



Janja KRISTL



Kemijske analizne metode v kmetijstvu in toksične snovi v ekosistemih

Navodila za laboratorijske vaje





Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo
in biosistemske vede

Kemijske analizne metode v kmetijstvu in toksične snovi v ekosistemih

Navodila za laboratorijske vaje

Avtorica
Janja Kristl

Februar 2022

Naslov <i>Title</i>	Kemijske analizne metode v kmetijstvu in toksične snovi v ekosistemi <i>Chemical Analytical Methods in Agriculture and Toxic Compounds in Ecosystems</i>	
Podnaslov <i>Subtitle</i>	Navodila za laboratorijske vaje <i>Instructions for Laboratory Exercises</i>	
Avtorica <i>Author</i>	Janja Kristl (Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede)	
Recenzija <i>Review</i>	Mitja Kolar (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo)	
	Tomaž Langerholc (Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede)	
Jezikovni pregled <i>Language editing</i>	Mojca Garantini (Univerza v Mariboru)	
Tehnični urednik <i>Technical editor</i>	Jan Perša (Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba)	
Oblikovanje ovitka <i>Cover designer</i>	Jan Perša (Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba)	
Grafike na ovitku <i>Cover graphics</i>	Vinograd Gradišče, Zgornji Leskovec, foto: Jan Perša, 2022 Chemie, avtor: fischnase69, Pixabay.com CC0, 2022	
Grafične priloge <i>Graphic material</i>	Avtorica	
Založnik <i>Published by</i>	Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba Slomškovo trg 15, 2000 Maribor, Slovenija https://press.um.si , zalozba@um.si	
Izdajatelj <i>Issued by</i>	Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede Pivola 10, 2311 Hoče, Slovenija https://www.fkbv.um.si , fkbv@um.si	
Izdaja <i>Edition</i>	Prva izdaja	Izdano <i>Published at</i> Maribor, februar 2022
Vrsta publikacije <i>Publication type</i>	E-knjiga	Dostopno na <i>Available at</i> https://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/654

CIP - Kataložni zapis o publikaciji
Univerzitetna knjižnica Maribor

54:631 (076.5) (0.034.2)

KRISTL, Janja

Kemijske analizne metode v kmetijstvu in toksične snovi v ekosistemi : navodila za laboratorijske vaje [Elektronski vir] / avtorica Janja Kristl. - 1. izd. - E-publikacija. - Maribor : Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba, 2022

Način dostopa (URL):

<https://press.um.si/index.php/ump/catalog/book/654>

ISBN 978-961-286-571-9

doi: 10.18690/um.fkbv.2.2022

COBISS.SI-ID 97381123



© Univerza v Mariboru, Univerzitetna založba
/ University of Maribor, University Press
Besedilo / Text © Kristl, 2022

To delo je objavljeno pod licenco Creative Commons Priznanje avtorstva 4.0 Mednarodna. / *This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.*

Uporabnikom je dovoljeno tako nekomercialno kot tudi komercialno reproduciranje, distribuiranje, dajanje v najem, javna priobčitev in predelava avtorskega dela, pod pogojem, da navedejo avtorja izvirnega dela.

Vsa gradiva tretjih oseb v tej knjigi so objavljena pod licenco Creative Commons, razen če to ni navedeno drugače. Če želite ponovno uporabiti gradivo tretjih oseb, ki ni zajeto v licenci Creative Commons, boste morali pridobiti dovoljenje neposredno od imetnika avtorskih pravic.

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

ISBN 978-961-286-571-9 (pdf)

DOI <https://doi.org/10.18690/um.fkbv.2.2022>

Cena
Price Brezplačni izvod

Odgovorna oseba založnika
For publisher prof. dr. Zdravko Kačič,
rektor Univerze v Mariboru

Citiranje
Attribution Kristl J. (2022). *Kemijske analizne metode v kmetijstvu in toksične snovi v ekosistemi: navodila za laboratorijske vaje*. Maribor: Univerzitetna založba. doi: 10.18690/um.fkbv.2.20222

Kazalo

Predgovor	1
Delo in varnost v laboratoriju	3
1 Določanje NaCl v živilih z obarjalno titracijo po Mohru	9
1.1 Teoretične osnove	9
1.2 Izvedba vaje.....	11
2 Določitev proteinov s Kjeldahlovo metodo	13
2.1 Teoretične osnove	13
2.2 Izvedba vaje.....	15
3 Določanje koncentracije rastlinam dostopnega bakra v talnih vzorcih s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo	19
3.1 Teoretične osnove	19
3.2 Izvedba vaje.....	22
4 Določitev skupnih fenolov z molekulsko absorpcijsko spektrometrijo	25
4.1 Teoretične osnove	25
4.2 Izvedba vaje.....	27
5 Določitev sladkorjev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti	31
5.1 Teoretične osnove	31
5.2 Izvedba vaje.....	34
6 Določitev izmenljivih frakcij svinca v talnih vzorcih z atomsko absorpcijsko spektrometrijo	37
6.1 Teoretične osnove	37
6.2 Izvedba vaje.....	39
7 Določitev vsebnosti oksalatov v sadju in zelenjavi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti	43
7.1 Teoretične osnove	43
7.2 Izvedba vaje.....	44
8 Kvalitativna določitev nitrata v zelenjavi	47
8.1 Teoretične osnove	47
8.2 Izvedba vaje.....	48

9	Spektrofotometrično določanje skupnega cianida	51
9.1	Teoretične osnove	51
9.2	Izvedba vaje.....	53
10	Določitev žveplovega dioksida (SO₂) v vinu po Rebeleinu	57
10.1	Teoretične osnove	57
10.2	Izvedba vaje.....	59
11	Kvalitativni testi za dokaz prisotnosti naravnih in umetnih barvil v živilih.....	63
11.1	Teoretične osnove	63
11.2	Izvedba vaje.....	64
	Priloga: Laboratorijski dnevnik.....	69

Predgovor

Navodila za vaje so namenjena študentom prvega letnika magistrskega študijskega programa Kmetijstvo. Vaje dopolnjujejo nekatere vsebinske sklope predavanj pri predmetih Kemijske analitične metode v kmetijstvu in Toksične snovi v ekosistemih. Vrstni red vaj je zasnovan tako, da vsebinsko sledijo osnovnim teoretičnim znanjem, ki so obravnavana na predavanjih. Študentu pomagajo razumeti posamezne pojme in laboratorijske postopke. Pri vsaki vaji so na kratko predstavljene teoretične osnove, ki so potrebne za razumevanje določene tematike in izvedbe eksperimenta. Sledi seznam potrebne opreme in priprava reagentov, ki jih v večini primerov na vajah neposredno ne boste pripravljali. Za uspešno izvedbo vaje natančno preberite navodila in se držite predpisanih postopkov. Če česa ne razumete, vprašajte asistenta za dodatno razlago. Ko ste z eksperimentalnim delom končali, preverite, ali ste umili in pospravili vse, kar ste uporabljali.

Delo in varnost v laboratoriju

Pri laboratorijskih vajah upoštevajte pravila za varno delo v laboratoriju in se strogo držite napotkov, ki jih dobite od asistenta. Ta vas bo seznanil o osnovnih lastnostih kemikalij, ki jih boste pri izvedbi vaje uporabljali (varnostni list). Kakršnokoli nezgodo ali poškodbo takoj sporočite asistentu oziroma osebi, ki vodi vaje. Pravila veljajo za vse, ki se v laboratoriju nahajajo.

Pravila za varno delo v laboratoriju

Steklovina

- Ne uporabljajte počene steklovine ali steklovine, na kateri so vidne praske;
- segreto steklovino ohlajajte počasi;
- ne segrevajte zaprtih steklenih posod;
- pri prenašanju steklenic uporabite obe roki;
- če steklenih obrusov ne morete ločiti, prosite za pomoč asistenta.

Električne naprave

- Pred priključitvijo aparatur na električno omrežje se prepričajte, ali so stikala na aparaturi v položaju izklop;

- ne (po)vlecite sunkovito vtikača iz vtičnice;
- z električno opremo ne rokujte z mokrimi rokami;
- v bližini aparaturne ne sme biti vnetljivih snovi;
- električni podaljšek uporabite le, kadar je nujno in čim krajši čas;
- preverite, ali je površina pod aparaturami suha (ni mokra);
- po končanem delu izklopite električne naprave.

Kemikalije

- Uporabljajte samo označene kemikalije;
- pred uporabo se prepričajte, ali ste izbrali pravo (v navodilih za vajo preverite ime in koncentracijo in primerjajte z zapisom na posodi);
- različne kemikalije združujte le, če je taka zahteva v navodilih za vaje;
- kemikalij nikoli ne okušajte;
- pipetirajte samo z nastavkom za pipeto (uporaba nastavka za pipeto je obvezna);
- pri delu se ne dotikajte oči;
- kislino vedno dodajate v vodo, nikoli obratno;
- ne vlivajte vroče vode (nad 90 °C) v kemikalije;
- ne zlivajte kemikalij v pomivalna korita (v odtoke);
- odpadne kemikalije zbiramo v posebnih posodah;
- ne odnašajte kemikalij iz laboratorija;
- zaradi varnosti ne postavljajte kemikalij na rob delovnega pulta;
- posodo, v katero ste shranili, vzorec takoj označite;
- s snovmi, ki so zdravju škodljive (mutagene, rakotvorne, akutno strupene) in hlapne, delamo samo v digestoriju;
- med laboratoriji lahko kemikalije prenašate le v zaprti embalaži z uporabo vozička ali košare.

Laboratorijski red

- Delo v laboratoriju je dovoljeno v času izvajanja laboratorijskih vaj;
- poškodovanih aparaturne in laboratorijskega inventarja ne uporabljate;
- v laboratorij ni dovoljeno prinašati hrane in pijač;
- hranjenje hrane in pijač v laboratorijskih hladilnikih ni dovoljeno;

- dolge lase morate speti;
- uporaba mobilnega telefona in prenosnikov je prepovedana;
- po končanem delu si obvezno umijte roke.



Pri praktični izvedbi vaj v laboratoriju je obvezna oprema študenta




- Navodila za vaje;
- zaščitna halja z dolgimi rokavi, ki sega vsaj do kolen (100 % bombaž);
- zaščitne rokavice;
- zaščitna očala;
- primerna obutev (uporaba natikačev in sandal ni dovoljena).

Piktogrami




Piktogrami so črni znaki na beli podlagi in imajo rdečo obrobo. Označujejo vrsto nevarnosti, ki je povezana z uporabo nevarne snovi ali zmesi. Piktogramov je devet in jih po GHS (Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals) delimo v tri skupine: znake za fizikalno nevarnost, znake za nevarnosti za zdravje in znake za nevarnost v okolju.


Fizikalne nevarnosti

Piktogram	Razred in kategorija nevarnosti
 <p>GHS 01</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Nestabilni eksplozivi in eksplozivi, ki ne spadajo med nestabilne eksplozive; – samoreaktivne snovi in zmesi; – organski peroksidi.
 <p>GHS 02</p>	<p>Vnetljivi plini, aerosoli, tekočine in trdne snovi:</p> <ul style="list-style-type: none"> – samoreaktivne snovi in zmesi; – piroforne tekočine in trdne snovi, ki v stiku z zrakom lahko povzročijo požar; – samosegrevajoče se snovi in zmesi; – snovi in zmesi, ki v stiku z vodo sproščajo vnetljive pline; – organski peroksidi, ki pri segrevanju lahko povzročijo požar.


Piktogram	Razred in kategorija nevarnosti
 <p>GHS 03</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Oksidativni plini, tekočine in trdne snovi, ki lahko ob prisotnosti kisika povzročijo eksplozijo ali požar ali pa le-tega okrepijo.
 <p>GHS 04</p>	<p>Plini pod tlakom:</p> <ul style="list-style-type: none"> – stisnjeni plini – lahko povzročijo eksplozijo; – utekočinjeni plini – ohlajeni utekočinjeni plini lahko povzročijo ozeblino in poškodbe; – raztopljeni plini – segrevanje lahko povzroči eksplozijo.
 <p>GHS 05</p>	<p>Jedka snov za kovine.</p>

Nevarnosti za zdravje

Piktogram	Razred in kategorija nevarnosti
 <p>GHS 05</p>	<p>Jedka snov, ki lahko povzroči hude opekline kože in poškodbe oči.</p>
 <p>GHS 06</p>	<p>Akutna strupenost po zaužitju, v stiku s kožo in pri vdihavanju.</p>
 <p>GHS 07</p>	<p>Akutno strupena (škodljiva) snov:</p> <ul style="list-style-type: none"> – povzroča draženje kože in oči, preobčutljivost kože; – draži dihalne poti; – ima narkotične učinke, povzroča zaspanost ali omotičnost.

 <p>GHS 08</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Povzročča mutacije in preobčutljivost dihal; – je rakotvorna; – učinkuje na rodnost in nerojenega otroka; – je strupena za posamezne organe – enkratna izpostavljenost; – je strupena za posamezne organe – ponavljajoča se izpostavljenost; – nevarnost pri vdihavanju, pri vstopu v dihalne poti in pri zaužitju je – lahko zdravju škodljiva ali smrtna.
---	---

Nevarnosti za okolje

Piktogram	Razred in kategorija nevarnosti
 <p>GHS 08</p>	<p>Nevarna za vodno okolje.</p>

Vir: ECHA (https://echa.europa.eu/documents/10162/2621167/eu-osha_chemical_hazard_pictograms_leaflet_sl.pdf/727fa2b6-4ebe-42a6-94ce-d376c4470b21)

Prva pomoč

- Vreznine: mesto vreza očistimo in prekrijemo z obližem ali povežemo s povojem;
- opekline hladimo pod hladno vodo;
- pri brizgih jedkih snovi na kožo le-to začnemo takoj spirati s hladno vodo (najmanj 15 minut);
- v primeru brizga v oči le-te začnemo takoj spirati s hladno vodo – spiramo pod pipo za izpiranje oči (Slika 1) najmanj 15 minut;
- SOS (klicna številka 112).



Slika 1: Pipa za spiranje oči

Vir: lasten.

Laboratorijski dnevnik

Študent vodi laboratorijski dnevnik, ki ga pripravi po naslednjih točkah:

1. Naslov vaje in datum
2. Namen vaje
3. Kratek opis dela
4. Meritve
5. Izračuni
6. Rezultati in diskusija

Laboratorijski dnevnik začnite z naslovom vaje, ki mu sledi namen vaje in kratek opis dela, ki ga zapišete tako, da lahko kdorkoli ponovi opisan eksperiment. Ne pozabite zapisati rezultatov meritev in narediti izračunov tam, kjer navodila za vajo to zahtevajo. Rezultate zberete in jih prikažete v obliki preglednic ali grafikonov. Preverite ali se rezultati ujemajo s pričakovanimi vrednostmi in jih komentirajte na način, kot je predviden pri posamezni vaji. Osnutek laboratorijskega dnevnika najdete v Prilogi 1.

Pomanjkljivo izdelane dnevničke vaj dopolnite in jih v ponovni pregled oddajte čim prej, najkasneje pred pristopom na kolokvij oziroma na izpit.

1 Določanje NaCl v živilih z obarjalno titracijo po Mohru

Osnovni pojmi: natrijev klorid, konzerviranje živil, obarjalna titracija, standardna raztopina

Namen vaje: Kloridne ione (Cl^-) v nevtralni ali šibko bazični raztopini vzorca živila titriramo s standardno raztopino srebrovega nitrata (AgNO_3) v prisotnosti indikatorja, ki je po Mohrovi metodi kromatni(VI) ion (CrO_4^{2-}).

1.1 Teoretične osnove

Natrijev klorid

Natrijev klorid (kuhinjska sol) uporabljamo kot sol pri kuhanju in pripravi hrane in ima pomembno tehnološko vlogo pri konzerviranju mnogih živil. Dodajanje soli hrani zaradi konzerviranja se uporablja že tisočletja. Zaradi hlajenja in drugih načinov konzerviranja hrane se je potreba po dodajanju soli zmanjšala, vendar raven natrija, zlasti v predelani hrani, ostaja visoka. Pri nekaterih živilih ima sol še vedno pomembno vlogo pri zmanjševanju rasti patogenov in organizmov, ki kvarijo izdelke in zmanjšujejo rok uporabnosti. Vsebnost soli v živilih ostaja visoka tudi, ker sol izboljša konsistenco in strukturo živil (npr. sir in kruh). Živila z najnižjimi vsebnostmi soli so: sveže sadje in zelenjava, oreščki, stročnice in žita (Institute of medicine (US) Committee on strategies to

reduce sodium intake, 2010). Vsebnost NaCl v konzervirani zelenjavi naj ne bi presegla 3 %. V Evropi je približno 7 % vse proizvedene soli namenjene za uporabo v živilske namene (European Chemicals Agency, 2021).

Človeško telo ne more proizvajati lastne soli, zato potreben dnevni vnos zagotovimo s hrano. V zadnjih desetletjih se je z vnosom tehnološko predelanih živil in dosoljevanjem pri kuhanju in hranjenju vnos soli (in s tem natrija) povečal do te mere, da sol obravnavamo kot pomembno prehransko nevarnost za zdravje. Prekomeren vnos natrija predstavlja tveganje za povišan krvni tlak. Za odraslo populacijo je priporočen dnevni vnos soli do 5 g, fiziološke potrebe po natriju pa odrasla oseba zagotovi z zaužitjem 1,4 g soli na dan. V državah zahodne Evrope vnesemo v organizem 80 % soli z uživanjem predelanih, pol pripravljenih in pripravljenih živil (Hlastan Ribič, 2009). Odrasli prebivalci Slovenije po podatkih NIJZ presegamo priporočeno dnevno količino soli, ki zadovolji fiziološke potrebe po natriju, za 130 %.

