

sapientia
tankönyvek



Csapó János
Albert Csilla
Kiss Dóra

Analitikai kémia élelmiszermérnököknek

Scientia Kiadó

Csapó János
Albert Csilla
Kiss Dóra

Analitikai kémia élelmiszer- mérnököknek

Csapó János
Albert Csilla
Kiss Dóra

Analitikai kémia élelmiszermérnököknek

Scientia Kiadó
Kolozsvár ■ 2020

MEGVALÓSULT A MAGYAR KORMÁNY
TÁMOGATÁSÁVAL



MINISZTERELNÖKSÉG
NEMZETPOLITIKAI ÁLLAMTITKÁRSÁG



BETHLEN GÁBOR
Alap

Felelős kiadó:

Kása Zoltán

Lektor:

Kovács Béla (Debrecen)

2. átdolgozott, bővített kiadás: 2020

© Scientia 2020

Minden jog fenntartva, beleértve a sokszorosítás, a nyilvános előadás, a rádió- és televízióadás, valamint a fordítás jogát, az egyes fejezeteket illetően is.

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României

CSAPÓ, JÁNOS

Analitikai kémia élelmiszermérnököknek / Csapó János, Albert Csilla, Kiss Dóra.

- Cluj-Napoca : Scientia, 2020

ISBN 978-606-975-034-6

I. Albert, Csilla

II. Kiss, Dóra

54

Tartalomjegyzék

Bevezetés	35
0. Az analitikai módszerek felosztása és a jellemzésükre alkalmas paraméterek	37
0.1. Az analitikai módszerek felosztása	37
0.1.1. Klasszikus analitikai módszerek.	37
0.1.2. Műszeres analitikai módszerek	37
0.2. Az analitikai módszerek jellemzésére alkalmas paraméterek	38
0.2.1. Szelektivitás és specifikusság.	38
0.2.2. Zavartűrés	38
0.2.3. Méréstartomány	39
0.2.4. Linearitás.	39
0.2.5. Érzékenység.	39
0.2.6. Kimutatási határ	39
0.2.7. Meghatározási határ	39
0.2.8. Pontosság.	40
0.2.9. Precizitás, ismételhetség, reprodukálhatóság	40
1. Minőségi kémiai analízis	41
1.1. A minőségi kémiai analízis célja	41
1.2. A minőségi kémiai analízis menete.	42
1.2.1. A kationok felkutatása az egyszerű analízis során.	43
1.2.2. Az anionok felkutatása az egyszerű analízis során	43
1.2.3. Lángfestési próba	44
1.3. Néhány fontosabb kation és anion kimutatása	45
1.4. Speciális vizsgálatok élelmiszerek komponenseinek kimutatására	49
1.4.1. A nitrátionok kimutatása ivóvízből	49
1.4.2. Arzén kimutatása	49
1.4.3. Az ammónia kimutatása Nessler-reagenssel	50
1.4.4. Zsírok és olajok avasodásának kimutatása Kreiss-reakcióval	50
1.4.5. A különböző fémnyomok kimutatása	51
1.4.6. Karbamid kimutatása élelmiszerekből	52
2. Mennyiségi kémiai analízis	53
2.1. Bevezetés a mennyiségi kémiai analízisbe	53
2.1.1. Mennyiségi kémiai analízis	53
2.1.2. Térfogatos (titrimetriás) kémiai analízis	53
2.1.3. Analitikai mérleg és mérlegelés	54
2.1.4. Laboratóriumi edények anyaga	56
2.1.5. Térfogatómérő eszközök.	59

6 ■ Tartalomjegyzék

2.1.6. Mérőoldatok	62
2.1.7. A titrálás hibaforrásai	63
2.2. Acidi-alkalimetria, neutralizációs analízis	65
2.2.1. Az indikátorok működése	65
2.2.1.1. Az indikátorok átcsapása. Indikátorexponens	65
2.2.1.2. Keverékindikátorok	67
2.2.1.3. A kísérleti körülmények hatása az indikátorok átcsapására	68
2.2.1.4. Néhány acidi-alkalimetriás indikátor	69
2.2.2. Ekvivalenciapont	70
2.2.2.1. Az ekvivalenciapont számítása	70
2.2.3. A hidrogénion-koncentráció változása titrálás közben	73
2.2.3.1. A pH változása erős sav, illetve erős bázis titrálása közben	74
2.2.3.2. A pH változása gyenge sav és gyenge bázis közömbösítése alkalmával	75
2.2.3.3. A pH mérése	76
2.2.4. Mérőoldatok készítése	78
2.2.4.1. 1 M HCl készítése és beállítása	78
2.2.4.2. 0,1 M HCl készítése és beállítása	81
2.2.4.3. 1 M NaOH készítése és beállítása	82
2.2.4.4. 0,1 M NaOH készítése és beállítása	83
2.2.4.5. 0,5 M alkoholos KOH készítése	83
2.2.5. Erős savak titrálása	84
2.2.5.1. Sósavoldat HCl-tartalmának meghatározása	84
2.2.5.2. Salétromsavoldat HNO ₃ -tartalmának meghatározása	85
2.2.5.3. Kénsavoldat H ₂ SO ₄ -tartalmának meghatározása	85
2.2.5.4. Peroxi-diszulfátok meghatározása	86
2.2.6. Gyenge savak titrálása	86
2.2.6.1. Ecetsavoldat CH ₃ COOH-tartalmának meghatározása	87
2.2.6.2. Ecetsavanhidrid meghatározása	87
2.2.6.3. Tejsav titrálása	88
2.2.6.4. Borkósav és borkó titrálása	89
2.2.6.5. Bórsav és alkálilborátok H ₃ BO ₃ -tartalmának meghatározása	89
2.2.6.6. Szénsavoldat CO ₂ -tartalmának meghatározása	90
2.2.6.7. Foszforsav és alkálifoszfátok meghatározása	91
2.2.7. Erős és gyenge bázisok titrálása	93
2.2.7.1. Kálilúg, nátronlúg és meszesvíz titrálása	93
2.2.7.2. Ammóniameghatározás	94
2.2.8. Nitrátmeghatározás	96
2.2.9. Acetilszalicilsav (aszpirin) meghatározása	97

2.3. Oxidációs és redukciós titrálási módszerek	98
2.3.1. Oxidáció-redukció	98
2.3.2. Redoxindikátorok	98
2.3.3. Permanganometria	99
2.3.4. Jodometria	100
2.3.4.1. Jodometriás indikátorok	102
2.3.4.2. 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ mérőoldat.	103
2.3.4.3. 0,1 M I_2 mérőoldat	106
2.3.4.4. Oxidálóanyagok által szabaddá tett jód mérése	106
2.3.4.4.1. Szabad halogének meghatározása	106
2.3.4.4.2. Hipokloritok meghatározása	107
2.3.4.4.3. Hidrogén-peroxid meghatározása	108
2.3.4.4.4. Permanganátok jodometriás meghatározása	108
2.3.4.4.5. Vízben oldott oxigén meghatározása Winkler szerint	109
2.3.4.5. Jodometriás cukormeghatározás	110
2.3.4.6. Zsírok és olajok jódszámának, illetve jód-brómszámának meghatározása	111
2.4. Csapadékos titrálási módszerek.	113
2.4.1. Néhány módszer a csapadékos titrálások végpontjának jelzésére	115
2.4.2. 0,1 M NaCl mérőoldat készítése.	115
2.4.3. 0,1 M AgNO_3 mérőoldat készítése	116
2.4.4. 0,1 M NH_4SCN (KSCN)-oldat készítése és beállítása.	116
2.4.5. Az ezüst csapadékos meghatározása	116
2.4.6. Kloridionok meghatározása	117
2.4.7. Jodidionok meghatározása	117
2.5. Komplex vegyületek képződésén alapuló módszerek.	118
2.5.1. Komplexometria. Kelatometria	118
2.5.1.1. Komplexometriás indikátorok.	119
2.5.1.2. Komplexon(III)-mérőoldat készítése	121
2.5.1.3. Kalcium és magnézium együttes mennyiségének megállapítása. A víz összes keménységének meghatározása	121
2.5.1.4. A kalcium komplexometriás meghatározása	122
2.5.1.5. A vas(III)-ionok komplexometriás meghatározása	122
3. Az ultrabolya-látható abszorpciós spektrofotometria és elválasztási módszerek élelmiszerek analízisében.	123
3.1. Ultrabolya-látható abszorpciós spektrofotometria.	123
3.1.1. Az UV-VIS spektrofotométer felépítése	126
3.1.2. Az UV-VIS spektrofotométerek különböző típusai	128
3.1.2.1. Egyfényutas spektrofotométerek.	128
3.1.2.2. Kétfényutas spektrofotométerek	128
3.2. Elválasztási módszerek élelmiszerek analízisében.	129

8 ■ Tartalomjegyzék

3.2.1. Kromatográfia	129
3.2.1.1. A kromatográfia elvi alapjai	129
3.2.1.1.1. A kromatográfiás módszerek csoportosítása	129
3.2.1.1.2. A kromatografálás mechanizmusa.	130
3.2.1.1.3. Oszlopkromatográfia	131
3.2.1.2. Adszorpciós kromatográfia	133
3.2.1.2.1. Az adszorpciós kromatográfia műveletei	135
3.2.1.2.2. Adsorbensek és minősítésük	136
3.2.1.2.3. A mozgófázis összetétele	137
3.2.1.2.4. Az alkalmazott kromatográfiás eljárások.	138
3.2.1.2.5. Nagyhatékonyságú (nagynyomású) folyadékromatográfia (HPLC).	138
3.2.1.2.6. A kromatogramok értékelése	141
3.2.1.3. Megoszlásos kromatográfia	141
3.2.1.3.1. Megoszlás, megoszlási törvény	142
3.2.1.3.2. A megoszlásos kromatográfia elmélete	142
3.2.1.3.3. Rétegekromatográfia.	143
3.2.1.3.4. Papírkromatográfia	144
3.2.1.3.5. Minőségi és mennyiségi meghatározás	145
3.2.1.4. Ioncserés kromatográfia.	146
3.2.1.4.1. Az ioncsere mechanizmusa	146
3.2.1.4.2. Az ioncserélő gyanták és tulajdonságaik.	147
3.2.1.4.3. Az ioncserés kromatográfia metodikája.	148
3.2.1.5. Gélkromatográfia	149
3.2.1.5.1. A gélkromatográfia elmélete	149
3.2.1.5.2. Gél típusok és a dextranszél	150
3.2.1.5.3. A gélkromatográfiás eljárás	151
3.2.1.5.4. Géloszlop-kromatográfia	151
3.2.1.5.5. Gélréteg-kromatográfia.	152
3.2.1.5.6. A gélkromatográfia alkalmazása	152
3.2.1.6. Gázkromatográfia.	153
3.2.1.6.1. A gázkromatográfia elmélete	154
3.2.1.6.2. Gázkromatográfiás készülék működése.	154
3.2.1.6.3. A gázkromatográfia néhány alkalmazása az élelmiszer-analitikában	159
3.2.1.7. Réteg- és papírkromatográfia.	159
3.2.1.7.1. A rétegekromatográfia alapjai	159
3.2.2. Tömegspektrometria alkalmazása az élelmiszer-analitikában	161
3.2.2.1. A tömegspektrometria elve	163
3.2.2.2. A tömegspektrométer felépítése	163
3.2.2.2.1. Ionforrások	163
2.2.2.2.1.1. Ionizáció vákuumban	163

3.2.2.2.1.2. Ionizáció légköri nyomáson	164
3.2.2.2.2. Tömegspektrométerek	166
3.2.2.2.3. Vákuumrendszer	167
3.2.2.3. GC-MS és HPLC-MS kapcsolt technikák	168
3.2.3. Elektroforézis és izoelektromos fókuszálás	169
3.2.3.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása	169
3.2.3.2. Poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE)	172
4. Élelmiszerek összetételének meghatározása	175
4.1. Nedvességtartalom-meghatározás	179
4.1.1. Nedvességtartalom meghatározása előszárítás nélkül.	179
4.1.2. A nedvességtartalom meghatározása előszárítással.	180
4.2. Az ásványi alkotórészek meghatározása	181
4.2.1. A nyershamu és a sósavban oldható hamutartalom meghatározása.	181
4.2.1.1. A nyershamutartalom meghatározása.	181
4.2.1.2. A sósavban oldható hamutartalom meghatározása	182
4.2.2. Az ásványi alkotórészek meghatározása spektroszkópiai módszerekkel	183
4.2.2.1. Emissziós színeképelemzés.	184
4.2.2.1.1. Lángfotometria	184
4.2.2.1.2. Plazmaemisszió	185
4.2.2.2. Abszorpciós színeképelemzés.	186
4.2.2.2.1. Atomabszorpciós fotometria	186
4.2.2.2.2. Ultraibolya és látható abszorpciós fotometria.	190
4.2.2.3. Infravörös spektroszkópia	191
4.2.2.4. Válogatott fejezetek	193
4.2.2.4.1. Az ember ásványianyag-ellátottságának vizsgálata.	193
4.2.2.4.2. A tehéntej ásványianyag-tartalma és annak megváltozása a tőgygyulladás következtében	195
4.2.2.4.2.1. A tej kloridion-tartalmának meghatározása	195
4.2.2.4.2.2. A tej nátriumtartalmának meghatározása	196
4.2.2.4.2.3. A tej ásványi alkotórészeinek meghatározása	197
4.2.2.4.2.4. A masztitiszes tej részarányának meghatározása elegejtejből az ásványianyag-tartalom alapján	198
4.2.2.4.3. Szeléntartalom meghatározása fluorimetriás módszerrel	199
4.2.2.4.4. Kén-tartalom-meghatározás élelmi anyagokból induktív csatolású plazmaemisszióval	200
4.2.2.4.5. Ionszelektív elektródok alkalmazása az élelmiszer-analitikában	201
4.2.2.4.5.1. Az ionszelektív elektródák alkalmazása.	201

4.2.2.4.5.2. A roncsolásban képződött ammónia meghatározása ionszelektív elektróddal.	204
4.3. Szerves alkotórészek meghatározása.	205
4.3.1. A nitrogén és különféle nitrogéntartalmú anyagok meghatározása.	205
4.3.1.1. A fehérjék kivonása, kicsapása	206
4.3.1.2. A fehérjetartalom mérése a nitrogéntartalom alapján	208
4.3.1.3. A nitrogéntartalom mérése Dumas módszerével	210
4.3.1.4. A Kjeldahl-féle módszer	213
4.3.1.5. Kjel-Foss-automata a nitrogéntartalom meghatározására.	216
4.3.1.6. Tecator Kjeltec fehérjemeghatározó	218
4.3.1.7. A valódifehérje meghatározása	220
4.3.1.8. Az emészthető nyersfehérje-tartalom meghatározása	221
4.3.1.8.1. Az emészthető nyersfehérje-tartalom meghatározása in vitro pepszines hidrolízissel	221
4.3.1.8.2. Az emészthető nyersfehérje-tartalom meghatározása in vitro pepszin-tripszin-hidrolízissel	222
4.3.1.8.3. Multienzimés módszer a fehérje in vitro emészthetőségének megállapítására	223
4.3.1.8.4. A fehérje in vitro emészthetőségének meghatározása pankreatinos hidrolízissel és aminosav-analízissel	224
4.3.1.9. Fehérjetartalom-meghatározás spektrofotometriás módszerekkel	224
4.3.1.9.1. Ultraibolya spektrofotometriás módszerek	224
4.3.1.9.2. Spektrofotometriás módszerek a látható fény tartományban	225
4.3.1.9.2.1. Biuret-módszer	226
4.3.1.9.2.2. Lowry-módszer	227
4.3.1.9.3. Fehérjetartalom-meghatározás festékkötéssel	230
4.3.1.9.3.1. Bradford-módszer	231
4.3.1.9.4. Egyéb módszerek a fehérjetartalom meghatározására	233
4.3.1.10. Élelmiszer-fehérjék vizsgálata elektroforézissel és izoelektromos fókuszálással	235
4.3.1.10.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása.	235
4.3.1.10.2. A poliakrilamidgél-elektroforézis (PAGE)	235
4.3.1.10.2.1. A fehérjeminták előkészítése, gélre vitele és az elektroforézis folyamata	236
4.3.1.10.2.2. Speciális alkalmazások az élelmiszerfehérje-kutatásban	237
4.3.1.10.3. Különféle fehérjék szétválasztása és meghatározása izoelektromos fókuszálással.	238
4.3.1.11. A fehérjék oszlopkromatográfiája	239

4.3.1.11.1. A fehérjék vizsgálata adszorpciósszlopkromatográfiával	240
4.3.1.11.2. A fehérjék vizsgálata megoszlósszlopkromatográfiával	240
4.3.1.11.3. A fehérjék vizsgálata ioncserésszlopkromatográfiával	241
4.3.1.11.3.1. Elválasztás ioncserélő műgyantákon	241
4.3.1.11.3.2. Elválasztás cellulózalapú ioncserélőkkel	242
4.3.1.11.3.3. Elválasztások ioncserélő géekkel	242
4.3.1.11.4. A fehérjék vizsgálata egyéb kromatográfiás módszerekkel	243
4.3.1.12. A fehérjék gélkromatográfiája	243
4.3.1.13. A fehérjék rétegekromatográfiája	244
4.3.1.13.1. A rétegekromatográfia alkalmazása élelmiszerfehérjék vizsgálatára	245
4.3.1.14. Roncsolás nélküli fehérjemeghatározás	246
4.3.1.15. A fehérje aminosav-összetételének meghatározása	248
4.3.1.15.1. Az aminosav-összetétel meghatározása ioncserésszlopkromatográfiával	248
4.3.1.15.2. Az aminosav-összetétel meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	254
4.3.1.15.3. Az aminosav-összetétel meghatározása fotometriásan	258
4.3.1.15.3.1. A metionintartalom meghatározása	258
4.3.1.15.3.2. A cisztintartalom meghatározása	260
4.3.1.15.3.3. A triptofántartalom meghatározása	262
4.3.1.15.4. A hasznosítható lizintartalom meghatározása	264
4.3.1.16. Válogatott fejezetek	265
4.3.1.16.1. Az állati eredetű fehérjék keratintartalmának meghatározása	265
4.3.1.16.2. A bakteriális eredetű fehérje meghatározása	266
4.3.1.16.3. Speciális kromatográfiás módszerek az egyes aminosavak meghatározására	268
4.3.1.16.4. A tej fehérjefrakcióinak szétválasztása és meghatározása	269
4.3.1.16.5. A masztitiszes tőgyből származó tej kimutatása a szabad D-aminosav-tartalom alapján	270
4.3.1.16.6. A karbamidtartalom meghatározása	272
4.3.2. Zsírtartalom és zsírsavösszetétel-meghatározás	273
4.3.2.1. A nyerszsírtartalom meghatározása	273
4.3.2.2. A peroxidszám és a savszám meghatározása	275

4.3.2.3. A zsír zsírsavösszetételének meghatározása	
gázkromatográfiásan	276
4.3.2.3.1. A gázkromatográfia elmélete	276
4.3.2.3.2. A napraforgóolaj és a disznózsír	
zsírsavösszetételének meghatározása	280
4.3.2.4. Válogatott fejezetek	282
4.3.2.4.1. Az illósavak meghatározása gázkromatográfiásan	282
4.3.2.4.2. F ₂ -toxin meghatározása gázkromatográfiával	283
4.3.2.4.3. Antioxidánsok (BHT) meghatározása	285
4.3.2.4.4. Szeléntartalom meghatározása biológiai mintákból	
gázkromatográfiás eljárással.	286
4.3.3. A nyersrost és a rostfrakciók meghatározása	287
4.3.3.1. A nyersrosttartalom meghatározása	
klasszikus módszerrel	287
4.3.3.2. A rostfrakciók meghatározása Van Soest szerint	289
4.3.4. A nitrogénmentes kivonható anyagok meghatározása	291
4.3.4.1. A cukrok kimutatása és meghatározása	291
4.3.4.1.1. Aldózok kimutatása Fehling-reakcióval és	
ezüsttükör-próbával	292
4.3.4.1.2. Az összes cukortartalom meghatározása	293
4.3.4.1.3. Monoszacharidok szétválasztása és meghatározása	
nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	295
4.3.4.2. A keményítő és meghatározása	296
4.3.4.2.1. Különböző kísérletek keményítővel.	296
4.3.4.2.2. A keményítőtartalom meghatározása	298
4.3.4.3. Válogatott fejezetek	299
4.3.4.3.1. Cukoripari késztermékek hamutartalmának	
meghatározása az elektromos vezetőképesség alapján	299
4.3.4.3.2. A melasszal kapcsolatos vizsgálatok	300
4.3.4.3.2.1. A melasz szárazanyag-tartalmának	
meghatározása kézi refraktométerrel	300
4.3.4.3.2.2. A melasz pH-jának elektrometriás	
meghatározása	302
4.3.4.3.2.3. A melasz összes aniontartalmának	
meghatározása ioncserével	303
4.3.4.3.2.4. A melasz kálium- és nátriumtartalmának	
meghatározása lángfotometriásan	304
4.3.4.3.3. A háztartási keményítő tisztaságának vizsgálata	
polarimetriás módszerrel	304
4.3.4.3.4. A rezisztenskeményítő-tartalom meghatározása	305
4.3.5. A provitaminok és a vitaminok meghatározása	307
4.3.5.1. A karotin- és a xantofilltartalom meghatározása	308

