

Določanje vsebnosti elementov in vitamina C

1. Določanje vsebnosti elementov

1.1 Železo v moki, obroku in konz. zelenjavi

Princip:

Določanje temelji na fotometričnem merjenju barve, ki nastane pri reakciji sulfosalicilne kisline z Fe^{2+} in Fe^{3+} .

Pribor:

- žarilni lonček
- 5 ml merilni valj,
- 50 ml merilna bučka
- steklen lij, filtrirni papir

Reagenti:

- 20 % HCl
- 5 % HCl
- 10 % 5-sulfosalicilna kislina ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_6\text{S} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 25 % NH_3

Izvedba:

5 do 10 g ($\pm 0,1$ mg) moke / živila natehtamo v žarilni lonček, prežarimo najprej na električni plošči, nato v pečici pri 550°C .

Ohladimo v eksikatorju in topimo v 5 ml 20 % HCl. Na vodni kopeli izparimo do suhega ter končno raztopimo v 5 ml 5 % HCl.

Vsebino filtriramo v 50 ml merilno bučko in dopolnimo do oznake. V isto 50 ml merilno bučko odpipetiramo alikvoten del raztopine vzorca (npr. 10 ml; 20 ml pri pšenični moki). Dodamo 5 ml 10 % sulfosalicilne kisline, pri čemer se raztopina obarva rdeče. Nato dodamo razt. NH_3 , da se barva spremeni v rumeno (10 kapljic). Dodamo še prebitek, in sicer 0,5-1 ml razt. NH_3 (10-20 kapljic). Dopolnimo do 50 ml in fotometričemo pri 430 nm. Enako postopamo s standardi. Koncentracijo železa v vzorcu odčitamo iz umeritvene krivulje ali izračunamo po Lambert-Beerovem zakonu.

Račun:

$$\text{mg Fe}/100 \text{ g vzorca} = \frac{E_x \cdot C_s}{E_s} \cdot \frac{100}{\text{odtehta}} \cdot R$$

E_x = ekstinkcija vzorca

C_s = koncentracija standarda

E_s = ekstinkcija standarda

Standardna raztopina:

0,967g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /100 ml

1 ml = 2 mg Fe

Standard 25-krat razredimo.

1 ml = 0,08 mg Fe

Umeritvena krivulja:

Na enak način pripravimo umeritveno krivuljo, le da namesto raztopine vzorca odmerimo od 0 do 1,0 ml razred ene standardne raztopine, kar predstavlja od 0 do 0,08 mg Fe/50 ml:

Oznaka buke	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ml. st. razt.	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,7	0,8
mg Fe/50ml	0	0,004	0,008	0,016	0,024	0,032	0,04	0,056	0,064

Ocena:

Naša pšenica vsebuje v 100 g približno 3,5 mg Fe, ki je pretežno v zunanji ovojnici zrna. Za moko veljajo naslednje orientacijske vrednosti:

- pšeni na moka tip "400" 0,6 mg Fe/100 g
- pšeni na moka tip "1100" 2,1 mg Fe/100 g
- prosena moka 6,8 mg Fe/100 g
- sojina moka 8,4 mg Fe/100 g
- ržena moka 2,0 mg Fe/100 g
- ajdova moka 2,8 mg Fe/100 g
- koruzna moka 1,2 mg Fe/100 g

1.2 Kompleksometrično določanje Ca in Mg v mleku

Kompleksometrične metode temeljijo na sposobnosti ionov nekaterih kovin, da dajejo s kompleksonom III - ali etilen-diamin-tetraacetatom (kratko EDTA) stabilne komplekse.

Princip:

- Določanje Ca in Mg: Mo no razred enemu mleku dodamo pri pH 12-12,5 določimo en prebitok EDTA. Ca in Mg v mleku se vežeta z EDTA v kompleks. Prebitok EDTA titriramo s standardno raztopino CaCl_2 . Kot indikator uporabljamo mureksid (amonijev purpurat). Temno vijolična barva preide v ciklam rdečo.
- Določanje samega Mg: pH zvišamo na 13 do 13,5. Pri tem se Mg iz kompleksa z EDTA obori kot $\text{Mg}(\text{OH})_2$ in sprosti ekvivalentno količino EDTA, ki jo titriramo naprej s CaCl_2 . Ta druga titracija dokazuje ekvivalent Mg.
- Vsebnost Ca izračunamo tako, da od presežka EDTA odštejemo obe porabi CaCl_2 .