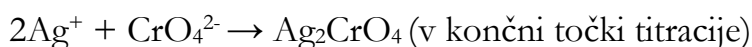
Sol je zelo pomembna mineralna sestavina, ki jo dodajamo tudi h krmi za prehrano domačih živali. Znano je, da goveja živina bolje prirašča, če ima na voljo zadostne količine soli, sol pa tudi povečuje apetit, žejo in izboljšuje prebavo.

Obarjalne titracije

Obarjalne titracije so osnovane na nastanku težko topne oborine, ki nastane pri reakciji med analitom in standardno raztopino. Standardne raztopine so raztopine reagentov z natančno znano koncentracijo. Večina obarjalnih titracij, ki jih uporabljamo v praksi, sloni na titracijah z raztopino srebrovega nitrata (AgNO_3). Končno točko titracije določimo z indikatorji ali potenciometrično z uporabo ionoselektivnih elektrod.

Pri določanju kloridnih ionov po Mohru raztopino vzorca titriramo s standardno raztopino AgNO_3 v nevtralnem ali slabo alkalnem mediju. Kot indikator uporabimo raztopino kalijevega kromata(VI) (K_2CrO_4). Med titracijo srebrovi ioni (Ag^+) reagirajo s kloridnimi ioni (Cl^-) v netopen srebrov klorid (AgCl), ki se iz raztopine izloči kot bela oborina. Po prvem prebitku standardne raztopine, zaradi reakcije med Ag^+ in kromatnimi(VI) ioni (CrO_4^{2-}), nastane rdeče rjava oborina srebrovega kromata(VI) (Ag_2CrO_4).

Reakcija



1.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- 0,05 M raztopina AgNO_3 , nasičena raztopina K_2CrO_4 , kremenčev pesek brez Cl^- , 0,1 M raztopina NaOH ;
- elektronska tehtnica, bireta, terilnica in pestilo, 100 ml merilna bučka, vodna kopel, cedilo, filtrirni papir, centrifuga, pH- testni lističi, 20 ml polnilna pipeta.

Postopek

V terilnico natehtajte 2–3 g vzorca (sir, kruh, mesni izdelek, konzervirana zelenjava) in si zapišite maso. Konzervirano zelenjavo pred tehtanjem precedite skozi cedilo, splaknite z demineralizirano vodo in posušite. Vzorcju v terilnici dodajte žličko kremenčevega peska, 2 do 3 ml vode in ga s pestilom dobro strite, da dobite homogeno zmes. Vsebino (suspenzijo) nato kvantitativno prenesite v 100 ml merilno bučko in pri tem sperite terilnico in pestilo s približno 50 ml vode. Dobro premešajte in merilno bučko postavite za 15 minut v vrelo vodno kopel. Suspenzijo ohladite na sobno temperaturo in merilno bučko z vodo dopolnite do oznake. Premešajte in filtrirajte ali centrifugirajte. S testnimi lističi preverite pH vrednost filtrata. Če filtrat reagira kislo, ga pred titracijo previdno nevtralizirajte z 0,1 M raztopino NaOH .

V dve erlenmajerici odpipetirajte 20 ml bistrega filtrata, dodajte 3–4 kapljice indikatorja, stene erlenmajerice sperite z demineralizirano vodo in titrirajte z 0,05 M raztopino AgNO_3 do nastanka rdeče rjave oborine. Na bireti odčitajte volumen raztopine, ki ste jo porabili za titracijo. Odstotek NaCl v živilu izračunajte po enačbi:

$$\%NaCl = \frac{V \cdot 5 \cdot 0,002925 \cdot 100}{m}$$

m = natehtan vzorec (g)

V = poraba raztopine AgNO_3 (ml)

Rezultat

Rezultat vaje je vsebnost soli v živilih, izražena v odstotkih. Rezultate zberite v preglednici in jih komentirajte. Izračunajte količino živila, s katero odrasla populacija ne bi presegla priporočenega dnevnega vnosa soli.

Uporabljeni viri

- European Chemicals Agency - ECHA. (2021). *The important role and many uses of salt in daily life*.
https://chemicalsinourlife.echa.europa.eu/guest-corner/-/asset_publisher/vcrOSpI91ebF/blog/the-important-role-and-many-uses-of-salt-in-daily-life
- Food Safety Authority of Ireland. (2017). *Sulphur dioxide and sulphites*.
https://www.fsai.ie/faq/additives/sulphur_dioxide_sulphites.html
- Hlastan Ribič, C. (2009). *Uvod v prebrano* (Učbenik za študente medicine in stomatologije). Univerza v Ljubljani.
- Institute of Medicine (US) Committee on Strategies to Reduce Sodium Intake. (2010). Henney, J. E., Taylor, C. L., Boon, C. S. (Eds.), *Strategies to reduce sodium intake in the United States*. National Academies Press (US).

2 Določitev proteinov s Kjeldahlovo metodo

Osnovni pojmi: beljakovine, Kjeldahlova metoda, empirični dejavniki, destilacija, kislinski razklop

Namen vaje: Po Kjeldahlovi metodi dušik vezan v organskih spojinah živil v prisotnosti koncentrirane žveplove(VI) kisline (H_2SO_4) reduciramo v amonijak (NH_3), ki s kislino tvori amonijev sulfat(VI) ($(NH_4)_2SO_4$). Dodamo močno bazo, natrijev hidroksid ($NaOH$), s katero iz soli izpodrinemo šibko bazo (NH_3) in jo z destilacijo uvajamo v znano množino H_2SO_4 . Množino prebitne kisline določimo s titracijo s standardno raztopino $NaOH$.

2.1 Teoretične osnove

Beljakovine

Beljakovine, maščobe in ogljikovi hidrati so organske spojine, ki jih s hrano v telo vnašamo v večjih količinah (makrohranila). Maščobe in ogljikovi hidrati primarno služijo kot vir energije, proteini pa kot gradniki teles. Organizmu zagotavljajo aminokisline in druge dušikove spojine, ki jih potrebuje za sintezo lastnih aminokislin. Nahajajo se v vsaki celici in tvorijo glavno maso protoplazme. Potreba po beljakovinah se s starostjo spreminja. Za otroke in mladostnike je priporočen dnevni vnos beljakovin od 0,9 do 1,0 g/kg telesne teže; za odrasle in starejše osebe pa 0,8 g/kg telesne teže. Zgornja meja vnosa beljakovin

za odrasle, ki po dosedanjih spoznanjih nima neželenih fizioloških učinkov, je 2 g/kg telesne mase (Hlastan Ribič, 2009).

Pri uravnoteženi prehrani je ob ustrezno zaužiti količini beljakovin pomembna tudi kakovost beljakovin, ki je določena s prisotnostjo esencialnih aminokislin. Vir beljakovin so meso, mleko, mlečni izdelki, ribe, jajca in nekatera živila rastlinskega izvora, predvsem stročnice (fižol, soja, grah), žita in oreščki. S hrano moramo zaužiti devet esencialnih (nujno potrebnih) aminokislin (levcin, izolevcin, histidin, metionin, fenilalanin, valin, triptofan, treonin in lizin). Večjo biološko vrednost imajo beljakovine živalskega izvora. V žitih vse esencialne aminokisliline niso zastopane v zadostnih količinah. Premalo je zlasti lizina (izjema je ajda), treonina in triptofana. Najpomembnejši element v beljakovinah je dušik. Rastline sintetizirajo proteine iz anorganskih snovi, ki jih dobijo iz tal in zraka.

Za določanje proteinov v mesu, žitih, krmi, pijačah, tleh, odpadnih vodah in drugih vzorcih uporabljamo Kjeldahlovo metodo, ki je bila razvita že leta 1883. V zadnjih 100 letih so se aparati in tehnika dokaj spremenili, osnovni postopki, ki jih je uvedel Kjeldahl, pa so ostali enaki. Metoda temelji na določanju proteinov posredno preko dušika in predpostavlja, da je ves dušik, ki je prisoten v vzorcu, vezan v beljakovinah. Analiza poteka v treh stopnjah: kislinski razklop, destilacija z vodno paro in titracija (Reid, Schwartz, Shoemaker, Smith in Sporns, 2004). Kislinski razklop vzorca poteka ob prisotnosti katalizatorja in žveplove(VI) kisline (H_2SO_4). Pri tem se dušik, ki je vezan v organskih spojinah, reducira v amonijak (NH_3), ki s kislino tvori amonijev sulfat(VI) ($(NH_4)_2SO_4$). Iz nastale soli z dodatkom močne baze, natrijevega hidroksida ($NaOH$), izpodrinemo šibko bazo (NH_3) in jo z destilacijo uvajamo v znano množino H_2SO_4 . Množino prebitne kisline (kislina, ki se ne porabi za nevtralizacijo NH_3) določimo s titracijo s standardno raztopino $NaOH$.

Vsebnost proteinov v vzorcu izračunamo s pomočjo ustreznega koeficienta. Predpostavljamo, da mešanica čistih proteinov vsebuje 16 % dušika. Vsebnost proteinov v vzorcu izračunamo tako, da določimo vsebnost skupnega dušika in vrednost pomnožimo s koeficientom 6,25 ($100/16$). Ta empirični koeficient uporabimo pri večini živil, ker je delež ne proteinskega dušika zanemarljiv. Kadar je za posamezno živilo znana prava vrednost, uporabimo specifični empirični koeficient (Preglednica 2.1).

Destilacija

Destilacija je postopek, ki ga uporabljamo za ločevanje snovi iz zmesi, če imajo le-te dovolj različne temperature vrelišča. Vzorec v destilacijski bučki segrejemo do vrenja. Pare potujejo do hladilnika, ki ga hladimo z vodo, in na hladni površini kondenzirajo. Destilat (kondenzirana tekočina) kaplja v posodo, ki je ločena od originalne tekočine.

Preglednica 2.1: Empirični koeficienti za preračun odstotka N v odstotek skupnih proteinov

Živilo	Empirični koeficient
Meso, jajca, jajčni izdelki	6,25
Mleko, mlečni izdelki	6,38
Ribe, morski sadeži	6,25
Pšenica, pšenični kosmiči, testenine	5,70
Mandlji	5,18
Arašidi	5,46
Riž	5,95
Soja	5,71
Otrobi	6,31
Koruza, koruzni zdrob	6,25
Proso, ješprenj, ječmenovi kosmiči, rž, oves	5,83
Polnozrnatni izdelki	5,83
Sončnična semena	5,30
Kokosovo meso	5,30
Zelenjava in zelenjavni izdelki (razen soje)	6,25
Sadje in izdelki iz sadja	6,25

Povzeto po An in Smith, 2004 ter Plestenjak in Golob, 1996.

2.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- Katalizator v obliki tablet, koncentrirana H_2SO_4 , 0,1 M raztopina NaOH, 32 % raztopina NaOH, Tashiro indikator, 0,05 M raztopina H_2SO_4 ,
- elektronska tehtnica, ladjica za tehtanje, steklene Kjeldahlove epruvete, vrelni kamenčki, grelni blok, destilacijska enota, bireta, erlenmajerice

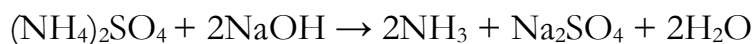
Postopek

Kislinski razklop

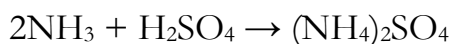
Na elektronski tehtnici natehtajte od 0,30 g do 1,0 g svežega vzorca ali ustrezno manjšo maso posušenega vzorca (odvisno od pričakovane vsebnosti skupnega dušika). Zapišite si maso vzorca in ga prenesite v stekleno epruveto. Dodajte katalizator (2 tableti), 20 ml koncentrirane H_2SO_4 (kislino dodajajte previdno) in vrelnne kamenčke. Če je potrebno, dodajte sredstvo proti penjenju. Na epruvete namestite stekleni pokrov in vklopite vodno črpalko za odsesavanje plinov. Epruvete postavite v grelni blok in pri $60\text{ }^\circ\text{C}$ in segrevajte 15 minut. Epruvete naj bodo dvignjene od dna bloka 1,5 do 2 cm (višino uravnajte z gumbom **Lift**). Med postopkom epruvete postopoma spustite nižje v grelni blok, odvisno od intenzivnosti reakcij, ki potekajo med razklopom. Nato temperaturo zvišajte na $360\text{ }^\circ\text{C}$ in segrevajte 2 do 3 ure, oziroma tako dolgo, da se raztopine obarvajo zeleno. Po razklopu raztopine ohladite na sobno temperaturo. Po enakem postopku pripravite tudi slepi vzorec (v stekleno epruveto dajte vse reagente brez vzorca).

Destilacija z vodno paro

Previdno dodajte vodo, da se soli popolnoma raztopijo (50 ml) in pri tem sperite rob epruvete. Epruveto nato pritrdite na aparat za destilacijo z vodno paro. K raztopini dodajte prebitek 32 % raztopine NaOH (~100 ml), s katero iz soli ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) izpodrinemo NH_3 . Pri tem poteče reakcija:



Amonijak destilirajte z vodno paro v erlenmajerico, v katero ste odpipetirali 25 ml 0,05 M raztopine H_2SO_4 in dodali 8 kapljic Tashiro indikatorja. Konica cevi mora biti ves čas potopljena v raztopino. Pri tem poteče reakcija nevtralizacije:



Titracija

Množino prebitne H_2SO_4 titrirajte z 0,1 M raztopino NaOH do spremembe barve indikatorja iz vijoličaste v zeleno.

Izračun

Vsebnost dušika (N) v odstotkih izračunajte po enačbi:

$$N (\%) = \frac{((25 - V_{sr}) - (25 - V_{sl})) \cdot 140}{1000 \cdot m}$$

V_{sr} = volumen porabe 0,1 M raztopine NaOH pri titraciji vzorca (ml)

V_{sl} = volumen porabe 0,1 M raztopine NaOH pri titraciji slepe raztopine (ml)

m = masa vzorca (g)

Rezultat

Za analizirane vzorce podajte vsebnost skupnega dušika (%) in vsebnost proteinov. Vsebnost proteinov izračunate z upoštevanjem empiričnih koeficientov.

Uporabljeni viri

- An, H. in Smith, D. (2004). Proteins. V R. E. Wrolstad, T. E. Acree, E. A. Decker, M. H. Penner, D. S. Reid, S. J. Schwartz, C. F. Shoemaker, D. M. Smith in P. Sporns (Eds.), *Handbook of food analytical chemistry 2004*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Hlastan Ribič, C. (2009). *Uvod v prebrano* (Učbenik za študente medicine in stomatologije). Univerza v Ljubljani.
- Plestenjak, A. in Golob, T. (1996). *Analiza kakovosti živil*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana.

3 Določanje koncentracije rastlinam dostopnega bakra v talnih vzorcih s plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo

Osnovni pojmi: mineralna hranila, baker, ekstrakcija, kislini razklop, atomska absorpcijska spektrometrija

Namen vaje: Z vodno raztopino dinatrijeve soli etilendiamintetraoetne kisline ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) iz talnih vzorcev, odvzetih na površinah z različno rabo tal, ekstrahiramo rastlinam dostopno frakcijo bakra. Pri valovni dolžini ($\lambda=324,7$ nm) izmerimo absorbanco bakra v raztopinah za umeritveno krivuljo, nato z merjenjem absorbance bakra v ekstraktih talnih vzorcev določimo njegovo koncentracijo.

3.1 Teoretične osnove

Mineralna hranila

Rastline potrebujejo izključno anorganska hranila, kar jih razlikuje od ljudi, živali in številnih vrst mikroorganizmov, ki dodatno kot vir energije potrebujejo tudi organska hranila. Rastline absorbirajo svetlobno energijo, ki jo v procesu fotosinteze izkoristijo za tvorbo ogljikovih hidratov in kisika iz ogljikovega dioksida in vode. Istočasno sprejemajo mineralna hranila iz tal in delno tudi skozi liste. Potrebujejo praktično vse elemente, nepogrešljivih je 13 elementov, ki jih glede na potrebe in zastopanost v rastlini delimo na

makrohranilne (dušik, fosfor, kalij, kalcij, magnezij in žveplo) in mikrohranilne elemente (bor, baker, železo, mangan, molibden, klor in cink) Za rastline so življenjsko pomembni (esencialni), saj so gradbeni elementi organskih spojin, aktivatorji encimov, imajo elektrokemijsko funkcijo pri vzdrževanju primerne ionske koncentracije in pH vrednosti, so stabilizatorji velikih organskih molekul in koloidnih delcev ter jih ne more nadomestiti noben drug element (Vodnik, 2012).

Ogljik, vodik in kisik, ki jih rastlina pridobi iz vode in ogljikovega dioksida, ne sodijo k mineralnim hranilom, a jih mora za normalno rast sprejeti zadostne količine. Previsoke koncentracije so za rastlino škodljive ali celo toksične, še posebej, če je samo en element prisoten v previsoki koncentraciji. V primeru pomanjkanja rastline razvijejo znake pomanjkanja, ki so značilni za element in povezani z njegovo vlogo v rastlini (Vodnik, 2012).

