ₂ S ₂ O ₃ , slepi vz.) =

Rezultat:

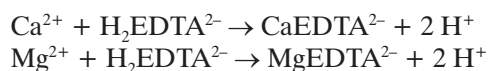
Podajte masno koncentracijo prostega, skupnega in vezanega SO₂ v vzorcu.

6.4 Določitev kalcijevih in magnezijevih ionov v mleku in jogurtu s kompleksometrično titracijo

Osnove:

V litru kravjega mleka je do 1,3 g kalcijevih (Ca^{2+}) in do 0,14 g magnezijevih (Mg^{2+}) ionov. Preprost in hiter način njihovega določanja je kompleksometrična titracija (str. 23).

Reakcije:



Naloga:

Določite masno koncentracijo kalcijevih in magnezijevih ionov v mleku ali jogurtu. ($M(\text{Ca}) = 40,1 \text{ g mol}^{-1}$, $M(\text{Mg}) = 24,3 \text{ g mol}^{-1}$)

Reagenti:

Raztopina EDTA, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.
 Pufurna raztopina $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$, pH 10.
 Raztopina NaOH, 2 mol L^{-1} .
 Indikator eriokrom črno T, trden.
 Indikator mureksid, trden.

Postopki:

A. Priprava vzorca:

V 250 mL merilno bučko odpipetirajte 15 mL dobro premešanega mleka oz. natehtajte 8–10 g jogurta in si maso vzorca zapišite na $\pm 1 \text{ mg}$ natančno. Razredčite s prečiščeno vodo do oznake in premešajte. S to raztopino opravite dvakrat določitev skupne vsebnosti kalcijevih in magnezijevih ionov in dvakrat določitev kalcijevih ionov.

B. Skupna določitev kalcijevih in magnezijevih ionov:

V 250 mL erlenmajerico odpipetirajte 50 mL razredčene raztopine mleka ali jogurta (glejte točko A), dodajte še približno 50 mL prečiščene vode, 2 mL amoniakalne pufrne raztopine (pH 10), pol žličke indikatorja eriokrom črno T in premešajte, da se indikator raztopi. Titrirajte s standardno raztopino EDTA do preskoka barve iz vinsko rdeče v modro.

C. Določitev kalcijevih ionov:

V 250 mL erlenmajerico odpipetirajte 50 mL razredčene raztopine mleka ali jogurta (glejte točko A), dodajte še približno 50 mL prečiščene vode, 5 mL raztopine NaOH,

pol žličke indikatorja mureksida in premešajte, da se indikator raztopi. Titrirajte s standardno raztopino EDTA do preskoka barve iz rožnate v modrovijolično.

Meritve:

$V/m(\text{vzorca}) =$	
Skupna določitev Ca^{2+} in Mg^{2+} :	Določitev Ca^{2+} :
$V_1(\text{EDTA}) =$	$V_1(\text{EDTA}) =$
$V_2(\text{EDTA}) =$	$V_2(\text{EDTA}) =$

Rezultat:

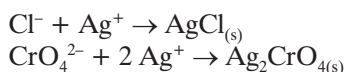
Podajte masno koncentracijo kalcijevih in magnezijevih ionov v vzorcu.

6.5 Določitev vsebnosti NaCl v slanici in konzervirani zelenjavi z obarjalno titracijo

Osnove:

Kuhinjska sol (NaCl) se uporablja za konzerviranje mnogih živil, tudi zelenjave. Vsebnost NaCl v konzervirani zelenjavi naj ne bi presegala 3 %. Enostavna metoda za določitev vsebnosti NaCl je obarjalna titracija (str. 23) kloridnih ionov s srebrevim nitratom v nevtralnem ali šibko bazičnem mediju (titracija po Mohru). Indikator je kromatni(VI) ion, ki daje s presežkom srebrevih ionov rdečerrjavo oborino. Drugi način določitve ekvivalentne točke je potenciometrična detekcija (str. 21–22).

Reakcije:



Naloga:

- Za vsako titracijo narišite titracijsko krivuljo (str. 22), prvi in drugi odvod titracijske krivulje ter odčitajte ekvivalentni volumen raztopine AgNO_3 .
- Izračunajte masno koncentracijo NaCl v vzorcu slanice oziroma masni delež v vzorcu konzervirane zelenjave. ($M(\text{Na}) = 23,0 \text{ g mol}^{-1}$, $M(\text{Cl}) = 35,5 \text{ g mol}^{-1}$)

Reagenti:

i-propanol.

Raztopina NaOH, 0,1 mol L⁻¹.

Raztopina indikatorja fenolftaleina v etanolu.

Raztopina K₂CrO₄, 5 %.

Raztopina AgNO₃, 0,1 mol L⁻¹, standardizirana.

Postopki:

A. Priprava vzorcev:

Slanica: v 250 mL merilno bučko odpipetirajte 5 mL slanice in razredčite do oznake s prečiščeno vodo. Od tega titrirajte alikvote po 50 mL, in sicer dva z indikatorjem K₂CrO₄ in dva s potenciometrično detekcijo.

Konzervirana zelenjava: zelenjavo sperite s prečiščeno vodo, nato še z *i*-propanolom. Počakajte, da se posuši. Natehtajte 20–30 g vzorca zelenjave in si maso vzorca zapišite na ± 1 mg natančno. Natehtani vzorec prenesite v homogenizator. Dodajte točno 200 mL prečiščene vode in homogenizirajte do enakomerno kašastega videza. Za titracijo s potenciometrično detekcijo v čašo odtehtajte 40–50 g kašastega materiala in si maso zapišite na ± 1 mg natančno. Titrirajte vsaj dve paralelki.