4.3.5.2. Zsíroldható vitaminok meghatározása	309
4.3.5.2.1. Az A-vitamin-tartalom meghatározása HPLC- módszerrel	309
4.3.5.2.2. A D ₃ -vitamin meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	310
4.3.5.2.3. E-vitamin (α-tokoferol) meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	311
4.3.5.2.4. A zsíroldható vitaminok szimultán meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával	311
4.3.5.3. A vízoldható vitaminok meghatározása	312
4.3.5.3.1. A B ₁ -vitamin- (tiamin-)tartalom meghatározása HPLC-vel fluorimetriás detektálással	312
4.3.5.3.2. A nikotinsavamid meghatározása HPLC-módszerrel . . .	313
4.3.5.3.3. A C-vitamin-tartalom meghatározása	314
4.3.5.3.3.1. A C-vitamin-tartalom meghatározása 2,6-diklór- fenol-indofenolos titrimetriával	314
4.3.5.3.3.2. Az aszkorbinsav-tartalom meghatározása spektrofotometriás módszerrel	315
4.3.5.3.3.3. Az aszkorbinsav meghatározása HPLC- módszerrel	316
4.3.5.3.3.4. A tej aszkorbinsav-tartalmának meghatározása . . .	317
4.3.5.3.4. Az U-vitamin-tartalom meghatározása automatikus aminosav-analizátorral	318
4.3.5.3.5. A karnitin meghatározása fotometriával	318
4.3.6. A mikotoxinok és meghatározásuk	319
4.3.6.1. A mikotoxinok általános jellemzése	319
4.3.6.2. A mikotoxinok képződésének feltételei	319
4.3.6.3. A mikotoxinok fizikai, kémiai és biológiai sajátosságai	320
4.3.6.4. A mikotoxinok meghatározása kémiai módszerekkel	321
4.3.6.4.1. Az F ₂ -toxin-tartalom vizsgálata vékonyréteg- kromatográfiával	321
4.3.6.4.2. Az F ₂ -toxin meghatározása gázkromatográfiával	322
4.3.7. Válogatott fejezetek	323
4.3.7.1. A szója és a szójatermékek tripszinhinhibitor- aktivitásának meghatározása	323
4.3.7.2. A szója ureázaktivitásának meghatározása	324
4.3.7.3. A szója hőkezeltségének megállapítása krezolvörös festékkötési próbával	325
4.3.7.4. Immunológiai módszerek a fehérjék szétválasztására és meghatározására	326
4.3.7.5. A glutén kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszerek	328

4.3.7.5.1. A gluténmeghatározás jelentősége.	329
4.3.7.5.2. Analitikai módszerek a glutén kivonására és meghatározására élelmiszerekből	330
4.3.8. Stabil izotópok alkalmazása az élelmiszer-analitikában	341
Felhasznált és ajánlott irodalom	345
Abstract	347
Rezumat	349
A kötet szerzői	351
Az elemek rendszáma, vegyjele és atomtömege	353
Az elemek periódusos rendszere	357

Summary

Introduction	35
0. Subdivision of analytical methods and parameters for their characterization	37
0.1. Subdivision of analytical methods	37
0.1.1. Classical analytical methods	37
0.1.2. Instrumental analytical methods	37
0.2. Parameters suitable for characterizing analytical methods	38
0.2.1. Selectivity and specificity	38
0.2.2. Ruggedness	38
0.2.3. Range of measurement	39
0.2.4. Linearity	39
0.2.5. Sensitivity	39
0.2.6. Limit of detection	39
0.2.7. Limit of determination	39
0.2.8. Accuracy	40
0.2.9. Precision, repeatability, reproducibility	40
1. Qualitative chemical analysis	41
1.1. Qualitative chemical analysis	41
1.2. The course of the qualitative chemical analysis	42
1.2.1. Detection of cations during the inorganic analysis	43
1.2.2. Detection of anions during the inorganic analysis	43
1.2.3. Flame colouring test	44
1.3. Detection of some important cations and anions	45
1.4. Specific examinations for the detection of foodstuff components	49
1.4.1. Detection of nitrate ions in drinking water	49
1.4.2. Detection of arsenic	49
1.4.3. Detection of ammonia by Nessler reagent	50
1.4.4. Detection of the rancidity of fats and oils by the Kreiss reaction	50
1.4.5. Detection of various metal traces	51
1.4.6. Detection of carbamide in foodstuffs	52
2. Quantitative chemical analysis	53
2.1. Introduction to the quantitative chemical analysis	53
2.1.1. Quantitative chemical analysis	53
2.1.2. Volumetric (titrimetric) chemical analysis	53
2.1.3. The analytical scale and weighing	54
2.1.4. Material of the laboratory vessels	56
2.1.5. Volume measuring tools	59
2.1.6. Measuring solutions	62

2.1.7. Error sources of titration	63
2.2. Acid–alkalimetry, neutralization analysis	65
2.2.1. How the indicators work	65
2.2.1.1. Transition of the indicators. Indicator exponent	65
2.2.1.2. Indicator mixtures	67
2.2.1.3. The effect of the experimental conditions on the transition of indicators	68
2.2.1.4. Major acid-alkalimetric indicators	69
2.2.2. Equivalence point	70
2.2.2.1. Calculation of the equivalence point	70
2.2.3. Change of hydrogen ion concentration during titration	73
2.2.3.1. Change of the pH during titration of a strong acid and of a strong base	74
2.2.3.2. Change of the pH during neutralization of a weak acid and a weak base	75
2.2.3.3. Measurement of the pH	76
2.2.4. Preparation of measuring solutions	78
2.2.4.1. Preparation of 1 M HCl and its adjustment	78
2.2.4.2. Preparation of 0.1 M HCl and its adjustment	81
2.2.4.3. Preparation of 1 M NaOH and its adjustment	82
2.2.4.4. Preparation of 0.1 M NaOH and its adjustment	83
2.2.4.5. Preparation of 0.5 M KOH alcoholic solution	83
2.2.5. Titration of strong acids	84
2.2.5.1. Determination of HCl contents of hydrochloric acid solution	84
2.2.5.2. Determination of HNO ₃ contents of nitric acid solution	85
2.2.5.3. Determination of H ₂ SO ₄ contents of sulphuric acid solution	85
2.2.5.4. Determination of peroxidisulphates	86
2.2.6. Titration of weak acids	86
2.2.6.1. Determination of CH ₃ COOH contents of acetic acid solution	87
2.2.6.2. Determination of acetic anhydride	87
2.2.6.3. Titration of lactic acid	88
2.2.6.4. Titration of tartaric acid and cream of tartar	89
2.2.6.5. Determination of H ₃ BO ₃ contents of boric acid and alkali borates	89
2.2.6.6. Determination of CO ₂ contents of carbonic acid solution	90
2.2.6.7. Determination of phosphoric acid and alkali phosphates	91
2.2.7. Titration of strong and weak bases	93
2.2.7.1. Titration of potassium hydroxide, sodium hydroxide, and calcium hydroxide solution	93

2.2.7.2. Determination of ammonia	94
2.2.8. Nitrate determination	96
2.2.9. Determination of acetylsalicylic acid (Aspirin)	97
2.3. Oxidation and reduction titration methods	98
2.3.1. Oxidation-reduction	98
2.3.2. Redox indicators	98
2.3.3. Permanganometry	99
2.3.4. Iodometry	100
2.3.4.1. Iodometric indicators	102
2.3.4.2. 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ measuring solution	103
2.3.4.3. 0.1 M I_2 measuring solution	106
2.3.4.4. Measurement of iodine released by oxidizing substances	106
2.3.4.4.1. Determination of free halogens	106
2.3.4.4.2. Determination of hypochlorites	107
2.3.4.4.3. Determination of hydrogen peroxide	108
2.3.4.4.4. Iodometric determination of permanganates	108
2.3.4.4.5. Determination of oxygen dissolved in water according to Winkler	109
2.3.4.5. Iodometric sugar determination	110
2.3.4.6. Determination of iodine number and iodinebromine number of fats and oils	111
2.4. Precipitation titration methods	113
2.4.1. Some methods for endpoint indication of precipitation titrations	115
2.4.2. Preparation of 0.1 M NaCl measuring solution	115
2.4.3. Preparation of 0.1 M AgNO_3 measuring solution	116
2.4.4. Preparation of 0.1 M NH_4SCN (KSCN) measuring solution and its adjustment	116
2.4.5. Precipitation determination of silver	116
2.4.6. Determination of chloride ions	117
2.4.7. Determination of iodide ions	117
2.5. Methods based on formation of complex compounds	118
2.5.1. Complexometry. Chelatometry	118
2.5.1.1. Complexometric indicators	119
2.5.1.2. Preparation of Complexon(III) measuring solution	121
2.5.1.3. Determination of total joint amount of calcium and magnesium Determination of total hardness of water	121
2.5.1.4. Complexometric determination of calcium	122
2.5.1.5. Complexometric determination of iron(III) ions	122
3. Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry and separation methods in food analysis	123
3.1. Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry	123

3.1.1. The structure of the UV-VIS spectrophotometers	126
3.1.2. The different types of UV-VIS spectrophotometers	128
3.1.2.1. Single-light spectrophotometers	128
3.1.2.2. Two-light spectrophotometers.	128
3.2. Separation methods in food analysis	129
3.2.1. Chromatography	129
3.2.1.1. Basic principles of chromatography	129
3.2.1.1.1. Grouping of chromatographic methods.	129
3.2.1.1.2. The mechanism of chromatography	130
3.2.1.1.3. Column chromatography	131
3.2.1.2. Adsorption chromatography	133
3.2.1.2.1. Adsorption chromatography operations	135
3.2.1.2.2. Adsorbents and their rating	136
3.2.1.2.3. The composition of the moving phase	137
3.2.1.2.4. The chromatographic procedures used	138
3.2.1.2.5. High-performance (high-pressure) liquid chromatography (HPLC)	138
3.2.1.2.6. Evaluation of chromatograms	141
3.2.1.3. Partition chromatography	141
3.2.1.3.1. Partition, partition coefficient	142
3.2.1.3.2. The theory of partition chromatography	142
3.2.1.3.3. Layer chromatography	143
3.2.1.3.4. Paper chromatography	144
3.2.1.3.5. Qualitative and quantitative determination	145
3.2.1.4. Ion-exchange chromatography	146
3.2.1.4.1. The mechanism for the ion exchange	146
3.2.1.4.2. Ion-exchange resins and their properties	147
3.2.1.4.3. Methodology of ion-exchange chromatography	148
3.2.1.5. Gel chromatography	149
3.2.1.5.1. The theory of gel chromatography.	149
3.2.1.5.2. Gel types and dextran gel.	150
3.2.1.5.3. The gel chromatography procedure.	151
3.2.1.5.4. Gel column chromatography	151
3.2.1.5.5. Gel layer chromatography	152
3.2.1.5.6. Application of gel chromatography.	152
3.2.1.6. Gas chromatography	153
3.2.1.6.1. The theory of gas chromatography	154
3.2.1.6.2. Operation of the gas chromatography apparatus	154
3.2.1.6.3. Some applications of gas chromatography in food analytics	159
3.2.1.7. Thin-layer and paper chromatography.	159
3.2.1.7.1. The basics of layer chromatography	159

3.2.2. The use of mass spectrometry in food analysis	161
3.2.2.1. The principle of mass spectrometry	163
3.2.2.2. The structure of the mass spectrometer	163
3.2.2.2.1. Ion sources	163
2.2.2.2.1.1. Ionization in vacuum	163
3.2.2.2.1.2. Ionization at atmospheric pressure	164
3.2.2.2.2. Mass spectrometers	166
3.2.2.2.3. Vacuum system.	167
3.2.2.3. GC-MS and HPLC-MS hyphenated techniques	168
3.2.3. Electrophoresis and isoelectric focusing	169
3.2.3.1. Electrophoresis and analytical application	169
3.2.3.2. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	172
4. Determination of foodstuff composition	175
4.1. Determination of the moisture contents	179
4.1.1. Determination of the moisture contents without preliminary drying	179
4.1.2. Determination of the moisture contents with preliminary drying	180
4.2. Determination of the mineral components	181
4.2.1. Determination of crude ash contents and of ash contents insoluble in hydrochloric acid	181
4.2.1.1. Determination of crude ash contents	181
4.2.1.2. Determination of ash contents insoluble in hydrochloric acid.	182
4.2.2. Determination of mineral components by spectroscopic methods.	183
4.2.2.1. Emission spectroscopy	184
4.2.2.1.1. Flame photometry	184
4.2.2.1.2. Plasma emission.	185
4.2.2.2. Absorption spectroscopy.	186
4.2.2.2.1. Atomic absorption photometry	186
4.2.2.2.2. Ultraviolet and visible absorption photometry	190
4.2.2.3. Infrared spectroscopy	191
4.2.2.4. Selected chapters.	193
4.2.2.4.1. Examination of mineral supplementation of humans	193
4.2.2.4.2. Mineral contents of the cow's milk and their change due to inflammation of udder	195
4.2.2.4.2.1. Determination of chloride ion contents	195
4.2.2.4.2.2. Determination of sodium contents.	196
4.2.2.4.2.3. Determination of mineral components of the milk	197
4.2.2.4.2.4. Determination of proportion of mastitic milk in the mixed milk on the basis of mineral contents.	198

4.2.2.4.3. Determination of selenium contents by fluorimetric method	199
4.2.2.4.4. Determination of sulphur contents in foodstuffs by inductively coupled plasma emission	200
4.2.2.4.5. Application of ion-selective electrodes in the foodstuff analysis	201
4.2.2.4.5.1. Application of ion-selective electrodes	201
4.2.2.4.5.2. Determination of ammonia formed during the destruction by ion-selective electrode	204
4.3. Determination of organic components	205
4.3.1. Determination of nitrogen and various nitrogenous materials	205
4.3.1.1. Extraction and precipitation of proteins	206
4.3.1.2. Measurement of protein contents based on nitrogen contents	208
4.3.1.3. Measurement of nitrogen contents by the Dumas method	210
4.3.1.4. The Kjeldahl method	213
4.3.1.5. Kjel-Foss automatic apparatus for the determination of nitrogen contents	216
4.3.1.6. Tecator Kjeltex protein analyser	218
4.3.1.7. Determination of true protein	220
4.3.1.8. Determination of digestible crude protein contents	221
4.3.1.8.1. Determination of digestible crude protein contents by in vitro pepsin hydrolysis	221
4.3.1.8.2. Determination of digestible crude protein contents by in vitro pepsin-trypsin hydrolysis	222
4.3.1.8.3. Multi-enzyme method for establishment of in vitro digestibility of proteins	223
4.3.1.8.4. Determination of in vitro digestibility of proteins by pancreatin hydrolysis and amino acid analysis	224
4.3.1.9. Determination of protein contents by spectrophotometric methods	224
4.3.1.9.1. Ultraviolet spectrophotometric methods	224
4.3.1.9.2. Spectrophotometric methods in the visible light range	225
4.3.1.9.2.1. The Biuret method	226
4.3.1.9.2.2. The Lowry method	227
4.3.1.9.3. Determination of protein contents by dye binding	230
4.3.1.9.3.1. The Bradford method	231
4.3.1.9.4. Other methods for protein contents determination	233
4.3.1.10. Examination of food proteins by electrophoresis and isoelectric focusing	235
4.3.1.10.1. Electrophoresis and its analytical application	235
4.3.1.10.2. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)	235

4.3.1.10.2.1. Preparation of the protein samples, layering onto the gel, and the process of electrophoresis.	236
4.3.1.10.2.2. Special applications in the research of food proteins	237
4.3.1.10.3. Separation and determination of different proteins using isoelectric focusing.	238
4.3.1.11. Column chromatography of proteins	239
4.3.1.11.1. Examination of proteins by adsorption column chromatography	240
4.3.1.11.2. Examination of proteins by partition column chromatography	240
4.3.1.11.3. Examination of proteins by ion-exchange column chromatography	241
4.3.1.11.3.1. Separation on ion-exchange resins.	241
4.3.1.11.3.2. Separation with cellulose-based ion exchangers	242
4.3.1.11.3.3. Separations by ion-exchange gels.	242
4.3.1.11.4. Examination of proteins by other chromatographic methods	243
4.3.1.12. Gel chromatography of proteins	243
4.3.1.13. Layer chromatography of proteins	244
4.3.1.13.1. Fundamentals of layer chromatography	245
4.3.1.13.2. Application of the layer chromatography for the examination of foodstuff proteins	246
4.3.1.14. Non-destructive protein determination	248
4.3.1.15. Determination of amino acid composition of proteins	248
4.3.1.15.1. Determination of amino acid composition by ion-exchange column chromatography	254
4.3.1.15.2. Determination of amino acid composition by high performance liquid chromatography	258
4.3.1.15.3. Photometric determination of amino acid composition	258
4.3.1.15.3.1. Determination of methionine contents	260
4.3.1.15.3.2. Determination of cysteine contents	262
4.3.1.15.3.3. Determination of tryptophan contents.	264
4.3.1.15.3.4. Determination of utilizable lysine contents.	265
4.3.1.16. Selected chapters.	265
4.3.1.16.1. Determination of keratin contents of proteins of animal origin	266
4.3.1.16.2. Determination of protein of bacterial origin	268
4.3.1.16.3. Specific chromatographic methods for the determination of the individual amino acids	269

4.3.1.16.4. Separation and determination of protein fractions of milk	270
4.3.1.16.5. Detection of milk deriving from a mastitic udder on the basis of free D-amino acid contents.	272
4.3.1.16.6. Determination of carbamide contents	273
4.3.2. Determination of fat contents and fatty acid composition	273
4.3.2.1. Determination of crude fat contents	275
4.3.2.2. Determination of peroxide number and acid number	276
4.3.2.3. Determination of fatty acid composition of fats by gas chromatography.	276
4.3.2.3.1. Theory of the gas chromatography	280
4.3.2.3.2. Determination of fatty acid composition of sunflower oil and hog's fat	282
4.3.2.4. Selected chapters.	282
4.3.2.4.1. Determination of volatile fatty acids by gas chromatography	283
4.3.2.4.2. Determination of F ₂ -toxin by gas chromatography	285
4.3.2.4.3. Determination of antioxidants (BHT)	286
4.3.2.4.4. Determination of selenium contents in biological samples by gas chromatographic technique	287
4.3.3. Determination of crude fibre and fibre fractions	287
4.3.3.1. Determination of crude fibre by the classic method	289
4.3.3.2. Determination of the fibre fractions by the Van Soest method.	291
4.3.4. Determination of nitrogen-free extractable materials	291
4.3.4.1. Detection and determination of sugars.	292
4.3.4.1.1. Detection of aldoses by the Fehling reaction and silver mirror reaction	293
4.3.4.1.2. Determination of total sugar contents	295
4.3.4.1.3. Separation and determination of monosaccharides by high-performance liquid chromatography	296
4.3.4.2. Starch and its determination.	296
4.3.4.2.1. Experiments with starch	298
4.3.4.2.2. Determination of starch contents.	299
4.3.4.3. Selected chapters.	299
4.3.4.3.1. Determination of ash contents of sugar industrial end products on the basis of electrical conductivity	300
4.3.4.3.2. Molasses examinations	300
4.3.4.3.2.1. Determination of dry matter contents of molasses using manual refractometer	302
4.3.4.3.2.2. Electrometric determination of the pH of the molasses	303

4.3.4.3.2.3. Determination of total anion contents of the molasses by ion exchange	304
4.3.4.3.2.4. Photometric determination of potassium and sodium contents of the molasses flame	304
4.3.4.3.3. Examination of the purity of the household starch by polarimetric method.	305
4.3.5. Determination of provitamins and vitamins	307
4.3.5.1. Determination of the carotene and xanthophyll contents	308
4.3.5.2. Determination of the fat-soluble vitamins	309
4.3.5.2.1. Determination of vitamin A contents by HPLC method	309
4.3.5.2.2. Determination of vitamin D ₃ by high-performance liquid chromatography.	310
4.3.5.2.3. Determination of vitamin E (α -tocopherol) by high-performance liquid chromatography.	311
4.3.5.2.4. Simultaneous determination of fat-soluble vitamins by high-performance liquid chromatography	311
4.3.5.3. Determination of the water-soluble vitamins	312
4.3.5.3.1. Determination of vitamin B ₁ (thiamine) contents by HPLC fluorimetric detection	312
4.3.5.3.2. Determination of nicotinamide by HPLC	313
4.3.5.3.3. Determination of vitamin C contents	314
4.3.5.3.3.1. Determination by 2,6-dichloro-phenol-indophenolic titrimetry.	314
4.3.5.3.3.2. Determination of ascorbic acid contents by spectrophotometric method	315
4.3.5.3.3.3. Determination of ascorbic acid by HPLC method	316
4.3.5.3.3.4. Determination of ascorbic acid contents of milk	317
4.3.5.3.4. Determination of vitamin U contents using automatic amino acid analyser	318
4.3.5.3.5. Determination of carnitine by photometry	318
4.3.6. Mycotoxins and their determination	319
4.3.6.1. General features of mycotoxins.	319
4.3.6.2. Conditions of mycotoxin formation	319
4.3.6.3. Physical, chemical, and biological properties of the mycotoxins.	320
4.3.6.4. Determination of mycotoxins using chemical methods.	321
4.3.6.4.1. Examination of F ₂ -toxin contents by thin-layer chromatography	321
4.3.6.4.2. Determination of F ₂ -toxin by gas chromatography	322
4.3.7. Selected chapters	323