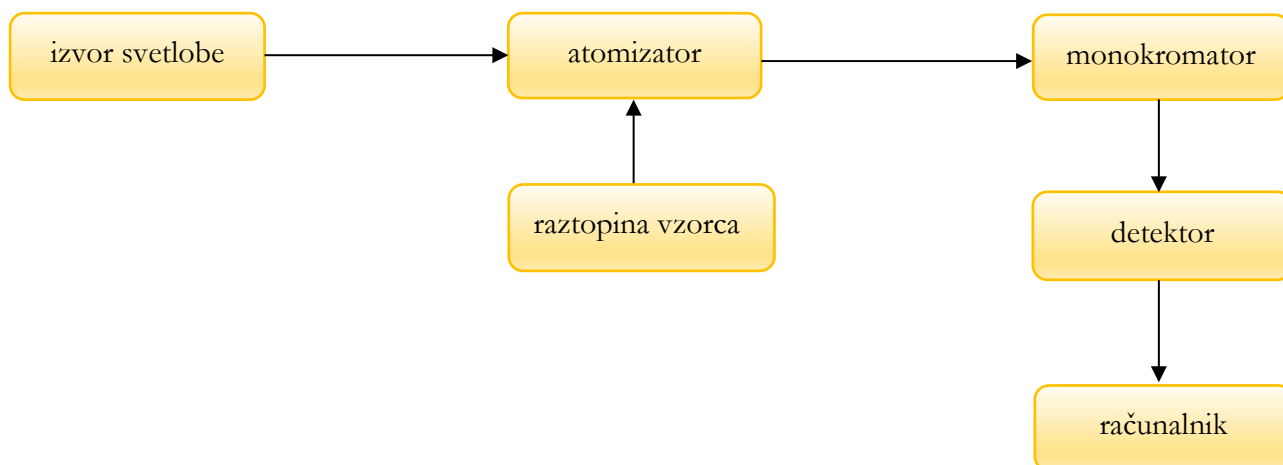
Mineralna hranila se v tleh nahajajo v prosti in vezani obliki. Okoli 2 % mineralnih hranil je v ionski obliki adsorbiranih na talnih delcih in se lahko izmenjajo z drugimi ioni (izmenljive oblike hranila), manj kot 0,2 % pa je raztopljenih v talni raztopini (vodotopna frakcija). Vodotopna frakcija in izmenljive oblike hranil v tleh predstavljajo količino rastlinam dostopnih hranil. Katione, ki so sorpcijsko vezani na talne koloide, lahko korenine s povečanjem koncentracije vodikovih ionov (H^+) v njihovi neposredni bližini sprostijo v talno raztopino. Večina preostalih hranil (skoraj 98 %) je vezanih v humusu (organska snov), v slabo topnih anorganskih spojinah in v talnih mineralih ter predstavljajo rezervno obliko hranil v tleh. Rastline lahko izkoriščajo vire nekaterih elementov (npr. N in P), vezanih v organski snovi tal, potem ko encimi razgradijo organske molekule. Encime, ki razgrajujejo organske molekule, izločajo rastline in tudi talni mikroorganizmi. Elementi, ki so vezani v strukturo talnih mineralov, rastlinam praviloma niso dostopni.

Atomska absorpcijska spektrometrija (AAS)

Z AAS merimo koncentracije kovin v raztopinah vzorcev (talni vzorci, rastlinski vzorci, različna živila itd.). Kadar nas zanimajo posamezne frakcije kovin, kot so npr. rastlinam dostopna hranila, trdne vzorce pred meritvami ekstrahiramo z ustrezno raztopino. V primeru, da nas zanima celokupna vsebnost kovin v vzorcu, pa naredimo kislinski razklop. V tem primeru k vzorcu dodamo kislino (HNO_3 , HCl ...) ali kombinacijo dveh ali več različnih kislin in vzorec segrejemo.

AAS temelji na merjenju absorpcije svetlobe karakteristične valovne dolžine. Izvor svetlobe je žarnica z votlo katodo, ki oddaja svetlobo določenih valovnih dolžin, ki so karakteristične za posamezen element. Oddano svetlobo absorbirajo prosti atomi v osnovnem energijskem stanju, ki nastanejo v procesu atomizacije, in pri tem preidejo v vzbujeno stanje. Atomizacija poteče po uvajanju vzorca v plamen ali grafitno cevko (atomizator). Količina absorbirane svetlobe (absorbanca) je odvisna od koncentracije elementa v raztopini. Zvezo med intenziteto absorbirane svetlobe (A) in koncentracijo absorbirajoče snovi (c) podaja Beer-Lambertov zakon: $A = \log(I/I_0) = k \cdot c$, pri čemer je k konstanta (Skoog, West in Holler, 1996).

Pred analizami raztopin vzorcev umerimo spektrometer s standardnimi raztopinami. To so raztopine z znanimi koncentracijami elementa, ki ga merimo, in so po sestavi (matriksu) čim bolj podobne raztopini vzorca. V plamen (zrak/acetilen ali N_2O /acetilen) najprej razpršimo slepo raztopino, s katero nastavimo ničlo inštrumenta (instrument zero). Nadaljujemo z raztopino z najnižjo koncentracijo elementa, ki ji sledijo raztopine z naraščajočimi koncentracijami elementa. Programska oprema računalnika nariše umeritveno krivuljo tako, da na x-os nanese koncentracije elementa, na y-os pa izmerjene vrednosti absorbanca. Sledijo meritve raztopin vzorcev, pri katerih inštrument izmeri absorbanco, in iz enačbe premice umeritvene krivulje izračuna koncentracijo elementa. Blok shema spektrometra ponazarja glavne komponente instrumenta in vrstni red posameznih stopenj v procesu merjenja.



Slika 3.1: Blok shema inštrumenta za plamensko atomsko absorpcijsko spektrometrijo

Ekstrakcija

Ekstrakcija je postopek, ki ga uporabljamo za izolacijo spojin, čiščenje ekstraktov vzorcev ali selektivno koncentriranje spojin, ki nas zanimajo. Ekstrakcijo uporabimo, kadar želimo iz vzorca dobiti samo določene sestavine (npr. rastlinam dostopne minerale, rastlinske pigmente, sladkorje, kisline, vitamine itd.) ali kot separacijsko tehniko, s katero ločimo določene sestavine vzorca od ostalih, ki bi pri meritvah lahko povzročale motnje, kar je običajno potrebno pred analizami kompleksnih bioloških vzorcev. Tradicionalne ekstrakcijske tehnike, ki jih še vedno uporabljamo, so ekstrakcija trdno-tekoče, ekstrakcija tekoče-tekoče in ekstrakcija po Soxhletu. Pri ekstrakciji trdno-tekoče k trdnemu homogenemu vzorcu dodamo topilo, v katerem je spojina, ki nas zanima, dobro topna.

3.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- 0,05 M vodna raztopina dinatrijeve soli etilendiamintetraocetne kisline ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$), standardna raztopina bakra (Cu , 1 g/l),
- elektronska tehtnica, polietilenske posodice z zamaškom, filtrirni papir, stekleni lijaki, stojalo za lijake, 50 ml merilne bučke, pipeta, stresalnik, mlin za mletje talnih vzorcev.

Postopek

Priprava talnega vzorca

Talni vzorec posušite na zraku do konstantne mase. Odstranite korenine in manjše kamenčke. Vzorec nato zmeljite v mlinu in ga presejte skozi sito s premerom odprtin 1 mm. V tako pripravljenem vzorcu lahko določimo različne parametre, ki so pomembni za kakovost tal.

Ekstrakcija rastlinam dostopnega Cu

V polietilensko posodico natehtajte 5,00 g zmletega vzorca in dodajte 50 ml 0,05 M raztopine Na₂-EDTA. Posodice zaprite z zamaškom in jih na stresalniku stresajte 2 uri. Med ekstrakcijo poteče kationska izmenjava. Natrijevi ioni (Na⁺) iz ekstrakcijske raztopine se izmenjajo z ioni Cu²⁺, ki so adsorbirani na površini talnih delcev. Ekstrakti naj stojijo toliko časa, da se delci usedejo, nato raztopino filtrirajte skozi naguban filtrirni papir. Prvih nekaj ml filtrata zavrzite. V ekstraktih vzorcev izmerite koncentracijo ekstraktibilnega Cu. Količina z EDTA ekstraktibilnih kationov je nekoliko višja, kot jih rastline dejansko sprejmejo iz tal (ÖNORM L 1089, 1993).

Priprava raztopin za umeritveno krivuljo

V 50 ml merilno bučko odpipetirajte 5 ml standardne raztopine Cu (1 g/l) in dopolnite do oznake z demineralizirano vodo. Koncentracija Cu v tako pripravljene raztopini je 100 µg/ml. Umeritveno krivuljo pripravite v koncentracijskem območju od 0,5 do 4,0 µg/ml Cu. Pripravite razredčitve raztopine Cu s koncentracijo 100 µg/ml tako, da dobite raztopine s koncentracijami Cu 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 in 4,0 µg/ml. Raztopine pripravite v 50 ml bučkah. S katero raztopino boste dopolnili bučke do oznake? Kako boste pripravili slepo raztopino?

Merjenje koncentracije Cu

Pred meritvami koncentracije Cu v ekstraktih talnih vzorcev nastavite spektrometer s slepo raztopino na ničlo in ga nato umerite z raztopinami z znanimi koncentracijam Cu, ki ste jih pripravili za umeritveno krivuljo. Raztopine razpršite v plamen zrak/acetilen. Ko računalnik izriše umeritveno krivuljo, nadaljujte z meritvami ekstraktov vzorcev. Absorbanco Cu izmerite pri valovni dolžini 324,7 nm.

Rezultat

Za talne vzorce, odvzete na površinah z različno rabo tal in različnim načinom pridelave, podajte vsebnost rastlinam dostopnega Cu v mg/kg zračno suhega vzorca tal in komentirajte rezultate.

Uporabljeni viri

- ÖNORM L 1089. (1993). *Chemische Bodenuntersuchungen – Bestimmung von EDTA-extrahierbarem Fe, Mn, Cu und Zn*. Österreichische Normeninstitute (ON).
- Skoog, D. A., West, D. M. in Holler, F. J. (1996). *Fundamentals of analytical chemistry* (7 th ed.). New York: Saunders College Publishing.
- Vodnik, D. (2012). *Osnove fiziologije rastlin*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

4 Določitev skupnih fenolov z molekulske absorpcijske spektrometrije

Osnovni pojmi: fenolne spojine, antioksidanti, molekulska absorpcijska spektrometrija

Namen vaje: V ekstraktih vzorcev sadja in zelenjave določimo koncentracijo skupnih fenolov. Ekstraktom vzorcev in raztopinam galne kisline dodamo reagent Folin-Ciocalteu. Fenolne spojine v alkalnem mediju rumeno barvo reagenta spremenijo v modro. Pri izbrani valovni dolžini na UV/Vis spektrometru izmerimo absorbance modro obarvanih raztopin galne kisline, da dobimo umeritveno krivuljo, in nato izmerimo tudi absorbance ekstraktov vzorcev.

4.1 Teoretične osnove

Fenolne spojine

Fenolne spojine ali polifenoli so sekundarni metaboliti, ki so v rastlinah zelo razširjeni. Nahajajo se v vseh delih rastlin in pomembno vplivajo na organoleptične lastnosti sadja in zelenjave (okus, vonj, barva živil in pijač). Ocenjujejo, da je teh spojin v naravi več kot milijon. Fenolne spojine so heterogena skupina spojin, vsem je skupno, da imajo vsaj en aromatski obroč in vsaj eno hidroksilno skupino. Lahko so enostavne molekule (npr. fenolne kisline) ali visoko polimerizirane spojine, kot so tanini in lignini. Zastopnost

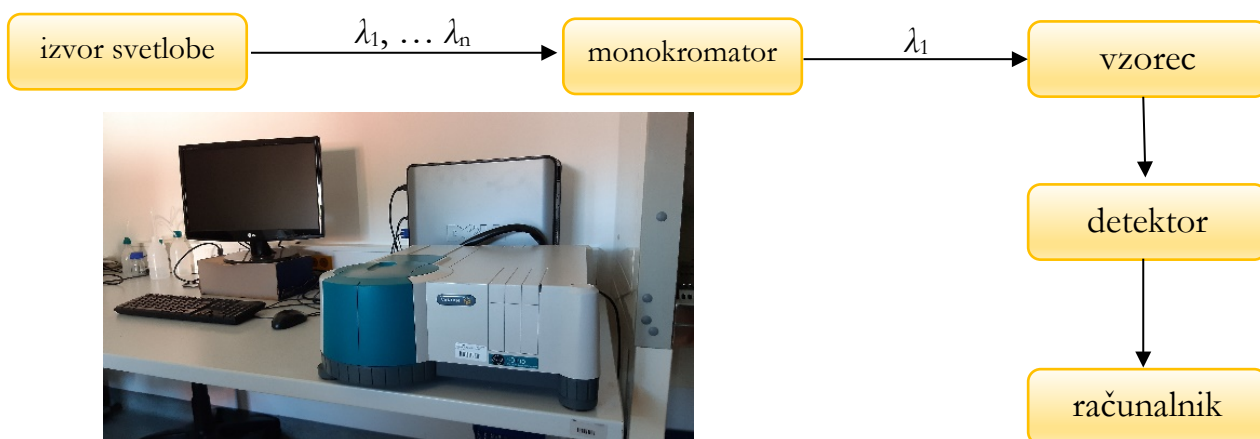
fenolnih spojin v rastlinah je odvisna od vrste rastline, načina pridelave, geografskega območja, stopnje zrelosti in drugih dejavnikov (Dai in Mumper, 2010).

Fenolne spojine se v rastlinah največkrat pojavljajo kot glikozidi (spojine, pri katerih sta alkohol in sladkor povezana z glikozidno vezjo) in imajo različne vloge. Služijo kot zaščita rastlin pri absorpciji UV sevanja, kot obramba pred patogeni in rastlinojedci, nekateri sodelujejo pri mehanski zaščiti rastlin ali pa delujejo kot signalne molekule pri cvetenju in oplojevanju. Na stresne dejavnike se rastlina odzove s povečano biosintezo fenolnih spojin (Taiz in Zeiger, 2006).

Fenolne spojine zelenjave, sadja, zelišč, olivnega olja in rdečega vina so deležne velike pozornosti, saj so naravni antioksidanti. Antioksidanti so reaktivne snovi, ki hitro oksidirajo. V prehranski industriji se uporabljajo za podaljševanje obstojnosti živil, saj le-te na zraku oksidirajo hitreje kot sestavine hrane. Dodatek sintetičnega antioksidanta 2-tert-butil-4-metoksifenol (BHA, butilirani hidroksianisol) maslu podaljša njegovo obstojnost. Nedavno so ugotovili, da je BHA lahko kancerogen, zato ga nadomeščajo z antioksidanti naravnega izvora npr. s hidroksitirosolom, ki se nahaja v plodovih oljk in olivnem olju (Amić, 2008). Antioksidanti delujejo blagodejno tudi na zdravje človeka, saj 'lovijo' proste radikale in preprečujejo oksidativni stres. Prosti radikali v organizmu nastajajo kot stranski proizvod metabolizma in v stresnih okoliščinah. Nekateri fenolne spojine delujejo tudi protivnetno, antimikrobno, antialergijsko in antimutageno.

Molekulska absorpcijska spektrometrija (MAS)

Molekulska absorpcijska spektrometrija je ena izmed najpogosteje uporabljenih spektroskopskih metod. Uporabna je za določanje anorganskih in organskih zvrsti. Pri MAS merimo delež svetlobe, ki jo absorbira raztopina v vidnem ali UV področju valovnih dolžin. Sestavni deli spektrometra so: izvor svetlobe, monokromator, prostor za vzorec (kiveta), detektor in merilni inštrument (Slika 4.1). Metoda temelji na merjenju zmanjšanja intenzitete svetlobe pri prehodu skozi raztopino vzorca. Del svetlobe se absorbira, intenziteto prepuščene svetlobe pa izmeri detektor. Meritve največkrat izvajamo v območju valovnih dolžin vidne svetlobe (valovne dolžine od 400 do 750 nm). Če spojina v vidnem spektralnem področju sama ne absorbira svetlobe, jo z različnimi reakcijami (dodatek ustreznega reagenta) pretvorimo v obarvan proizvod. Koncentracijo analita določimo na osnovi primerjave absorbance za vzorec in standardne raztopine (Skoog, West in Holler, 1996).



Slika 4.1: Blok shema UV/Vis spektrometra in vrstni red posameznih stopenj v procesu merjenja

Vir: lasten

Ekstrakcija

Teoretične osnove glej vajo 3.

4.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- Galna kislina, reagent Folin-Ciocalteu, Na_2CO_3 , aceton, etanol, led;
- elektronska tehtnica, mlin za mletje svežih vzorcev, terilnica in pestilo, epice (1,5 ml), 50 ml centrifugirke, 10, 25, 50 in 100 ml merilne bučke, 500 ml merilna bučka, pipeta, ultrazvočna kopel, centrifuga, vibracijski stresalnik, inkubator, merilni valj, mikrokivete, stojalo za epice, reagenčna steklenica.