B. Določitev vsebnosti NaCl v vzorcu – titracija z indikatorjem:

Alikvot razredčene slanice (glejte točko A) odpipetirajte v erlenmajerico in prilijte približno 50 mL prečiščene vode. Dodajte 2–3 kapljice indikatorja fenolftaleina in titrirajte z raztopino NaOH do preskoka barve iz brezbarvne v rahlo rožnato. Zapišite si porabo raztopine NaOH. V drugo erlenmajerico ponovno odpipetirajte alikvot razredčene slanice, dodajte prečiščeno vodo in zapisano porabo raztopine NaOH. Nato v isto erlenmajerico odpipetirajte še 2 mL raztopine K_2CrO_4 , premešajte in titrirajte s standardno raztopino $AgNO_3$ do pojava obstojne rdečerjave oborine.

C. Določitev vsebnosti NaCl v vzorcu – titracija s potenciometrično detekcijo:

V čašo odpipetirajte 50 mL razredčene slanice (glejte točko A) ali natehtajte 40–50 g homogenizirane zelenjave (glejte točko A) in si maso vzorca zapišite na ± 1 mg natančno. Prilijte še približno 25 mL prečiščene vode in premešajte. V raztopino spustite magnetno mešalo, postavite čašo na mešalnik in nastavite enakomerno mešanje. Potopite elektrodi v raztopino in odčitajte začetno razliko potencialov. Z bireto dodajajte sprva po 0,5 mL raztopine $AgNO_3$, po vsakem dodatku počakajte, da se potencialna razlika ustali in si jo zapišite. Ko postanejo spremembe potencialne razlike večje, zmanjšajte odmerke titrirnega reagenta na 0,1 mL. Titracija je končana, ko se potencial po izraziti spremembi zopet ustali.

Meritve:

Slanica:	Konzervirana zelenjava:
$V(\text{vzorca}) =$	$m(\text{vzorca}) =$
Indikator: $V_1(AgNO_3) =$	$m_1(\text{homog. mater.}) =$
$V_2(AgNO_3) =$	$V_1(AgNO_3) =$
Potenc. det.: $V_1(AgNO_3) =$	$m_2(\text{homog. mater.}) =$
$V_2(AgNO_3) =$	$V_2(AgNO_3) =$

Rezultat:

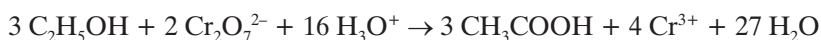
Podajte masno koncentracijo NaCl v slanici in masni delež NaCl v konzervirani zelenjavi.

6.6 Določitev etanola v vinu z molekulsko absorpcijsko spektrometrijo

Osnove:

Etanol v kislem mediju oksidiramo z dikromatnimi(VI) ioni do očetne kisline, pri tem se dikromat(VI) reducira do kromovih(III) ionov. Slednje lahko določimo s titracijo (metoda po Rebeleinu) ali spektrometrično (metoda po Caputiju). Etanol iz vina predhodno predestiliramo (str. 19) zaradi drugih spojin v vinu, ki bi motile reakcijo in spektrometrično določitev (str. 24–25).

Reakcija:



Naloga:

- Izračunajte smerni koeficient (b), odsek na ordinati (a) in korelacijski koeficient (r) za odvisnost absorbance standardnih raztopin od koncentracije etanola v njih (str. 11–13).
- Iz enačbe umeritvene premice izračunajte volumski delež etanola v vzorcu vina (v %). ($M(\text{H}) = 1,0 \text{ g mol}^{-1}$, $M(\text{C}) = 12,0 \text{ g mol}^{-1}$, $M(\text{O}) = 16,0 \text{ g mol}^{-1}$)

Reagenti:

Etanol (96 %, v/v).

Raztopina $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) in H_2SO_4 (približno 32 %).

Postopki:

A. Priprava standardnih raztopin za umeritveno premico:

V pet 100 mL merilnih bučk odpipetirajte ustrezne volumne etanola: 5, 8, 10, 13 in 15 mL, in razredčite do oznake s prečiščeno vodo. Premešajte.

B. Destilacija vzorca vina:

Pripravite destilacijsko aparaturo in jo ogrejte tako, da predestilirate nekaj mL prečiščene vode. V 150 mL čašo odpipetirajte 25 mL raztopine $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ in H_2SO_4 ter jo postavite tako, da konec cevi za destilacijo sega v raztopino, do dna erlenmajerice. V 100 mL destilacijsko bučko odpipetirajte 1 mL vzorca vina, nekajkrat sperite stene bučke s prečiščeno vodo, premešajte in bučko pritrdite na zamašek na začetku cevi za destilacijo. Destilacijsko bučko spustite na ogret grelec in destilirajte 15 min. Po končani destilaciji grelec odmaknite, konec cevi za destilacijo dvignite iz raztopine in oplaknite s prečiščeno vodo v erlenmajerico, nato snemite še destilacijsko bučko in konec destilacijske cevi ponovno splaknite.

C. Priprava standardnih raztopin in destilata vzorca za spektrofotometrično meritev:

Pripravite si šest 50 mL merilnih bučk. Vanje odpipetirajte po 25 mL raztopine $K_2Cr_2O_7$ in H_2SO_4 . V prvo bučko nato odpipetirajte 0,5 mL prečiščene vode – slepi vzorec, v preostalih pet pa po 0,5 mL raztopin z različno vsebnostjo etanola, ki ste jih pripravili prej (glejte točko A). Dopolnite do oznake s prečiščeno vodo in premešajte. Vsebino erlenmajerice po destilaciji vzorca vina (glejte točko B) kvantitativno prenesite v 100 mL merilno bučko in jo dopolnite do oznake s prečiščeno vodo ter premešajte. Vse bučke termostatirajte 20 min pri 60 °C na vodni kopeli, nato jih ohladite na sobno temperaturo.