24 ■ Summary

4.3.7.1. Determination of trypsin inhibitor activity of soya and soya products	323
4.3.7.2. Determination of the urease activity of soya	324
4.3.7.3. Determination of extent of heat treatment of the soya by cresol red dye-binding test.	325
4.3.7.4. Immunological methods for the separation and determination of proteins.	326
4.3.7.5. Analytical methods suitable for the detection and quantification of gluten	328
4.3.7.5.1. The significance of gluten determination	329
4.3.7.5.2. Analytical methods for the extraction and determination of gluten from food	330
4.3.8. Application of stable isotopes in food analysis	341
Literature.	345
Abstract	347
Rezumat.	349
About the authors	351
The atomic number, chemical symbol, and atomic mass of the elements	353
The periodic system of the elements	357

Cuprins

Introducere	35
0. Clasificarea metodelor analitice și parametrii utilizați în caracterizarea lor	37
0.1. Clasificarea metodelor analitice	37
0.1.1. Metodele analitice clasice.	37
0.1.2. Metode instrumentale de analiză.	37
0.2. Parametrii folosiți în caracterizarea metodelor analitice	38
0.2.1. Selectivitate și specificitate	38
0.2.2. Rezistența la perturbații	38
0.2.3. Domeniul de măsurare	39
0.2.4. Liniaritate	39
0.2.5. Sensibilitate.	39
0.2.6. Limita de detecție	39
0.2.7. Limita de determinare	39
0.2.8. Precizie	40
0.2.9. Precizie, repetabilitate, reproductibilitate	40
1. Chimie analitică calitativă.	41
1.1. Chimie analitică calitativă.	41
1.2. Cursul analizei chimice calitative.	42
1.2.1. Detectarea cationilor în timpul analizei anorganice	43
1.2.2. Detectarea anionilor în timpul analizei anorganice	43
1.2.3. Testul colorării flăcării	44
1.3. Detectarea unor importanți cationi și anioni	45
1.4. Examinări specifice pentru detectarea componentelor din alimente	49
1.4.1. Detectarea ionilor de nitrați din apă potabilă	49
1.4.2. Detectarea arsenului	49
1.4.3. Detectarea amoniei cu reactiv Nessler	50
1.4.4. Detectarea râncezirii uleilor și grăsimilor cu reacția Kreiss	50
1.4.5. Detectarea urmelor de metale.	51
1.4.6. Detectarea carbamidei din alimente.	52
2. Chimie analitică cantitativă	53
2.1. Introducere în chimia analitică cantitativă.	53
2.1.1. Chimie analitică cantitativă	53
2.1.2. Volumetrie (titrimetrie).	53
2.1.3. Balanța analitică și măsurarea	54
2.1.4. Materialul vaselor de laborator	56
2.1.5. Instrumente pentru măsurarea volumului.	59
2.1.6. Soluții titrate (etalon)	62

2.1.7. Surse de eroare în cursul titrării	63
2.2. Acidi-alcalimetre, analiză neutralizantă	65
2.2.1. Funcționarea indicatorilor	65
2.2.1.1. Intervalul de viraj a indicatorilor. Exponent de indicator	65
2.2.1.2. Mixturi de indicatori	67
2.2.1.3. Efectele condiției experimentale la virarea indicatorului	68
2.2.1.4. Indicatori majori acidi-alcalimetrici	69
2.2.2. Punctul de echivalență	70
2.2.2.1. Calcularea punctului de echivalență	70
2.2.3. Schimbarea concentrației de ioni de hidrogen în timpul titrării	73
2.2.3.1. Schimbarea pH-ului în timpul titrării, respectiv a unui acid tare cu o bază tare	74
2.2.3.2. Schimbarea pH-ului în timpul neutralizării unor acizi slabi cu baze slabe	75
2.2.3.3. Măsurarea pH-ului.	76
2.2.4. Prepararea soluțiilor etalon	78
2.2.4.1. Prepararea de HCl 1 M și ajustarea ei	78
2.2.4.2. Prepararea de HCl 0.1 M și ajustarea ei	81
2.2.4.3. Prepararea de NaOH 1 M și ajustarea ei	82
2.2.4.4. Prepararea de NaOH 0.1 M și ajustarea ei	83
2.2.4.5. Prepararea soluției alcoolice de KOH 0.5 M	83
2.2.5. Titrarea acizilor tari	84
2.2.5.1. Determinarea conținutului în HCl a soluției de acid clorhidric	84
2.2.5.2. Determinarea conținutului în HNO ₃ a soluției de acid azotic	85
2.2.5.3. Determinarea conținutului în H ₂ SO ₄ a soluției de acid sulfuric	85
2.2.5.4. Determinarea peroxi-disulfatului	86
2.2.6. Titrarea acizilor slabi	86
2.2.6.1. Determinarea conținutului în CH ₃ COOH a soluției de acid acetic	87
2.2.6.2. Determinarea anhidridei acetice	87
2.2.6.3. Titrarea acidului lactic	88
2.2.6.4. Titrarea acidului tartaric și a sosului tartar	89
2.2.6.5. Determinarea conținutului în H ₃ BO ₃ a soluției de acid boric a alcaliborajilor	89
2.2.6.6. Determinarea conținutului în CO ₂ a soluției de acid carbonic	90
2.2.6.7. Determinarea acidului fosforic și a fosfaților alcalici	91
2.2.7. Titrarea bazelor tari și slabe	93

2.2.7.1. Titrarea soluțiilor de hidroxid de potasiu, hidroxid de sodiu și hidroxid de calciu	93
2.2.7.2. Determinarea amoniei	94
2.2.8. Determinarea nitraților	96
2.2.9. Determinarea acidului acetilsalicilic (Aspirină)	97
2.3. Titrări redox	98
2.3.1. Oxidare-reducție	98
2.3.2. Redoxi indicatori	98
2.3.3. Permanganometrie	99
2.3.4. Iodometrie	100
2.3.4.1. Indicatori iodometrici	102
2.3.4.2. Soluție de titrare $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 M	103
2.3.4.3. Soluție de titrare I_2 0.1 M	106
2.3.4.4. Măsurarea iodului eliberat de substanțe oxidante	106
2.3.4.4.1. Determinarea halogenilor liberi	106
2.3.4.4.2. Determinarea hipocloriților	107
2.3.4.4.3. Determinarea peroxidului de hidrogen	108
2.3.4.4.4. Determinarea iodometrică a permanganatului	108
2.3.4.4.5. Determinarea oxigenului dizolvat în apă în acord cu Winkler	109
2.3.4.5. Determinarea iodometrică a zahărului	110
2.3.4.6. Determinarea indicelui de iod și indicelui de iodbrom la grăsimi și uleiuri	111
2.4. Titrare cu precipitare	113
2.4.1. Câteva metode pentru indicarea punctului de terminare la titrare cu precipitare	115
2.4.2. Prepararea soluției de titrare NaCl 0.1 M	115
2.4.3. Prepararea soluției de titrare AgNO_3 0.1 M	116
2.4.4. Prepararea soluției de titrare NH_4SCN (KSCN) 0.1 M și ajustarea ei	116
2.4.5. Determinarea argintului cu precipitare	116
2.4.6. Determinarea ionilor de clor	117
2.4.7. Determinarea ionilor de iod	117
2.5. Metode bazate pe formare de complecși	118
2.5.1. Complexometrie. Chelatometrie	118
2.5.1.1. Indicatori complexometrici	119
2.5.1.2. Prepararea soluției de titrare Komplexon(III)	121
2.5.1.3. Determinarea conținutului total de calciu și magneziu. Determinarea durtății totale a apei	121
2.5.1.4. Determinarea complexometrică a calciului	122
2.5.1.5. Determinarea complexometrică a ionilor de fer(III)	122

3. Metode de spectrofotometria de absorbție UV-VIS și de separare

utilizate in analiza alimentelor	123
3.1. Spectrofotometria de absorbție UV-VIS	123
3.1.1. Construcția spectrofotometrului UV-VIS	126
3.1.2. Tipuri de spectrofotometre UV-VIS	128
3.1.2.1. Spectrofotometre cu un singur fascicol	128
3.1.2.2. Spectrofotometre cu două fascicole	128
3.2. Metode separative de analiza alimentelor	129
3.2.1. Cromatografia	129
3.2.1.1. Principiile cromatografiei	129
3.2.1.1.1. Clasificarea metodelor cromatografice	129
3.2.1.1.2. Mecanismul cromatografierii	130
3.2.1.1.3. Cromatografia pe coloană	131
3.2.1.2. Cromatografia de adsorbție	133
3.2.1.2.1. Operații ale cromatografiei de adsorbție	135
3.2.1.2.2. Adsorbanți și calitatea lor	136
3.2.1.2.3. Compoziția fazei mobile	137
3.2.1.2.4. Procedee cromatografice folosite	138
3.2.1.2.5. Cromatografie de lichide de înaltă performanță (presiune ridicată) (HPLC)	138
3.2.1.2.6. Interpretarea cromatogramelor	141
3.2.1.3. Cromatografia de repartiție	141
3.2.1.3.1. Repartiția, legile repartiției	142
3.2.1.3.2. Bazele teoretice ale cromatografiei de repartiție	142
3.2.1.3.3. Cromatografia pe strat	143
3.2.1.3.4. Cromatografia pe hârtie	144
3.2.1.3.5. Determinări calitative și cantitative	145
3.2.1.4. Cromatografia prin schimb ionic	146
3.2.1.4.1. Mecanismul schimbului ionic	146
3.2.1.4.2. Rășini schimbătoare de ioni și proprietățile lor	147
3.2.1.4.3. Metodica cromatografiei prin schimb ionic	148
3.2.1.5. Cromatografia prin gel	149
3.2.1.5.1. Teoria cromatografiei prin gel	149
3.2.1.5.2. Tipuri de geluri și gelul dextran	150
3.2.1.5.3. Procedeele cromatografiei prin gel	151
3.2.1.5.4. Cromatografie prin gel tip coloană	151
3.2.1.5.5. Cromatografia prin gel subțire	152
3.2.1.5.6. Utilizări ale cromatografiei în gel	152
3.2.1.6. Cromatografie de gaz	153
3.2.1.6.1. Bazele teoretice ale cromatografiei de gaze	154
3.2.1.6.2. Funcționarea cromatografelor de gaze	154

3.2.1.6.3. Câteva utilizări ale cromatografiei de gaze în analiza alimentelor	159
3.2.1.7. Cromatografia pe strat și cromatografia pe hârtie	159
3.2.1.7.1. Bazele teoretice ale cromatografiei pe strat	159
3.2.2. Folosirea spectrometriei de masă în analiza alimentelor	161
3.2.2.1. Principiul spectrometriei de masă	163
3.2.2.2. Structura unui spectrometru de masă	163
3.2.2.2.1 Surse de ioni	163
3.2.2.2.1.1. Ionizarea în vid	163
3.2.2.2.1.2. Ionizarea la presiune atmosferică.	164
3.2.2.2.2. Spectrometre de masă	166
3.2.2.2.3. Sistem în vid.	167
3.2.2.3. Tehnicile de separare GC-MS și HPLC-MS.	168
3.2.3. Electroforeza și focusarea izoelectrică	169
3.2.3.1. Utilizări analitice ale electroforezei	169
3.2.3.2. Electroforeză prin gel de poliacrilamidă (PAGE)	172
4. Determinarea componentelor din alimente	175
4.1. Determinarea conținutului de umiditate.	179
4.1.1 Determinarea conținutului de umiditate fără preuscări	179
4.1.2. Determinarea conținutului de umiditate cu preuscări	180
4.2. Determinarea componentelor minerale.	181
4.2.1. Determinarea cenușei crude și cenușei insolubile în acid clorhidric.	181
4.2.1.1. Determinarea cenușei crude	181
4.2.1.2. Determinarea cenușei insolubile în acid clorhidric.	182
4.2.2. Determinarea componentelor minerale prin metode spectroscopice.	183
4.2.2.1. Spectroscopie cu emisie	184
4.2.2.1.1. Fotometrie în flacără.	184
4.2.2.1.2. Emisie de plasmă	185
4.2.2.2. Spectroscopie de absorbție	186
4.2.2.2.1. Fotometrie de absorbție atomică	186
4.2.2.2.2. Fotometrie de absorbție UV-VIS.	190
4.2.2.3. Spectroscopie în infraroșu	191
4.2.2.4. Capitole selectate.	193
4.2.2.4.1. Examinarea mineralelor suplimentare la om	193
4.2.2.4.2. Conținutul în minerale a laptelui de vacă și schimbarea acestuia în timpul inflamației ugerului.	195
4.2.2.4.2.1. Determinarea conținutului de ioni de clor.	195
4.2.2.4.2.2. Determinarea conținutului de sodiu	196
4.2.2.4.2.3. Determinarea conținutului de minerale în lapte	197

4.2.2.4.2.4. Determinarea proporției de lapte mastitic din mixturi de lapte pe baza conținutului de minerale.	198
4.2.2.4.3. Determinarea seleniului prin metoda fluorimetrică	199
4.2.2.4.4. Determinarea conținutului de sulf a alimentelor cu emisie de plasmă cuplată inductiv	200
4.2.2.4.5. Aplicarea electrozilor ionselectivi în analiza alimentelor	201
4.2.2.4.5.1. Aplicarea electrozilor ionselectivi	201
4.2.2.4.5.2. Determinarea amoniei formate prin destrucție de cătref electrozi ionselectivi	204
4.3. Determinarea componentelor organici.	205
4.3.1. Determinarea nitrogenului și a materialelor nitrogenoase	205
4.3.1.1. Extracția și precipitarea proteinelor	206
4.3.1.2. Măsurarea conținutului de proteine pe baza conținutului de nitrogen	208
4.3.1.3. Măsurarea conținutului de nitrogen prin metoda Dumas	210
4.3.1.4. Metoda Kjeldahl.	213
4.3.1.5. Aparatul automatic Kjell-Foss pentru determinarea nitrogenului	216
4.3.1.6. Analizatorul de proteine Kjeltect	218
4.3.1.7. Determinarea proteinei reale.	220
4.3.1.8. Determinarea conținutului de proteină crudă digestibilă	221
4.3.1.8.1. Determinarea conținutului de proteină crudă digestibilă prin hidroliză pepsinică in vitro	221
4.3.1.8.2. Determinarea conținutului de proteină crudă digestibilă prin hidroliză pepsinică-tripsinică in vitro	222
4.3.1.8.3. Metodă multienzimică pentru stabilirea digestibilității in vitro a proteinelor	223
4.3.1.8.4. Determinarea digestibilității in vitro a proteinelor prin hidroliza cu pancreatină și analiza aminoacizilor	224
4.3.1.9. Determinarea conținutului de proteine prin metoda spectrofotometrică.	224
4.3.1.9.1. Metoda UV spectrofotometrică	224
4.3.1.9.2. Metoda spectrofotometrică în lumina vizibilă	225
4.3.1.9.2.1. Metoda Biuret	226
4.3.1.9.2.2. Metoda Lowry	227
4.3.1.9.3. Determinarea conținutului de proteine prin metoda colorimetrică.	230
4.3.1.9.3.1. Metoda Bradford	231
4.3.1.9.4. Alte metode pentru determinarea conținutului de proteine.	233

4.3.1.10. Examinarea proteinelor alimentare prin electroforeză și focusare isoelectrică	235
4.3.1.10.1. Electroforeza și aplicațiile ei analitice.	235
4.3.1.10.2. Poliacrilamid gel electroforeză (PAGE)	235
4.3.1.10.2.1. Prepararea probelor de proteine, stratificare în gel, și procesul electroforetic	236
4.3.1.10.2.2. Aplicațiile speciale în cercetarea proteinelor din alimente.	237
4.3.1.10.3. Separarea și determinarea diferitelor proteine folosind focusarea isoelectrică.	238
4.3.1.11. Cromatografia de coloană a proteinelor	239
4.3.1.11.1. Examinarea proteinelor prin cromatografia de absorbție pe coloană.	240
4.3.1.11.2. Examinarea proteinelor prin cromatografia de partiție pe coloană	240
4.3.1.11.3. Examinarea proteinelor prin cromatografia de schimb ionic.	241
4.3.1.11.3.1. Separarea pe rășine schimbătoare de ioni	241
4.3.1.11.3.2. Separarea cu schimbători de ioni pe bază de celuloză	242
4.3.1.11.3.3. Separarea pe geluri schimbătoare de ioni	242
4.3.1.11.3.4. Examinarea proteinelor folosind alte metode cromatografice.	243
4.3.1.12. Cromatografia de gel a proteinelor	243
4.3.1.13. Cromatografia de strat subțire a proteinelor.	244
4.3.1.13.1. Fundamentele cromatografiei de strat subțire.	245
4.3.1.13.2. Aplicarea cromatografiei de strat subțire pentru examinarea proteinelor alimentare	246
4.3.1.14. Determinări nedestructive a proteinelor.	248
4.3.1.15. Determinarea compoziției de aminoacizi a proteinelor	248
4.3.1.15.1. Determinarea aminoacizilor cu cromatografia de coloană cu schimb ionic	254
4.3.1.15.2. Determinarea aminoacizilor prin cromatografia lichidă de înaltă performanță.	258
4.3.1.15.3. Determinarea aminoacizilor prin metoda fotometrică	258
4.3.1.15.3.1. Determinarea conținutului de metionină.	260
4.3.1.15.3.2. Determinarea conținutului de cisteină.	262
4.3.1.15.3.3. Determinarea conținutului de triptofan.	264
4.3.1.15.3.4. Determinarea conținutului de lizină utilizabilă	265
4.3.1.16. Capitole selectate.	265

4.3.1.16.1. Determinarea conținutului de keratină a proteinelor de origine animală	266
4.3.1.16.2. Determinarea proteinelor de origine bacteriană	268
4.3.1.16.3. Metode cromatografice specifice pentru determinarea individuală a aminoacizilor	269
4.3.1.16.4. Separarea și determinarea fracției de proteine din lapte	270
4.3.1.16.5. Detectarea laptelui provenit de la uger mastitic pe baza conținutului de D aminoacizi liberi	272
4.3.1.16.6. Determinarea conținutului de carbamidă	273
4.3.2. Determinarea conținutului de grăsimi și de acizi grași	273
4.3.2.1. Determinarea conținutului de grăsime crudă.	275
4.3.2.2. Determinarea indicelui de peroxid și a celui de aciditate	276
4.3.2.3. Determinarea compoziției de acizi grași a grăsimilor prin cromatografia de gaze	276
4.3.2.3.1. Teoria cromatografiei de gaze.	280
4.3.2.3.2. Determinarea compoziției de acizi grași a uleiului de floarea soarelui și a grăsimii de porc.	282
4.3.2.4. Capitole selectate.	282
4.3.2.4.1. Determinarea acizilor grași volatili prin cromatografia de gaze	283
4.3.2.4.2. Determinarea F2-toxinei prin cromatografie de gaze	285
4.3.2.4.3. Determinarea antioxidanților (BHT)	286
4.3.2.4.4. Determinarea conținutului de seleniu a probelor biologice prin tehnica cromatografiei de gaze.	287
4.3.3. Determinarea fibrelor crude și a fracțiilor de fibre	287
4.3.3.1. Determinarea fibrelor crude prin metoda clasică.	289
4.3.3.2. Determinarea fracțiilor de fibre prin metoda Van Soest.	291
4.3.4. Determinarea materialelor extractabile fără conținut de nitrogen	291
4.3.4.1. Detectarea și determinarea zaharurilor.	292
4.3.4.1.1. Detectarea aldozelor cu reacția Fehling și reacția oglindei de argint	293
4.3.4.1.2. Determinarea conținutului total de zaharuri	295
4.3.4.1.3. Separarea și determinarea monozaharidelor prin cromatografia lichidă de înaltă performanță.	296
4.3.4.2. Amidonul și determinarea lui.	296
4.3.4.2.1. Experimente cu amidon.	298
4.3.4.2.2. Determinarea conținutului de amidon	299
4.3.4.3. Capitole selectate.	299

4.3.4.3.1. Determinarea conținutului de cenușă în zahărul industrial și în produse zaharoase pe baza conductivității electrice	300
4.3.4.3.2. Examinarea melasei	300
4.3.4.3.2.1. Determinarea substanței uscate din melasă folosind refractometrul de mână	302
4.3.4.3.2.2. Determinarea electrometrică a pH-ului melasei	303
4.3.4.3.2.3. Determinarea conținutului total de anioni a melasei prin cromatografia de schimb ionic	304
4.3.4.3.2.4. Determinarea conținutului de potasiu și sodiu a melasei prin fotometrie de flacără	304
4.3.4.3.3. Examinarea purității amidonului menajer prin metoda polarimetrică	305
4.3.5. Determinarea provitaminelor și a vitaminelor.	307
4.3.5.1. Determinarea carotinei și a xantofilei.	308
4.3.5.2. Determinarea vitaminelor solubile în grăsimi	309
4.3.5.2.1. Determinarea conținutului de vitamina A prin metoda HPLC	309
4.3.5.2.2. Determinarea vitaminei D ₃ prin cromatografia lichidă de înaltă performanță.	310
4.3.5.2.3. Determinarea vitaminei E (-tocoferol) prin cromatografia lichidă de înaltă performanță.	311
4.3.5.2.4. Determinarea simultană a vitaminelor solubile în grăsimi prin cromatografia lichidă de înaltă performanță	311
4.3.5.3. Determinarea vitaminelor solubile în apă	312
4.3.5.3.1. Determinarea conținutului de vitamina B ₁ (tiamin) prin HPLC cu detectare fluorimetrică	312
4.3.5.3.2. Determinarea nicotinamidei prin HPLC	313
4.3.5.3.3. Determinarea conținutului de vitamina C.	314
4.3.5.3.3.1. Determinarea conținutului de vitamina C prin titrimetrie cu 2,6-dicloro-fenol-indofenol	314
4.3.5.3.3.2. Determinarea conținutului de acid ascorbic cu metoda spectrofotometrică	315
4.3.5.3.3.3. Determinarea acidului ascorbic prin metoda HPLC	316
4.3.5.3.3.4. Determinarea conținutului de acid ascorbic al laptelui.	317
4.3.5.3.4. Determinarea conținutului de vitamina U folosind analizatorul automat de aminoacid	318
4.3.5.3.5. Determinarea carnitinei prin fotometrie	318
4.3.6. Micotoxinele și determinarea lor	319

4.3.6.1. Trăsăturile generale ale micotoxinelor	319
4.3.6.2. Condițiile formării micotoxinei	319
4.3.6.3. Proprietățile fizice, chimice și biologice ale micotoxinelor	320
4.3.6.4. Determinarea micotoxinelor folosind metode chimice	321
4.3.6.4.1. Examinarea conținutului de F_2 -toxină cu cromatografia de strat subțire	321
4.3.6.4.2. Determinarea F_2 -toxinei cu cromatografie de gaze	322
4.3.7. Capitole selectate	323
4.3.7.1. Determinarea activității inhibitorului de tripsină din soia și produsele de soia	323
4.3.7.2. Determinarea ureazei active din soia	324
4.3.7.3. Determinarea expunerii tratamentului termic al soiei cu colorare cu roșu de crezol	325
4.3.7.4. Metode imunologice pentru separarea și determinarea proteinelor	326
4.3.7.5. Metode analitice potrivite pentru detectarea și cuantificarea glutenului	328
4.3.7.5.1. Semnificația determinării glutenului	329
4.3.7.5.2. Metode analitice pentru extragerea și determinarea glutenului din alimente	330
4.3.8. Aplicarea izotopilor stabili în analiza alimentelor	341
Literatură de specialitate	345
Abstract	347
Rezumat	349
Despre autori	351
Numărul atomic, simboluri chimice și masa atomică a elementelor	353
Sistemul periodic al elementelor	357

Bevezetés

Az *Analitikai kémia élelmiszermérnököknek* című könyv a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Karának élelmiszermérnök-hallgatói számára készült. Reményeink szerint e könyvet a leendő élelmiszermérnökökön kívül a környezetmérnök szak hallgatói is fogják használni, sőt talán a leendő új szakok hallgatóinak is segítségére lesz tanulmányaik során. A könyv megírásakor figyelemmel kellett lenni a karon kialakult hagyományokra, hogy a könyvben szereplő analitikai módszerek kapcsolódjanak az egyéb tárgyak keretében oktatott anyaghoz, ezért olyan könyvet szeretttünk volna írni, amelyet a hallgatók több tárgy gyakorlati oktatása során is hasznosítani tudnak, sőt a leendő élelmiszeripari mérnökök is szívesen lapozgatni fognak.