Reagenti:

- 0,02 M EDTA: 7,444 g EDTA s krist. vodo/1000 ml. To je C_M EDTA določimo s to je 0,02 M CaCl_2 pri pH 13. Hranimo v polietilenski steklenici (steklo vsebuje Ca).
- 0,02 M CaCl_2 : CaCO_3 sušimo do konst. teže pri 100° C. Odtehtamo to je 2 g CaCO_3 , ga spravimo v 1000 ml merilno bučko, topimo v malo c. HCl, dokler ne prenehajo izhajati mehurčki CO_2 , nato dopolnimo z vodo do oznake. Hranimo v polietilenski steklenici.
- 8 M KOH (44,8 g/100 ml)
- mureksid: mešanica mureksida in NaCl ali KCl (1 : 25)

Za pripravo vseh reagentov uporabljamo bidest. v. ali dest. v. brez Ca!

Pribor:

- 200 ml merilne bučke,

- 0,2 ml pipeta ali 1 ml graduirana
- 5 ml, 10 ml, 50 ml pipete
- 2 ml ali 5 ml graduirana pipeta
- 5 ml mikro bireta

Izvedba:

Vzorec mleka dobro premešamo, odpipetiramo 10 ml v 200 ml merilno bučko in dopolnimo z bidest. vodo do oznake. 50 ml tako razredjenega mleka odpipetiramo v 100 ml erlenmajerico in dodamo s pipeto 5 ml 0,02 M EDTA - presežek.

Določitev Ca + Mg

Tej raztopini s kapalko dodamo ca 0,2 ml KOH (pH = 12-12,5) in noževno konico mureksida. Raztopina se obarva temno vijolično. Presežek EDTA titriramo iz mikrobirete s CaCl₂ do ciklamno rdeče barve (ml CaCl₂ = v₁).

Določitev Mg

Isti raztopini dodamo še ca 1,5 ml KOH (8 M, pH 13-13,5). Pri tem se Mg, vezan na EDTA, obori kot Mg(OH)₂, sprosti se ekvivalentna količina EDTA in mureksid se zopet obarva temno vijolično. Nadaljujemo titracijo s CaCl₂ do ponovnega preskoka barve (ml CaCl₂ = v₂).

Razračun:

Izračunamo vsebnost Mg:

$$\frac{m(\text{Mg})}{M(\text{Mg})} = c(\text{CaCl}_2) \cdot v(\text{CaCl}_2)$$

$$\text{mg Mg/l mleka} = c(\text{CaCl}_2) \cdot v_2(\text{CaCl}_2) \cdot M(\text{Mg}) \cdot R$$

v₂ = ml CaCl₂ (poraba pri drugi titraciji)

M(Mg) = 24,3

R = 400

Izračunamo vsebnost Ca:

$$\text{mg Ca/l mleka} = [V_{\text{EDTA}} \cdot T - (v_1 + v_2)] \cdot c(\text{CaCl}_2) \cdot M(\text{Ca}) \cdot R$$

v₁ = ml CaCl₂ (poraba pri prvi titraciji)

v₂ = ml CaCl₂ (poraba pri drugi titraciji)

M(Ca) = 40,08

R = 400

T = razmerje med v(CaCl₂) in v(EDTA) pri medsebojni titraciji

$$T = \frac{v(\text{CaCl}_2)}{v(\text{EDTA})} = \frac{\text{ml CaCl}_2}{5 \text{ ml EDTA}}$$

Ocena:

Vsebnost Ca v mleku je 1100 do 1300 mg/l, vsebnost Mg pa 90 do 140 mg/l.

1.3 Merjenje električne prevodnosti medu

Merjenje specifične električne prevodnosti lahko služi kot koristna informacija o kakovosti in morebitni potvorjenosti medu, lahko pa je v pomoč tudi pri določanju vrste medu.

Princip:

Merjenje električne prevodnosti raztopine medu s konduktometrom proizvajalca KÜBLER.

Reagenti:

- destilirana ali deionizirana voda

Pribor:

- merilna posoda (lonček)
- aša
- pipeta
- plastična žlička
- konduktometer

Opomba: Ne dotikajte se kovinskih delov aparata!