D. Spektrofotometrična meritev:

V kiveto nalijte raztopino slepega vzorca. Raztopino nalijte do približno 4/5 višine kivete, ki jo pri tem držite na neprozornih površinah. Z vpojnim papirjem obrišite stene kivete in jo vstavite v držalo. Pokrov spektrofotometra zaprite. Valovno dolžino merjenja nastavite na 582 nm. Absorbanco slepega vzorca nastavite na nič. Nato odčitajte absorbance za vse standardne raztopine in za vzorec. Vsakič, ko v kiveti menjate raztopino, odlijete prejšnjo raztopino v čašo za odpad, oplaknete kiveto z naslednjo raztopino in šele nato nalijete novo raztopino, kiveto vstavite v spektrofotometer in odčitajte absorbanco.

Meritve:

Absorbance standardnih raztopin:	Absorbanca destilata vina:
$A_1(5 \text{ mL}) =$	$A_{vz} =$
$A_2(8 \text{ mL}) =$	
$A_3(10 \text{ mL}) =$	
$A_4(13 \text{ mL}) =$	
$A_5(16 \text{ mL}) =$	

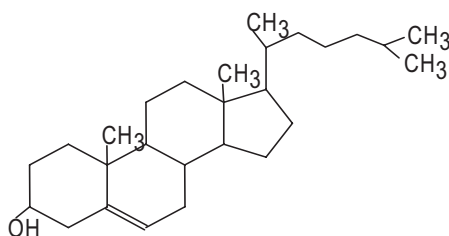
Rezultat:

Podajte parametre umeritvene premice in volumski delež etanola v vzorcu.

6.7 Določitev holesterola v mleku z molekulsko absorpcijsko spektrometrijo

Osnove:

Holesterol spada med lipide z osnovno kemično strukturo sterola. Za telo je nujno potreben, saj je sestavina celičnih membran, iz njega tudi nastajajo steroidni hormoni in vitamin D. Prevelike količine holesterola v prehrani pa so vendarle škodljive zaradi pospeševanja srčnožilnih bolezni. Ena od preprostejših metod za določitev holesterola je spektrometrična (str. 24–25). Spojino je treba najprej ekstrahirati iz vzorca (str. 19–20), nato dosežemo razvoj barve z dodatkom železovih(II), železovih(III) soli ali z reagentom *o*-ftalaldehidom v kislem mediju. Pri vaji boste spoznali postopek z železovim(III) kloridom.



Strukturna formula holesterola.

Naloga:

- Izračunajte smerni koeficient (*b*), odsek na ordinati (*a*) in korelacijski koeficient (*r*) za odvisnost absorbance standardnih raztopin od masne koncentracije holesterola v njih (str. 11–13).
- Iz enačbe umeritvene premice izračunajte masno koncentracijo holesterola v vzorcih mleka.

Reagenti:

Raztopina holesterola, 0,1 g L⁻¹ v 96 % etanolu.

Etanol (96 %, v/v).

Raztopina KOH, 50 %.

Heksan.

Barvni reagent: vsebuje FeCl₃, H₃PO₄ in koncentrirano H₂SO₄.

Postopki:

A. Ekstrakcija holesterola:

V večjo epruveto z zamaškom odpipetirajte 1 mL mleka. Dodajte 1,5 mL etanola in 1 mL raztopine KOH. Epruveto zaprite in jo segrevajte 15 min na vodni kopeli

(60 °C). Ohladite in raztopini dodajte 1,5 mL prečiščene vode ter 5 mL heksana. Centrifugirajte 10 min pri 2500 r min⁻¹ v centrifugi. Previdno odpipetirajte 3 mL heksanskega ekstrakta v suho epruveto in odparite heksan do suhega na vodni kopeli (50 °C) s prepihavanjem z zrakom.

B. Priprava standardnih raztopin za umeritveno premico:

V pet epruvet odpipetirajte 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,6 mL in 0,8 mL osnovne raztopine holesterola ter dodajte ustrezen volumen etanola, da bo končni volumen raztopine 2,0 mL. V šesto epruveto odpipetirajte samo 2,0 mL etanola – slepi vzorec.

C. Priprava raztopin za spektrometrično meritev:

V epruveto s suhim heksanskim ekstraktom vzorca dodajte 2 mL etanola in dobro premešajte. V vse epruvete (slepi vzorec, standardne raztopine, raztopina vzorca) previdno dodajte po 2 mL barvnega reagenta, zelo previdno premešajte in ohladite. Epruvete zamašite in jih pustite 30 min pri sobni temperaturi.

D. Spektrometrična meritev:

- Posnemite absorpcijski spekter v območju od 450–800 nm za standardno raztopino srednje koncentracije. Iz dobljenega spektra določite valovno dolžino, ki ustreza maksimumu absorpcije.
- V dve kiveti nalijte raztopino slepega vzorca. Raztopino nalijte do približno 4/5 višine kivete, ki jo pri tem držite na neprozornih površinah. Z vpojnim papirjem obrišite stene kivete in jo vstavite v držalo. Pokrov spektrofotometra zaprite. Valovno dolžino merjenja nastavite na valovno dolžino, ki ste jo določili kot maksimum absorpcije. Absorbanco nastavite na nič. Nato odčitajte absorbance za vse raztopine za umeritveno premico in za vzorce. Vsakič, ko v kiveti menjate raztopino, odlijete prejšnjo raztopino v čašo za odpad, oplaknete kiveto z naslednjo raztopino in šele nato nalijete novo raztopino, kiveto vstavite v spektrofotometer in odčitajte absorbanco.