Postopek

Priprava raztopin

- Ekstrakcijska raztopina: aceton: voda (70 : 30, v/v). Z merilnim valjem odmerimo 350 ml acetona in ga prelijemo v reagentno steklenico. Dodamo 150 ml vode in premešamo. Raztopino postavimo v hladilnik.
- Raztopina Na_2CO_3 : Natehtamo 37,5 g Na_2CO_3 . Kvantitativno ga prenesemo v 500 ml merilno bučko in dopolnimo z vodo do oznake.
- Reagent Folin-Ciocalteu: V 10 ml merilno bučko odpipetiramo 1 ml raztopine reagenta Folin-Ciocalteu in z vodo dopolnimo do oznake.

- Osnovna standardna raztopina galne kisline: Natehtamo 0,0625 g galne kisline in jo raztopimo v 2–5 ml etanola. Raztopino kvantitativno prenesemo v 25 ml merilno bučko in jo z vodo dopolnimo do znake. Koncentracija galne kisline v raztopini je 2500 µg/ml.

Priprava trdnih vzorcev in ekstrakcija fenolnih spojin

Sveže vzorce sadja in zelenjave zmeljite, da dobite homogen vzorec. V 50 ml centrifugirke natehtajte 1,00 g vzorca in si zapišite maso. Če so bili vzorci posušeni z zamrzovanjem (liofilizirani vzorci), jih zmeljite in v 50 ml centrifugirko natehtajte 0,20 g. Dodajte 10 ml ekstrakcijske raztopine in premešajte na vibracijskem stresalniku. Centrifugirke z vzorci za 20 minut postavite v ultrazvočno kopel, ki jo hladite z ledom. Nato suspenzije centrifugirajte 15 minut pri 7.500 obratih na minuto (rpm). Bistri del odlijete v 50 ml merilno bučko in z vodo dopolnite do oznake. Namesto centrifugiranja lahko vzorec prefiltrirate. Pred meritvami ekstrakte redčite tako, da 1 ml ekstrakta odpipetirate v 25 ml merilno bučko in z vodo dopolnite do oznake. Ekstrakte vzorcev z višjimi vsebnostmi fenolnih spojin (borovnice, maline, višnje...) redčite 0,5 ml/25 ml.

Priprava tekočih vzorcev

Sveže stisnjen pomarančni sok, sok limone in grenivke pred meritvami redčite tako, da odpipetirate 0,25 ml soka v 25 ml merilno bučko in dopolnite z vodo do oznake. Po navodilih skuhajte zeleni in črni čaj. V 50 ml merilno bučko odpipetirajte 1 ml ohlajenega čaja in dopolnite z vodo do oznake. Raztopino premešajte in odpipetirajte 1 ml tako pripravljene raztopine v 50 ml merilno bučko in dopolnite z vodo do oznake. Espresso kavo kvantitativno prenesite v 100 ml merilno bučko in z vodo dopolnite do oznake. Raztopino premešajte in odpipetirajte 0,5 ml tako pripravljene raztopine v 50 ml merilno bučko in dopolnite z vodo do oznake.

Priprava raztopin galne kisline za umeritveno krivuljo

1 ml osnovne standardne raztopine galne kisline (GA) odpipetirajte v 50 ml merilno bučko in z vodo dopolnite do oznake. Koncentracija GA v tako pripravljene raztopini je 50 µg/ml. Pripravite razredčitve raztopine s koncentracijo GA 50 µg/ml tako, da dobite raztopine s koncentracijami 0,2, 0,6, 1,2, 2,4 in 6,4 µg GA/ml. Raztopine pripravite v 25 ml merilnih bučkah.

Obarvanje fenolnih spojin z reagentom Folin-Ciocalteu

Fenolne spojine, ki so prisotne v ekstraktih vzorcev, reagirajo z reagentom Folin-Ciocalteu v alkalnem mediju in rumeno barvo reagenta spremenijo v modro. V epice (1,5 ml) odpipetirajte 100 μ l slepe raztopine, 100 μ l raztopin z znano koncentracijo galne kisline in 100 μ l ekstrakta vzorca. Dodajte 200 μ l redčenega reagenta Folin-Ciocalteu in premešajte na vibracijskem stresalniku. Po 5 minutah in ne kasneje kot v 7 minuti dodajte 800 μ l raztopine Na_2CO_3 . Raztopine ponovno premešajte in pustite stati 2 uri v temi na sobni temperaturi. Čas, potreben za razvoj modre barve, lahko skrajšate tako, da raztopine za 30 minut postavite v inkubator, ki ga predhodno segrejete na 40 °C.

Merjenje koncentracije galne kisline

S slepo raztopino nastavite spektrofotometer na ničlo. Pri valovni dolžini 765 nm izmerite absorbance raztopin z znano koncentracijo galne kisline in nato tudi absorbance ekstraktov vzorcev.

Rezultat

Za analizirane vzorce podajte vsebnost fenolnih spojin v mg GAE (ekvivalent galne kisline) na 100 g vzorca oziroma na 100 ml vzorca.

Uporabljeni viri

- Amić, D. (2008). *Organska kemija za studente agronomske struke*. Školska knjiga.
- Dai, J., Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15, 7313–7352.
- Skoog, D. A., West, D. M. in Holler, F. J. (1996). *Fundamentals of analytical chemistry* (7th ed.). New York: Saunders College Publishing.
- Taiz, L. in Zaiger, E. (2006). *Plant physiology* (4th ed.). Sunderland (Mass.): Sinauer Associates.

5 Določitev sladkorjev s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

Osnovni pojmi: ogljikovi hidrati, monosaharidi, disaharidi, tekočinska kromatografija, kromatogram

Namen vaje: Iz vzorcev živil z vodo ekstrahiramo vodotopne sladkorje. Koncentracijo glukoze, fruktoze in saharoze določimo z RI detektorjem po ločitvi spojin na kromatografski koloni.

5.1 Teoretične osnove

Ogljikovi hidrati

Ogljikovi hidrati so najbolj razširjene organske spojine v naravi. Gradijo jih trije elementi: ogljik, vodik in kisik. Proizvajajo jih rastline s fotosintezo, pri kateri kot primarni proizvod nastane glukoza. Po nekaterih ocenah se letno s fotosintezo veže okoli 200 milijard ton CO₂ in proizvede okoli 400 milijard ton O₂. Ogljikovi hidrati se v rastlinah nahajajo v prosti obliki ali pa kot sestavni deli večjih makromolekul. Služijo kot vir energije, ki jo celice iz njih sproščajo v procesu dihanja. Sproščena energija se skladišči v molekulah adenozin trifosfata (ATP). Najpomembnejša monosaharida v naravi sta glukoza (imenovana tudi grozdni in krvni sladkor) in fruktoza (sadni sladkor). Nahajata se skupaj s saharozo (disaharid) v plodovih sadja, semenih, listih, cvetovih rastlin in medu. Glavna

sestavina meda je naravni invertni sladkor (70–80 %), ki je ekvimolarna zmes glukoze in fruktoze in nastane s hidrolizo saharoze. Pri pripravi medu to reakcijo izvajajo čebele. Saharozo v čisti obliki v velikih količinah proizvajamo iz sladkorne pese in sladkornega trsa. Raztopine z visokimi koncentracijami saharoze povzročajo visok osmotski tlak, ki inhibira rast mikroorganizmov, zato saharozo uporabljamo tudi kot konzervans (Amić, 2008). Saharosa v rastlinah predstavlja glavno transportno obliko sladkorja, ki se do porabnikov transportira po delu žil, ki ga imenujemo floem. Monosaharidi zaradi reducirajoče narave niso primerna oblika za prenos po rastlini (Vodnik, 2012).

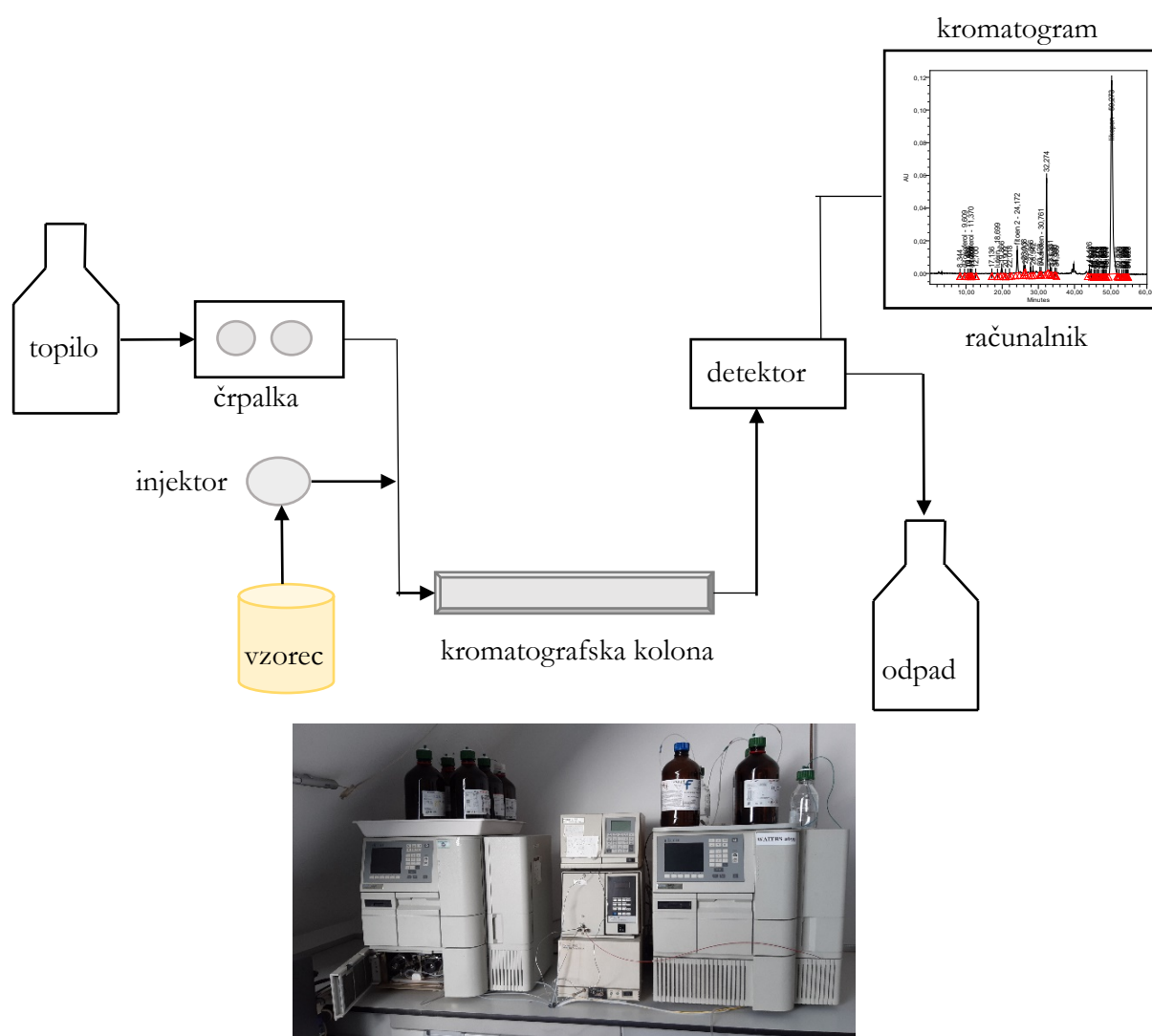
V zrelih plodovih predstavlja skupna količina sladkorjev od 2 do 65 % sveže snovi. V zelenih plodovih sadja prevladuje škrob, ki se med dozorevanjem spremeni v enostavne sladkorje. Živali in ljudje ogljikove hidrate zaužijemo s hrano rastlinskega izvora. Za razliko od rastlin je količina ogljikovih hidratov v živalskih tkivih nizka (pri človeku < 1 %).

Ogljikovi hidrati zagotavljajo energijo, ki je potrebna za normalen potek življenjskih funkcij, hkrati se uporabljajo za doseganje želene teksture živil. Monosaharidi (glukoza, fruktoza, manoza) in disaharidi (saharosa, maltoza, laktoza) imajo visok glikemični indeks in se po zaužitju hitro absorbirajo v kri. Zaradi povišanja koncentracije krvnega sladkorja se poveča izločanje inzulina. Več kot 50 % dnevno potrebne energije naj bi zagotovili z uživanjem ogljikovih hidratov, pri tem monosaharidi in disaharidi naj ne bi prispevali več kot 10 % (Hlastan Ribič, 2009).

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Pojem kromatografija je uvedel ruski botanik Cvet, ki je razvil metodo za ločevanje rastlinskih pigmentov. Pri kromatografskih metodah gre za postopke ločevanja, identifikacije in/ali kvantitativne določitve kemijskih spojin. Spojine, ki so prisotne v raztopini vzorca (npr. sladkorji v sokovih, organske kisline v ekstraktih sadja), se ločijo zaradi različne porazdelitve med stacionarno in mobilno fazo. Kako se bo določena spojina porazdeljevala med obe fazi, je odvisno od polarosti in prisotnosti funkcionalnih skupin, v nekaterih primerih od hlapnosti in velikosti molekule. Stacionarna faza je največkrat v kromatografski koloni in se med procesom ne premika. Mobilna faza potuje skozi kromatografsko kolono. Pri tekočinski kromatografiji je mobilna faza tekočina (voda, organska topila, vodne puferske raztopine).

Raztopino spojin injiciramo na kolono, skozi katero vodimo topilo (Slika 5.1). Ločene spojine zazna detektor. Signal detektorja je podan kot kromatografski vrh. Graf, ki prikazuje odvisnost signala od retencijskega časa, imenujemo kromatogram. Retencijski čas pove, kako dolgo se spojina zadržuje na koloni (od injiciranja do detektorja). Ker je za posamezno substanco pri določenih kromatografskih pogojih specifičen, omogoča identifikacijo spojine. Površina kromatografskega vrha je odvisna od koncentracije spojine in omogoča kvantitativne določitve. Pri kvantitativnih določitvah pripravimo umeritveno krivuljo, ki na x-osi prikazuje koncentracije posamezne spojine, na y-osi pa višine kromatografskih vrhov (Skoog, West in Holler, 1996).



Slika 5.1: Tekočinski kromatograf in shema sistema za tekočinsko kromatografijo

Vir: lasten

5.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- Glukoza, saharoza, fruktoza, dvakrat demineralizirana voda;
- elektronska tehtnica, centrifuga, 50 ml centrifugirke, stojalo za centrifugirke, epice (1,5 ml), 25 ml merilne bučke, pipeta, ultrazvočna kopel, vibracijski stresalnik, terilnica in pestilo, merilni valj, viala za HPLC, stojalo za viala.

Postopek

Priprava vzorcev in ekstrakcija sladkorjev

Vzorci sadja in zelenjave zmeljite v mlinu ali strite v terilnici. V 50 ml centrifugirke natehtajte od 0,40 do 0,70 g suhega vzorca oziroma od 1,50 do 2,00 g svežega homogeniziranega vzorca in si zapišite maso. Dodajte 20 ml vode, suspenzije premešajte na vibracijskem stresalniku (1 minuto) in jih postavite v ultrazvočno kopel, segreto na 80–85 °C (30 minut). Ekstrakte ohladite na sobno temperaturo in centrifugirajte 15 minut pri temperaturi 23 °C in 8.500 obratih na minuto. Supernatant kvantitativno prelijte v 25 ml bučko in dopolnite z vodo do oznake. Premešajte, prelijte v epice in centrifugirajte (10.500 obratov na minuto, 10 °C, 20 minut). Centrifugiranje lahko nadomestimo s filtriranjem raztopin skozi 0,45 µm filter.

Priprava raztopin posameznih sladkorjev za umeritveno krivuljo

Pri pripravi raztopin z znano koncentracijo posameznih sladkorjev uporabite že pripravljene osnovne standardne raztopine glukoze, fruktoze in saharoze s koncentracijo 20 mg/ml. Volumne posamezne raztopine (Preglednica 5.1) odpipetirajte z elektronsko pipeto v 1,5 ml epice, dodajte vodo in premešajte. Raztopine prenesite v viala za HPLC. Za pripravo raztopin uporabite dvakrat demineralizirano vodo.

Preglednica 5.1: Priprava raztopin z znanimi koncentracijami sladkorjev

	Glukoza		Fruktoza		Saharoza		Voda
	V (µl)	Y (mg/ml)	V (µl)	Y (mg/ml)	V (µl)	Y (mg/ml)	µl
Std ₁	25	0,50	25	0,50	25	0,50	925
Std ₂	50	1,00	50	1,00	400	8,00	500
Std ₃	200	4,00	200	4,00	200	4,00	400
Std ₄	400	8,00	400	8,00	50	1,00	150

Določitev koncentracije sladkorjev

Koncentracijo sladkorjev izmerite s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti v povezavi z detektorjem za merjenje lomnega količnika (RI-detektor). Viale z raztopinami sladkorjev in ekstraktov vzorcev vstavite v avtomatski podajalnik vzorcev in sledite navodilom asistenta.

Kromatografski pogoji:

- kromatografska kolona RCM-Monosaccharide Ca^{2+} (8 %),
- pretok mobilne faze 0,4 ml/minuto (dvakrat demineralizirana voda),
- temperatura kolone 60 °C,
- volumen injiciranega vzorca oziroma standardne raztopine sladkorjev: 20 μl .