Izvedba:

Med, ki smo mu že izmerili vsebnost vode, zajamemo s plastično žličko in z njim dober, brez zračnih mehurčkov, napolnimo merilni lonček. Z ravnim delom žličke odrežemo odvečni med. Med, ki ostane na zunanji strani lončka, popolnoma odstranimo. Tako napolnjen lonček v poljubni legi položimo v ašo in dodamo potrebno količino vode.

Volumen vode, potrebne za pripravo raztopine medu, je odvisen od tega, koliko vode oz. suhe snovi vsebuje med. Odčitamo ga iz diagrama 1. Izhajamo iz % vode ali % suhe snovi (desna ali leva skala diagrama). Opomba: Volumen vode, ki ga odčitamo iz diagrama, velja le, če uporabljamo pripadajoči originalni lonček.

Mešamo s plastično žličko tako dolgo, da se med popolnoma raztopi.

Pred merjenjem speremo konduktometer z destilirano vodo in posušimo s papirnato brisačo. Aparat potopimo približno 4 cm globoko v raztopino medu; s tresenjem nekaj sekund mešamo, pustimo aparat v raztopini in preverimo, da na elektrodah ni zračnih mehurčkov (če so na elektrodah mehurčki, aparat dvignemo iz raztopine in ga nekajkrat lahko stresemo). Aparat mirno držimo, tako, da se ne dotika dna in pazimo, da se na okencu pokaže izmerjena vrednost. Izmerjeno vrednost delimo s tisoč. Rezultat je "električna prevodnost vzorca medu". Enota je mS/cm (milisimens na centimeter).

Tabela: Električna prevodnost različnih vrst medu

vrsta	Električna prevodnost (mS/cm)	
	vir: Leo Kuebler	slovenski med (orientacijsko)
ista razt. sladkorja	okrog 0,1	
cvetlični med	0,08 - 0,18	0,33 – 0,80
kostanjev med	0,8 - 1,4	0,96 – 2,25
gozdni med	1,0 - 1,6	0,8 – 1,7
akacijev med		0,08 – 0,25
lipov med		0,60 – 1,00
smrekov med		0,92 – 1,63
hojev med		0,89 – 1,57