Meritve:

Absorbance standardnih raztopin:	Absorbanca ekstrakta vzorca:
$A_1(0,1 \text{ mL}) =$	$A_{vz1} =$
$A_2(0,2 \text{ mL}) =$	$A_{vz2} =$
$A_3(0,4 \text{ mL}) =$	
$A_4(0,6 \text{ mL}) =$	
$A_5(0,8 \text{ mL}) =$	

Rezultat:

Podajte parametre umeritvene premice in masno koncentracijo holesterola v vzorcih.

6.8 Določitev skupnih kovinskih ionov v jajcih z atomsko absorpcijsko spektroskopijo

Osnove:

Jajca so pomemben vir osnovnih hranil pa tudi vitaminov in mineralov. Eno jajce (50–60 g) vsebuje v različnih zvrsteh približno 200 mg natrija, 150 mg kalija, 50 mg kalcija, 10 mg magnezija, 2–3 mg železa, 2 mg cinka, 0,1 mg bakra, sledove kroma. Druge kovine v večjih količinah (več kot 1 mg kg⁻¹) štejemo med onesnaževalce, ki pridejo v jajca zaradi nepravilno sestavljene krme kokoši. Kovinske ione v tako nizkih koncentracijah določamo z metodo atomske absorpcijske spektroskopije – AAS (str. 25) po predhodnem razklopu vzorca (str. 16–17). V razklopljenem vzorcu se nahajajo le še prosti ioni kovin.

Naloga:

- Narišite umeritveno premico za odvisnost absorbance standardnih raztopin od masne koncentracije cinkovih in železovih ionov v njih (str. 11–12).
- Iz umeritvene premice določite masno koncentracijo obeh ionov v raztopini vzorca.
- Z metodo standardnih dodatkov (str. 12–13) grafično določite vsebnost železovih ionov v raztopini vzorca.

Reagenti:

Raztopina HNO₃, 1 : 1.

Raztopina H₂O₂, 30 %.

Raztopina Fe³⁺, 0,1 g L⁻¹.

Raztopina Zn²⁺, 0,1 g L⁻¹.

Inštrumentacija:

Atomski absorpcijski spektrometer.

Žarnici z votlo katodo za merjenje železa in cinka.

Postopki:

A. Razklop vzorca:

Jajce (rumenjaki in beljaki) dobro homogenizirajte s stepanjem. V tehtalno posodico natehtajte 1,8–2,2 g homogeniziranega jajca in si maso vzorca zapišite na ± 1 mg natančno. Natehtani vzorec prenesite v bučko za razklop, nato posodico sperite z nekaj mililitri prečiščene vode. Dodajte steklene vrelnice. V bučko za razklop dodajte 10 mL raztopine HNO₃ in raztopino H₂O₂ (1–2 mL). Počasi segrevajte in po potrebi dolivajte raztopino HNO₃. Vrenje naj traja, dokler se raztopina ne zbistri,

nato pa še 30 min. Pustite, da se bučka ohladi vsaj na 50 °C, nato njeno vsebino kvantitativno prenesite v 25 mL merilno bučko in razredčite s prečiščeno vodo do oznake. Premešajte.

B. Priprava standardnih raztopin kovin:

V petih 100 mL merilnih bučkah pripravite standardne raztopine, ki vsebujejo tako cinkove kot železove(III) ione v masni koncentraciji 0,2, 0,5, 1, 2 in 5 mg L⁻¹. Pripravite jih tako, da odpipetirate ustrezne volumne raztopine Fe³⁺ in raztopine Zn²⁺ v merilne bučke, razredčite do oznake s prečiščeno vodo in premešate. Slepri vzorec pri tej vaji je prečiščena voda.

C. Analiza standardnih raztopin in vzorca z AAS:

Določitev cinkovih ionov: V aparaturi naj bo žarnica s cinkovo votlo katodo. Absorbanco merite pri 213,9 nm in širini reže 0,7 nm. Raztopine razpršujete v plamen etin/zrak, in sicer najprej s slepim vzorcem nastavite absorbanco na nič, nato odčitajte absorbance za standardne raztopine in končno še za raztopino vzorca.

Določitev železovih ionov: V aparaturi naj bo žarnica z železovo votlo katodo. Absorbanco merite pri 248,3 nm in širini reže 0,2 nm. Raztopine razpršujete v plamen etin/zrak, in sicer najprej s slepim vzorcem nastavite absorbanco na nič, nato odčitajte absorbance za standardne raztopine in končno še za raztopino vzorca.

D. Določitev vsebnosti železovih ionov z metodo standardnih dodatkov:

S pomočjo umeritvene premice (točka C) ocenite koncentracijo železovih ionov v vzorcu. V štiri epruvete odmerite po 4 mL vzorca in ocenite maso železovih ionov v tem volumnu. Izračunajte potrebni volumen standardne raztopine Fe³⁺s koncentracijo 0,1 g L⁻¹, ki jo boste dodali k 4 mL vzorca, da bo masa železovih ionov dvakratna, trikratna ali štirikratna glede na maso v vzorcu brez standardnega dodatka. Pri izračunu vsebnosti železovih ionov v vzorcu upoštevajte povečanje volumna vzorca ob dodatku standardne raztopine Fe³⁺.

Meritve:

$$m(\text{vzorca}) =$$

umeritvena premica:

	absorbanca					
	SR 0,2 mg L ⁻¹	SR 0,5 mg L ⁻¹	SR 1 mg L ⁻¹	SR 2 mg L ⁻¹	SR 5 mg L ⁻¹	vzorec
Zn ²⁺						
Fe ³⁺						

metoda standardnih dodatkov:

	absorbanca			
	vzorec	SD1	SD2	SD3
Fe ³⁺				

Rezultat:

Koncentracije ionov v raztopini preračunajte na masni delež (v mg kg⁻¹) cinkovih in železovih(III) ionov v originalnem vzorcu jajca.