Rezultat

Podajte vsebnost posameznih sladkorjev v mg/100 g živila. Rezultate prikažite tabelarično.

Uporabljeni viri

- Amić, D. (2008). *Organska kemija za studente agronomske struke*. Školska knjiga.
- Hlastan Ribič, C. (2009). *Uvod v prebrano* (Učbenik za študente medicine in stomatologije). Univerza v Ljubljani.
- Skoog, D. A., West, D. M. in Holler, F. J. (1996). *Fundamentals of analytical chemistry* (7 th ed.). New York: Saunders College Publishing.
- Vodnik, D. (2012). *Osnove fiziologije rastlin*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

6 Določitev izmenljivih frakcij svinca v talnih vzorcih z atomsko absorpcijsko spektrometrijo

Osnovni pojmi: svinec, emisijske vrednosti, vodotopna frakcija, mobilna in potencialno biorazpoložljiva frakcija, kislinski razklop, celokupna koncentracija, atomska absorpcijska spektrometrija

Namen vaje: Iz talnega vzorca z vodo ekstrahiramo vodotopno frakcijo svinca. Z dodatkom 0,01 M raztopine CaCl_2 ekstrahiramo mobilno in potencialno biorazpoložljivo frakcijo. Za določitev celokupne vsebnosti svinca naredimo kislinski razklop vzorca z dodatkom koncentrirane $\text{HCl}:\text{HNO}_3$ v volumskem razmerju 3 : 1 (v/v). Koncentracije svinca v pripravljenih raztopinah vzorcev izmerimo z merjenjem absorbance pri izbrani valovni dolžini na spektrometru za AAS.

6.1 Teoretične osnove

Svinec

Svinec je strupena kovina, ki predstavlja tveganje za zdravje ljudi. Na prioriteten seznamu nevarnih snovi, na katerega je Agencija za strupene snovi in register bolezni (ATSDR, 2019) uvrstila 275 snovi, je svinec na drugem mestu. Pri razvrstitvi snovi po strupenosti so upoštevali kombinacije več dejavnikov: njihovo pogostost v okolju, toksičnost in izpostavljenost ljudi.

Svinec je element, ki je v manjših količinah naravno prisoten v zemeljski skorji. Kadar celokupna vsebnost svineca v tleh ne presega mejne emisijske vrednosti (85 mg/kg suhih tal), so tla neonesnažena. V takšnih tleh lahko pride do onesnaženja pridelkov z drugimi viri (onesnažena voda, zrak, nepravilna uporaba sredstev za zaščito rastlin). Pri vsebnosti svineca 100 mg/kg so tla po zakonodaji onesnažena in obstaja velika verjetnost, da kovina prehaja iz tal v vrtnine. Pri vsebnosti 530 mg/kg (kritična emisijska vrednost) tla niso primerna za pridelavo rastlin, ki se uporabljajo v prehrani ljudi in živali (Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih vrednostih nevarnih snovi v tleh, 1996). Poznavanje celokupnih vsebnosti težkih kovin v talnih horizontih pove le malo o njihovi strupenosti za organizme, zato se za prikaz dejanske možne nevarnosti za človeka in okolje vedno bolj uporablja biodostopnost, ki je opredeljena kot delež onesnažila v tleh, ki je organizmu takoj dosegljiv.

Težke kovine so vezane na različne frakcije tal. Od vezave je odvisna njihova dostopnost za organizme. Kovine, vgrajene v kristalne strukture mineralov, so razmeroma neaktivne. Rastlinam dostopne so tiste kovine, ki se v ionski obliki nahajajo v talni raztopini, in tiste, ki so adsorbirane na površini talnih koloidov. Ostale oblike, ki so vezane na karbonate, na železove, manganove ali aluminijeve okside, in tiste, ki tvorijo komplekse z organsko snovjo tal, lahko obravnavamo kot relativno mobilne ali trdno vezane, odvisno od kombinacije fizikalnih in kemijskih lastnosti tal. Najpomembnejše lastnosti tal, ki vplivajo na mobilnost kovin in razpoložljivost, so tekstura (delež gline), pH-vrednost, vsebnost organske snovi, redoks potencial, železovi in manganovi oksidi ter kationi in anioni v talni raztopini, ki v tleh pogosto tekmujejo za ista sorpcijska mesta (Marschner, 1995).

Običajno je v naravnih tleh rastlinam dostopna frakcija težkih kovin majhna. V naravnih tleh, ki so nastala na matični kamnini, bogati s kovinami, in v onesnaženih tleh, lahko rastlinam dostopna frakcija predstavlja tudi od 30 do 60 % celokupne vsebnosti kovin. Svinec ostaja v vrhnjih plasteh tal zaradi močne vezave na sorpcijski kompleks.

Atomska absorpcijska spektrometrija

Teoretične osnove glej vajo 3.

6.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- Koncentrirana HCl in HNO₃, 1,0 M vodna raztopina MgCl₂ (pH = 7,0), 1,0 M raztopina amonijevega acetata (pH = 5,0), CH₃COOH, standardna raztopina Pb (1 g/l);
- elektronska tehtnica, centrifuga, terilnica in pestilo, plastično sito, izparilnice, polietilenske posodice z zamaškom, centrifugirke, filtrirni papir, lijaki, 50 ml merilne bučke, merilni valj, pipeta, stresalnik, peščena kopel.

Postopek

Priprava talnega vzorca

Talne vzorce posušimo na zraku, zdrobimo v terilnici in presejemo skozi plastično sito.

Kislinski razklop vzorca za določitev celokupne vsebnosti svınca

V izparilnico natehtajte 3 g zračno suhega vzorca in ga navlažite z vodo. Izparilnice prenesite v digestorij, počasi dodajte 21 ml koncentrirane HCl in 7 ml koncentrirane HNO₃. Razmerje kislin HCl: HNO₃ mora biti 3 : 1 (v/v). Vzorec pustite stati 12–16 ur pri sobni temperaturi. Naslednji dan jih počasi segrejte do vrenja in pustite, da nežno vrejo 2 uri. Pazite, da vsa kislina ne povre. Po potrebi dodajte 2 M raztopino HCl. Raztopino ohladite na sobno temperaturo in prefiltrirajte v 50 ml merilne bučke, ki jih do oznake dopolnite z vodo.

Ekstrakcija posameznih frakcij Pb

F1: Topna in izmenljiva frakcija

V polietilensko posodico natehtajte 2,5 g talnega vzorca in dodajte 20 ml 1,0 M raztopine MgCl₂ (pH = 7,0). Posodice zaprite in jih pri sobni temperaturi stresajte 1 uro na stresalniku. Nato vzorce centrifugirajte 15 minut pri 5.000 rpm, bistri del prelijte v polietilensko posodico in jih do analize hranite v hladilniku.

F2: Frakcija vezana na karbonate

K trdnemu preostanku (F1) dodajte 20 ml 1,0 M raztopine amonijevega acetata s pH vrednostjo 5,0 (pH raztopine nastavite z raztopino CH_3COOH). Posodice zaprite in jih pri sobni temperaturi 4 ure stresajte na stresalniku, nato vzorce prefiltrirajte. Vsak vzorec pripravite v dveh ponovitvah. Izmenljiv svinec (F1) in svinec, ki je vezan na karbonate (F2), je biodosten (potencialno razpoložljiv za privzem v rastline) (Jena, Gupta, Dhundhel, Matic, Frančišković Bilinski in Devic, 2013).

Določanje koncentracije Pb z atomsko absorpcijsko spektrometrijo

V 50 ml merilno bučko odpipetirajte 5 ml standardne raztopine Pb (1 g/l) in dopolnite do oznake z demineralizirano vodo. Koncentracija Pb v raztopini je 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Pripravite raztopine za tri umeritvene krivulje: za vodotopno in mobilno frakcijo Pb v koncentracijskem območju od 0,5 do 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, za celokupno koncentracijo Pb pa v območju od 1 do 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Izračunajte volumne standardne raztopine Pb s koncentracijo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ki jih boste odpipetirali v 50 ml merilne bučke, da bodo koncentracije Pb v pripravljenih raztopinah 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 4,0, 8,0 in 16,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. S katero raztopino boste dopolnili bučke do oznake? Kako boste pripravili slepe raztopine?

Merjenje koncentracije Pb

Koncentracije Pb v pripravljenih raztopinah boste izmerili na spektrometru za plamensko AAS. V spektrometer najprej razpršite raztopine z znano koncentracijo Pb, ki ste jih pripravili za umeritveno krivuljo, nato nadaljujete z meritvami ekstraktov vzorcev. Ekstrakte vzorcev (mobilna in potencialno razpoložljiva frakcija Pb) in raztopine po kislinskem razklopu vzorcev (celokupna vsebnost) merimo neposredno, brez predhodnega redčenja. Absorbanco Pb v raztopinah izmerite pri valovni dolžini 217 nm.

Rezultat

Podajte količino vodotopne in potencialno biorazpoložljive frakcije Pb v talnih vzorcih ter celokupno vsebnost. Izračunajte kakšen odstotek celokupne vsebnosti Pb v vzorcu predstavljata omenjeni frakciji. Rezultate podajte v mg Pb/kg zračno suhega vzorca tal in jih komentirajte.

Uporabljeni viri

- ATSDR Agency for toxic substances and disease registry. (2019). Substance priority list. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>
- Jena, V., Gupta, S., Dhundhel, R. S., Matic, N., Frančičković Bilinski, S., Devic, N. (2013). Determination of total heavy metal by sequential extraction from soil. *International Journal of research in Environmental Science and Technology*, 3(1), 35–38.
- Marschner, H. (1995). *Mineral nutrition of higher plants* (2 nd ed.). London: Academic Press
- Uredba o mejnih, opozorilnih in kritičnih emisijskih vrednostih nevarnih snovi v tleh. (1996). *Uradni list RS*, št. 68/96 in 41/04 – ZVO-1.

7 Določitev vsebnosti oksalatov v sadju in zelenjavi s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti

Osnovni pojmi: vodotopni oksalati, celokupni oksalati, idioblasti, tekočinska kromatografija

Namen vaje: Iz vzorcev sadja in zelenjave z vodo ekstrahiramo vodotopne oksalate in z 2 M raztopino HCl celokupne oksalate. Po ločitvi na kromatografski koloni izmerimo koncentracijo oksalatih ionov v ekstraktih vzorcev z merjenjem absorbance pri izbrani valovni dolžini na PDA detektorju.

7.1 Teoretične osnove

Oksalati

Oksalna kislina (HOOC–COOH) je v naravi zelo razširjena. V prosti obliki ali v obliki soli se nahaja v mnogih rastlinskih vrstah. Rastline v svojih tkivih nalagajo različno količino oksalatov, ki je odvisna predvsem od rastlinske vrste, rastlinskega organa in klimatskih razmer ter se giblje od 3 do 80 % suhe snovi (Gouveia, Ganança, Lebot in Pinheiro de Carvalho, 2018; Nguyễn, Lê in Savage, 2018). Najvišja vsebnost je običajno v listih, nižja v semenih in steblih. Na vsebnost oksalatov v plodovih pomembno vpliva tudi stopnja zrelosti. V rastlinah se oksalati nahajajo v obliki vodotopnih in netopnih soli. Vodotopne

so kalijeve, natrijeve in amonijeve soli, netopne pa kalcijeve in magnezijeve soli. V rastlinskih celicah se oksalati nalagajo izven vakuole v posebnih celičnih strukturah, ki jih imenujemo kristalni idioblasti.

Oksalati so metabolični proizvodi rastlin, ki zaradi negativnih učinkov predstavljajo neželeno snov v človekovi prehrani. Oksalna kislina nastaja v telesu sesalcev kot stranski proizvod pri metabolizmu vitamina C in soli glioksalne kisline (Liebman in Al-Wahsh, 2011), zato lahko z dodatnim vnašanjem oksalne kisline s hrano pripomoremo k nastanku ledvičnih kamnov in prekomernemu izločanju oksalatov z urinom (Gupta, 2007). Glavni vir oksalatov v človekovi prehrani so živila rastlinskega izvora. Med živila z visokimi vsebnostmi sodijo rabarbara, špinača, rdeča pesa, bezgove jagode, karambola, črni čaj, kakav, leguminoze (arašidi, fižol, soja), agava, nekateri oreščki, kasava in taro (Massey, 2007). Na njihovo vsebnost v hrani lahko vplivamo s procesi predelave.

Ekstrakcija

Teoretične osnove ekstrakcije glej vajo 3.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Teoretične osnove tekočinske kromatografije glej vajo 5.

7.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- 2 M raztopina HCl, 12,5 mM vodna raztopina H₂SO₄, standardna raztopina C₂O₄²⁻ (1 g/l), dvakrat demineralizirana voda;
- elektronska tehtnica, vodna kopel, centrifuga, mlin za mletje svežih in suhih vzorcev, terilnica in pestilo, steklene posodice z zamaškom, pipete, epice, 10 in 25 ml merilne bučke, 50 ml centrifugirke, merilni valj, 0,45 µm filtri za brizge, viala za HPLC.

Postopek

Priprava vzorcev

Vzorci sadja in zelenjave zmeljite ali pa jih najprej posušite in nato zmeljite.

Ekstrakcija vodotopnih in celokupnih oksalatov

V steklene posodice natehtajte okoli 0,10 g posušenega in zmletega vzorca. Če pripravljate sveže vzorce, natehtajte od 2,0 do 5,0 g vzorca, odvisno od pričakovane vsebnosti oksalatov, in si zapišite maso. Vsak vzorec natehtajte v dveh ponovitvah. Za ekstrakcijo vodotopnih oksalatov k vzorcu dodajte 15 ml dvakrat demineralizirane vode, za ekstrakcijo skupnih oksalatov (vodotopni in netopni) pa 15 ml 2 M raztopine HCl. Posodice zaprite z zamaškom, ročno stresite in jih za 15 minut postavite na vodno kopel, ogreto na 80 °C (Kristl, Sem, Mergeduš, Zavišek, Ivančič in Lebot, 2021). Po končani ekstrakciji suspenzije ohladite na sobno temperaturo in jih prelijte v 50 ml centrifugirke. Centrifugirajte 15 minut pri 10 °C in 8.000 obratih na minuto. Po centrifugiranju svežih vzorcev bistri del kvantitativno prenesite v 25 ml bučke in jih dopolnite do oznake z vodo. Premešajte in ekstrakte prefiltrirajte skozi 0,45 µm filter v vialo. Če za analizo uporabite posušene vzorce, jih po centrifugiranju samo prefiltrirajte v vialo za HPLC.

Priprava raztopin $C_2O_4^{2-}$ za umeritveno krivuljo

Umeritveno krivuljo pripravite v koncentracijskem območju 10–100 µg $C_2O_4^{2-}$ /ml. Raztopine s koncentracijo ionov $C_2O_4^{2-}$ 10, 20, 40, 60 in 100 µg/ml pripravite v 10 ml merilnih bučkah. V osnovni standardni raztopini je koncentracija ionov $C_2O_4^{2-}$ 1.000 µg/ml. Izračunajte volumne osnovne standardne raztopine, ki jih boste odpipetirali za pripravo raztopin za umeritveno krivuljo. Za dopolnjevanje merilnih bučk uporabite dva krat demineralizirano vodo.

Določitev koncentracije $C_2O_4^{2-}$

Koncentracijo ionov $C_2O_4^{2-}$ v ekstraktih vzorcev določimo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti. Vialo z raztopinami z znano koncentracijo ionov $C_2O_4^{2-}$ in ekstrakte vzorcev vstavite v avtomatski podajalnik vzorcev. Intenziteto absorbirane svetlobe izmerite pri valovni dolžini 210 nm s PDA-detektorjem.

Kromatografski pogoji:

- kromatografska kolona Rezex ROA-organic acid H+ (300 × 7,8 mm),
- pretok mobilne faze 0,5 ml/minuto (12,5 mM vodna raztopina H₂SO₄),
- temperatura kolone 25 °C,
- volumen injiciranega vzorca oziroma standardne raztopine oksalatih ionov: 20 µl.

Rezultat

Podajte vsebnost vodotopnih, netopnih in skupnih oksalatov v mg/100 g vzorca in komentirajte rezultate.

Uporabljeni viri

- Gouveia, C. S. S., Ganança, J. F. T., Lebot, V., Pinheiro de Carvalho, M. Â. A. (2018). Quantitation of oxalates in corms and shoots of *Colocasia esculenta* (L.) Schott under drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40(12), 214.
- Gupta, R. C. (2007). *Veterinary toxicology. Basic and clinical principles*. (1th ed.). Academic press INC Elsevier Science.
- Kristl, J., Sem, V., Mergeduš, A., Zavišek, M., Ivančič, A., Lebot, V. (2021). Variation of oxalate content among corm parts, harvest time, and cultivars of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott. *Journal of food composition and analysis*, 102, 104001, 1–8.
- Liebman, M., Al-Wahsh, I. A. (2011). Probiotics and other key determinants of dietary oxalate absorption. *Advances in Nutrition*, 2(3), 254–260.
- Massey, L. K. (2007). Food oxalate: factors affecting measurement, biological variation, and bioavailability. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(7), 1191–1194.
- Nguyễn, H. V. H., Lê, H. M., Savage, G. P. (2018). Effects of maturity at harvesting and primary processing of cocoa beans on oxalate contents of cocoa powder. *Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 86–90.