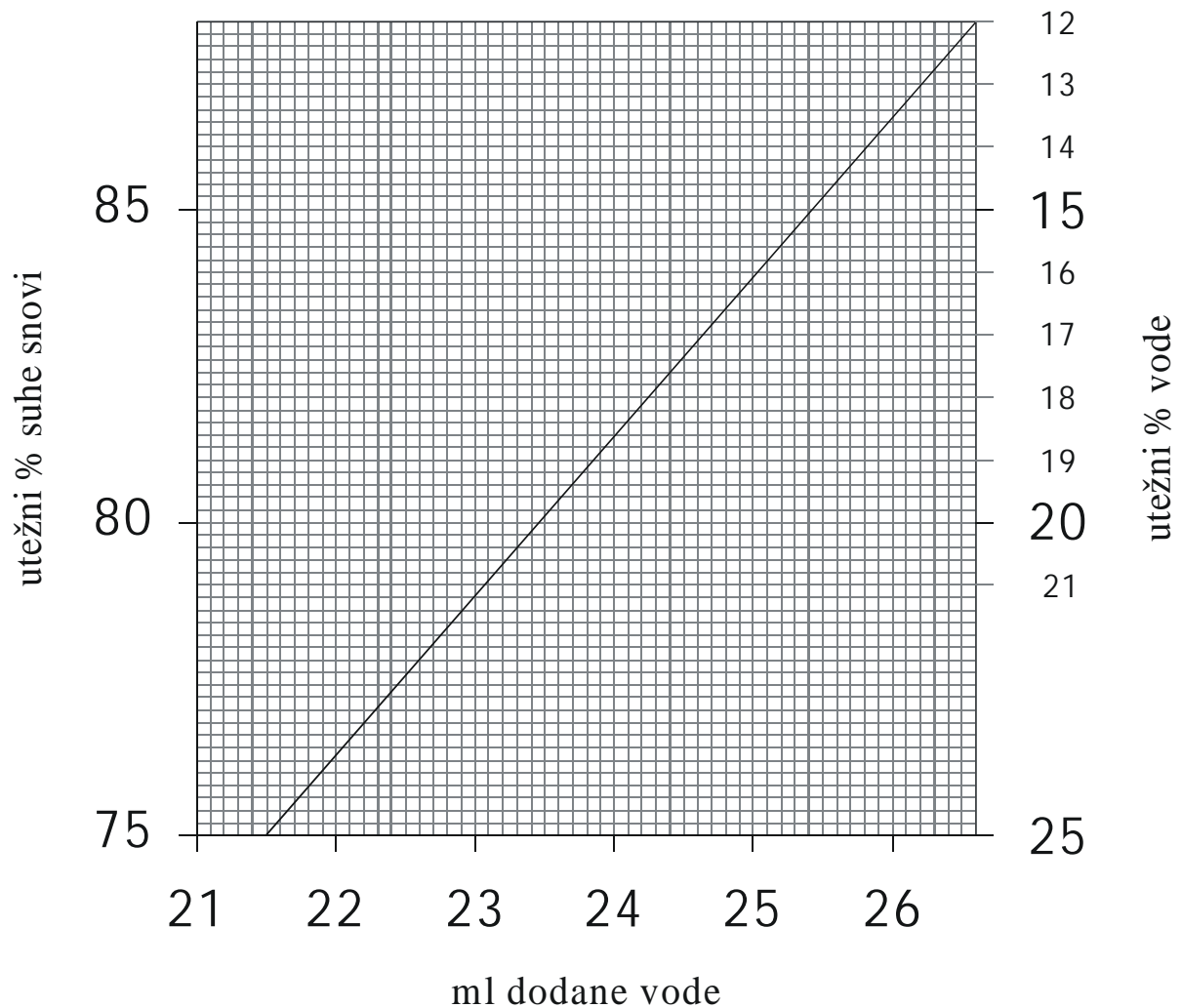


Diagram 1: Volumen dodane vode glede na izmerjen % vode (% suhe snovi) v medu

1.4 Določanje NaCl po Mohru v mesu in mesnih izdelkih, konzervah zelenjavi in obroku

Princip:

Titracija kloridov z AgNO_3 v nevtralnem ali slabo alkalnem mediju, indikator je raztopina K_2CrO_4 .

Reagenti:

- 0,1 M AgNO_3
- nasičena raztopina K_2CrO_4
- kremen ev pesek brez Cl^-
- razredena NaOH

Pribor:

- terilnica
- 100 ml merilna bučka
- vodna kopel

- bireta

Izvedba:

2 g ($\pm 0,001$) mesa tremo s peskom v terilnici ob dodatku 2 do 3 ml vode. To kvantitativno speremo v 100 ml merilno bučko s ca 50 ml vode. Zra no suh vzorec natehtamo v ašo in speremo v 100 ml merilno bučko s ca 50 ml vode. Dobro premešamo in postavimo za 15 minut v vrelo vodno kopel. Po ohlajitvi v mrzli vodi dopolnimo do oznake, premešamo in filtriramo. 20 ml bistrega filtrata odpipetiramo v erlenmajerico in titriramo z 0,1 N AgNO₃ ob prisotnosti par kapljic K₂CrO₄ do nastanka rde kaste barve oz. oborine. Če filtrat reagira kislo (lakmus), ga pred titracijo previdno nevtraliziramo z razred enim NaOH.

Račun:

$$\% \text{ NaCl} = \frac{b \cdot 5 \cdot 0,0059}{a} \cdot 100$$

a = odtehta vzorca (g)

b = poraba AgNO₃ (ml)

1 ml 0,1 N AgNO₃ = 0,0059 g NaCl

Rezultat:

..... % NaCl v vzorcu.

2. Določanje vsebnosti vitamina C

2.1 Titracijsko določanje vitamina C v sadnem soku in medu

Princip:

Askorbinska kislina je močan reducent in kot taka jo lahko določimo s titracijo z oksidanti ali tako, da dodamo oksidant v prebitku in ta prebitek reduciramo nazaj z reducentom. Najpogosteje izvedemo direktno titracijo, in sicer z oksidantom diklor-fenol-indofenolom.

Opozorilo: Kvantitativno reakcijo motijo drugi reducenti, kot so fenoli, železovi in bakrovi ioni itd. Zato naj postopki potekajo čim hitreje.

Reagenti:

- 2-6 diklorofenolindofenol (DI), priprava: 200 mg DI topimo v 8 ml vrele dest. vode. Kvantitativno prelijemo v 500 ml merilno bučko, dopolnimo do oznake (1 ml = 0,24 mg askorbinske kisline). Raztopina je uporabna 3-4 dni.
- 10 % očetna kislina
- askorbinska kislina p. a. za standardizacijo DI-reagenta

Pribor:

- 5 ml ali 10 ml pipeta
- 25 ali 50 ml bireta

Izvedba (za bistre in skoraj brezbarvne sokove):

Odpipetiramo nekaj ml soka (npr. 4 ml) v erlenmajerico in razredimo z dest. vodo do ca 150 ml, dodamo 5 ml 10 % očetne kisline in titriramo z DI-reagentom do rdeče barve, obstojne 15 sekund.