A könyv rövid minőségi kémiai analízissel indul, melyet nagyobb terjedelmű klasszikus mennyiségi kémiai analízis követ. E fejezetekben a hallgatók megismerkedhetnek a minőségi és mennyiségi analízis menetével, az acidi-alkalimetriával, az oxidációs-redukciós, valamint csapadékos titrálási módszerekkel, legvégül pedig a komplex vegyületek képződésén alapuló meghatározásokkal. Ezt követően az ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometria és az elválasztási módszerek, ezen belül az élelmiszerek analízisében rendkívül nagy jelentőségű kromatográfia, elektroforézis és izoelektromos fókuszálás elméleti alapjait ismertetik a szerzők.

Ezen fejezetek után az élelmiszerek főbb komponenseinek meghatározására kifejlesztett módszerek kerülnek tárgyalásra. E rész elején a nedvességtartalom meghatározását követően az ásványi alkotórészek meghatározásával és a különböző spektroszkópiai módszerekkel ismerkedhetnek meg a hallgatók. A továbbiakban a nitrogéntartalmú anyagok meghatározásával; ezen belül a fehérjetartalom, a fehérjefrakciók, illetve a fehérje aminosav-összetételének meghatározásával foglalkozunk. Az élelmiszerek legdrágább makrokomponensével, a fehérjével kiemelten foglalkozunk, és próbálunk minden olyan módszert ismertetni, amelyek alkalmasak az élelmiszer-fehérjék minősítésére. A zsírtartalom és a zsírsavösszetétel meghatározását követően a nyersrost, a nyersrostfrakciók analízisét tárgyaljuk. A nitrogénmentes kivonható anyagok sorában meghatározzuk a cukrokat és a keményítőt, és vizsgáljuk a különböző cukortartalmú készítmények tulajdonságait is. Jelentős helyet szentelünk a provitaminok és vitaminok meghatározásának, valamint a mikotoxinoknak. A legtöbb fejezetet a *Válogatott fejezetek* című összeállítás zárja, amelyekben speciális élelmiszer-analitikai módszerek kerülnek ismertetésre.

A könyv írása során igyekeztünk a fejezeteket úgy összeállítani, hogy azok megismerésére és a vizsgálatok végzésére, az Élelmiszer-tudományi tanszék műszereire és eszközeire alapozva, a hallgatóknak lehetőségük legyen. A fejezeteket

próbáltuk úgy egymásra építeni, hogy a hallgató az egyszerűbb vizsgálatoktól folyamatosan jusson el a bonyolultabbakig, megismerve az élelmiszerek analízisének legfontosabb lépéseit.

Végül hálás köszönetünket szeretnénk kifejezni lektorunknak, **dr. Kovács Béla** professzornak és **Stanics Judit** vegyész technikusnak a lelkiismeretes gépelésért és a könyvben lévő képletek szerkesztéséért. A könyvben maradt hibák kizárólag a szerzők „érdemei”. Kérjük a hallgatókat, szíveskedjenek ezekre a figyelmet felhívni.

Csík Szereda, 2020. augusztus 30.

Dr. Albert Csilla
egyetemi adjunktus

Dr. Csapó János
az MTA doktora, egyetemi tanár

Kiss Dóra
PhD-hallgató

0. fejezet

Az analitikai módszerek felosztása és a jellemzésükre alkalmas paraméterek

0.1. Az analitikai módszerek felosztása

A klasszikus analitikai módszereket a 19. században kezdték fejleszteni, mely munka a 20. század elején rendkívüli mértékben felgyorsult. Olyan módszerek alakultak ki ebben az időben, melyeket, megfelelő módosítást követően, ma is széles körben alkalmazunk. A nitrogént még ma is a Dumas- vagy a Kjeldahl-eljárással határozzuk meg; az alapelv ugyanaz, a kifejlesztett módszerek azonban a gyorsaságot és a megbízhatóságot jelentősen javították. Ezzel a klasszikus analitikai módszerektől máris eljutottunk a műszeres analitikáig, mely ma már uralja az analitikai kémiát, az alapokról, a klasszikus módszerekről azonban nem feledkezhetünk meg.

0.1.1. Klasszikus analitikai módszerek

Kezdetben a legtöbb elemzést a minta komponensei elválasztásával végezték, mely során csapadékképződést, extrakciót vagy desztillációt alkalmaztak. Az elválasztott komponenseket ezt követően valamilyen reagenssel kezelték, amely segítségével olyan kémiai reakciót alkalmaztak, mely megváltoztatta a mérni kívánt komponens tulajdonságait, aminek alapján a komponens mennyisége meghatározhatóvá vált. Az analizálandó komponensek kvantitatív elemzéséhez gravimetriás (tömeg szerinti) vagy térfogat (térfogat szerinti) elemzési módszert alkalmaztak. A gravimetriás méréseknél a meghatározást a vizsgálandó komponens tömegváltozására vagy az adott komponenssel képzett csapadék tömegének mérésére vezetjük vissza. A titrimetriás eljárások esetén az analizálandó komponenst oldat fázisban reagáltatjuk a mérőoldatban lévő reagenssel, és a mérőoldatból számoljuk ki a koncentrációt. Ezeket a klasszikus analitikai módszereket a mai napig használják számos laboratóriumban, alkalmazásuk azonban egyre inkább csökken; a műszeres analitikai módszerek egyre jobban kiszorítják őket.

0.1.2. Műszeres analitikai módszerek

A huszadik század elején a tudósok kezdték kihasználni a mérendő komponensek fizikai tulajdonságaiban rejlő lehetőségeket, amelyekkel műszeres analitikai

módszereket dolgoztak ki. Ilyen fizikai tulajdonságok voltak a vezetőképesség, az elektródpotenciál, a fényabszorpció vagy -emisszió, a fluoreszcencia és a tömeg-töltés arány. Hatékony kromatográfiás és elektroforetikus technikákkal kezdték helyettesíteni a desztillációs, az extrakciós és a csapadékképzésen alapuló módszereket a meghatározást megelőzően. Ezeket az új módszereket, melyek nagyon hasonló tulajdonságú komponensek elválasztására és meghatározására egyaránt alkalmasak voltak, műszeres analitikai módszereknek nevezték. Az utóbbi időben a számítógép- és az elektronikai ipar nagyarányú fejlődése nagymértékben hozzájárul a modern műszeres analitikai módszerek jelentős fejlődéséhez és elterjedéséhez.

0.2. Az analitikai módszerek jellemzésére alkalmas paraméterek

Az analitikai módszerek jellemzői közül a legfontosabbak a szelektivitás, a specifikusság, a zavartűrés, a méréstartomány, a linearitás, az érzékenység, a kimutatási határ, a meghatározási határ, a pontosság és a precizitás.

0.2.1. Szelektivitás és specifikusság

Egy analitikai módszer szelektivitása azt jelenti, hogy az analitikai módszer milyen mértékben képes az adott komponens meghatározására a mintában található zavaró komponensek jelenlétében. Akkor szelektív egy módszer, ha a mért jel az analizálandó komponensből származik, és az egyéb komponensek csak kismértékben járulnak hozzá a válaszjelhez. Az alkalmazott minta-előkészítő módszerrel, a zavaró komponensek többségének eltávolításával lehetséges a zavaró hatását csökkenteni és a módszert szelektívebbé tenni. Egy meghatározandó komponensre vagy a komponensek egy csoportjára tökéletesen szelektív módszert specifikusnak nevezünk, mivel azonban a mintamátrix mindig befolyásolja a mérendő komponens válaszjelét, tökéletesen specifikus analitikai módszer nem létezik.

0.2.2. Zavartűrés

A zavartűrés, azaz a módszer eszköz- és környezetállósága, az analitikai módszerek egyik legfontosabb tulajdonsága. Az analitikai módszer zavartűrését úgy vizsgáljuk, hogy szándékosan megváltoztatott mérési körülmények között végezve az analízist számítjuk a pontosságot és a precizitást, majd meghatározzuk az egyes paraméterek azon alkalmazhatósági tartományait, amelyeknél a pontosság és a precizitás nem tér el szignifikánsan.

0.2.3. Méréstartomány

A méréstartomány a mérendő komponens azon koncentrációtartománya, amely intervallumban az adott komponens kielégítő pontossággal és precizitással elemezhető. A módszer méréstartományát, a kalibrációs tartományt úgy kell meghatározni, hogy az alkalmazott kalibrációs pontoknak át kell fogniuk a minták koncentrációját.

0.2.4. Linearitás

A koncentráció és az analitikai jel között az adott tartományban az összefüggésnek lineárisnak kell lennie, mely koncentrációtartományt a mérőgörbe lineáris tartományának nevezzük. A lineáris méréstartományt standard minták elemzésével határozzuk meg, és a koncentráció-válaszjel adatpárookra a legkisebb négyzetek módszerével számítjuk a kalibrációs egyenes egyenletét. A kalibrációt abban a koncentrációtartományban tekintjük lineárisnak, ahol az illesztett és mért értékek eltérése nem nagyobb mint 10%.

0.2.5. Érzékenység

Az érzékenység a kalibrációs egyenes meredeksége, azaz az érzékenység az egységnyi koncentrációváltozásra eső válaszjelváltozás. Ha a kalibrációs görbe egyenes, akkor a mérés érzékenysége a kalibrációs görbe meredeksége. Ha a kalibrációs görbe nem egyenes, akkor nem egy tartományra, hanem csak egy pontra tudjuk megadni az érzékenységet, ami az ahhoz a ponthoz húzott érintő egyenes meredeksége.

0.2.6. Kimutatási határ

Egy analitikai módszer kimutatási határa az a koncentrációérték, amelynek mérésekor kapott válaszjel egyértelműen megkülönböztethető a háttér válaszjelétől, azaz a vakminta szórásának háromszorosához tartozó koncentrációérték. Ez a definíció akkor érvényes, ha vakérték-korrekciót alkalmazunk a kalibrációs görbe megszerkesztése előtt. Ha nem használunk vakérték-korrekciót, akkor az elméleti kimutatási határ egy adott komponens azon koncentrációja, amelyhez tartozó válaszjel értéke megegyezik a vakminta válaszjelének és a vakminta válaszjel háromszoros tapasztalati szórásának összegével.

0.2.7. Meghatározási határ

A meghatározási határ az a legkisebb koncentrációérték, amely az adott módszerrel még elfogadható precizitás és pontosság mellett határozható meg. Ha a kalib-

rációs görbe tengelymetszete nem hanyagolható el, akkor egy adott komponens meghatározási határa azon koncentrációérték, amelyhez tartozó válaszjel értéke megegyezik a vakminta válaszjelenek és a vakminta-válaszjel tízszeres tapasztalati szórásának összegével.

0.2.8. Pontosság

A módszer pontossága, helyessége azt fejezi ki, hogy a mérési eredmény a mérendő mennyiség valódi értékéhez milyen közel esik. Meghatározása ismert koncentrációjú anyaggal történhet, melyet egy megbízható referenciaanyag analízisével végezhetünk. Ha megfelelő referenciaanyag nem áll rendelkezésre, akkor a mintához a mérendő komponens ismert mennyiségét adjuk, és meghatározzuk a hozzáadás előtti és utáni koncentrációértékeket, majd számítjuk a koncentrációkülönbséget. Ismert koncentrációjú anyag analízise esetén a minta-előkészítés és a mérés pontosságát együtt tudjuk becsülni, a második esetben viszont csupán az analitikai módszer pontosságára tudunk következtetni.

0.2.9. Precizitás, ismételhetőség, reprodukálhatóság

A módszer precizitása az egymás után, rövid időtartamon belül megismételt vizsgálatok eredményei közötti eltérés mértéke, amelyet rendszerint a szórással fejezünk ki. A mérések számának növelésével csökkenthető a tapasztalati szórás értéke. A szórást könnyebb összehasonlítani, ha a relatív szórást (a szórást szorozzuk 100-zal és osztjuk az átlaggal) adjuk meg.

A mérési eredmények ismételhetősége a precizitás azon fajtája, amely a mérendő mennyiség ugyanazon feltételek között megismételt mérései során kapott eredmények közelsége. A mérési eredmények reprodukálhatósága a precizitás azon fajtája, amely a mérendő mennyiség legalább egy megváltozott feltétel mellett megismételt mérései során kapott eredmények közelsége.

1. fejezet

Minőségi kémiai analízis

A kémiai analízis feladata az anyagok alkotórészeinek minőségi felismerése és az alkotórészek viszonylagos mennyiségének meghatározása, így a kémiai analízis feladatköre két nagy részre osztható:

- minőségi vagy kvalitatív analízisre és
- mennyiségi vagy kvantitatív analízisre.

1.1. A minőségi kémiai analízis célja

A minőségi analízis célja a vegyületek, elegyek vagy keverékek egyszerű vagy összetett alkotórészeinek a felismerése. Szabatos és megbízható következtetést a minőségi összetételre vonatkozóan csak kémiai reakciók alapján kaphatunk, ezért a vizsgálandó anyagot ismert összetételű reagensekkel, kémszerekkel hozzuk össze, és megfigyeljük az eközben fellépő kémiai változásokat. A reakciók javarészt folyadékokban, főként vizes oldatokban játszódnak le. A reakcióval járó feltűnő kémiai változás leggyakrabban abból áll, hogy a vizsgált anyag egyik alkotórésze a kémszer valamelyik alkotórészével oldhatatlan vegyületté alakul, és csapadék formájában kiválik. A csapadék színéből és más kémszerekkel szemben tanúsított viselkedéséből következtethetünk a keresett alkotórész minőségére. Gázfejlődéssel járó reakciók esetében a gáz fizikai és kémiai tulajdonságait figyeljük meg. Néha a kémszer az oldatban színváltozást hoz létre, amely jellemző bizonyos alkotórészek jelenlétére.

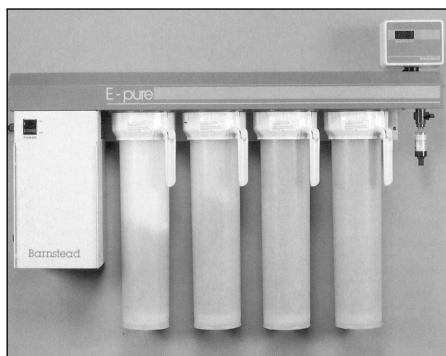
A keresett alkotórész felkutatása akkor sikerül gyorsan és kellő biztonsággal, ha az alkalmazott reakció jellemző és érzékeny. A kémiai reakció akkor **jellemző**, ha a megfigyelhető változást csak az a keresett egy bizonyos alkotórész mutatja. A reakció akkor **érzékeny**, ha a vizsgált anyag nagyon kis mennyiségének vagy igen híg oldatának alkalmazásakor is élesen megfigyelhető változás következik be. Így például a higany(II)kation jellemző kémszere a nátrium-hidroxid, mert ez csak a higany(II)ionok vizes oldatával okoz sárga csapadékot. A kloridionok nagyon kis mennyisége is kimutatható AgNO_3 -tal, mert a keletkező AgCl -csapadék még igen híg oldatban is észlelhető.

Hasonló alkotórészek egy-egy csoportjának jellemzésére az ún. **közös kémszerek** használatosak, az egyes csoportokon belüli alkotórészek felismerését pedig **különleges kémszerekkel** végezzük. A kémszerekkel végzett reakciókat a kivitelezés módja szerint kémcső-, csepp- és mikrokémiaili reakcióknak nevezzük.

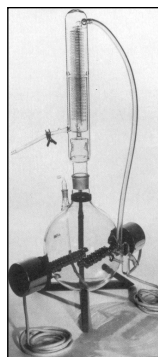
A **kémcsőreakciókat** a vizsgálandó anyag 1-2 cm³-ével kémcsőben végezzük. A kémszert cseppenként, rázogatós, esetleg melegítés közben adjuk a vizsgálandó anyaghoz, és megfigyeljük az eközben végbemenő változásokat. A **cseppreakciókat** a vizsgált anyag 1-2 cseppjével és kb. ugyanannyi kémszerrel óraüvegen, porceláncsészében, cseppentőlemezen vagy szűrőpapíron végezzük. A **mikrokémiai reakciókat** mikroszkóp segítségével végezzük 150-200-szoros nagyításban, keresve a jellegzetes színű és alakú kristályokat, illetve azok halmazait.

Az analitikai eljárások során rendkívül fontos az igen tiszta, jó minőségű desztillált vagy ioncserélt víz előállítása. Két ilyen minőségű vizet előállító berendezés látható az 1.1. ábrán.

Ultrasztavíz-előállító berendezés



Vízdesztilláló berendezés



1.1. ábra. Tiszta vizet előállító készülékek

1.2. A minőségi kémiai analízis menete

Az analizálni kívánt anyag elővizsgálata után a vizsgálati anyagot legtöbbször híg savakban vagy vízben feloldjuk, amennyiben nem oldódik, feltárjuk, oldhatóvá tesszük. A vizsgálandó anyag oldatával végezzük a keresett alkotórészek felkutatását. Az egyszerű analízis célja egy homogén vegyület jelenlétének megállapítása, a keverékek alkotórészeinek felkutatása viszont az összetett minőségi analízis módszereivel történik. A minőségi analízis munkamenete a következő:

- elővizsgálat,
- a vizsgálni kívánt komponensek extrakciója vagy az anyag feloldása, feltárása,
- a kationok felkutatása
 - egyszerű analízissel,
 - összetett analízissel,

- az anionok felkutatása,
- szerves vegyületek kimutatása.

1.2.1. A kationok felkutatása az egyszerű analízis során

A leggyakrabban előforduló kationokat szulfidjaik és karbonátjaik eltérő oldhatósága alapján az osztályreagensek segítségével öt osztályba sorolhatjuk. Az osztályreagensek a sósav, a kén-hidrogénes víz, az ammónium-szulfid és az ammónium-karbonát.

Az **I. osztály** kationjainak savanyú oldatából a kén-hidrogén vízben, híg sávkban és ammónium-szulfidban oldhatatlan csapadékot választ le. Ezen kationok a sósavval szemben két alosztályba sorolhatók. Az **I/a.** alosztály kationjai kloridionokkal csapadékot adnak (közéjük tartoznak az Ag^+ , Pb^{2+} és a Hg_2^{2+}). Az **I/b.** alosztály kationjai kloridionokkal nem adnak csapadékot (idetartoznak a Hg^{2+} , Cu^{2+} , Bi^{3+} , Cd^{2+}).

A **II. osztály** kationjainak savanyú oldatából a kén-hidrogén csapadékot választ le, amely ammónium-szulfidban oldódik. E csoport tagjai az As^{3+} , As^{5+} , Sb^{3+} , Sb^{5+} , Sn^{2+} és az Sn^{4+} .