8 Kvalitativna določitev nitrata v zelenjavi

Osnovni pojmi: nitrat, nitrit, methemoglobinemija, kvalitativna določitev, testni lističi

Namen vaje: Ekstrakcijo nitrata in nitrita iz vzorcev zelenjave izvedemo z dodatkom vode. Koncentracijo nitrata in nitrita v ekstraktih vzorcev in pitne vode ocenimo s testnimi lističi Quantofix.

8.1 Teoretične osnove

Nitrat

Nitrat je prisoten v vseh ekosistemih. V tla ga vnašamo z mineralnimi gnojili, hlevskim gnojem in gnojevko. Naravno nastaja v tleh pri razgradnji organske snovi in z vezavo atmosferskega dušika. Atmosferski dušik (N_2) lahko nekatere rastline (npr. metuljnice) dobijo s simbiotsko vezavo s pomočjo bakterij (N-fiksirajoče bakterije, modro-zelene cepljivke), ki se nahajajo na koreninah in gomoljčkih in ga v seriji biokemijskih procesov spremenijo v amonijski dušik (NH_4^+). S pomočjo nitrifikacijskih bakterij se amonijski dušik v tleh spremeni v nitritno (NO_2^-) in nitratno obliko (NO_3^-). Nitrat je prevladujoča oblika dušika v dobro prezračenih tleh zmerne klime. V tleh je dobro mobilan (Foth, 1990). Po sprejemu nitrata v rastlinsko celico ni takojšnje potrebe za njegovo pretvorbo. Po ksilemu se transportira v nadzemne dele rastlin. Rastline nitratno in amonijsko obliko dušika vgrajujejo v proteine (Vodnik, 2012).

Nitrat je v hrani rastlinskega izvora naravno prisoten. Večina zelenjave ima sposobnost nalaganja nitratov. Med zelenjavo z visokimi vsebnostmi nitrata spadajo redkvice, rukvica, špinača, blitva, rukola, zelena solata, rdeča pesa, peteršilj in zelena. Vsebnost nitratov je običajno najvišja v pecljih, sledijo listi, stebela, korenin, socvetja, gomolji, čebulice, sadeži in semena, v katerih so vsebnosti najnižje (Shaid Umar in Iqbal, 2007). Skupaj z nitritom se kot aditiv uporablja za zaščito živil (npr. prekajenih mesnih izdelkov) pred bakterijami iz rodu *Clostridium*. Mesni izdelki prispevajo manj kot 5 % vnosa nitratov v naš organizem. Naravno je prisoten tudi v vodnih ekosistemih in pitni vodi. Onesnaženje voda in podtalnice z nitratom je običajno posledica prekomernega gnojenja z mineralnimi gnojili in vpliva komunalnih odplak.

Na vsebnost nitratov v sveži zelenjavi vplivajo biološki dejavniki (vrsta rastline, rastlinski organ, zrelost rastline), dejavniki okolja in kmetijski dejavniki (sestava tal, založenost z dušikom, vlažnost tal, intenziteta osvetlitve, temperatura, letni čas, način pridelave). Po spravilu pridelka sta pomembna dejavnika skladiščenje in procesiranje zelenjave. Pri skladiščenju zelenjave na sobni temperaturi se vsebnost nitratov v nekaj dneh zniža na račun povečanja vsebnosti nitritov, do česar pride zaradi mikrobiološke redukcije nitrata v nitrit (nitrat reduktaza) (Shaid Umar in Iqbal, 2007).

Prve omejitve za vsebnost nitratov so bile postavljene za pitno vodo. Po evropskih normativih je dopustna vsebnost nitratov v pitni vodi 25 mg/l. V Sloveniji veljavni predpisi dopuščajo vsebnost nitratov 50 mg/l in nitritov 0,50 mg/l (ARSO, 1996). Najbolj znan škodljiv učinek nitritov, ki nastanejo po redukciji nitratov, na zdravje ljudi je pojav methemoglobinemije. Nitrit reagira z Fe^{2+} v hemoglobinu, pri čemer nastane methemoglobin, ki moti prenos kisika v tkiva (Katan, 2009).

8.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- Testni lističi quantofix nitrat/nitrit;
- elektronska tehtnica, nož, nož za lupljenje, deska za rezanje, 600 ml plastične čaše, palični mešalnik, filtrirni papir, 50 ml polietilenske posodice, merilni valj (100 ml).

Postopek

Homogenizacija vzorca in ekstrakcija nitratov

Pri sveži zelenjavi najprej odstranite neužitne dele. Operite jo pod tekočo hladno vodo, oplaknite z demineralizirano vodo in posušite s papirnato brisačo. Za določanje nitratov v črni redkvi in krompirju vzorce najprej operite s tekočo vodo in jih nato posušite s papirnato brisačo. Krompir in redkev nato olupite. Zamrznjeno zelenjavo rahlo odtalite, le toliko, da se trdni vzorec in tekočina ne ločita. Svežo zelenjavo narežite na manjše koščke. Pri blitvi ločeno pripravite liste in peclje. V 600 ml plastično čašo natehtajte 10 g svežega zamrznjenega ali konzerviranega vzorca zelenjave, dodajte 90 ml dvakrat demineralizirane vode in s paličnim mešalnikom mešajte vsaj 1 minuto. Nato suspenzijo filtrirajte preko filter papirja v 50 ml polietilensko posodico (ISO 15517:2003(E), 2003). Koncentracijo nitrata in nitrita v ekstraktih vzorcev in pitne vode ocenite s testnimi lističi Quantofix. Meritve izvedite po navodilih na embalaži. Ocenjene koncentracije (mg/l) preračunajte v mg/100 g vzorca.

Rezultat

Vsebnost nitrata in nitrita podajte v mg/100 g vzorca. Na osnovi kvalitativno ocenjenih vrednosti nitrata v posamezni zelenjavi izračunajte, kakšen je prispevek zaužitja 100 g posamezne vrste zelenjave k dovoljenemu dnevnemu vnosu nitrata v telo. Vrednost ADI (maksimalni sprejemljiv dnevni vnos, Acceptable Daily Intake) poiščite v literaturi.

Uporabljeni viri

ARSO, (1996). *Okolje v Sloveniji. Vode*.

<https://www.arso.gov.si/varstvo%20okolja/poro%C4%8Dila/poro%C4%8Dila%20o%20stanju%20okolja%20v%20Sloveniji/007f.pdf>

Foth, H. D. (Ed.). (1990). *Fundamentals of soil science*. (8th ed.) New York: John Wiley & Sons.

ISO 15517:2003(E) – International Organization for Standardization. (2003). *Tobacco – Determination of nitrate content – Continuous-flow analysis method*.

Katan, M. B. (2009). Nitrate in foods: harmful or healthy? *American Journal of Clinical Nutrition*, 90, 11–2.

Shaid Umar, A., Iqbal, U. (2007). Factors responsible for nitrate accumulation: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 27, 45–57.

Vodnik, D. (2012). *Osnove fiziologije rastlin*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo.

9 Spektrofotometrično določanje skupnega cianida

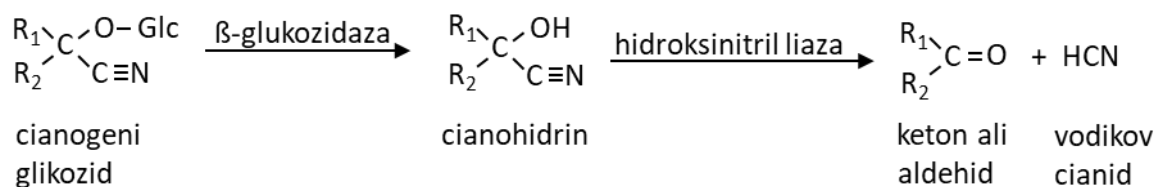
Osnovni pojmi: cianid, cianogeni glikozidi, encimska hidroliza, pikratni papir, toksičnost

Namen vaje: V vzorcih določimo vsebnost skupnega cianida s pikratno metodo, ki je osnovana na reakciji vodikovega cianida (HCN) in rumenega pikrata, pri čemer nastane izopurpurna kislina, ki je rdeče barve. Vzorcem dodamo encim β -glukozidazo, ki razgradi cianogene glikozide. Pri encimski hidrolizi sproščen HCN se veže na pikratni papir in nastane izopurpurna kislina, ki jo raztopimo v vodi. Pri izbrani valovni dolžini s spektrofotometrom izmerimo intenziteto absorpcije rdeče obarvane raztopine.

9.1 Teoretične osnove

Cianogeni glikozidi so rastlinski sekundarni metaboliti. V rastlinah imajo pomembno vlogo pri obrambi pred rastlinojedci in žuželkami (insekti). So vodotopne in dokaj stabilne spojine. Sinteza cianogenih glikozidov se začne iz α -aminokislina (valin, izolevcin, levcin, triozin, fenilalanin). Cianogeni glikozidi so zgrajeni iz α -hidroksinitrila, na katerega je z glikozidno vezjo vezan sladkor. Glede na število sladkornih enot, ki so vezane na aglikonski obroč, spojine delimo na: monosaharidni cianogeni glikozidi (prunasin, durin, linamarin), disaharidni (amigdalinalin in linustatin), trisaharidni ali polisaharidni cianogeni glikozidi (lucumin, kserantin, vicianin, oksiantin) (Vetter, 2000). V postopku, ki ga imenujemo cianogeneza, pride do stika med cianogenimi glikozidi, ki se nahajajo v vakuoli,

in β -glukozidazo. Poteče hidroliza, pri kateri se cepi β -glukozidna vez in nastane nestabilni cianohidrin. Ta spontano ali s pomočjo encima hidrosinitril liaze razpade na vodikov cianid (HCN) (Slika 9.1).



Slika 9.1: Encimsko katalizirana hidroliza cianogenih glikozidov

Cianogene glikozide so identificirali v več kot 3.000 rastlinah iz 130 družin (npr. *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Leguminosae*, *Linaceae*, *Compositae*, itd.). Vsebujejo jih tudi nekatere glive, žuželke (insekti), in mikroorganizmi. Znanih je več kot 60 različnih spojin, ki se nahajajo v vseh rastlinskih tkivih. Karakteristična cianogena spojina je običajno prisotna v rastlinah iz ene ali dveh družin. Pri sadnih vrstah iz družine rožnic običajno najdemo amigdalinalin in prunasin, v različnih vrstah bezga pa sambunigrin. Vsebnost cianogenih glikozidov v rastlinah je odvisna od starosti in vrste rastline, dejavnikov okolja (svetloba, temperatura), talnega tipa in letnega časa, spreminja se tudi med različnimi deli rastline. Visoke koncentracije cianogenih glikozidov so običajno v listih, lahko pa se spojine koncentrirajo tudi v koreninah, semenih in drugih rastlinskih tkivih (Kristl, 2019). Mnoge cianogene rastline se uporabljajo kot krma za živali ali kot živila (kasava, limski fižol).

Toksičnost živil ocenimo s količino sproščenega cianida in njegove absorpcije. Za živila običajno podajamo koncentracijo HCN. Po podatkih EFSA (2019) so vsebnosti HCN v mletih mandljih 1,4 mg/kg, v marcipanu od 15 do 50 mg/kg in v mareličnih koščicah od 120 do 4000 mg/kg. Akutna letalna doza (LD_{50}) za ljudi je od 0,5 do 3,5 mg HCN/kg telesne teže.

Vsebnost cianidnih ionov (CN^-) v vzorcih živil bomo določili s pikratno metodo, ki je osnovana na reakciji HCN in rumenega pikrata pri čemer nastane izopurpurna kislina, ki je rdeče barve. Postopek izvedemo v treh stopnjah: (1) priprava vzorca, (2) razgradnja cianogenih glikozidov s pomočjo β -glukozidaze in vezava sproščene HCN na pikratni papir ter (3) raztapljanje izopurpurne kisline v vodi in meritev intenzitete barve raztopine s spektrofotometrom.

9.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- Raztopina pikrinske kisline (1 %), Na_2CO_3 , amigdalín, β -glukozidaza, KH_2PO_4 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, led;
- elektronska tehtnica, steklene vialé z zamaškom (headspace vialé), sterilizator, centrifuga, filtrirni papir Whatman No. 1, petrijevka, epice, stojalo za vialé in epice, 10, 25 in 100 ml merilne bučke, 1.000 ml merilna bučka, 50 ml čaša, rotacijski stresalnik, semi- in mikrokivete, pipeta, klešče za trenje koščic, kavni mlinček, ravnilo, plastični trak.

Postopek

Priprava raztopin

- Raztopina fosfatnega pufra ($\text{pH} = 5$): natehtamo 9,0786 g KH_2PO_4 in ga z vodo raztopimo v 1.000 ml merilni bučki (raztopina A). Natehtamo 11,876 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in ga raztopimo v 1.000 ml vode (raztopina B). V 100 ml merilno bučko odpipetiramo 0,95 ml raztopine B in do oznake dopolnimo z raztopino A.
- Raztopina β -glukozidaze: V 10 ml merilno bučko s pipeto kanemo 1 kapljico encima (> 2 mg) in z raztopino pufra dopolnimo do oznake.
- Raztopina Na_2CO_3 : 1 g Na_2CO_3 raztopimo v 9,5 ml vode.
- Raztopina pikrinske kisline: zmešamo 10 ml pripravljene pikrinske kisline in 10 ml raztopine Na_2CO_3 .
- Raztopina amigdalina: natehtamo 50 mg amigdalina in ga raztopimo v 25 ml merilni bučki. Raztopino pripravimo v fosfatnem pufri ($\text{pH} = 5$). Koncentracija cianidnih ionov v raztopini je 113,76 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

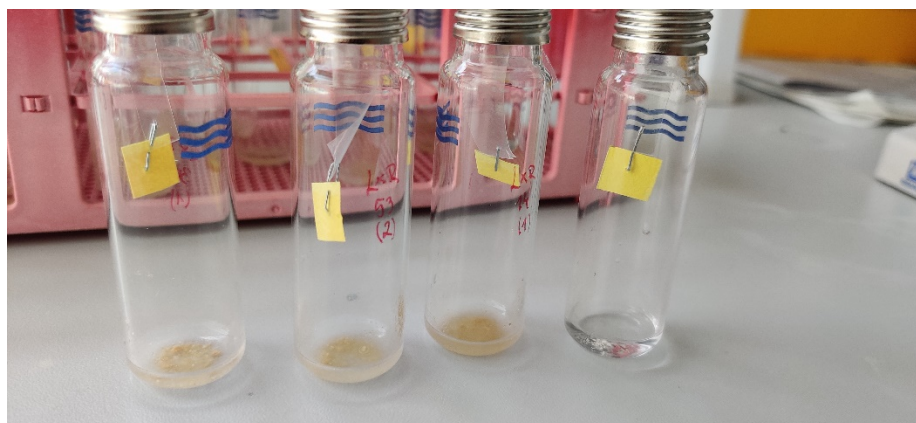
Priprava vzorcev in pikratnega papirja

Lanena semena, mandlje in bambusove vršičke zmeljite. Koščice sliv in češenj najprej zdrobite s kleščami in nato zmeljite v kavnem mlinčku. Pri marcipanu in persipanu priprava vzorca ni potrebna.

Filtrirni papir narežite na **točno** 1 cm široke trakove. Raztopino pikrinske kisline prelijte v petrijevko in vanjo potopite trakove filtrirnega papirja. Papir nato posušite in ga hranite v hladilniku v zaprti temni posodi.

Encimska hidroliza cianogenih glikozidov

V steklene vialo natehtajte od 40 do 300 mg vzorca, odvisno od pričakovane koncentracije cianidnih ionov. Vialo postavite na led. Dodajte 1 ml raztopine fosfatnega pufra (pH = 5.0) in 200 μ l raztopine β -glukozidaze. Pri večjih masah vzorca (300 mg) dodajte 2 ml raztopine pufra. Vstavite pikratni papir velikosti 1 cm \times 1 cm (ne sme se dotikati raztopine), ki ste ga predtem s sponko pritrdili na plastični trak in vialo takoj zaprite s pokrovom (Slika 9.2). Vsak vzorec pripravite v treh ponovitvah. V naslednjih 9 vial ponovno natehtajte vzorec mandljev, marcipana in lanenih semen. Dodajte 1 ml raztopine pufra. Encima **ne** dodajte.



Slika 9.2: Vialo z vzorcem in vstavljenim pikratnim papirjem

Foto: Luka Grgurič

Priprava raztopin z znano koncentracijo cianidnih ionov (CN^-)

Umeritveno krivuljo cianidnih ionov pripravite v koncentracijskem območju 4 do 18 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Za pripravo umeritvene krivulje uporabite amigdalina. V serijo 10 ml bučk odpipetirajte 0,351, 0,703, 1,055 in 1,582 ml raztopine amigdalina in dopolnite do oznake s fosfatnim pufrom. Koncentracije cianidnih ionov v posamezni raztopini so: 4,0, 8,0, 12,0 in 18,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. V vialo, ki ste jih postavili na led, odpipetirajte 1 ml raztopine cianidnih ionov, dodajte 200 μ l raztopine β -glukozidaze, namestite pikratni papir in vialo takoj zaprite. Vsako točko umeritvene krivulje pripravite v treh ponovitvah. Za slepo raztopino odpipetirajte 1 ml raztopine fosfatnega pufra. Vialo postavite za vsaj 20 ur (čez noč) v sušilnik, segret na 40 $^{\circ}\text{C}$. Naslednji dan vse raztopine ohladite na sobno temperaturo. Papir

prenesite v 1,5 ml epice, dodajte 1 ml vode in pustite stati 30 minut. Če raztopine po odstranitvi filtrirnega papirja niso bistre, jih centrifugirajte.