6.9 Določitev hlapnih spojin v čajih (arome čaja) s plinsko kromatografijo v povezavi z masno spektrometrijo

Osnove:

Aroma čaja je eden važnejših parametrov njegove kakovosti. Običajno jo ocenjujejo organoleptično. Hlapne sestavine čaja, ki sestavljajo njegovo aromo, lahko določamo tudi z analiznimi metodami. Pri tej vaji bomo spojine – sestavine arome – vzorčevali iz plinske faze nad vzorcem (angl. *headspace*) oziroma ekstrahirali iz iste faze z mikroekstrakcijo na trdno fazo (str. 20), jih ločili s plinsko kromatografijo (str. 26) in identificirali z masno spektrometrijo (str. 25).

Naloga:

Identificirajte nekatere sestavine arome črnega čaja “Earl Grey”, aromatiziranega z bergamotko. Primerjajte vzorčevanje iz plinske faze nad vzorcem in ekstrakcijo iste faze z mikroekstrakcijo na trdno fazo za karakterizacijo arome čaja.

Reagenti:

Vlakno za mikroekstrakcijo na trdno fazo s polidimetilsiloksanjsko stacionarno fazo, debelina plasti 100 μm , nameščeno na držalo za ročno uporabo (nastavek za SPME).

Eterično olje lupine bergamotke (*Citrus bergamia*), pridobljeno s stiskanjem.

Inštrumentacija:

Plinski kromatograf z masnospektrometričnim detektorjem.

Postopki:

A. Vzorčevanje iz plinske faze nad vzorcem:

V 10 mL posodico penicilinko natehtajte 0,4–0,6 g čaja in si maso vzorca zapišite na $\pm 0,1$ g natančno. Posodico zaprite z ustreznim pokrovčkom in jo za 5 min postavite na termostatirano vodno kopel (40 °C). Po tem času prebodite pokrovček s siringo za vzorčevanje plinov in vzorčite 1 mL iz plinske faze nad vzorcem. Injicirajte v plinski kromatograf.

B. Ekstrakcija iz plinske faze nad vzorcem z mikroekstrakcijo na trdno fazo:

V 10 mL posodico penicilinko natehtajte 0,4–0,6 g čaja in si maso vzorca zapišite na $\pm 0,1$ g natančno. Posodico zaprite z ustreznim pokrovčkom in jo za 5 min postavite na termostatirano vodno kopel (40 °C). Po tem času prebodite pokrovček z iglo nastavka za SPME in vlakno za mikroekstrakcijo potisnite iz zaščitnega ovoja v plinsko fazo. Počakajte 15 min, nato vlakno potegnite nazaj v zaščitni ovoj. Zaščitni ovoj (iglo) nastavka za SPME vstavite v injektorski del kromatografa in spustite vlakno.

C. Analiza eteričnega olja bergamotke:

V 10 mL posodico penicilinko kanite 2 kapljici eteričnega olja. Posodico zaprite z ustreznim pokrovčkom in jo za 5 min postavite na termostatisirano vodno kopel (40 °C). Po tem času vzorčujte iz plinske faze nad oljem po postopkih, opisanih pod točkama A in B.

D. Plinsko-kromatografska analiza z masnospektrometrično detekcijo:

Ko ste injicirali plinsko fazo oziroma vstavili vlakno za SPME v injektorski del, začnite s temperaturno programirano analizo. Vlakno po 3 min potegnite nazaj v zaščitni ovoj in umaknite iz injektorskega dela.

E. Identifikacija nekaterih hlapnih spojin iz čaja:

V kromatogramih določite retencijske čase glavnih vrhov in si oglejte njihove masne spektre. S pomočjo knjižnice masnih spektrov ugotovite identiteto glavnih vrhov v kromatogramu arome čaja in eteričnega olja bergamotke.

Meritve:

t_R /min						
spojina						
ploščina vrhov po postopku A						
ploščina vrhov po postopku B						

Rezultat:

Napišite pogoje dela na plinskem kromatografu z masnospektrometričnim detektorjem (kolona – stacionarna faza, dimenzije; mobilna faza, pretok; temperaturni program; temperature posameznih delov aparata).

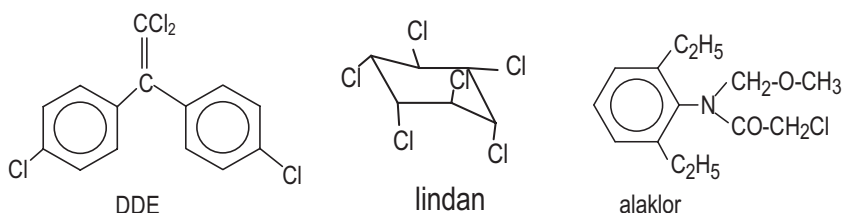
Navedite komponente arome čaja, ki ste jih identificirali.

Priložite kromatograme in masne spektre.

6.10 Določitev ostankov pesticidov v zelenjavi s plinsko kromatografijo

Osnove:

V sadju, zelenjavi in zeliščih so lahko ostanki pesticidov, bodisi zaradi načina pridelave bodisi zaradi kasnejše obdelave s sredstvi proti plesnim ipd. Običajno je vsebnost teh spojin nizka (manj kot 1 mg kg^{-1}), zato je pred analizo potrebna predkoncentracija hkrati z ekstrakcijo (str. 19–20). V koncentriranem ekstraktu analiziramo pesticide s plinsko kromatografijo (str. 26).



Strukturne formule določevanih pesticidov.