A **III. osztály** kationjai híg savanyú oldatban kén-hidrogénnel nem adnak csapadékot. Csapadékot csak semleges vagy lúgos közegből ammónium-szulfiddal lehet leválasztani. Közéjük tartoznak a Co^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} , Zn^{2+} és a Mn^{2+} .

A **IV. osztály** kationjainak szulfidjai oldhatók, de semleges vagy gyengén lúgos oldatból ammónium-karbonáttal csapadékot adnak. E csoporthoz tartoznak a Ca^{2+} , Sr^{2+} és a Ba^{2+} .

Az **V. osztály** kationjai az előzőekben nem említett kémszerekkel jellemezhetők. A csoport tagjai a Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Li^+ , NH_4^+ és a H^+ .

Az egyes kationok kimutatása általában speciális reakciók segítségével történik. Néhány példát az 1.3. fejezet tartalmaz.

1.2.2. Az anionok felkutatása az egyszerű analízis során

Az anionokat a közös kémszerekkel szemben tanúsított viselkedésük alapján szintén analitikai osztályokba sorolhatjuk. Az egyes osztályok jellemzésére és egymástól való megkülönböztetésére a következő osztályreagensek szolgálnak: sósav vagy salétromsav, bárium-klorid vagy bárium-nitrát és ezüst-nitrát. Az anionok elkülönítése lényegesen nehezebb feladat, mint a kationoké. A felsorolt kémszerekkel való viselkedésük alapján az anionokat az alábbi négy osztályba sorolhatjuk.

Az **I. osztály** anionjainak vizes oldatából az erős savak (sósav, salétromsav) gázt fejlesztenek vagy csapadékot választanak le. E csoportba tartozók a CO_3^{2-} , HCO_3^- , SO_3^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_2 , S^{2-} , S_x^{2-} , SiO_3^{2-} , ClO^- .

A **II. osztály** anionjai erős savaktól észrevehetően nem változnak, semleges oldatukból azonban a Ba^{2+} -ionok csapadékot választanak le, tehát ezen anionok bárium-sói vízben oldhatatlanok. E csoport tagjai a SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , BO_3^{3-} , F^- , IO_3^- , BrO_3^- .

A **III. osztály** anionjai erős savaktól, valamint semleges oldatban báriumionoktól nem változnak, salétromsavval megsavanyított oldatukban viszont ezüst-nitráttal csapadékot adnak. Az e csoportba tartozó anionok bárium-sói tehát vízben oldódnak, ezüstsói viszont vízben és salétromsavban oldhatatlanok. Ezek a Cl^- , Br^- , I^- , CN^- , SCN^- , $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$.

A **IV. osztály** anionjai erős savaktól nem változnak, semleges oldatukból báriumionok nem választanak le csapadékot, salétromsavval megsavanyított oldatuk nem reagál az ezüst-nitráttal, tehát az e csoportba tartozó anionok bárium- és ezüstsói vízben oldhatók. Idetartoznak az NO_3^- , NO_2^- , CH_3COO^- , ClO_3^- , OH^- és $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$.

Az egyes osztályokba sorolt ionokat speciális reakciók segítségével lehet egymástól elkülöníteni és kimutatni. A könyvnek nem feladata az összes anion és kation kimutatásának ismertetése, a hallgatók tudásszintjének növelése érdekében csak a legfontosabb kationok és anionok kimutatását mutatjuk be.

1.2.3. Lángfestési próba

A kationok egy részének haloidsói nem világító **Bunsen-lángban** izzítva elpárolognak, és gőzük a lángot jellemző színűre festi. E sók a láng magas hőmérsékletén fém- és halogénatomokra disszociálnak, a fématomok pedig e hőmérsékleten jellemző színű fényt sugároznak ki. Mivel a halogének fénysugárzása rendkívül csekély, ezért a láng színe a fémalkotórészre jellemző.

A lángfestési próba során 4-5 mm hosszú, vékony platinadrót egyik végét egy üvegcsőbe forrasztjuk, másik végét pedig kör alakban meggörbítjük úgy, hogy az átmérője kb. 2 mm legyen. A lángfestési próba előtt a drót meggörbített végét nem világító Bunsen-lángba tartjuk mindaddig, amíg a láthatatlan szennyezés elpárolog és a láng szintelen lesz. Ha ez nem történik meg, a drótot tömény sósavba mártjuk és újból kiizzítjuk. Az izzó platinavéggel megérintjük a vizsgálandó só szilárd porát, amelyből egy kevés a drótra tapad, majd a drót végét 1 csepp sósavval megnedvesítjük, a láng csúcsához tartjuk, amit a vizsgálandó anyag jellegzetes színűre fest. A lángfestési próba során különféle fémek az alábbi szint adják:

sárga:	Na
fakóibolya:	K
kárminvörös:	Li, Sr
téglavörös:	Ca
fakózöld:	Ba
smaragdzöld:	Cu
fakókék:	Pb, As, Sb

Ha a lángfestési próba negatív, az még nem jelenti azt, hogy a keresett fém esetleg kis koncentrációban nincs jelen. Ha a vizsgálandó anyagban a fémek fém-oxidok vagy rosszul oldódó csapadékok formájában vannak jelen, célszerű ezeket izzítás után sósavval haloidokká átalakítani, amelyek rendszerint sokkal illékonyabbak az eredeti vegyületnél.

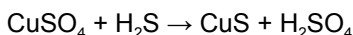
1.3. Néhány fontosabb kation és anion kimutatása

A kimutatás menete: A reakciókat kémcsőben, kis anyagmennyiségekkel (1-1,5 cm³) végezzük. A reagensből csak néhány cseppet adagolunk, majd a változás megfigyelése után újabb mennyiség hozzáadásával tesszük teljessé a reakciót.

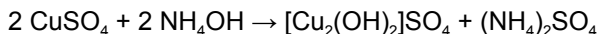
A Cu²⁺-ionok kimutatása

Törzsoldat: 0,5 M CuSO₄.

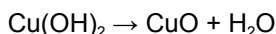
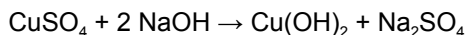
– Kén-hidrogén hatására a sósavval megsavanyított oldatból fekete CuS-csapadék válik le.



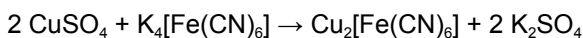
– Kevés NH₄OH-tól világoskék csapadék alakjában bázisos réz(II)só válik le, ami az NH₄OH fölöslegében réz(II)-tetraminsó keletkezése közben intenzív kék színnel oldódik.



– A nátrium-hidroxid hideg oldatból világoskék Cu(OH)₂-csapadékot választ le, mely csapadék a főzésre megfeketedik, a Cu(OH)₂ ugyanis vízvesztéssel CuO-dá alakul.

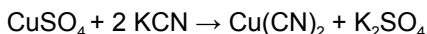


– A K₄[Fe(CN)₆] a vörösbarna Cu₂[Fe(CN)₆] csapadékot választja le, ami híg savakban nem oldódik, az NH₄OH azonban a csapadékot oldja.

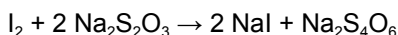
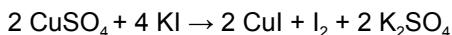


46 ■ 1. Minőségi kémiai analízis

– Kálium-cianid hatására először sárga színű $\text{Cu}(\text{CN})_2$ csapadék válik le, mely azonnal CuCN -ra és ciángázra bomlik (igen mérgező!). KCN főlegében a CuCN szintelen komplex vegyületként oldódik.



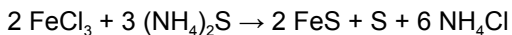
– A kálium-jodid fehér réz-jodid-csapadékot választ le, azonban az egyidejűleg keletkező jód barna színe a csapadék fehér színét elfedi. Ha a jódot nátrium-tioszulfáttal eltávolítjuk, eltűnik a réz(I)-jodid csapadék fehér színe.



A Fe^{3+} -ionok reakciói

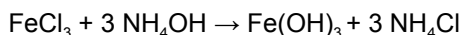
Törzsoldat: 1 M FeCl_3 .

– $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ hatására semleges vagy gyengén lúgos közegben fekete csapadék alakjában $\text{FeS} + \text{S}$ keveréke válik le.



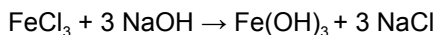
Sósavban a csapadék oldódik, levegőn pedig barna színű $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -dá oxidálódik.

– NH_4OH hatására vörösbarna, kocsonyás állapotú vas(III)-hidroxid válik le, ami a kémszer feleslegében sem oldódik.

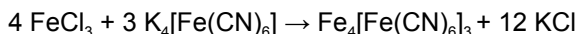


A csapadék híg savakban oldódik.

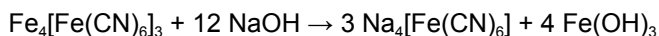
– NaOH hatására vörösbarna, kocsonyás állományú vas(III)-hidroxid válik le, mely a kémszer feleslegében oldódik.



– $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ hatására kék színű (berlinikék) csapadék válik le. A csapadék híg savakban nem oldódik, koncentrált savak azonban oldják.



A vas(III)-[hexaciano-ferrát(II)] nátrium-hidroxid hatására vörösbarna $\text{Fe}(\text{OH})_3$ -dá alakul.



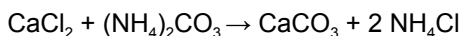
A berlinikék-reakció rendkívül jellemző a vasvegyületekre.

A Ca^{2+} -ionok reakciói

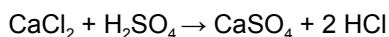
Törzsoldat: 1 M CaCl_2 .

– Savanyú oldatban a H_2S , valamint semleges oldatban az $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ csapadékot nem okoz.

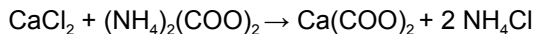
– $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ vagy a Na_2CO_3 semleges vagy gyengén lúgos oldatból fehér CaCO_3 -csapadékot választ le.



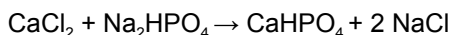
– A H_2SO_4 vagy az oldható szulfátok tömény kalciumsóoldatból CaSO_4 -ot (gipsz) választanak le.



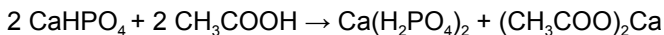
– $(\text{NH}_4)_2(\text{COO})_2$ gyengén lúgos, semleges vagy ecetsavas közegből fehér kalcium-oxalát-csapadékot választ le.



– Na_2HPO_4 semleges vagy gyengén lúgos kalciumsóoldatból fehér CaHPO_4 csapadékot választ le.



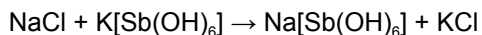
A csapadék sósavban és salétromsavban könnyen, ecetsavban valamivel nehezebben oldódik.



A Na^+ -ionok reakciói

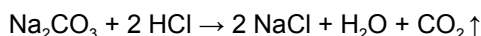
Törzsoldat: 1 M NaCl .

Kálium-antimonát $\text{K}[\text{Sb}(\text{OH})_6]$ frissen készült telített oldata 1%-nál töményebb nátriumsó semleges vagy gyengén lúgos oldatából fehér, porszerű, kristályos nátrium-antimonátot választ le.

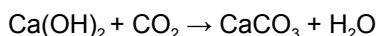


A karbonátionok (CO₃²⁻) reakciói

– HCl vagy szénsavnál erősebb savak a karbonátokat CO₂-gáz fejlődése közben elbontják,



a fejlődő szén-dioxid a meszes vizet [telített Ca(OH)₂-oldat] kalcium-karbonát keletkezése közben megzavarosítja.



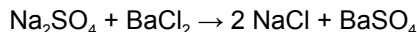
– Az oldható karbonátok hidrolízis folytán lúgos kémhatásúak,



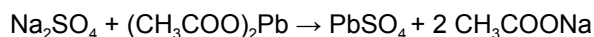
tehát ha a karbonátok vizes oldatához 1 csepp fenolftaleint teszünk, az oldat élénkpiros lesz.

A szulfátionok (SO₄²⁻) reakciói

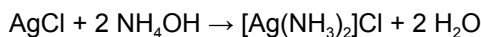
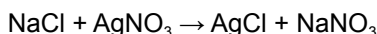
– BaCl₂ fehér, porszerű BaSO₄-csapadékot választ le.



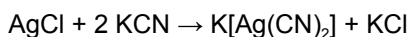
– (CH₃COO)₂Pb hatására fehér PbSO₄-csapadék válik le, ami vízben és híg kénsavban alig, híg salétromsavban nehezen, forró, tömény sósavban azonban teljesen feloldódik.

**A kloridionok (Cl⁻) reakciói**

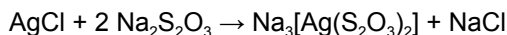
– AgNO₃ hatására fehér, túrós csapadék válik le, amely napfényen megsötétedik. A csapadékot a NH₄OH komplex só keletkezése közben oldja.



A KCN az AgCl-csapadékot komplex ezüst-cianid keletkezése közben oldja.



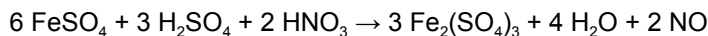
Nátrium-tioszulfátban a csapadék komplex nátrium-ezüst-tioszulfát keletkezése közben oldódik.



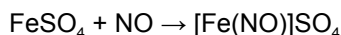
1.4. Speciális vizsgálatok élelmiszerek komponenseinek kimutatására

1.4.1. A nitrátionok kimutatása ivóvízből

A nitrátok vas-szulfát és koncentrált kénsav hatására nitrogén-monoxidra bomlanak, ami a vas-szulfát feleslegével barna színű komplex vegyületté egyesül. Utóbbi egyértelműen a nitrát jelenlétére utal. 1 cm³ nitráttartalmú oldathoz óvatosan 3 cm³ koncentrált kénsavat adunk, és a reakcióelegyet vízcsap alatt lehűtjük, majd a megdöntött kémcső falán végigfolyatva fele térfogatnyi, frissen készült vas-szulfát-oldatot rétegzünk fölé. Nitrát jelenlétében a két folyadék határfelületén barna gyűrű keletkezik, mely a ferdén tartott kémcső óvatos forgatásakor szélesebb lesz, és így jobban észrevehetővé válik. A két folyadékréteg összekeverésekor vagy melegítés hatására a színeződés eltűnik. A barna gyűrű a nitrozo-ferro-szulfáttól $\{\text{Fe}(\text{NO})\text{SO}_4\}$ származik, ugyanis tömény kénsav hatására a nitrátokból salétromsav szabadul fel, amely a fölös koncentrált kénsav jelenlétében a vas-szulfátot erőlyesen oxidálja az alábbi reakcióegyenlet szerint:



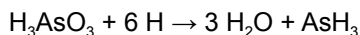
A felszabaduló nitrogén-monoxid a vas-szulfát feleslegével barna színű, laza komplex vegyületté egyesül az alábbi reakció szerint:



E vegyület magas hőmérsékleten elbomlik, és a folyadék elszíntelenedik.

1.4.2. Arzén kimutatása

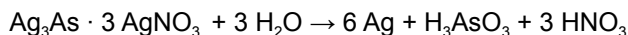
Az arzén kimutatására a **Marsh-féle próba** és a **Gutzeit-próba** alkalmas. A Marsh-próba során az oldható arzénvegyületeket a naszczensz hidrogén AsH₃ gázzá redukálja, ami hevítés során összetevőire disszociál.





Az elemi arzén kiválásából az arzéntartalomra tudunk következtetni.

A Gutzeit-próba során az arzénvegyületből naszcensz hidrogénnel előállított AsH_3 -gáz a tömény ezüst-nitráttal átitatott szűrőpapíron sárga foltot idéz elő, amely vízzel megcseppentve megfeketedik. A lejátszódó reakció a következő:



A kivált fekete ezüstből az arzén jelenlétére lehet következtetni. A próbát úgy végezzük, hogy a kémcsőbe néhány darabka tiszta, granulált cinket teszünk, hozzáadjuk a vizsgálandó oldat néhány cseppjét, majd kénsavat és réz-szulfátot adunk hozzá. A kémcső száját a savcseppek visszatartására vattadugóval bedugjuk, majd tiszta, fehér szűrőpapírt helyezünk rá, amit gumigyűrűvel rögzítünk. A kifeszített szűrőpapír közepére 1 csepp 50 tömeg%-os ezüst-nitrát-oldatot cseppentünk, melyen arzén jelenlétében barna vagy fekete gyűrűvel szegélyezett citromsárga színű folt keletkezik. A sárga folt vízzel való megnedvesítéskor megfeketedik. Hasonló összeállítással egy vakpróbát is készítünk, amely az arzéntartalmú (vizsgálandó) oldat kivételével minden más egyéb vegyületet tartalmaz. A szűrőpapírok színét rövid időközönként összehasonlítjuk.

1.4.3. Az ammónia kimutatása Nessler-reagenssel

A Nessler-reagens [K-Hg(II)-jodid lúgos oldata] ammóniumsók oldatában sárgásbarna csapadékot, hígabb oldatban sárgásbarna elszíneződést okoz. A lúgos reagens ugyanis ammóniumsók oldatából ammóniát tesz szabaddá, mely K-Hg(II)-jodiddal bázisos Hg(II)-amido-jodid [$\text{HgO} \cdot \text{Hg}(\text{NH}_2)\text{I}$] keletkezése közben reagál az alábbi reakcióegyenlet szerint:



A kémszer hatóanyaga valójában a Hg(II)-jodid, amelyet a fölös mennyiségű kálium-jodid tart oldatban. E rendkívül érzékeny reakció ivóvizek ammóniatartalmának kimutatására szolgál.

1.4.4. Zsírok és olajok avasodásának kimutatása Kreiss-reakcióval

A Kreiss-reakciót a zsírok avasodásakor keletkezett aldehidek és ketonok kimutatására használják. A kimutatáskor 2 cm^3 olajat vagy megolvasztott zsiradékot,

esetleg 2 cm^3 megolvasztott zsiradékra kloroformos vagy éteres oldatát 2 cm^3 koncentrált sósavval 1 percig rázzuk, majd 2 cm^3 0,6%-os benzolos rezorcinoldatot adunk hozzá, és végül az elegyet erősen összerázzuk. Ezt követően 5 percig állni hagyjuk, majd a savas rész színéből következtethetünk az avasodás mértékére. Amennyiben az olaj vagy a zsír avas volt, a savas rész piros vagy kékespiros színeződést ad. Ha a reakciót nem rezorcinoldattal, hanem 0,1%-os floroglucinoldattal végezzük, akkor az élénkpirostól az ibolyaszínig terjedő színeződést tapasztalunk. A reakció rendkívül érzékeny az aldehidek jelenlétére, ezért halvány elszíneződés esetén – ha egyébként érzékszervileg az avasság nem érzékelhető – nem szabad a zsír olaj avas voltára következtetni.

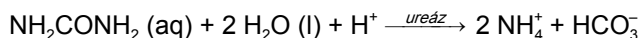
1.4.5. A különböző fémnyomok kimutatása

Szinte minden fémnek megvan az a speciális reagense, amellyel csak rá jellemző színreakciót ad, és amelynek segítségével az illető fém nyomnyi mennyisége is kimutatható. Élelmiszerekben jelen lévő szennyező fémnyomok kimutatásához először roncsolással a szerves anyagokat el kell távolítani, hogy a fémtartalom zavartalanul meghatározható legyen. A roncsolás során a vizsgált élelmiszert sárlétsav-, kénsav- vagy perklórsav-oldattal mindaddig hevítjük, amíg az összes szerves anyagot el nem roncsoltuk. A roncsolást akkor tekinthetjük befejezettnek, ha víztiszta, gyengén fehér vagy sárga színű oldatot kapunk, amelyből közvetlenül vagy megfelelő hígítás után végezhetjük a különböző fémek kimutatását. A törzsoldatból az óntartalmat a fenil-fluoronnal végzett reakcióval mutatjuk ki, melynek során az ón(IV)ionok a reagenssel narancsszínű komplexet képeznek. Az **alumínium** a 8-hidroxi-kinolinnal sárga színű komplex vegyületet képez, amelynek színintenzitása az alumíniumtartalommal arányos. A **vastartalom** kimutatása során az oldathoz hidroxilamin-hidrogénkloridot adunk, amely a háromértékű vasat kétértékűvé redukálja. A vas(II)ion a α, α' -dipiridillel 6-os pH-nál vörös színeződést ad, melynek színintenzitása a vas koncentrációjával arányos. A **rézartalom** kimutatására a roncsolás után kapott oldathoz lúgosítás után Nadietil-ditiokarbonátot adunk, ami sárga színű rézkomplexet eredményez. A színes vegyületet szén-tetrakloriddal kirázva a módszert mennyiségi meghatározással is lehet fejleszteni, hisz a színintenzitás a réz koncentrációjával arányos. Az ólomtartalom kimutatása során ditizon-oldatot adunk a mintához, melynek hatására vörös színű fémkomplex keletkezik, aminek színintenzitása az ólom mennyiségével arányos.

A többi fémre is kidolgoztak hasonló módszereket, sőt ezen módszerek közül többet mennyiségi analízisre alkalmas eljárásá fejlesztettek, melyeket a különböző fotometriás nyomelemzési módszerek tárgyalnak.