Merjenje koncentracije cianidnih ionov (CN⁻)

S slepo raztopino nastavite ničlo spektrometra, nato ga umerite z raztopinami cianidnih ionov in izmerite absorbance raztopin vzorcev. Meritve izvedite pri valovni dolžini 510 nm.

Rezultat

Rezultat je vsebnost HCN v mg/kg vzorca. Primerjajte in komentirajte rezultate, ki ste jih za iste vzorce dobili z in brez dodatka encima.

Uporabljeni viri

- EFSA. (2019). *Evaluation of the health risks related to the presence of cyanogenic glycosides in foods other than raw apricot kernels*. *EFSA Journal*, 17(4), 5662.
- Kristl, J. (2019). Cianogeni glikozidi. *Kemija v šoli in družbi*. (<https://www.kemija.net/stevilke/225>)
- Vetter, J. (2000). Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, 38, 11–36.

10 Določitev žveplovega dioksida (SO₂) v vinu po Rebeleinu

Osnovni pojmi: vino, žveplov dioksid, konzervans, antioksidant, alergen, titracija

Namen vaje: V vinu določimo vsebnost skupnega in prostega SO₂ po Rebeleinu. Vzorec vina destiliramo in destilat zbiramo v prebitku raztopine kalijevega jodata (KIO₃). Po dodatku škrobovice določimo koncentracijo skupnega SO₂ s titracijo z raztopino natrijevega tiosulfata (Na₂S₂O₃). Vsebnost prostega SO₂ v vinu določimo s titracijo vzorca z raztopino KIO₃. Indikator je škrobovica, s katero izločen jod v končni točki titracije obarva raztopino modro.

10.1 Teoretične osnove

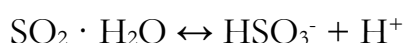
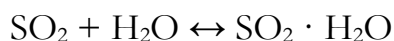
Žveplov dioksid

Žveplov dioksid (SO₂) in sulfiti (E220-E228) se tradicionalno uporabljajo kot antioksidanti in konzervansi v zelenjavnih in sadnih izdelkih (sadni sok, sirup, marmelade), suhem sadju, pivu, nekaterih svežih klobasah (»sausages«), mesu hamburgerjev z najmanj 4 % zelenjave, zamrznjenih morskih sadežih, piškotih in vinu. Podrobnejše podatke o živilih, ki jim aditive lahko dodamo, in najvišjih dovoljenih vsebnostih najdemo v Uredbi (ES) št. 1333/2008 evropskega parlamenta in sveta (2008).

Po navedbah Svetovne zdravstvene organizacije (WHO) so aditivi za živila snovi, ki jih dodajamo živilom za ohranjanje ali izboljšanje varnosti, svežine, okusa, teksture ali videza hrane. Aditiv se lahko uporabi za živila šele po opravljeni oceni tveganja, ki ne predstavlja nevarnosti za zdravje ljudi. Priporočila izda skupni strokovni odbor FAO/WHO za aditive za živila (JECFA). Žveplov dioksid in sulfiti veljajo za alergene v skladu z Uredbo (EU) št. 1169/2011 o zagotavljanju informacij o živilih potrošnikom. Za predpakirana živila mora biti njihova prisotnost v živilu ali pijači navedena na etiketi s polnim imenom, kadar vsebnost presega 10 mg/kg ali 10 mg/l (izraženo kot SO₂). Na izdelkih, za katere seznam sestavin ni potreben (npr. alkoholne pijače z več kot 1,2 vol % alkohola), mora biti prisotnost alergena na etiketi navedena (npr. vsebuje žveplov dioksid, vsebuje sulfite). Pri občutljivih ljudeh povzročijo dermatitis, koprivnico, hipotenzijo, bolečine v trebuhu in drisko. Posebna tvegana skupina so bolniki z astmo (4–10 % populacije), saj je lahko vnos manj kot 10 mg sulfita dovolj, da sproži napad astme (Vally in Misso, 2012).

Žveplov dioksid in sulfiti se v živilsko-prehranski industriji uporabljajo kot konzervansi hrane, saj preprečujejo rast mikrobov. Hkrati delujejo kot antioksidanti s sposobnostjo zaviranja oksidacijskega encima polifenol-oksidadze, ki katalizira potemnitev izdelkov iz sadja in zelenjave. V vinarstvu se SO₂ dodaja v mošt in vino za preprečevanje aktivnosti oksidacijskih encimov (npr. polifenol-oksidadze in peroksidaze) in kemijskih oksidacij, za preprečevanje rasti neželenih bakterij, kot so mlečnokislinske in očetnokislinske bakterije in kvasovk (npr. iz rodu *Brettanomyces*, ki sodelujejo pri nastanku neprijetnih vonjev vina), za zakasnitev ali preprečevanje nastanka spojin, ki povzročajo rjavenje, in za vezavo s porabniki žvepla (acetaldehid, α -ketoglutarat, piruvat, polifenoli vina, sladkorji itd.). Neželeni učinki SO₂ so nevtralizacija arome vina, neprijeten okus in vonj ter nastanek vodikovega sulfida (H₂S). Za žveplanje vina uporabljajo trakove (žveplenice), plinasti SO₂, 5–6 % vodna raztopina žveplove(IV) kisline (H₂SO₃) (žveplasta kislina) in kalijev bisulfit (K₂S₂O₅), iz katerega se v kislih raztopinah (vino, grozdni sok) sprosti SO₂ (Boulton, Singleton, Bisson in Kunkee, 1998).

Mošti in vina imajo običajno pH od 3 do 4. Prevladujoča oblika raztopljenega SO₂ v moštih in vinih je hidrogensulfatni(IV) ion oziroma bisulfitni ion (HSO₃⁻), ki je glavna oblika žvepla pri pH vrednostih od 1,86 do 7,18. Zelo majhen delež žvepla v vinih je v molekularni obliki (SO₂), in sicer od 6 % pri pH vrednosti 3,0 do 0,6 % pri pH vrednosti 4,0. Ta oblika žvepla prevladuje pri pH < 1,86, medtem ko je glavna oblika pri pH vrednostih > 7,18 sulfatni(IV) ion (SO₃²⁻). V mošt ali vino dodan SO₂ disociira v tri oblike po reakcijah:



Določena količina SO₂, ki ga dodamo v vino, se veže na spojine vina, npr. na acetaldehid, sladkorje, piruvat in druge porabnike žvepla. Imenujemo ga vezani SO₂. Prosti SO₂ je definiran kot nevezana oblika SO₂ v vinu in vključuje raztopljen SO₂ ter nevezana HSO₃⁻ in SO₃²⁻. V kakšnem deležu se posamezne oblike SO₂ pojavljajo v vinu, je odvisno od pH-vrednosti. Za vinarje je pomembna koncentracija prostega SO₂, saj lahko le ta oblika žvepla prepreči neželjeno oksidacijo in zavira mikrobnost. Koncentracija prostega SO₂, ki zagotavlja stabilnost vina, je 0,825 mg/l. Koliko molekularnega SO₂ moramo dodati v vino, da zagotovimo to koncentracijo prostega SO₂, je odvisno od pH-vrednosti vina (npr. pri pH vina 3,4 moramo dodati 32 mg/l SO₂, pri pH 4 pa 125 mg/l SO₂). Več podatkov o potrebnih dodatkih SO₂ glede na pH-vrednost vina najdete v objavi avtorjev Košuta in Jug (2010). Skupni SO₂ je vsota vezanega in prostega SO₂.

10.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- KIO₃, KI, H₂SO₄ (96 %), škrob, Na₂S₂O₃ · 5H₂O, metanol, propanal (C₃H₆O; oznaka na steklenici - propionaldehid), 1 M raztopina NaOH;
- grelna gnezdo, destilacijska bučka (100 ml), hladilnik, 25 ml bireta, 50 ml bireta, erlenmajerica (250 ml), 2 ml in 10 ml polnilna pipeta, 100 in 1000 ml merilna bučka, merilni valj, 500 ml čaša, parafilm, pH-testni lističi, avtomatska pipeta.

Postopek

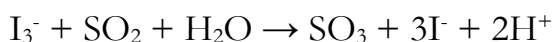
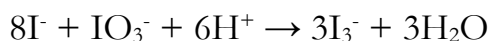
Vsebnost skupnega in prostega SO₂ v vinu bomo določili po Rebeleinu. Vzorec vina destiliramo in v destilatu določimo koncentracijo skupnega SO₂ s titracijo z raztopino jodovice in natrijevega tiosulfata. Gre za referenčno metodo, s katero odpravimo številne moteče dejavnike, ki vplivajo na rezultat, kadar uporabimo metodo po Ripperju. Postopek določitve je povzet po navodilih Košmerl in Kač (2010).

Priprava raztopin

- Raztopina kalijevega jodata: natehtamo 0,1115 g KIO_3 in ga kvantitativno prenesemo v 1.000 ml merilno bučko, dodamo 50 ml 1 M raztopine NaOH in dopolnimo do oznake z vodo;
- raztopina H_2SO_4 (16 %): v 1.000 ml merilno bučko nalijemo demineralizirano vodo (do polovice), z merilnim valjem previdno dodamo 175 ml koncentrirane H_2SO_4 , premešamo in dopolnimo z vodo do oznake;
- raztopina škrobovice (indikator): v 500 ml vrele vode dodamo 2 g škroba, ločeno v 500 ml demineralizirane vode raztopimo 20 g KI in dodamo 10 ml 1 M raztopine NaOH . Obe raztopini združimo in hranimo v hladilniku;
- raztopina natrijevega tiosulfata: natehtamo 1,5512 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in ga raztopimo v 10 ml 1 M raztopine NaOH in 500 ml vode. Ko se sol raztopi, merilno bučko (1000 ml) z vodo dopolnimo do oznake;
- raztopina propanala (10 %): odpipetiramo 10 ml propanala v 100 ml merilno bučko in jo z vodo dopolnimo do oznake.

Določitev prostega SO_2

Bireto napolnite z raztopino KIO_3 . V erlenmajerico odpipetirajte 10 ml vzorca vina, previdno dodajte 10 ml 16 % raztopine H_2SO_4 in 10 ml raztopine škrobovice. Premešajte in titrirajte z raztopino KIO_3 do preskoka barve raztopine v rahlo modro. Barva mora biti obstojna vsaj 20–30 sekund. Med titracijo poteče redoks reakcija po enačbi:



Med jodidnim ionom (I^-) in jodatom (IO_3^-) nastane trijodidni ion (I_3^-). Dokler je v vzorcu prisoten SO_2 , ta reagira z I_3^- . V končni točki titracije, ko v vzorcu ni več SO_2 , se v raztopini pojavi prosti jod, ki se veže v vijačnico škroba. Kompleks, ki pri tem nastane, je modre barve.

Na bireti odčitajte porabljen volumen raztopine KIO_3 in ga pomnožite z 10. Rezultat (Y_1) je masna koncentracija prostega SO_2 (mg SO_2 /l vina) in reducentov (predvsem askorbinske kisline in reducirajočih sladkorjev).

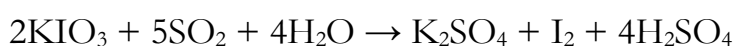
Določitev prostega SO₂ s korekcijo na askorbinsko kislino

V erlenmajerico odpipetirajte 10 ml vzorca vina, dodajte 1 ml 10 % raztopine propanala in premešajte. Vrat erlenmajerice pokrijte s parafilmom in počakajte **natančno** 5 minut. Poteče reakcija med prostim SO₂ in propanalom. Po 5 minutah dodajte 10 ml 16 % raztopine H₂SO₄ in 10 ml raztopine škrobovice. Premešajte in titrirajte z raztopino KIO₃ do preskoka barve raztopine v rahlo modro. Na bireti odčitajte porabljen volumen raztopine KIO₃ in ga pomnožite z 10. Rezultat (Y₂) je masna koncentracija askorbinske kisline (vitamina C), izražena kot prosti SO₂ (mg/l). Dejansko koncentracijo prostega SO₂ izračunajte po enačbi:

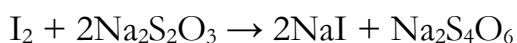
$$Y(\text{prosti SO}_2) = Y_1 - Y_2$$

Določitev skupnega SO₂

Najprej izvedite destilacijo z 10 ml demineralizirane vode (3–4 minute), da ogrejete destilacijski sistem. V erlenmajerico (predložka) odmerite iz birete 50 ml raztopine KIO₃ in erlenmajerico nastavite na konec destilacijske cevi tako, da je konica cevi potopljena v raztopino. V 100 ml destilacijsko bučko odpipetirajte 2 ml metanola, 10 ml vzorca vina in 10 ml 16 % raztopine H₂SO₄. Premešajte in bučko pritrdite na destilacijski sistem. Bučka mora biti v ogretem grelnem gnezdu. Destilirajte točno 3 minute. Ko uvajamo SO₂ v raztopino KIO₃, deluje SO₂ kot redukcijsko sredstvo in reducira jodat do joda po reakciji:



Po končani destilaciji z vodo sperite konico cevi, ki je bila potopljena v raztopino KIO₃. Snemite destilacijsko bučko in konico destilacijske cevi ponovno sperite. Raztopino ohladite (tekoča hladna voda), dodajte 10 ml raztopine škrobovice in 10 ml 16 % raztopine H₂SO₄. Ker je v raztopini prisoten prosti (elementarni) jod, se le-ta ob dodatku škrobovice obarva temno modro oziroma črno. Bireto (25 ml) napolnite s standardizirano raztopino Na₂S₂O₃ in titrirajte do preskoka iz črno oziroma temno modro obarvane raztopine v brezbarvno ali rahlo modrikasto. Med titracijo poteče reakcija:



Poraba raztopine Na₂S₂O₃, ki jo odčitate na bireti, pomeni masno koncentracijo skupnega SO₂ v vinu (mg SO₂/l vina).

Koncentracijo vezanega SO₂ izračunajte po enačbi: Y (vezani) = Y (skupni) – Y (prosti).

Titracija slepega vzorca

Za kontrolo koncentracije reagentov naredite tudi titracijo slepega vzorca. V erlenmajerico odmerite iz birete 50 ml raztopine KIO₃, dodajte 10 ml raztopine škrobovice in 10 ml 16 % raztopine H₂SO₄. Premešajte in titrirajte z raztopino Na₂S₂O₃ do razbarvanja. Maksimalno dovoljeno odstopanje pri titraciji slepega vzorca je ± 2 mg SO₂/l.

Rezultat

Za analizirane vzorce vin podajte vsebnost prostega in vezanega SO₂ (mg/l). S testnimi lističi izmerite pH-vrednost vzorcev vina. Koncentracija prostega SO₂, ki zagotavlja stabilnost vina, je 0,825 mg/l. V literaturi poiščite, koliko molekularnega SO₂ moramo dodati v vino, da zagotovite stabilnost vina.

Uporabljeni viri

- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. in Kunkee, R. E. (1998). *Principles and practices of winemaking*. New York: Chapman & Hall.
- Košmerl, T. in Kač, M. (2010). *Kemijske analize in postopki čiščenja vina: laboratorijske vaje pri izbirnem predmetu Vinarstvo*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo.
- Košuta M. in Jug T. (2010). Koliko žvepla dodati? *SAD: revija za sadjarstvo, vinogradništvo in vinarstvo*, 21(3), 20–21.
- Uredba (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in sveta z dne 16. decembra 2008 o aditivih za živila. (2008). *Uradni list Evropske unije*, L 354/16.
- Uredba (EU) št. 1169/2011 Evropskega parlamenta in sveta z dne 25. oktobra 2011 o zagotavljanju informacij o živilih potrošnikom, spremembah uredb (ES) št. 1924/2006 (ES) št. 1925/2006 Evropskega parlamenta in Sveta ter razveljavitvi Direktive Komisije 87/250/EGS, Direktive Sveta 90/496/EGS, Direktive Komisije 1999/10/ES, Direktive 2000/13/ES Evropskega parlamenta in Sveta, direktiv Komisije 2002/67/ES in 2008/5/ES in Uredbe Komisije (ES) št. 608/2004. (2011). *Uradni list Evropske unije*, L 304/18.
- Vally, H., Misso, N. L. A. (2012). Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 5(1) 16–23.

11 Kvalitativni testi za dokaz prisotnosti naravnih in umetnih barvil v živilih

Osnovni pojmi: naravna barvila, sintetična barvila, aditivi, kvalitativni testi

Namen vaje: S kvalitativni testi v vzorcih živil dokažemo prisotnost/odsotnost naravnih barvil (karamela, klorofil, kurkuma in anato) in sintetičnih barvil. Kisla sintetična barvila dokazujemo z volneno nitko, na kateri v kislem mediju nastane pozitiven naboj, ki deluje kot gonilna sila za difuzijo kislega barvila v vlakno. Privlačna sila nastane zaradi sulfonskih (HSO_3^-) ali karboksilnih (CH_3COO^-) funkcionalnih skupin v molekuli barvila.