Naloga:

- Izračunajte smerne koeficiente (b) in odseke na ordinati (a) za odvisnost ploščine kromatografskih vrhov pesticidov v standardnih raztopinah od koncentracije pesticidov v njih (str. 11–12). Iz enačb umeritvenih premic izračunajte koncentracije pesticidov v ekstraktih zelenjave ($\gamma_{vz.}$) in ekstraktih zelenjave z dodanimi pesticidi ($\gamma_{vz.+p.}$).
- Izračunajte izkoristek ekstrakcije (η) za vse pesticide.

$$\eta = \frac{(\gamma_{vz.+p.} - \gamma_{vz.})}{\gamma_{teor.}}$$

- Določite koncentracijo pesticidov v zelenjavi.

Reagenti:

Osnovna standardna raztopina pesticidov v heksanu: lindan (LN), alaklor (AK), *p,p'*-DDE (DDE); vsi v masni koncentraciji 200 mg L^{-1} .

Heksan, kromatografsko čist.

Aceton, kromatografsko čist.

Etilacetat, kromatografsko čist.

Metanol, kromatografsko čist.

Raztopina trietilamina v etilacetatu, 1 %.

Mešanica etilacetata in acetona (90 : 10).

Trdna faza oktil-silikagel (C_8), 500 mg, polnjeno v ekstrakcijske kolonice.

Trden Na_2SO_4 , brezvodni.

Inštrumentacija:

Ultrazvočna kopel.

Laboratorijska centrifuga.

Plinski kromatograf s plamensko-ionizacijskim detektorjem.

Postopki:

A. Priprava delovnih standardnih raztopin:

Iz osnovne standardne raztopine pesticidov pripravite v 5 mL merilnih bučkah pet raztopin v heksanu z masnimi koncentracijami pesticidov 2, 5, 10, 20 in 40 mg L⁻¹.

B. Ekstrakcija zelenjave:

V epruvete z obrusom natehtajte 10 g sesekljane sveže zelenjave, dodajte 20 mL acetona in postavite za 10 min na ultrazvočno kopel. Nato zmes prefiltrirajte ali centrifugirajte 5 min pri 3000 r min⁻¹. Od bistre raztopine po centrifugiranju odpipetirajte 10 mL v 100 mL merilno bučko in dopolnite do oznake s prečiščeno vodo, premešajte. Na enak način ekstrahirajte tudi zelenjavo s predhodno dodanimi pesticidi (5 mg kg⁻¹).

C. Čiščenje in predkoncentriranje ekstrakta :

Skozi ekstrakcijsko kolonico, polnjeno z oktil-silikagelom, s potisnim nastavkom potisnite 3 mL etilacetata, nato 3 mL metanola in končno še 5 mL prečiščene vode. Kolonico priključite na presesalno bučo in s pomočjo vodne črpalke skoznjo presesajte 100 mL razredčenega ekstrakta zelenjave (glejte točko B). Kolonica naj se med presesavanjem ekstrakta ne izsuši. Nato skoznjo prečrpajte še 2 mL prečiščene vode. Nadaljnjih 5 min skozi kolonico črpajte samo zrak, nato jo snemite s presesalne buče. S potisnim nastavkom potisnite skozi kolonico v graduirano epruveto najprej 2 mL raztopine trietilamina v etilacetatu, nato še trikrat po 2 mL mešanice etilacetata in acetona (90 : 10). Vse eluate prefiltrirajte skozi plast brezvodnega Na_2SO_4 na filter papirju v suho epruveto. Eluat postavite na vodno kopel (približno 50 °C) in ga prepihujte z dušikom, da se njegov volumen zmanjša na 1 mL.

D. Plinsko-kromatografska analiza:

Z 10 µL brizgo odmerite 1 µL standardne raztopine ali koncentriranega eluata in ga injicirajte v injektorski del ter začnite s temperaturno programirano analizo. Ko je le-te konec in se termostatorni del kromatografa zopet ohladi na začetno temperaturo, lahko injicirate naslednjo raztopino. Med posameznimi raztopinami spirajte brizgo s heksanom. V kromatogramu vsake raztopine določite retencijske čase in ploščine glavnih vrhov.

Meritve:

		ploščine vrhov						
pesticid	t_R /min	SR 2 mg L ⁻¹	SR 5 mg L ⁻¹	SR 10 mg L ⁻¹	SR 20 mg L ⁻¹	SR 40 mg L ⁻¹	ekstrakt zelenjave	ekstrakt zelenjave s pesticidi
lindan								
alaklor								
DDE								

Rezultat:

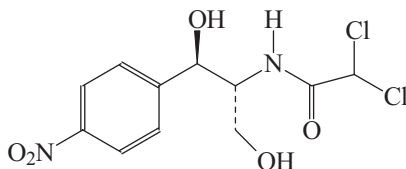
Napišite pogoje dela na plinskem kromatografu (kolona – stacionarna faza, dimenzije; mobilna faza, pretok; temperaturni program; temperature posameznih delov aparata, prostornina injiciranega vzorca).

Podajte izkoristke ekstrakcije za posamezne pesticide in njihovo vsebnost v zelenjavi.

6.11 Določitev antibiotika kloramfenikola v medu s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Osnove:

Kloramfenikol, skrajšano tudi CAP (iz angl. *chloramphenicol*), je bakteriostatični antibiotik širokega spektra, ki ga v naravi proizvaja mikroorganizem *Streptomyces venezuelae*. Pogosto ga uporabljajo za preprečevanje in/ali zdravljenje bakterijskih infekcij pri vzrejnih živalih. Precej pogosta je uporaba kloramfenikola pri vzreji rib, goveda, uporablja pa se tudi v čebelarstvu ob *hudi gnilobi čebelje zalege*, ki jo povzroča bakterija *Paenibacillus larvae*. V zadnjem času je uporaba kloramfenikola v veterinarske namene, kjer gre za povezavo s humano prehrano v Sloveniji, Evropski uniji, Kanadi in ZDA prepovedana. Pri zdravljenju ljudi se omenjeni antibiotik uporablja lokalno pri očesnih vnetjih, sistemsko pa le kot alternativa, ko ni drugega primerne zdravila (npr. pri hudih okužbah s salmonelami in hudih oblikah meningitisa in tifusa).