1.4.6. Karbamid kimutatása élelmiszerekből

A karbamid az *ureáz* enzim hatására az alábbi reakció szerint bomlik ammóniára és szén-dioxidra:



A keletkezett hidrogén-karbonát anionok a későbbiek során szén-dioxidra és vízre bomolhatnak, az ammóniumionok pedig ammónia formában távozhatnak a rendszerből. A keletkező ammóniumionok a rendszer pH-ját akár több egységgel is megnövelhetik, amit egy jól megválasztott indikátorral lehet mérni. A gyakorlatban történő kimutatás során 5-10 g feltételezhetően karbamidot tartalmazó mintából vizes kivonatot készítenek, majd ebből *ureáz* enzimet és indikátort tartalmazó szűrőpapírra vagy tesztcsíkra cseppentenek pár cseppet. A tesztcsíkot vagy szűrőpapírt olyan reagensoldatba mártják bele, melynek 100 cm³-e 0,1 g krezolvörös indikátort, ill. 1 g por alakú *ureázt* tartalmaz. Karbamid jelenlétében a tesztcsíkra cseppentett oldat helyén pár percen belül piros színű folt figyelhető meg pozitív teszt esetén.

A karbamid meghatározására lehetőség van ammóniaszelektív elektróddal is, ugyanis az *ureáz* enzim hatására a felszabaduló ammóniumionok az ammóniaszelektív elektród membránpotenciálját megváltoztatják. Ismeretesek olyan elektródák is, melyek membránja fixen kötött *ureáz* enzimet tartalmaz, aminek segítségével a karbamid ammóniává történő átalakulása a membránban végbemegy.

Az előzőekben ismertetett eljárás alkalmas a szója *ureáz*enzim-tartalmának gyors kimutatására úgy, hogy a szűrőpapírt 1% karbamidot és 0,1% krezolvörös indikátort tartalmazó oldatba mártjuk, és amelyre szójaliszt vízzel készített szuszpenzióját cseppentjük. Amennyiben a szójaliszt *ureáz* enzimet tartalmazott, a szűrőpapír színe az enzim aktivitásának függvényében halvány rózsaszíntől a sötétvörösre változhat.

2. fejezet

Mennyiségi kémiai analízis

2.1. Bevezetés a mennyiségi kémiai analízisbe

2.1.1. Mennyiségi kémiai analízis

A mennyiségi kémiai analízis célja **vegyületek, keverékek vagy elegyek minőségileg előzetesen jellemzett alkotórészei viszonylagos mennyiségének meghatározása**. Míg a minőségi analízis arra ad feleletet, hogy a vizsgált anyag milyen alkotórészekből áll, addig a mennyiségi analízis megmondja, hogy az anyag ezen alkotórészekből mennyit, általában hány százalékot tartalmaz. A keresett alkotórész meghatározása csak egészen ritka esetben történhet úgy, hogy az alkotórészt elemi állapotban, tisztán leválasztjuk és tömegét megmérjük. Túlnyomórészt bizonyos kémiai vagy fizikai-kémiai módszerekhez folyamodunk, melyek eredményéből számítás útján következtethetünk az illető alkotórész mennyiségére. A meghatározás módja szerint tehát megkülönböztetünk **kémiai** és **fizikai-kémiai** módszereket.

A mennyiségi analízis *kémiai* módszerei közvetve vagy közvetlenül a mérlegelésen alapszanak. A meghatározandó anyagon teljesen végbemenő kémiai változásokat idézünk elő, és a reagens térfogatából vagy a reakciótermék tömegéből következtetünk az alkotórész mennyiségére. Eszerint megkülönböztetünk *térfogatos (titrimetriás, volumetriás)* és *tömeganalitikai (gravimetriás)* módszereket. A mennyiségi analízis *fizikai-kémiai* módszerei igen sokfélék lehetnek. E könyv több fejezetében a mennyiségi kémiai analízis térfogatos módszereit ismertetjük.

2.1.2. Térfogatos (titrimetriás) kémiai analízis

A térfogatos kémiai analízis módszereinél a megmért vizsgálandó anyag oldatához olyan ismert töménységű mérőoldatot adunk, ami a meghatározandó alkotórészsel gyorsan és teljesen végbemenő reakcióba lép. A fogyott mérőoldat térfogatából a keresett alkotórész mennyisége kiszámítható.

A számítások elvégzésére **a keresett alkotórész kémiai átalakulásához szükséges mérőoldat mennyiségét pontosan ismernünk kell**, ezért a mérőoldatból éppen csak annyit kell alkalmaznunk, amennyi a reakció befejezéséhez szükséges. Ez csak akkor lehetséges, ha **a reakció, amelyen a kérdéses módszer**

alapszik, egyértelműen és teljesen végbemegy, élesen végződik, és befejeződése pontosan megfigyelhető.

A reakciók végpontjának jelzésére, ha ezt az oldat színének megváltozása különben nem jelzi, általában **indikátorokat** (jelzőket) használunk, amelyek a reakció befejezését élénk színváltozással árulják el. E festékindikátorokon kívül **a vizsgálandó oldatba merülő elektród potenciálváltozása** vagy **az oldat vezető-képességének változása** is alkalmas lehet **a reakció végpontjának felismerésére.**

2.1.3. Analitikai mérleg és mérlegelés

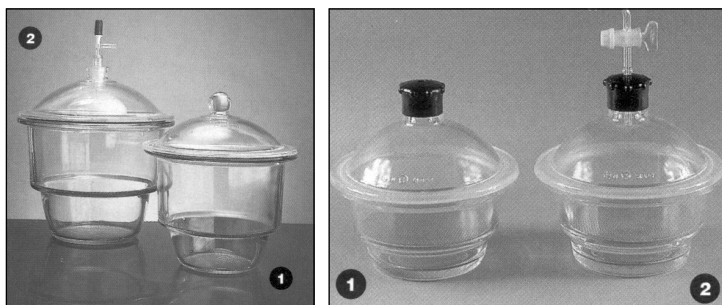
A térfogatos analízis során százalékos összetételt, vagyis tömegviszonyokat állapítunk meg, tehát ismernünk kell a kiindulásul szolgáló vizsgálandó anyag pontos tömegét. Ismert koncentrációjú mérőoldatot is csak úgy tudunk készíteni, hogy az oldandó anyag tömegét pontosan megmérjük, illetve a kész oldatot pontosan ismert tömegű anyagra állítjuk be. Ezek szerint a térfogatos analízis részben közvetlenül, részben közvetve tömegmérésen alapszik.

Az anyagok tömegének meghatározására az **analitikai mérleget** használjuk. Az analitikai mérleg régebben finom kivitelezésű, gyakorlatilag egyenlő karú mérleg volt. Lengő rendszere két merevített, rendszerint sárgaréz- vagy alumíniumból készült, könnyű korból és erre merőleges mutatóból állt, mely achát- vagy acélprizma élével támaszkodik a mérlegoszlop tetejére szerelt achát-lemezre. A mérleg serpenyői ugyancsak achátlemezből való betéttel ellátott kengyelek segítségével voltak a mérlegkarok végére erősített achátékekre fel-függesztve. A mérlegoszlop belsejében foglal helyet az arretáló (tehermentesítő emelő) szerkezet, ami kívülről rézkilincs elforgatásával hozható működésbe. A mérleg egyéb részei még az oszlopra, a mérlegnyelv alá erősített skála, a lovastömeg eltolására való szán, valamint az egész mérleget magába foglaló, felhúzható ajtóval ellátott üvegszekrény. Az analitikai mérleg legnagyobb teherbírása rendszerint 100-200 g. A modern analitikai mérlegek pontossága elérheti a 0,1-0,01 mg-ot (2.1. ábra).

A mérlegelésnél, a mérleg használatánál az alábbiakat kell betartani. A mérleget és a tömegeket tartsuk *tisztán*. Evégből tartsunk a mérlegben egy kis hajszálcsetet, és legyen kéznél egy darabka szarvasbőr is, amellyel az egyes alkotórészeket vagy a mérlegasztalt időnként letisztítjuk. A mérleg egyoldalú *felmelegedését* és lehűlését kerüljük. A mérleg felállítása ezért fűtőtestektől távol, napfénytől és léghuzattól óvott helyen, a laboratóriumtól elkülönített mérlegszobában történjék. Forró vagy meleg tárgyakat a mérlegelés előtt szabad levegőn hagyjuk kihűlni, majd exsikkátorban (2.2. ábra) vagy lefedett üvegpohárban a mérleg mellé tesszük, és teljes hőmérséklet-kiegyenlítődéig állni hagyjuk. Például edényeket a melegítéstől számított fél óra, üveg- vagy porcelánedényeket 45 perc múlva mérhetünk. Meleg testek a mérlegkarok megnyúlása és főleg a meleg hatására fellépő konvekciós légáramlások miatt nem mérhetők meg pon-



2.1. ábra. Laboratóriumi mérlegek



2.2. ábra. Exszikkátorok

tosan. Közepes méretű, befedett tégely például, melynek hőmérséklete $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ -kal nagyobb a környezeténél, pusztán a benne lévő levegő kisebb sűrűsége folytán $0,1\text{ mg}$ -mal könnyebb, mint teljes hőmérséklet-kiegyenlítés után. A mérőtömegeket a hőmérséklet-kiegyenlítés miatt ugyancsak tartjuk állandóan a mérleg mellett.

Az exszikkátorból kivett mérőedényeket vagy nagyobb felületű üvegeszközt nem szálasodó vászonnal vagy szarvasbőrrel való letörlés után, bedugaszolt állapotban 10 percre helyezzük a mérlegszekrénybe, hogy felületük a *levegő nedvességével* egyensúlyba kerüljön. Közvetlenül a mérés előtt nyissuk ki az edény dugóját egy pillanatra, hogy a nyomáskülönbség kiegyenlítődjék. Közönséges üvegből készült edény a körülményektől függően 100 cm^2 -enként $1\text{--}10\text{ mg}$ nedvességet is megköthet felületén. Nagy felületű üvegedények mérésénél tehát helyesen járunk el, ha az edényt ugyanolyan térfogatú, alakú és előkezelésű üvegedénnyel egyensúlyozzuk ki.

Papírcímke, szűrőpapír, dugó, valamint ujlenyomatokkal ellátott edény nem ad állandó tömeget. A mérendő tárgyakat alkalmas fémfogókkal, szarvasbőrrel vagy nem szálasodó vászondarabbal megfogva helyezzük mérlegre. Közvetlen

mérés előtt az üvegeszközöket nem szabad vászonnal vagy szarvasbőrrel dörzsölni, mert felületük elektromosan feltöltődhet, és ez zavarja a mérést.

A *lemérendő anyagot* nem szabad közvetlenül a mérleg serpenyőjére rakni, hanem valamilyen könnyű edényben kell mérni. Nem higroszkópos anyagokat nyitott kis üveg bepárlócsészében vagy csónak alakú üvegedényben mérünk le. A higroszkópos anyagok mérésére becsiszolt dugóval ellátott mérőedénykét vagy mérőcsövecskét használunk. Az üres edények pontos abszolút tömegének ismerete fölösleges, ezért az egyszerűség kedvéért ezek tömegének megállapításakor a mérleg egyensúlyi helyzetét nem az üres mérleg egyensúlyi helyzetére, hanem a skála nullapontjára állítjuk be. Ugyanígy járunk el az anyag és az edény együttes tömegének megállapításakor is. Mivel a bemért anyag tömegét a két mérés különbsége adja meg, az edény tömegének mérésekor elkövetett kis hiba kiesik.

Ha ugyanabból az anyagból különböző kis részleteket akarunk lemérni, úgy járunk el, hogy először lemérjük az anyaggal telt edény tömegét, majd veszteség nélkül kiszórjuk belőle egy másik edénybe a kívánt anyagmennyiséget, és a maradékot visszamérjük. A második részletet egy másik edénybe szórjuk, és a maradékot újból visszamérjük. Ily módon eljárva két beméréshez összesen csak három tömegmérést kell végeznünk. Illékony anyagok vagy vizes oldatok lemérését bedugaszolt üvegdugós edényben végezzük. A párolgással járó tömegcsökkenést az óraüveggel való befedés nem küszöböli ki. 0,1%-nál nem pontosabb meghatározásoknál 10 g-nál nagyobb tömegű beméréseket (oldatok) célszerűbb milligramm pontosságú táramérleggen végezni.

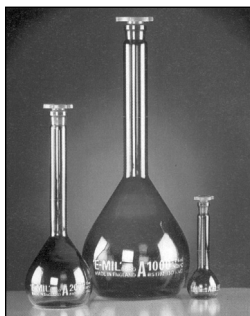
Az analitikai gyakorlatban százalékos anyagtartalmat, vagyis tömegviszonyokat állapítunk meg. Ezért nem kell ismernünk a meghatározott alkotórész és a bemért anyag pontos abszolút tömegét, hanem csupán a kettő tömegviszonyát. Ez a tömegmérést annyiban egyszerűsíti, hogy abszolút tömegmérés helyett aránylag egyszerűbb, relatív tömegméréssel is megelégedhetünk. Ha ugyanis méréseinket mindig ugyanazon mérleg ugyanazon serpenyőjén végezzük, a karok egyenlőtlen-ségéből származó hiba a tömegviszonyok számításánál kiesik.

2.1.4. Laboratóriumi edények anyaga

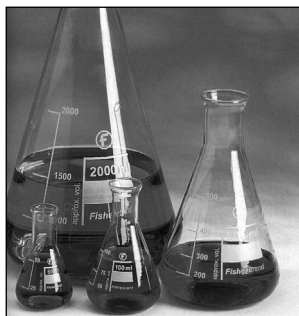
Pontos mennyiségi analízishez feltétlenül szükséges, hogy a laboratóriumi edények anyagával, használati módjával és az alkalmazásukkal járó hibákkal tisztában legyünk.

A közönséges nátronüveg (körülbelüli összetétele: SiO_2 75%, Na_2O 12%, CaO 13%) enyhe vörös izzáson (500-600 °C) lágyul, könnyen megömleszthető és a hőmérséklet-változásokra érzékeny. Vízben és savakban, különösen magasabb hőmérsékleten, jelentékeny mértékben oldódik. Lúgok erősen megmarják. Főleg üvegcsővek, mérőhengerek, mérőlombikok, pipetták és erős falú edények (kém-szerüvegek) készítésére használják.

Erlenmeyer-lombikok

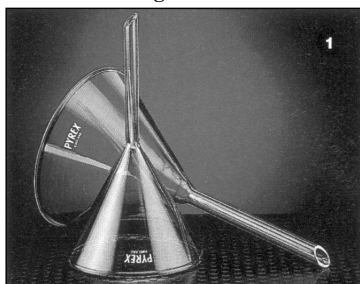


Mérőlombikok

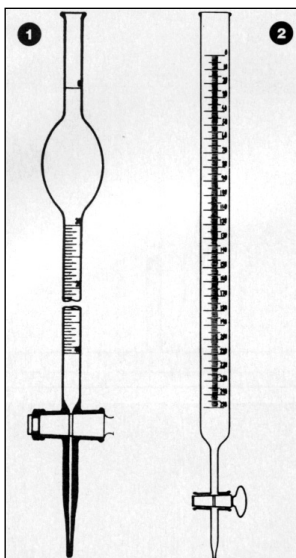


2.3. ábra. Lombikok

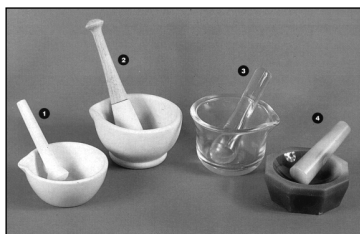
Üvegtölcsérek



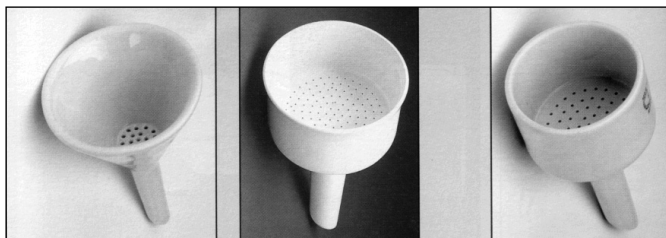
Büretták



Dörzsmozsarak



Porcelánszűrők



2.4. ábra. Laboratóriumi eszközök

A jénai üveg (bórsav, nátrium- és magnéziumszilikát tartalmú üvegek) 600–700 °C között lágyulnak, hőmérséklet-változással szemben elég ellenállóak, és kémiai ellenálló képességük is igen nagy. Erős lúgok azonban, különösen magas hőmérsékleten, megtámadják. Lombikok, poharak, hőmérők és nagyobb ellenálló képességű eszközök készítésére használják (2.3., 2.4. ábra).

A káliüveg (körülbelüli összetétele: SiO_2 71%, K_2O 18%, CaO 11%) magas hőmérsékleten (700–800 °C-on) lágyul, hőmérséklet-változásokkal, valamint vegyszerekkel szemben elég ellenálló. Égetőcsövek, nehezen olvadó üvegeszközök készítésére használják.

Az ólomüveg (körülbelüli összetétele: SiO_2 52%, K_2O 13%, PbO 35%) alacsony hőmérsékleten (400–500 °C) lágyul, hőérzékeny, vízzel és vegyszerekkel szemben kicsi az ellenálló képessége. Redukálólángban hevítve, fémólm kiválása miatt megfeketedik. Lágú üveg, fénytörő képessége nagy. Főleg optikai eszközök készítésére, valamint fémeknek üvegbe való forrasztására használják.

A porcelán magasabb hőmérsékletre (1300 °C) hevíthető, mint az üveg. Lúgokkal és savakkal szemben ellenállóbb, de a foszforsav erősen megtámadja. A hőmérséklet-változásra kevésbé érzékeny, azonban hevítését és hűtését óvatosan kell végezni. Lúgos ömledékek kevés alumínátot és szilikátot oldanak ki belőle. Főleg tégelyek, tégelyfedők, bepárlócsészék, izzítólemezek és égetőcsövek készítésére használják. 1000 °C feletti használatra zománcozás nélküli porcelán-eszközöket is forgalomba hoznak.

A kvarc edények 1700 °C körül lágyulnak. Hőmérséklet-változással szemben teljesen érzéketlenek. A kvarc savakkal szemben ellenálló (kivéve a foszforsavat), lúgok már közönséges hőmérsékleten is megtámadják. Magasabb hőmérsékleten minden bázisos fénoxid, borát és foszfát megtámadja. Magas hőmérsékleten még az ujjlenyomatok kevés fénoxid-tartalma is üvegeképződéshez és így meghomályosodáshoz vezet. A kvarc, a megmunkálás hőmérséklete szerint, kétféle alakban kerül forgalomba: a magas hőmérsékleten megmunkált kvarceszközök üvegszerűen átlátszóak (kristálykvarc), míg az alacsonyabb hőmérsékleten megmunkált eszközök levegőbuboréktól homályosak. A kvarcot főleg tégelyek, csészék és égetőcsövek készítésére használják. A kvarctégelyekben főleg savanyú feltárásokat végzünk.

A platina – tégely, csésze stb. alakjában – a mennyiségi analízis gyakran nélkülözhetetlen eszköze. Magas olvadáspontja (1800 °C), mechanikai és kémiai ellenálló képessége, jó hővezetése a platinát majdnem pótolhatatlanná teszi. Mechanikai szilárdságának növelésére gyakran 0,5–1,0% irídiummal ötvözik. Fejlődő halogének a platinát megtámadják, ezért belőle készült edényekben nem szabad királyvizet vagy haloidokat tartalmazó anyagot oxidálóanyagokkal (HNO_3 , KMnO_4 , FeCl_3 stb.) melegíteni. Lúgos ömledékek a platinaedény felületét megtámadják. A Na_2CO_3 önmagában még nem idéz elő káros változást, de a szilárd NaOH , KOH , Na_2O_2 , valamint $\text{Na}_2\text{CO}_3 + \text{KNO}_3$ már reagál a platínával és jelentős korróziót idéz elő.

A **nikkelt** tégelyek és csészék készítésére használják. Olvadáspontja 1455 °C. A nikkelt már híg savakban is oldódik és könnyen oxidálódik, ezért savanyú vagy oxidáló ömlesztést nem szabad benne végezni. A lúgos ömledékek megsavanyítását sem szabad nikkeledényben végezni. A nikkeledényeket lúgos anyagok ömlesztésére használják, habár kismértékben ezek az anyagok is megtámadják, és az ömledék mindig tartalmaz kevés nikkelt. A nikkeledényeket a gázláng redukáló része nikkelt-tetrakarbonil képződése közben megtámadja.

Az **ezüstöt** tégelyek és csészék készítésére használják. Az ezüstöt lúgos oldatok és ömledékek nem támadják meg, ezért kiválóan alkalmazható lúgos ömledékek készítésénél. Az ezüst olvadáspontja aránylag alacsony (960 °C), ezért hevítését óvatosan kell végezni, szűrőlángban nem szabad izzítani.

Az **aranyedényeket** a megolvasztott fém-hidroxidok nem támadják meg. A tiszta arany olvadáspontja 1060 °C.