11.1 Teoretične osnove

Barvila

Barvila za živila so snovi sintetičnega ali naravnega izvora, ki obnovijo naravno barvo živila ali ga obarvajo. V živilih se uporabljajo predvsem zaradi lepšega in privlačnejšega videza, nekatera naravna barvila delujejo tudi kot antioksidanti. Večinoma so topna v vodi, posamezna se bolje topijo v maščobah. Naravna barvila so klorofil, karotenoidi (npr. anato, kapsatin, lutein, kantaksantin), riboflavin, žafran, kurkuma, betanin, karamela, antocianini in druga. Pridobivamo jih iz rastlin (rdeče pese, rdeče paprike, korenja, šipka, paradižnika, drugih vrst sadja in zelenjave), gliv in živali. V proizvodnji ali predelavi živil

je uporaba naravnih barvil v porastu, ker pa so v primerjavi s sintetičnimi barvili manj obstojna, se lahko med tehnološkimi postopki razgradijo (FSSAI, 2015).

Sintetična barvila delimo na kislila in bazična. Trenutno so vsa za tehnološke namene dovoljena vodotopna sintetična barvila kislila. Vključujejo tri rdeče odtenke, dva rumena, dva modra in en zelen odtenek. Za živila je uporaba sintetičnih barvil določena v Uredbah s področja aditivov za živila. Barvil ni dovoljeno dodajati nepredelanemu živilu (zelenjava, sveže sadje), stekleničenim vodam, oljem, jajcem in jajčnim izdelkom, testeninam, sadnim in zelenjavnim sokovom, marmeladam, džemom, kavi, čajem, vinu, mleku in osnovnim izdelkom iz mleka, moki, izdelkom iz čokolade in sadnim nektarjem. Dovoljena sintetična barvila se najpogosteje dodajajo slaščičarskim izdelkom, kandiranemu sadju, sadnim rezinam, sadnim sirupom, sladoledu, bombonom, ribjim in drugim morskim izdelkom, sirom, prehranskim dopolnilom, aromatiziranim brezalkoholnim pijačam, prigrizkom, kot so npr. čipsi in snacksi. Barvila, za katera je pri označevanju živil potrebno navesti dodatne informacije, so oranžno FCF (E 110), kinolinsko rumeno (E 104), karmoizin (E 122), rdeče AC (E 129), tartrazin (E 102) in rdeče R4 (E 124). Dodatne informacije o barvilih najdete v Uredbi (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in sveta z dne 16. decembra 2008 o aditivih za živila (2008).

Prisotnost kislilnih barvil v živilih ugotavljamo z vlakni. Kislila barvila imajo v strukturi molekule eno ali več sulfonskih (HSO_3^-) ali karboksilnih (CH_3COO^-) funkcionalnih skupin. Vlakna obarvajo iz kislilnih raztopin. V kislilnih raztopinah na vlaknu nastane pozitiven naboj, ki deluje kot gonilna sila za difuzijo barvila v vlakno. Na ta način se lahko barvajo vlakna, na katerih v prisotnosti kisline nastane pozitiven naboj (volna, svila, najlon).

11.2 Izvedba vaje

Reagenti in pribor

- Etanol, eter (dietil eter), petroleter, aceton, 5 % raztopina NaNO_2 , koncentrirana HCl , 1 % raztopina resorcinola (sveže pripravljena), 10 % raztopina KOH v metanolu, raztopina NH_3 , raztopina H_3BO_3 , raztopina alkohola in etra (10 ml 96 % etanola in 30 ml etra), 40 % raztopina SnCl_2 , 0,1 M raztopina NaOH , 2 % raztopina NH_3 v 70 % etanolu, razredčena raztopina CH_3COOH , 2 % raztopina NaOH ;
- elektronska tehtnica, kuhalna plošča, centrifuga, filtrirni papir, centrifugirke, epruvete, 1 in 5 ml pipeta, izparilnice, čaše, vodna kopel, bela volnena nit, Soxhletov aparat, pH testni lističi, kuhalna plošča, terilnica in pestilo, centrifuga, merilni valj.

Postopek

a) Testi za prisotnost naravnih barvil

Karamela

Za prisotnost karamele izvedite Fieheov test. Vzorec ekstrahirajte s 50 ml etra. Ekstrakt prelijte v izparilnico in pustite, da topilo izpari. K preostanku dodajte 3 kapljice 1 % raztopine resorcinola in HCl. Nastanek roza barve je pozitiven test na prisotnost karamele. Namesto etra lahko za ekstrakcijo uporabite aceton. V tem primeru se ob prisotnosti karamele pojavi rdeče-vijolična barva (FSSAI, 2015).

Klorofil

Vzorec ekstrahirajte z etrom in k ekstraktu dodajte 10 % raztopino KOH v metanolu. Barva porjavi. Če se hitro spremeni nazaj v zeleno, ste potrdili prisotnost klorofila (FSSAI, 2015).

Kurkuma

Manjšo količino vzorca dajte v centrifugirko, dodajte etanol in nekaj časa stresajte. Nato bistri del ekstrakta vzorca prelijte v čašo. Dodajte košček filtrirnega papirja in izparite topilo na vodni kopeli do suhega. Omočite posušen filtrirni papir z nekaj kapljicami raztopine borove kisline, h kateri ste dodali nekaj kapljic HCl. Ponovno posušite filtrirni papir. Če je v vzorcu prisotna kurkuma, bo posušen papir češnjevo rdeče barve, ki se spremeni v modro-zeleno, ko dodate kapljico raztopine NaOH ali NH_3 v metanolu (FSSAI, 2015).

Anato

Raztopljeno maščobo (maslo, margarina) ali olje stresajte z 2 % raztopino NaOH. Filtrirni papir navlažite in ga prelijte z ekstraktom. Filtrirni papir se bo obarval v barvo slame, ki se ohrani tudi po nežnem spiranju z vodo. Papir posušite, dodajte kapljico 40 % raztopine SnCl_2 in ga ponovno posušite. Če se pojavi vijolična barva, ste potrdili prisotnost anata (FSSAI, 2015).

Rezultat

Pripravi preglednico testiranih živil in pri posameznem živilu označi prisotnost/odsotnost posameznega naravnega barvila.

b) Test za prisotnost sintetičnih barvil v rumenjaku

Rumenjak ločite od beljaka in ga dobro homogenizirajte. Dodajte 15 ml raztopine etanola in etra, dobro premešajte in filtrirajte. S filtracijo ločite kosmičaste ostanke od rumene raztopine. V epruveto odpipetirajte 5 ml bistre raztopine, dodajte 1 ml 5 % raztopine NaNO_2 in nekaj kapljic koncentrirane HCl ter močno stresite. Pri reakciji med NaNO_2 in HCl nastane dušikova kislina, ki razbarva naravna barvila rumenjaka, na umetna barvila ne vpliva.

Rezultat

V jajčnem rumenjaku so (niso) prisotna umetna barvila.

c) Test za prisotnost prepovedanih barvil v oljih

V centrifugirko odmerite 5 ml vzorca in dodajte 5 ml koncentrirane HCl . Nežno nekaj časa stresajte in nato pustite stati 5 minut. Če je prisotno nedovoljeno barvilo, bo iz vzorca olja prešlo v kislino (v zgornjo plast).

Rezultat

V vzorcih olj je/ni prisotno prepovedano barvilo.

d) Test za prisotnost sintetičnih barvil

Za identifikacijo sintetičnih barvil v živilih je potrebna ekstrakcija barvila iz pripravljene raztopine živila. Če je v živilu prisotnih več barvil, jih lahko ločimo in identificiramo s papirno kromatografijo. Postopki, ki sledijo, so povzeti po opisu v literaturi (FSSAI, 2015).

Priprava bele volnene niti

Volneno nit za pletenje ekstrahiramo s petroletrom v Soxhletovem aparatu 2–3 ure, da odstranimo maščobo. Nato nit zavremo v zelo razredčeni raztopini NaOH in nato tudi v vodi, da odstranimo bazo.

Priprava vzorcev

Brezalkoholne pijače (npr. gazirane pijače): Ker je večina pijač v tej kategoriji kislih, jih lahko običajno neposredno tretirate z volneno nitjo. Če je pH vrednost nevtralna ali v bazičnem območju, vzorec nakisajte z očetno kislino.

Alkoholne pijače (npr. vino): Alkoholne pijače zavrite, da odstranite alkohol. Če je potrebno, vzorec nakisajte.

Živila na osnovi škroba (npr. keksi, praški za pudinge, kreme): Kekse in podobne vzorce (5 g) natehtajte v terilnico, dodajte 25 ml 2 % raztopine NH_3 v 70 % etanolu in zdrobite, da dobite homogeno zmes. Pustite stati 1 uro, nato zmes prelijte v centrifugirko in centrifugirajte. Bistro raztopino prenesite v čašo in na vodni kopeli izparite do suhega. K preostanku dodajte 15 ml razredčene očetne kisline.

Reakcija

V čaše s približno 15 ml pripravljenih nakisanih raztopin vzorcev dodajte 5 cm volneno nit in vzorce zavrite. Pustite tako dolgo, da se nit obarva. Volneno nit vzamete iz raztopine in jo sperite s tekočo vodo. Nit nato prenesite v čašo z raztopino razredčenega NH_3 in ponovno segrejte. Če se nit razbarva, ste dokazali prisotnost kislega sintetičnega barvila. Barvilo, ki je bilo prisotno v živilu, ostane v alkani raztopini.

Če bi poskus nadaljevali z identifikacijo barvila s papirno kromatografijo, bi nit odstranili iz raztopine, raztopino nakisali, vanjo potopili novo volneno nit in zavreli, dokler se barvila ne bi vezala na nit. Barvila bi nato ekstrahirali z malim volumnom razredčene raztopine NH_3 in filtrirali. Nato bi barvilo skoncentrirali tako, da bi raztopino postavili na vodno kopel, segreli do vrenja in pustili vreti tako dolgo, da bi se volumen raztopine zmanjšal. Koncentrat barvila bi nato nanесли na kromatografski papir.

Volneno nit lahko obarvajo tudi naravna barvila, ki so prisotna v živilu, vendar se naravna barvila običajno z niti v alkalni raztopini NH_3 ne odstranijo. Bazična barvila ekstrahiramo tako, da živilo pripravimo v bazični raztopini NH_3 , zavremo z volneno nitjo in barvilo z niti odstranimo v razredčeni kislini. Če test pokaže prisotnost bazičnega barvila, kaže na prisotnost prepovedanega barvila (FSSAI, 2015).

Rezultat

Pripravi preglednico testiranih živil in pri posameznem živilu označi prisotnost/odsotnost sintetičnega barvila.

Uporabljeni viri

- FSSAI. (2015). *Manual of methods of analysis of foods, food additives*. Food safety and standards authority of India. Ministry of health and family welfare government of India, New Delhi. http://www.old.fssai.gov.in/Portals/0/Pdf/Draft_Manuals/FOOD_ADDITIVES.pdf
- Uredba (ES) št. 1333/2008 Evropskega parlamenta in sveta z dne 16. decembra 2008 o aditivih za živila. (2008). *Uradni list Evropske unije*, L 354/16.

Priloga: Laboratorijski dnevnik



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo
in biosistemske vede

POROČILO LABORATORIJSKIH VAJ

DATUM: _____

Številka vaje: _____

Ime in Priimek: _____

Študijski program: _____

NASLOV VAJE: _____

1. Namen vaje: (opišite v nekaj stavkih)

3. Meritve (zapišite rezultate meritev npr. volumne standardne raztopine, porabljene za titracijo vzorca, izmerjene koncentracije ...)

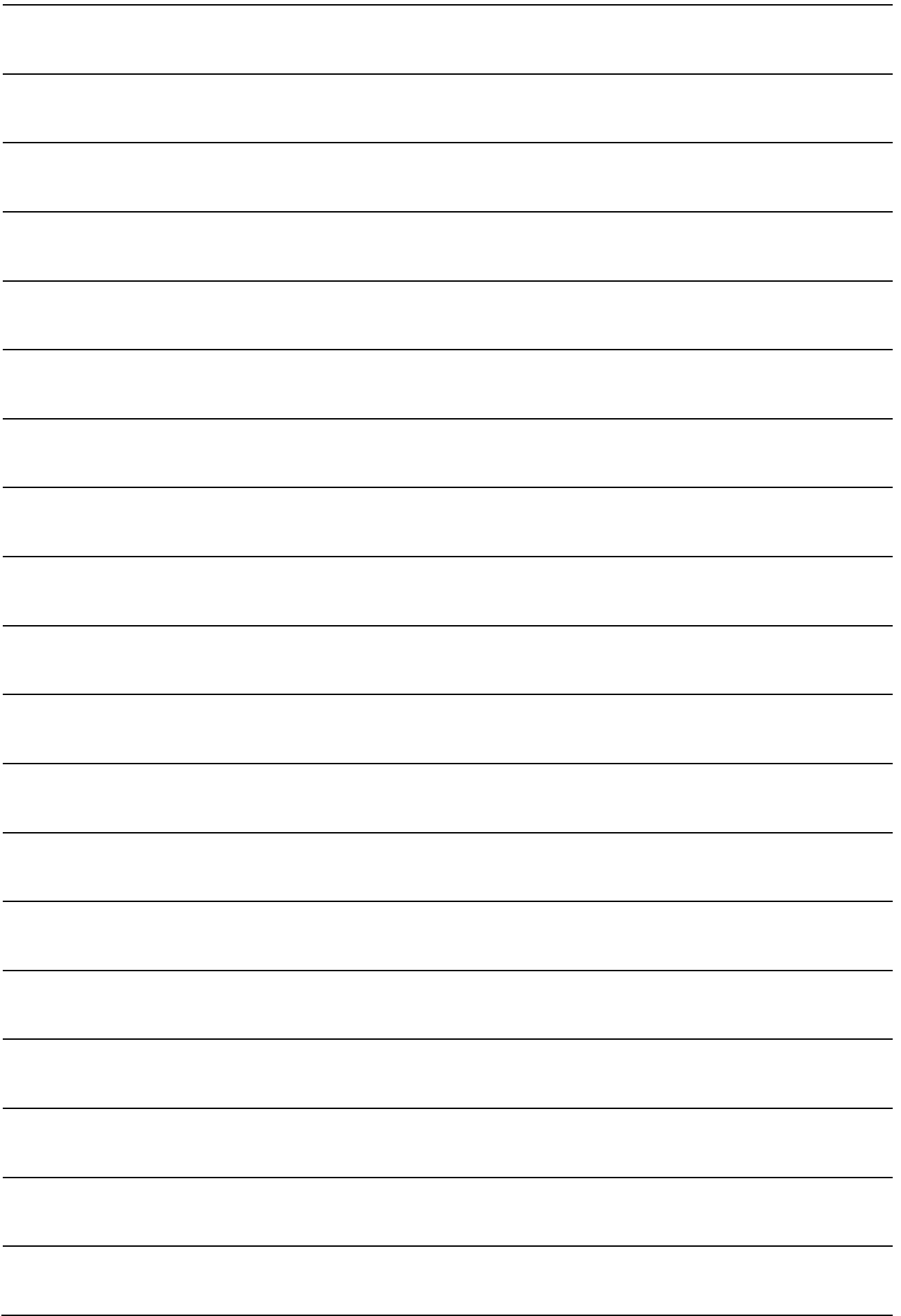


- 4 Izračuni (zapišite izračune, ki ste jih naredili pri pripravi raztopin za umeritvene krivulje, pri preračunih izmerjenih koncentracij v mg/kg ali mg/100 g vzorca ...)



- 5 Rezultati in diskusija (rezultate prikažite v preglednici, grafu ali besedilu. Opišite, ovrednotite dobljene rezultate in jih komentirajte skladno z navodili vaje).





KEMIJSKE ANALIZNE METODE V KMETIJSTVU IN TOKSIČNE SNOVI V EKOSISTEMIH: NAVODILA ZA LABORATORIJSKE VAJE

JANJA KRISTL

Univerza v Mariboru, Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Maribor, Slovenija.
E-pošta: janja.kristl@um.si

Povzetek Navodila za vaje dopolnjujejo nekatere vsebinske sklope predavanj pri predmetih Kemijske analitične metode v kmetijstvu in Toksične snovi v ekosistemih. Študentu pomagajo razumeti posamezne pojme (ekstrakcija, atomska absorpcijska spektrometrija, molekulska absorpcijska spektrometrija, tekočinska kromatografija, kislinski razklop) in laboratorijske postopke. V gradivu so opisani postopki priprave vzorcev in kvantitativne določitve natrijevega klorida, proteinov, skupnih fenolov, sladkorjev, oksalatov, vodikovega cianida v vzorcih živil in žveplovega dioksida v vinu. Vključena je tudi kvalitativna določitev nitrata in nitrita v ekstraktih živil ter kvalitativni testi za ugotavljanje prisotnosti naravnih in sintetičnih barvil. Vsebina zajema tudi določitev rastlinam dostopnega bakra ter vodotopne in biodostopne frakcije svinca v talnih vzorcih.

Ključne besede:

natrijev
klorid,
proteini,
oksalati,
vodikov
cianid,
naravna in
sintetična
barvila,
fenoli,
žveplov
dioksid,
svinec,
baker,
nitrat



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kmetijstvo
in biosistemske vede