Strukturna formula kloramfenikola.

Koncentracije kloramfenikola so navadno v območju ppb–ppm, kar zahteva predkoncentracijo analita pred analizo. Pri vaji bomo v ta namen izvajali “on-line” ekstrakcijo na trdni fazi (SPE) (str. 20) v povezavi s HPLC. Ekstrakcijska kolonica je v skladu z naravo analita nepolarna, prav tako analizna kolona.

Naloga:

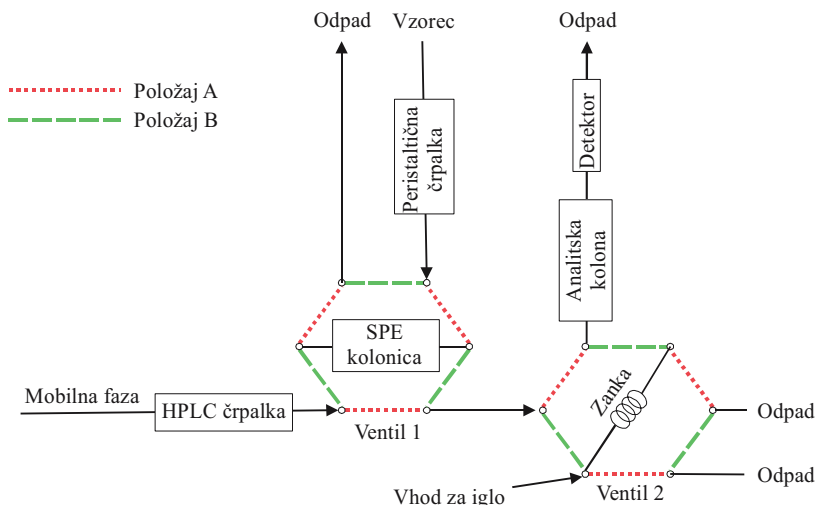
- Določite izkoristek ekstrakcije za kloramfenikol na nepolarni C_{18} trdni fazi.
- S pomočjo metode standardnih dodatkov (str. 12–13) grafično določite vsebnost kloramfenikola v vzorcu medu (vzorec je pripravljen v laboratoriju).

Reagenti:

Standardna raztopina kloramfenikola v prečiščeni vodi s koncentracijo 50 mg L^{-1} .
Ekstrakcijska kolonica: nepolarna stacionarna faza C_{18} .

Inštrumentacija:

Peristaltična črpalka.
Tekočinski kromatograf (HPLC).



Shematska predstavitev sistema za analizo CAP v medu z »on-line« SPE v povezavi s HPLC.

Tabela 6.1: Položaj ventilov med predkoncentracijo in zaporedno elucijo ter injiciranjem.

Postopek		Položaj ventila	
		1	2
Ekstrakcija	kondicioniranje		
	prečrpavanje vzorca	A	A ali B
	spiranje		
	eluiranje ekstrakta	B	A ali B
Injiciranje	vnos vzorca v zanko	A	A
	injiciranje vzorca	A	B

Postopki:

A. Predkoncentriranje raztopin:

Pretok črpanja vzorca čez SPE kolonico s peristaltično črpalko: $\approx 2 \text{ mL min}^{-1}$.

Potek ekstrakcije:

- aktivacija oz. regeneracija ekstrakcijske kolonice s spiranjem z metanolom 2,5 min;
- spiranje s prečiščeno vodo ("Milli Q" voda) 2,5 min;
- črpanje vzorca 2,5 min;
- spiranje s prečiščeno vodo ("Milli Q" voda) 2,5 min.

Injiciranje ekstrakta:

- elucija spojin z ekstrakcijske kolonice z mobilno fazo na analizno kolono v nasprotni smeri od črpanja vzorca ("back-flush").

B. Izkoristek ekstrakcije:

Iz osnovne standardne raztopine CAP (50 mg L^{-1}) pripravite v 10 mL merilni bučki razredčeno standardno raztopino CAP v prečiščeni vodi s koncentracijo $0,25 \text{ mg L}^{-1}$. Za določitev izkoristka ekstrakcije za kloramfenikol primerjajte ploščino vrha, ki jo dobite pri direktnem injiciranju osnovne standardne raztopine CAP (50 mg L^{-1}) s ploščino vrha, ki jo dobite po predkoncentraciji razredčene standardne raztopine CAP ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$), kot je opisano pod točko A.

C. Ocena koncentracije kloramfenikola v medu:

V 100 mL merilno bučko natehtajte 1 g medu in dopolnite do oznake s prečiščeno vodo. Premešajte in raztopino predkoncentrirajte po postopku pod točko A. S primerjavo ploščine kromatografskega vrha za CAP po predkoncentraciji raztopine medu in ploščine po predkoncentraciji razredčene standardne raztopine CAP ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$) določite približno vsebnost kloramfenikola v raztopini medu.

D. Določitev koncentracije kloramfenikola z metodo standardnih dodatkov:

Izračunajte in odmerite potrebno količino osnovne standardne raztopine CAP (50 mg L^{-1}) v 10 mL merilno bučko, ki jo do oznake dopolnete z raztopino medu, da se bo vsebnost CAP enkrat, dvakrat oziroma trikrat povečala. Za vsako raztopino ponovite postopek predkoncentracije in elucije na analizno kolono (glejte točko A).