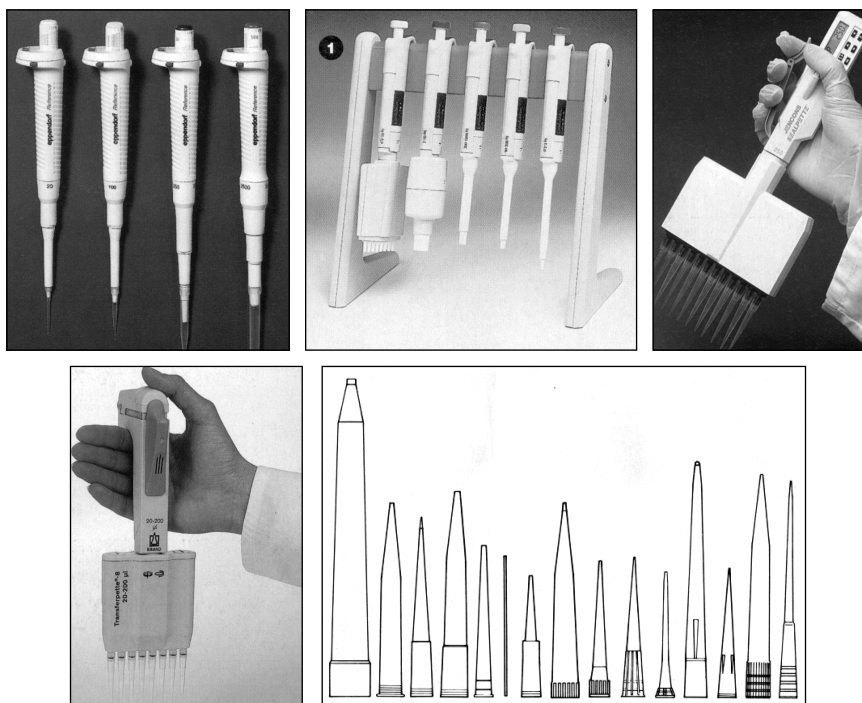
2.1.5. Térfogatmérő eszközök

A folyadékok térfogatának pontos mérésére a mérőlombikok, a pipetták és büretták szolgálnak. A térfogatmérő eszközök a kereskedelemben „hitelesített” minőségben kerülnek forgalomba.

A **mérőlombikok** keskeny nyakú, üveg dugós állólombikok, nyakukon körkörös jellel. A mérőlombikokat meghatározott térfogatú oldatok készítésére használjuk, és éppen ezért betöltésre vannak kalibrálva. Ez azt jelenti, hogy a mérőlombikot a rajta feltüntetett hőmérsékletű (rendszerint 20 °C-ú) folyadékkal pontosan a jelig töltjük, a benne lévő folyadék térfogata éppen annyi, mint ahány cm³-es a lombik jelzése. A lombikból kiöntött folyadék térfogata az üveghez való tapadás folytán valamivel kisebb. A mérőlombikok (és általában a térfogatmérő eszközök) 20 °C hőmérsékletre vannak kalibrálva. Ha tehát bennük oldatokat készítünk, az anyag feloldódása után meg kell várnunk, míg az oldás közben beálló hőmérséklet-csökkenés vagy hőmérséklet-emelkedés kiegyenlítődik, majd 20 °C-ú vízzel, rázogatózás közben annyira töltjük fel, hogy a folyadék meniszkusza a jel alatt 1-2 cm-re álljon. Kétpercnyi utánfolyás bevárása után fecskendőpalackból vagy pipettából annyi vizet csepegtetünk hozzá, hogy a folyadék meniszkuszának alsó része a jelen átfektetett síkot éppen érintse. A lombikot ezután bedugjuk, tartalmát alaposan összerázzuk.

A **pipetták** a mérőlombikhoz hasonlóan a meghatározott folyadék részletek lemérésére szolgálnak. A mérőlombikkal ellentétben kifolyásra kalibráltak, vagyis a belőlük kiengedett folyadék térfogata egyezik a rajtuk feltüntetett térfogattal. A pipetták valódi térfogata tehát a belső felületükön tapadó folyadék réteg térfogatával nagyobb a rajtuk feltüntetett térfogatnál. A folyadék pontos adagolására ma már főként automata pipettákat és diszpenzereket alkalmaznak (2.5., 2.6. ábra).

Az *egyjelű pipettával* való térfogatmérés úgy történik, hogy a folyadékot lassú szívással a pipetta nyakán lévő körkörös jel fölé szívjuk, a felső nyílását száraz mutatóujjunkkal befogjuk, a pipetta szárát kívülről szűrőpapírral vagy tiszta ru-



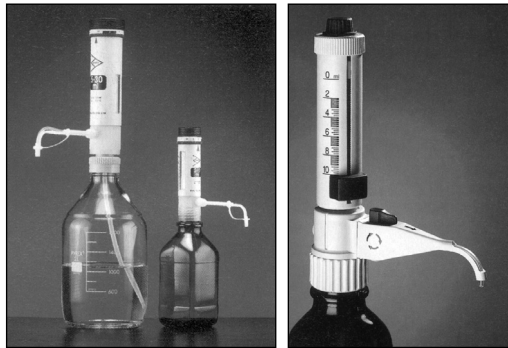
2.5. ábra. Különböző típusú pipettorok és pipettorhegyek

hával szárazra töröljük, majd kifolyónyílását az edény falához érintve és a felső nyíláson tartott ujjunkat kissé meglazítva, a folyadék meniszkuszát a jelre beállítjuk. Kiürítésnél a pipettát függőlegesen tartjuk, és csúcsát az edény falához érintjük. Teljes kifolyás után 15 másodpercnyi utánfolyást várunk, miközben a pipetta csúcsát állandóan az edény falához érintve tartjuk.

A kétjelű pipettákat az egyjelű pipettákhoz hasonló módon töltjük meg, kiürítésnél azonban akkor várunk utánfolyási időt, amikor a folyadék meniszkusza az alsó jel fölött kb. 5 mm-re áll. Az utánfolyás bevárása után a folyadék meniszkuszát pontosan az alsó jelre állítjuk, miközben a pipetta végét az edény falához érintjük.

Az osztott pipetták egyenletes keresztmetszetű, alul lehúzott végű, felül keskenyebb üvegcsőben folytatódó, cm^3 vagy $0,1 \text{ cm}^3$ beosztással ellátott üvegcsővek. Pontosabb térfogatmérésre nem alkalmasak. Tetszés szerinti kisebb folyadékmennyiségek közelítő pontosságú lemerésére használjuk.

Csak teljesen zsírmentes falú pipettával lehet helyes térfogatmérést végezni. A zsírmentesítés króm-kénsavval történhet. Evégből a pipetta végére rövid gumicsövet húzunk, óvatosan króm-kénsavat szívunk bele, ügyelve arra, hogy az ne érjen a gumicsőhöz, majd a gumicsövet szorítócsappal elzárjuk. A pipettát króm-



2.6. ábra. Különböző típusú diszpenzerek

kénsavval egy éjszakán át állni hagyjuk, majd vízzel és desztillált vízzel kiöblítjük és függőleges helyzetben szárítjuk.

A **büretta** kifolyásra kalibrált térfogatmérő eszköz. Egyenletes keresztmetszetű, alul csappal elzárható mérőcső, amely az össztérfogaton belül tetszőleges térfogatú folyadékrészletek pontos lemérésére alkalmas. A gyakorlatban leginkább elterjedtek az 50 és 25 cm³ térfogatú, 0,1 cm³ beosztású büretták, melyeken a 0,1 cm³-eket pontosan leolvashatjuk, a 0,01 cm³-eket pedig becsülhetjük. E büretták skálával beosztott részének hossza kb. 60 cm. 10 cm³-nél kisebb térfogatok pontos mérésére a kb. 50 cm hosszú, 0,02 cm³ beosztású, 10 cm³-es, finom büretták szolgálnak. Ezekon 0,01 cm³-t pontosan lehet becsülni. A mikrobüretták 2-5 cm³ térfogatú, igen finom beosztású büretták, melyek rendszerint utántöltő berendezéssel is el vannak látva. Ezekon 0,001 cm³-t még becsülni lehet.

A bürettákat állványba fogva, függőleges helyzetben használjuk. A büretta csapját csapzsírral vagy vazelinnel vékonyan bekenjük, és a csapülésbe szorítva néhányszor körülforgatjuk. A jól zsírozott csaptest átlátszó, levegőbuboréktól mentes, és furata nincsen zsírral eltömődve. A büretta belső falának zsírmentesnek kell lennie. A tefloncsapos büretták zsírzást nem igényelnek. 10 cm³ folyadékra legalább 1 perc kifolyási időt kell számítanunk. Ez idő alatt az utánfolyás olyan csekély, hogy csak gyakorlatilag észre sem vehető hibát okoz. A leolvasást a csap elzárása után fél perccel végezzük. Minél kisebb a büretta átmérője, annál nagyobb hibát okozhat az utánfolyás. Túlságosan kis átmérőjű bürettáknál (mikrobüretták) a kifolyási időt 10 cm³-enként 4-5 percre kell hosszabbítanunk.

A csepphiba csökkentése céljából a bürettacsap „csőrének” lehetőleg kis átmérőjűnek kell lennie. Ha ez túlságosan nagy lenne, szűrőlámban meglágyítva vékonyabbra húzzuk. Legmegfelelőbbek az olyan csapnyílású büretták, melyeken egy csepp térfogata kb. 0,03 cm³. A csepptérfogatot úgy állapítjuk meg, hogy kb. 50 cseppet kiengedünk a bürettából, és a leolvasott térfogatváltozást elosztjuk a cseppek számával. Az igen szűk csapnyílású büretták könnyen eltömődhetnek.

A buretta leolvasását nagy körültekintéssel kell végeznünk. A parallaxikus hiba kiküszöbölésére leolvasáskor a szemünket a menizkusszal egy magasságban tartjuk. E feltételnek könnyen eleget tudunk tenni olyan burettáknál, amelyek minden cm^3 beosztásnál körkörös jellel vannak ellátva. Ezeknél a leolvasás akkor parallaxismentes, ha a jelet vízszintes vonalnak látjuk. Közöséges buretták leolvasása alkalmával a $0,01 \text{ cm}^3$ -t, mikroburettáknál a $0,001 \text{ cm}^3$ -t becsüljük. A csap végén lógó cseppet az edény falához való érintéssel le kell szednünk.

A térfogatmérő edények kalibrálása. A forgalomban levő, *hitelesített* térfogatmérő edények pontossága közöséges analitikai célokra általában megfelelő. Ezen edények hibája ugyanis a közöséges analitikai meghatározások hibahatárán belül esik. A hitelesített edények hibahatárai:

Mérőlombikoknál: $50 \text{ cm}^3 \pm 0,06\%$, $100 \text{ cm}^3 \pm 0,05\%$, $500 \text{ cm}^3 \pm 0,028\%$, $1000 \text{ cm}^3 \pm 0,019\%$.

Pipettáknál: $2 \text{ cm}^3 \pm 0,3\%$, $10 \text{ cm}^3 \pm 0,15\%$, $20 \text{ cm}^3 \pm 0,1\%$, $100 \text{ cm}^3 \pm 0,05\%$.

Bürettáknál: $10 \text{ cm}^3 \pm 0,2\%$, $30 \text{ cm}^3 \pm 0,1\%$, $50 \text{ cm}^3 \pm 0,08\%$.

Az értékekből látható, hogy a kisebb edények pontatlanabbak, mint a nagyobbak. Ha a meghatározást nagyobb pontossággal akarjuk végezni, vagy nem hitelesített mérőedények állnak rendelkezésünkre, a használatba vett edények térfogatát tömegmérés útján kalibrálni, illetve a használat közben leolvasott térfogatot a kapott korrekcióval helyesbíteni kell.

2.1.6. Mérőoldatok

A térfogatos analízishez pontosan ismert töménységű mérőoldatokra van szükségünk. Bármilyen koncentrációjú oldattal titrálhatunk, ha az oldat koncentrációját ismerjük. A számítás egyszerűsítésére azonban célszerű olyan mérőoldatokkal dolgozni, amelyek koncentrációja az oldott anyag molekulatömegével arányos. Az oldatok koncentrációját molaritásban fejezzük ki.

A mólos oldat 1000 cm^3 -ében a kérdéses anyag g-molekulatömegnyi mennyisége van oldva. *Ebből következik, hogy a mólos oldat 1000 cm^3 -e a meghatározandó anyag g-molekulatömegnyi mennyiségét méri.* A gyakorlatban legtöbbször mólos oldatnál **tízszer hígabb** oldatot – $0,1 \text{ M}$ oldatot – használunk. Ennek 1000 cm^3 -ében a g-molekulatömeg tizedrésze van feloldva. Használatos még $0,5 \text{ M}$, $0,2 \text{ M}$ és $0,01 \text{ M}$ koncentrációjú mérőoldat is.

A mólos **oldatok készítése** ritkán történhet az anyag közvetlen bemérésével. Erre csak olyan anyagok alkalmasak, amelyek:

- tisztán előállíthatók;
- összetételük pontosan megegyezik a képletből számítható összetétellel;
- levegőn könnyen mérhető, vagyis nem higroszkóposak és nem vesztek el könnyen kristályvizüket, illetve a levegő oxigénjétől és szén-dioxid-tartalmától nem változnak.

E követelményeknek megfelelő anyag a legtöbb esetben nem áll rendelkezésünkre. Ilyenkor durvább beméréssel vagy töményebb oldat hígításával közelítő pontosságú oldatot készítünk, és az oldat hatóértékét titrálással állapítjuk meg. E beállítást természetesen olyan anyagra kell végezni, ami tiszta, könnyen mérhető és összetétele pontosan ismert. A beállító anyagok tisztítására és szárítására nagy gondot kell fordítani, mert nem tudjuk ellenőrizni ezek hatóértékét.

2.1.7. A titrálás hibaforrásai

A titrálás, mint minden mérés, bizonyos hibával jár. Ha tehát ugyanazt a titrálást többször egymás után megismételjük, nem kapjuk pontosan ugyanazt a fogyást, hanem az egyes mérések eredményei bizonyos szórást mutatnak. Az egyes mérési eredmények tehát eltérhetnek a valódi értéktől. Eredményeink megítélése szempontjából fontos az észlelési *hiba* nagyságának ismerete. Az észlelési hiba két részből tevődik össze: a szubjektív okokra visszavezethető véletlen hibából és az objektív okokra visszavezethető *rendszeres hibából*.

A titrálás véletlen hibái. A véletlen hibák érzékszerveink tökéletlenségéből, az észlelő pillanatnyi fáradtságából és a kísérleti feltételek kismértékű ellenőrizhetetlen ingadozásaiból származnak. Ha a rendszeres hibákat kiküszöböljük vagy legalábbis állandóan tartjuk (pl. ugyanazon bürettából, ugyanazzal a mérőoldattal és indikátorral, ugyanazon térfogatban végezzük a titrálást), a többször megismélt titrálások eredményei a mért mennyiség valódi értéke körül szórást mutatnak. Ez onnan származik, hogy a véletlen hibák hol növelik, hol csökkentik az eredményt.

A véletlen hibákról mondottakból kitűnik, hogy egyetlen titrálás véletlen hibája elméletileg végtelen nagy, vagyis nulla annak a valószínűsége, hogy egyetlen titrálással a meghatározást pontosan elvégezhessük. A titrálásoknál tehát minél több, de legalább három párhuzamos meghatározást kell végeznünk. Ilyen kisszámú mérés esetében a valószínű hiba nagyságrendjét a középértéktől való legnagyobb eltérésből (a legnagyobb szórásból) állapíthatjuk meg. Tudományos pontosságú titrálásoknál 8-12 párhuzamos meghatározást kell végeznünk, feltéve, hogy a titrálás rendszeres hibái a véletlen hibák mellett elhanyagolhatók.

A titrálás rendszeres hibái az alkalmazott módszer sajátos hibáin (nem teljesen végbemenő reakciók) és a mérlegelés hibáin kívül *az eszközökből származó hibából, a műveletekből származó hibából, a személyi hibából és a módszer hibáiból* tevődnek össze.

Az eszközökből származó hiba. Idesoroljuk a mérőeszközök *kalibrációs hibáit*, amiket ismételt ellenőrzéssel küszöbölhetünk ki. A *leolvasási hibát* többszöri parallaxismentes leolvasással csökkenthetjük. A térfogatmérő eszközök *utánfolyási hibáját* a kalibrálásnál mért kifolyási és utánfolyási idők pontos betartásával csökkenthetjük.

A műveletekből származó hibák. Ebbe a csoportba sorolhatók azok a hibák, amelyek a helytelenül vagy gondatlanul végzett műveletekből adódnak. Ilyen hibák



2.7. ábra. Különböző típusú mágneses keverők

okozója lehet az oldatba hulló por, a gázfejlődéskor vagy forraláskor keletkező freccsenés, a túl nagy edény alkalmazása, a levegőből abszorbeálódott szénsav, a mesterséges fénynél való titrálás stb. E hibákat gondos és körültekintő munkával, a műveletek begyakorlásával és a munkakörülmények helyes megválasztásával kiküszöbölhetjük.

Személyi hiba. Az analitikus személyiségéből, egyéni adottságaiból adódó hibák sorolhatók ide. Sokan például az indikátorok színváltozását nem képesek pontosan észlelni, annak ellenére, hogy nem minősíthetők teljesen színvaknak. A személyi hiba különös fajtája az „előítéletből” származó hiba. Ennek az a lényege, hogy mérési eredményeink megállapításánál hajlandók vagyunk előző méréseink eredményei által befolyásoltatni magunkat. Így második vagy harmadik párhuzamos titrálásnál hajlamosak vagyunk inkább a bürettafogyást figyelni, és kisebb figyelmet szentelünk az indikátor színátcsapásának.

A módszer hibái. E hibafajtát az alkalmazott módszer körülményei szabják meg. Okozhatják a nem teljesen végbemenő kémiai folyamatok, az indukált reakciók, a mellékfolyamatok, a csapadékos reakciónál a csapadék oldhatósága vagy az együtt leválás jelensége. A módszer hibája szórásban és állandó eltérésben egyaránt megnyilvánulhat. E hiba nagyságát csak úgy tudjuk megállapítani, hogy pontosan ismert mennyiségű anyaggal végezzük el az elemzést pontos eszközzel, a személyi hiba lehető elkerülésével. A valódi érték és a titrálással meghatározott érték eltérése megadja a rendszeres hibát, illetve az előző hibák kiküszöbölésével a módszer hibáját. A tényleges módszereknél majd mindig fellépő módszeres hiba a *csepphiba* és az *indikátorhiba*. A titrálási folyamat segítésére a 2.7. ábrán látható mágneses keverőket alkalmazzuk.

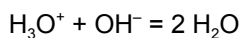
Csepphiba. A titrálásnál a mérőoldatot addig adagoljuk a meghatározandó anyag oldatához, míg az utoljára hozzáadott részlet, rendszerint egy csepp, jól észlelhető változást (színváltozás, zavarosság stb.) idéz elő. Ilyenkor valószínű, hogy az oldatot az utoljára hozzáadott mérőoldatrészlettel, rendszerint egy cseppel túl-

titráljuk. Ennek oka egyrészt az, hogy a titrálás végpontját jelző reakció láthatósági határa kicsi, másrészt pedig az, hogy a mérőoldat adagolható legkisebb részlete egy csepp. A csepphibát megfelelő koncentrációjú mérőoldattal, óvatos titrálással és a csepp törtrészeinek adagolásával csökkenthetjük. A csepphibát kolorimetriás vagy potenciometriás úton meg is határozhatjuk és korrekcióba vehetjük.

Az indikátorhiba onnan származik, hogy a reakció végpontját jelző indikátor nem pontosan az ekvivalenciapontban mutat átcsapást, hanem valamivel előbb vagy később. Az indikátorhiba tisztán a lejátszódó kémiai folyamattól és az alkalmazott indikátor természetétől függ, tehát sajátosan jellemző az illető titrálási eljárásra. Nem csökkenthető tetszés szerint; értéke csak akkor nulla, ha az indikátor pontosan az ekvivalenciapontban mutat átcsapást, vagyis ha az indikátor megfelel az ekvivalenciapontnak.

2.2. Acidi-alkalimetria, neutralizációs analízis

Ismeretlen koncentrációjú savaknak ismert koncentrációjú lúgokkal való térfogatos meghatározását *acidimetriának* (savmérésnek) nevezzük. Ehhez hasonlóan **ismeretlen koncentrációjú lúgoknak ismert koncentrációjú savval való térfogatos meghatározását *alkalimetriának* (lúgmérésnek) nevezzük.** Mindkét eljárás alapja a savak és bázisok egymásra hatásakor lejátszódó **közömbösítés**. A végbemenő folyamat:



egyenlettel kifejezett vízképződés.

2.2.1. Az indikátorok működése

Az acidi-alkalimetriás titrálások végpontját indikátorral jelezzük. **Az acidi-alkalimetriás indikátorok gyengén savanyú vagy gyengén bázikus karakterű festékek, melyek savanyú közegben más színt mutatnak, mint lúgos közegben.** A sav, ill. lúg hatására beálló színváltozás festékindikátoroknál rendszerint a molekula belső átrendeződésének következménye.

2.2.1.1. Az indikátorok átcsapása. Indikátorexponens

Erős sav oldata erősen savanyú kémhatású, vagyis az oldat H^+ -koncentrációja nagy (pH-ja kicsi). Ha a savat erős lúggal titráljuk, akkor az oldat H^+ -koncentrációja csökken (pH-ja nő). A savval éppen ekvivalens mennyiségű lúg hozzáadásakor az oldat sem szabad savat, sem szabad lúgot nem tartalmaz. Az oldat H^+ -koncentrációja tehát éppen akkora lesz, mint a tiszta vize (pH = 7). Ha a titrálendő erős savhoz olyan

indikátort adunk, mely színét éppen a semleges pontban ($\text{pH} = 7$) változtatja, ez pontosan jelzi a titrálás végpontját. A valóságban kevés olyan indikátor akad, amelynek átcsapása éppen a semleges pontba esik. Az indikátorok legnagyobb része vagy a savanyú tartományban (pH kisebb mint 7), vagy a lúgos tartományban (pH nagyobb mint 7) mutat színátcsapást. Ez azonban nem jelenti azt, hogy ezek az indikátorok alkalmatlanok az acidi-alkalimetriás titrálások végpontjának jelzésére. A savak és bázisok ekvivalenciapontja ugyanis nem mindig esik egybe a semleges ponttal. Ilyenkor tehát olyan indikátort kell választanunk, melynek átcsapása az ekvivalenciapont közelébe esik. Máskor viszont a titrálendő oldat és a mérőoldat koncentrációjának növelésével az indikátorhibát annyira csökkenthetjük, hogy tágabb pH -tartományban átcsapó indikátorok között is válogathatunk.