Slepi vzorec:

Ker porabita voda in očetna kislina nekaj DI-barvila za svoje obarvanje do rdeče barve, moramo to napako odšteti, zato vzporedno z vzorcem naredimo slepi vzorec. 150 ml vode nakisamo s 5 ml 10 % očetne kisline in titriramo iz mikrobirete kot pri vzorcu, vendar le po 0,1 ml DI-reagenta.

Standardizacija DI - raztopine

Pripravimo si raztopino, ki vsebuje 0,24 mg askorbinske kisline v 1 ml. Npr. 0,120 g raztopimo v dest. vodi v 500 ml merilni buki. 5 ml te raztopine (1,2 mg askorb. kisl.) odpipetiramo v erlenmajerico, dodamo 150 ml dest. vode in 5 ml 10 % očetne kisline in titriramo z DI raztopino.

$$f_{DI} = \frac{5 \text{ ml}}{\text{ml DI}}$$

Račun:

ml glavne titracije - ml slepega vzorca = ml DI za npr. 4 ml soka

1 ml DI = 0,24 mg vitamina C

$$\text{mg vit. C/l soka} = \frac{\text{ml DI} \cdot f_{DI} \cdot 0,24}{\text{ml(soka)}} \cdot 1000$$

Rezultat:

Analizirani sadni sok vsebuje mg vitamina C/l.

2.2 HPLC določanje vitamina C v sadnem soku in medu

Princip:

Stabilizacija L-askorbinske kisline (L-AK) z metafosforno kislino ter določitev vsebnosti vitamina C z uporabo tekoinske kromatografije visoke loljivosti.

Reagenti:

- 1,5 % metafosforna kislina: 15 g $(\text{HPO}_3)_n$ raztopimo v bidestilirani vodi in razredimo do 1000 ml. Po določenem času metafosforna kislina hidrolizira v o-fosforno kislino, zato vsaki pripravimo svežo.
- izhodna standardna raztopina L-AK: odtehtamo 100 mg L-AK, raztopimo in razredimo do 100 ml z 1,5 % $(\text{HPO}_3)_n$. Pripravimo svežo.
- standardne raztopine L-AK 3 koncentracij: 1, 4 in 7 ml izhodne standardne raztopine L-AK odpipetiramo v 100 ml merilno buko in razredimo z 1,5 % $(\text{HPO}_3)_n$ do oznake (c = 10, 40 in 70 mg/l). Pripravimo sveže.

Kromatografski pogoji:

Gradientna naprava: Maxi Star, Knauer

Kolona: Aminex HPX - 87H, 300 x 7,8 mm; Bio - Rad

Mobilna faza: 0,005 M H_2SO_4

Pretok mobilne faze: 0,6 ml/min

Volumen injiciranja: 10 μl

Detektor: UV - VIS, 245 nm, Knauer

Izvedba:

V vialo odmerimo ustrezen volumen oz. maso ($\pm 0,01$ g) soka glede na priporočeno vsebnost vitamina C (npr. 2 g multivitaminskega, 4 g pomarančnega, 10 g jabolčnega) in dopolnimo z 1,5 % raztopino $(\text{HPO}_3)_n$ do 20 g. Dobro premešamo in ekstrahiramo 10 minut na sobni temperaturi. Prelijemo v ependorfko in centrifugiramo 15 minut pri 0°C in 4000 obratih. Supernatant nato prefiltriramo skozi Milipore filter ($0,45\ \mu\text{m}$) v vialo. Tako pripravljen vzorec injiciramo v kolono HPLC.

Račun:

Po končanem kromatografskem ločenju dobimo kromatogram. Iz znanih površin kromatografskega vrha L-AK za standardne raztopine L-AK, njihovih koncentracij in površin kromatografskih vrhov, ki jih dobimo pri analizi vzorcev soka, izračunamo koncentracijo vitamina C v soku. Upoštevamo faktor razreditve vzorca (npr. 10, 5, 2).

Rezultat:

Analizirani sadni sok vsebuje mg vitamina C/l.