Meritve:

	SR 50 mg L^{-1}	SR $0,25 \text{ mg L}^{-1}$	Vzorec	Vz.+SD1	Vz.+SD2	Vz.+SD3
Ploščina krom. vrha						

Rezultat:

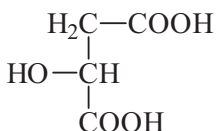
Napišite pogoje dela na tekočinskem kromatografu (kolona – stacionarna faza, dimenzije; mobilna faza – sestava, pretok; način in pogoji detekcije spojine, prostornina injiciranega vzorca).

Podajte koncentracijo kloramfenikola v medu v mg kg^{-1} .

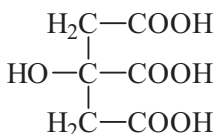
6.12 Določitev organskih kislin s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC)

Osnove:

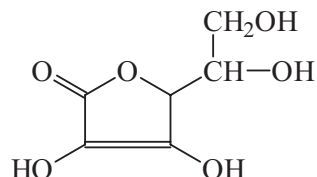
Jabolčna, citronska in askorbinska kislina so organske kisline, ki so naravno prisotne v sadju in zelenjavi. Askorbinsko kislino prištevamo med vitamine – vitamin C.



jabolčna kislina



citronska kislina



askorbinska kislina

Strukturne formule določevanih organskih kislin.

Za separacijo in identifikacijo organskih kislin lahko uporabljamo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) (str. 26). Kisline ločujemo na nepolarnih kolonah, uporabljamo pa kislno vodno mobilno fazo (pH 2–3). Kisline detektiramo z UV-detektorjem pri 220 nm, kjer absorbira karbonilna skupina. Če imajo kisline v svoji strukturi dvojne vezi, jih lahko detektiramo tudi pri 254 nm. Absorpcija svetlobe je v tem primeru dosti močnejša, zato je meja zaznavnosti za takšne kisline dosti nižja.

Naloga:

- Določite retencijske čase za jabolčno, citronsko in askorbinsko kislino.
- Določite koncentracijo posameznih organskih kislin v vzorcu.

Reagenti:

Standardne raztopine jabolčne in citronske kisline s koncentracijo 0,5 g L⁻¹ ter askorbinske kisline s koncentracijo 16 mg L⁻¹.

Inštrumentacija:

Tekočinski kromatograf (HPLC).

Postopki:

A. Priprava standardnih raztopin:

Pripravite pet standardnih raztopin kislin v 10 mL merilnih bučkah. Koncentracijsko območje za jabolčno in citronsko kislino naj bo od $0,1 \text{ g L}^{-1}$ do $0,5 \text{ g L}^{-1}$, za askorbinsko kislino pa od 2 mg L^{-1} do 16 mg L^{-1} .

B. Analiza s tekočinsko kromatografijo:

Standardne raztopine in vzorec najprej direktno injicirajte. Glede na ploščine vrhov za posamezno organsko kislino v vzorcu le-tega ustrezno razredčite in ponovno trikrat injicirajte.

Meritve:

kislina	t_R/min	ploščine vrhov							
		SR 1	SR 2	SR 3	SR 4	SR 5	vzorec prvič	vzorec drugič	vzorec tretjič
jabolčna									
citronska									
askorbinska									

Rezultat:

Napišite pogoje dela na tekočinskem kromatografu (kolona – stacionarna faza, dimenzije; mobilna faza – sestava, pretok; način in pogoji detekcije spojine, prostornina injiciranega vzorca).

Določite retencijske čase organskih kislin pri izbranih kromatografskih pogojih.

Določite vsebnost posameznih organskih kislin v vzorcih s pomočjo umeritvenih premic (str. 11–12). Rezultat podajte kot srednjo vrednost treh določitev z relativnim standardnim odklikom (str. 9).

7 UPORABLJENA LITERATURA

D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler: *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 5. izd., Saunders College Publ., Fort Worth 1988, ZDA.

D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman: *Principles of Instrumental Analysis*, 5. izd., Saunders College Publ., Philadelphia 1998, ZDA.

D. Voet, J. G. Voet: *Biochemistry*, 2. izd., John Wiley & Sons Inc., New York 1995, ZDA.

Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 16. izd., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg 1997, ZDA.

Eurachem Guide: *The Fitness for Purpose of Analytical Methods*, Internet Version, Eurachem Working Group 1998.

N. Bajt, S. Škerlavaj – Golec, I. Štrumbelj – Drusany: *Živilska tehnologija, vaje*, II. zvezek: Olja, sadje, zelenjava, alkoholne pijače, Zavod RS za šolstvo, Ljubljana 2001.

A. Plestenjak, T. Golob: *Analiza kakovosti živil*, UL – BF Oddelek za živilstvo, Ljubljana 1996.

V. Abram, M. Zelenik – Blatnik: *Vaje iz živilske kemije za študente živilske tehnologije*, 2. izd., UL – BF Oddelek za živilstvo, Ljubljana 2002.

T. Košmerl, M. Kač: *Osnovne kemijske analize mošta in vina*, UL – BF Oddelek za živilstvo, Ljubljana 2003.

T. Komac: *Določanje nekaterih organskih spojin v vinih*, diplomsko delo, UL – FKKT, Ljubljana 1997.

V. Zupančič: *Določevanje pesticidov v zeliščih*, diplomsko delo, UL – FKKT, Ljubljana 2003.

W. Schröter, K.–H. Lautenschläger, H. Bibrack, A. Schnabel, *Kemija, splošni priročnik*, Tehniška založba Slovenije, Ljubljana 1993.

M. Bader: *A Systematic Approach to Standard Addition Methods in Instrumental Analysis*, *Journal of Chemical Education*, oktober 1980, volumen 57, številka 10, strani 703–706.