Az indikátorok jellemzésére két adat szolgál: az indikátor átcsapási pontja vagy *indikátorexponense*, illetve az indikátor átcsapási tartománya.

Az indikátor átcsapási pontja (indikátorexponens) alatt azt a pH -értéket értjük, amelynél az indikátor savanyú vagy lúgos alakja egyenlő koncentrációban van jelen. Egy HA indikátorsav disszociációjára érvényes a tömeghatás törvénye:

$$\frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = K_s$$

Az indikátorok savmaradékionja $[\text{A}^-]$ és disszociálatlan molekulája $[\text{HA}]$ különböző színű. Az átcsapási pontban a savmaradékion koncentrációja megegyezik a disszociálatlan sav koncentrációjával: $[\text{A}^-] = [\text{HA}]$; ezekkel egyszerűsítve:

$$[\text{H}^+] = K_s$$

Az átcsapási pont H^+ -koncentrációja tehát számszerűen megegyezik az indikátorsavak disszociációs egyensúlyi állandójával. Ha az egyenlet mindkét oldalának negatív logaritmusát vesszük, akkor (mivel $-\log [\text{H}^+] = \text{pH}$):

$$\text{pH} = -\log K_s.$$

Vagyis az átcsapási pont pH -ja indikátorsavak esetében megegyezik az egyensúlyi állandó negatív logaritmusával. Ezt a negatív logaritmust (kitevőt) *indikátorexponensnek* nevezzük és $\text{p}K_s$ -vel jelöljük.

Indikátorbázis esetében az indikátorexponens értékét a következőképpen számítjuk ki. A BOH képletű indikátorbázis disszociációjára érvényes a tömeghatás törvénye:

$$\frac{[\text{B}^+] \cdot [\text{OH}^-]}{[\text{BOH}]} = K_b$$

A K_b -t a víz ionszorzatával elosztva az alábbi összefüggéshez jutunk:

$$\frac{[\text{BOH}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{B}^+]} = \frac{K_v}{K_b}$$

ahol $K_v = [\text{H}^+] \cdot [\text{OH}^-] =$ a víz ionszorzata. Számértéke: $K_v = 10^{-14}$.

Az átcsapási pontban $[\text{BOH}] = [\text{B}^+]$, tehát $[\text{H}^+] = \frac{10^{-14}}{K_b}$

Az egyenlet mindkét oldalának negatív logaritmusát véve,

$$-\log K_b = \text{p}K_b, \quad \text{pH} = 14 - \text{p}K_b.$$

Indikátorbázisok esetében tehát az indikátorexponens számértékét úgy kapjuk meg, hogy a víz ionexponensének (14) számértékéből levonjuk az indikátorbázis exponensét ($\text{p}K_b$).

Ha $\text{p}K_i = 7$, vagy attól csak kevéssé tér el, akkor az indikátor egyenlően érzékeny a H^+ - és OH^- -ra. Ha $\text{p}K_i$ kisebb 7-nél, akkor az indikátor kevésbé érzékeny savakra, mint lúgokra. Ha viszont $\text{p}K_i$ 7-nél nagyobb, akkor az indikátor savakra érzékenyebb.

Az indikátor átcsapási tartománya. A szem érzékenysége színváltozásokra eléggé korlátozott. Az egyik szín mellett általában csak akkor veszi észre a másikat, ha az a másiknak legalább 10%-át teszi ki. Ebből következik, hogy az átcsapási intervallum ($\text{p}K_i - 1$) pH-nál kezdődik és ($\text{p}K_i + 1$) pH-nál végződik. Előbbi esetben a lúgos közegben állandó forma a savanyú formának 10%-át teszi ki, utóbbi esetben pedig a savanyú forma 10%-a a lúgos formának. A legtöbb indikátor átcsapási tartománya tehát 2 pH-egység. Az indikátorok többségénél már 0,2 pH-változás az átcsapási pont környezetében észrevehető színváltozást okoz. Egyes titrálásoknál a csapadék képződését vagy oldódását, a színes komplex keletkezését vagy megszűnését, a fluoreszcencia vagy a lumineszcencia jelenség fellépését vagy eltűnését használhatjuk fel a titrálás végpontjának jelzésére.

2.2.1.2. Keverékindikátorok

Az indikátorok átcsapási intervalluma nem változik meg más színes anyag jelenlétében, csupán a szubjektív színérzet változik az oldat összes extinkciójának megváltozása következtében. Néhány indikátor színátcsapása élesebbé és kontrasztosabbá tehető, ha az oldat egyidejűleg más színű, és az átcsapási intervallum környezetében ugyancsak átcsapást mutató indikátort vagy színét nem változtató festéket tartalmaz. Így például előnyös a sárga–vörös átcsapást mutató indikátorhoz (metilnarancs, dimetilsárga, metilvörös) valamilyen kék színű festéket (meti-

lénkék) keverni. Az önmagában indikátor tulajdonságokat nem mutató kék festék a kevésbé kontrasztos sárga–vörös átcsapást kontrasztosabb zöld–ibolya átcsapássá változtatja. E két utóbbi szín közelítőleg komplementer, és így az átmenet igen szűk tartományra szorítókozó szürke tónusban mutatkozik meg. A keverékindikátorok igen előnyösek gyengén színes oldatban vagy mesterséges világítás mellett. Igen szűk átcsapási intervallumuk folytán olyan titrálásoknál is használhatók, amelyeknél a többi indikátor nem mutat éles átcsapást.

2.2.1.3. A kísérleti körülmények hatása az indikátorok átcsapására

Hőmérséklet-emelkedés hatására az indikátorok átcsapási pontja a semleges pont felé tolódik el. Ennek oka főleg az, hogy a víz ionszorzata nagymértékben változik a hőmérséklettel, míg az indikátorok egyensúlyi állandójának változása viszonylag kicsi. Bázisokra érzékeny indikátorok (metilnarancs, metilvörös) átcsapása meleg oldatban általában igen bizonytalan, míg savakra érzékeny indikátorok (fenolftalein, timolftalein) átcsapása a forrási hőmérsékleten is éles. Bázisokra érzékeny indikátorok jelenlétében tehát csak hideg oldatban lehet titrálni. Ha a titrálást valamilyen oknál fogva forralni kell, a titrálást a lehűtés után fejezzük be.

Az oldatok szén-dioxid-tartalma. Levegőn végzett titrálásoknál számolnunk kell azzal, hogy oldataink szén-dioxidot tartalmaznak. A vízben oldott szén-dioxid, mint gyenge sav, megváltoztatja az indikátor színét. *Mindazok az indikátorok, amelyek indikátorexponense 4-nél nagyobb* (metilvörös, fenolftalein, timolftalein), *szén-dioxidra érzékenyek.* Az ezekkel végzett titrálásoknál tehát különös gondot kell fordítanunk a levegő szén-dioxidjának távol tartására. Ez úgy történhet, hogy oldataink készítésére frissen kiforralt és lehűtött vizet használunk. A 0,1 MPa nyomású CO₂-dal telített víz pH-ja 3,9 körül van. A közönséges levegő szén-dioxidjával egyensúlyban lévő vizes oldat pH-ja viszont csak 6 körüli érték. Ez tehát azt jelenti, hogy sok CO₂-ot tartalmazó vízen közönséges levegőt átszívva a víz CO₂-tartalma annyira csökken, hogy az említett indikátorokat már nem zavarja. Karbonátok titrálása alkalmával a felszabaduló szén-dioxidot úgy távolítjuk el, hogy az oldatot a végpont elérése előtt felforraljuk, majd a titrálást gyors lehűtés után fejezzük be. Fenolftaleinindikátort használva, a titrálást forró oldatban is végezhetjük.

Az indikátorkoncentráció befolyása különösen az egyszínű indikátoroknál nagy, mivel itt a színes forma láthatósági határa szabja meg az indikátor átcsapási pontját. Így pl. míg sok fenolftaleinnél az első észrevehető rózsaszínű színeződés pH = 8,2-nél jelenik meg, addig kevés fenolftalein alkalmazása esetén észrevehető színeződést csak pH = 9,2-nél észlelünk. A kétszínű indikátorok koncentrációjának befolyása az átcsapásra több körülménytől függ (viszonylagos színerősség, a két indikátornak különböző oldhatósága stb.). Túl sok indikátor alkalmazása esetén az átcsapás általában kevésbé éles.

Az alkohol befolyása az indikátorok átcsapására. Igen sok titrálást alkoholos közegben vagy alkohol–víz elegyében kell végeznünk. Régi alkohol alkalmazása

esetén számolnunk kell azzal, hogy oxidáció folytán ecetsavat tartalmazhat, és így savanyú kémhatású. Oldószerül való alkalmazása esetén tehát vagy vakpróbát kell végezni a felhasznált mennyiséggel, vagy az oldószert előzőleg közömbösíteni kell.

2.2.1.4. Néhány acidi-alkalimetriás indikátor

Metilnarancs. Savanyú közegben vörös, lúgos közegben sárga színű. Érzékenysége bázisokra nagy, savakra kicsi. **Erős vagy gyenge bázisok és erős savak titrálásánál alkalmazzuk.** Gyenge savakra nem érzékeny, és így a szénsav alig zavarja. 0,1%-os vizes oldatát használjuk felforralás és szűrés után. 20 cm³ titrálendő oldathoz 1 csepp indikátort használunk.

Dimetilsárga. Színe, átcsapási intervalluma és indikátorexponense ($pK_i = 3,9$) kb. ugyanolyan, mint a metilnarancsé. Átcsapása valamivel kontrasztosabb. **Erős és gyenge bázisok, valamint erős savak titrálásánál alkalmazzuk.** Indikátorhibája valamivel nagyobb, szénsavérzékenysége viszont valamivel kisebb, mint a metilnarancsé. 0,1%-os alkoholos oldatából 20 cm³ titrálendő oldatra 2 csepp indikátort használunk.

Metilvörös. Indikátorexponense: $pK_i = 5,3$, átcsapási intervalluma $pH = 4,4-6,2$. Savanyú közegben élénkvörös, lúgos közegben sárga színű. **Erős és gyenge bázisok, valamint erős savak titrálásánál alkalmazzuk.** Gyenge savakra kissé érzékenyebb, mint a metilnarancs, ezért a szénsav kissé zavarja. A szénsav zavaró hatását lúgok titrálásánál úgy küszöböljük ki, hogy a színátcsapásig titrált oldatot kb. 5 percre forraljuk, és a megsárgult és teljesen lehűtött oldatot újból a végpontig titráljuk. Készítése: 0,2 g szilárd metilvöröst 60 cm³ alkoholban oldunk, és az oldatot vízzel 100 cm³-re egészítjük ki. 20 cm³ titrálendő oldathoz 2 csepp indikátort használunk. A metilvörös híg, erős savak titrálására különösen alkalmas, mert kicsi az indikátorhibája.

Fenolftalein. Indikátorexponense: $pK_i = 8,4$, átcsapási intervalluma $pH = 8,2-10$. Savanyú közegben színtelen, lúgos közegben vörös. **Erős és gyenge savak, valamint erős bázisok titrálásánál alkalmazzuk.** A szén-dioxid zavarja a fenolftaleint, ezért a titrálás befejezése előtt a szén-dioxidot a savanyú vagy semleges oldat forralásával el kell távolítani. Lúgok titrálásánál a levegő széndioxidját távol kell tartani. 1 g fenolftaleint 60 cm³ alkoholban oldunk és vízzel 100 cm³-re egészítjük ki. 20 cm³ titrálendő oldatra 2 csepp indikátort használunk. Erősen lúgos közegben a fenolftalein fenolát képződése közben elszíntelenedik.

Metilvörös-metilénkék keverékindikátor. 1 térfogat 0,2%-os alkoholos metilvörös és 1 térfogat 0,1%-os alkoholos metilénkék keveréke. Indikátorexponense: $pK_i = 5,4$. Színe savanyú közegben vörösesibolya, lúgos közegben zöld. Színátcsapása igen éles: $pH = 5,3$ -nál vörösesibolya, $5,4$ -nél piszkoskék, $5,6$ -nál piszkoszöld. Szénsavra éppen annyira érzékeny, mint a metilvörös. **Erős és gyenge bázisok, valamint erős savak titrálásánál alkalmazzuk.** 20 cm³ oldatra 2 csepp indikátorkeveréket használunk.

2.2.2. Ekvivalenciapont

Erős savak és erős bázisok közömbösítésénél a titrálás végpontját akkor érjük el, amikor az oldatban a H^+ -ionok koncentrációja egyenlővé válik az OH^- -ionok koncentrációjával, vagyis az oldat semleges kémhatású lesz ($pH = 7$). Más az eset azonban a gyenge savak és gyenge bázisok titrálása alkalmával. Ha gyenge savat erős bázissal titrálunk, a gyenge sav sója keletkezik, ami a hidrolízis folytán lúgos kémhatást mutat. Ha viszont gyenge bázist titrálunk erős savval, olyan só keletkezik, amelynek kémhatása hidrolízis révén savanyú.

Azt a pH-értéket, amelyre az oldat ekvivalens mennyiségű sav és bázis egymásra hatásakor beáll, ekvivalenciapontnak vagy titrálási exponensnek nevezzük. Az ekvivalenciapont nem egyezik meg feltétlenül a semleges ponttal, hanem ettől – gyenge savak és gyenge bázisok titrálása esetén – többé-kevésbé eltérhet. *A reakció végpontját jelző indikátort úgy kell megválasztanunk, hogy annak indikátorexponense az ekvivalenciapont közelébe essék.* Az ekvivalenciapont meghatározása történhet kísérleti úton vagy számítással. *Az ekvivalenciapont kísérleti meghatározása* tulajdonképpen pH-mérési feladat. Erre bármelyik kolorimetriás vagy potenciometriás pH-mérési módszer megfelel. *Az ekvivalenciapont számítással való megállapítása* a titrálás folyamán keletkező só hidrolízisegyensúlyának tanulmányozása útján történhet.

2.2.2.1. Az ekvivalenciapont számítása

Erős savak és erős bázisok egymásra hatásakor keletkező sók hidrolízise gyakorlatilag elhanyagolható mértékű, ezek ekvivalenciapontja tehát megegyezik a semleges ponttal: $pH = 7$.

Gyenge savaknak erős bázissal való közömbösítésekor keletkező normális só hidrolízis révén gyengén lúgos kémhatású, az ekvivalenciapont pH-ja tehát nagyobb 7-nél. Az oldat pH-ja függ a gyenge sav disszociációs egyensúlyi állandójától és az oldat koncentrációjától. A gyenge sav sójának hidrolízisére vonatkozó egyensúlyból a következő összefüggés vezethető le:

$$[H^+] = \sqrt{\frac{K_{\text{víz}} \cdot K_s}{c}}$$

ahol $K_{\text{víz}}$ a víz ionszorzata (számértéke szobahőmérsékleten 10^{-14}), K_s a sónak megfelelő gyenge sav disszociációs egyensúlyi állandója, c a só koncentrációja mol/dm^3 -ben kifejezve. Ha a fenti kifejezés negatív logaritmusát vesszük, a következő kifejezést kapjuk:

$$pH = 7 + \frac{1}{2}pK_s + \frac{1}{2}\log c$$

ahol: $pK_s = -\log K_s = \text{savexponens}$.

Az összefüggésből ki tudjuk számítani a gyenge savak ekvivalenciapontjának pH-ját. Ki lehet számolni például, hogy milyen pH-ig kell a 0,1 M ecetsavat titrálunk 0,1 M NaOH-dal. Mivel a közömbösítés befejezésekor a keletkező Na-acetát kétszer akkora térfogatban van, mint az ecetsav, a koncentráció $c = 0,05$ M. Az ecetsav disszociációs egyensúlyi állandója $K_s = 1,8 \cdot 10^{-5}$ ($pK_s = 4,75$).

$$\text{pH} = 7 + \frac{1}{2}pK_s + \frac{1}{2}\log c$$

Az ekvivalenciapont pH-ja 8,72. A titrálást tehát fenolftalein indikátor jelenlétében végezhetjük, mert ez a pH-érték a fenolftalein átcsapási intervallumába esik.

Többértékű savak titrálásánál elvileg megvan a lehetőség arra, hogy a titrálást normális só vagy savanyú só képződéséig folytassuk. Tulajdonképpen hasonló a helyzet több, különböző erősségű sav egymás melletti meghatározásánál is. A titrálás megvalósításának lehetősége az egyes disszociációs állandók nagyságától és viszonyától függ. Ha a titrálást normális só képződéséig folytatjuk, az ekvivalenciapont kiszámítására az utolsó, a legkisebb egyensúlyi állandó a mérvadó. A számítást éppen úgy végezzük, mintha csak egy sav lenne jelen. A borkősav két disszociációs állandója például közönséges hőmérsékleten $K_1 = 9,7 \cdot 10^{-4}$ és $K_2 = 9 \cdot 10^{-5}$. A borkősav tehát a normális só képződéséig éppen úgy titrálható, mint egy $9 \cdot 10^{-5}$ egyensúlyi állandójú egybázisú sav. Hasonló az eset a citromsavnál ($K_1 = 8 \cdot 10^{-4}$, $K_2 = 5 \cdot 10^{-5}$ és $K_3 = 2 \cdot 10^{-6}$), ami simán megtitrálható mint $2 \cdot 10^{-6}$ egyensúlyi állandójú egybázisú sav. A foszforsav harmadik egyensúlyi állandója ($K_3 = 3,6 \cdot 10^{-13}$) oly kicsi (az ekvivalenciapont pH-ja 13 körül), hogy a titrálás nem végezhető el. Ilyen esetben a titrálást csak savanyú só képződéséig végezzük.

Savanyú só képződéséig csak akkor titrálhatunk meg valamilyen többértékű savat, ha a megfelelő egyensúlyi állandók hányadosa – elméleti megfontolások alapján – legalább 10 000. Az ekvivalenciapont hidrogénion-koncentrációját a sav első (K_1) és második (K_2) egyensúlyi állandójából a következő kifejezés alapján számíthatjuk ki:

$$[H^+] = \sqrt{K_1 \cdot K_2}$$

Az ekvivalenciapont pH-ját megkapjuk, ha e kifejezések negatív logaritmusát vesszük:

$$\text{pH} = 1/2 (pK_1 + pK_2)$$

Az ekvivalenciapont tehát független az oldat koncentrációjától. Lényegileg ugyanezek a feltételek és kifejezések érvényesek két különböző erősségű sav egymás melletti meghatározására is. A foszforsav esetében az egyensúlyi állandók: $K_1 = 1,1 \cdot 10^{-2}$, $K_2 = 2 \cdot 10^{-7}$, $K_3 = 3,6 \cdot 10^{-13}$. Az egyensúlyi állandók viszonya:

$K_1/K_2 = \text{kb. } 10^5$ és $K_2/K_3 = \text{kb. } 2 \cdot 10^5$. A foszforsav tehát mint egybázisú sav és mint kétbázisú sav is titrálható. A megfelelő titrálási exponensek $\text{pH} = 4,35$ és $9,57$.

A gyenge bázisoknak erős savakkal való titrálásánál az ekvivalenciapont hidrogénion-koncentrációja, ill. pH -ja a keletkező só hidrolízisének egyensúlyából a gyenge savakhoz hasonlóan vezethető le. A számítások eredményei a következők:

$$[\text{H}^+] = \sqrt{\frac{K_v \cdot c}{K_b}}$$

A titrálási exponens:

$$\text{pH} = 7 - \frac{1}{2} \text{p}K_b - \frac{1}{2} \log c$$

Ahol $\text{p}K_b = -\log K_b$, c pedig a keletkező só mólkonzentrációja az ekvivalenciapontban. A többértékű savak titrálására vonatkozó törvényszerűségek vonatkoznak a *többértékű bázisokra* is. Ha tehát egy többértékű bázist normális sóig akarunk közömbösíteni, úgy a titrálási exponenst a legkisebb egyensúlyi állandóból számítjuk ki. A többértékű bázist bázisos sóig csak akkor titrálhatjuk, ha a megfelelő egyensúlyi állandók viszonya legalább $10\,000$. A titrálási exponenst ez esetben a következő képlettel számíthatjuk ki:

$$\text{pH} = 14 - 1/2 (\text{p}K_1 + \text{p}K_2).$$

A savak és bázisok titrálási exponensének kiszámításához ismernünk kell tehát a disszociációs egyensúlyi állandókat. A leggyakrabban előforduló savak és bázisok egyensúlyi állandóit, valamint a megfelelő exponenseket a 2.1. táblázat tartalmazza.

2.1. táblázat. Néhány gyenge sav és gyenge bázis disszociációs egyensúlyi állandója $20\text{ }^\circ\text{C}$ -on

Savak	K_{sav}	$\text{p}K_s$	Bázisok	$K_{\text{bázis}}$	$\text{p}K_b$		
H_3AsO_3	$K_1 \dots$	$6 \cdot 10^{-10}$	9,22	Ammónia	$1,87 \cdot 10^{-5}$	4,76	
H_3AsO_4	$K_1 \dots$	$5 \cdot 10^{-3}$	2,30	Hidrazin	$3 \cdot 10^{-6}$	5,52	
H_3BO_3	$K_1 \dots$	$6 \cdot 10^{-10}$	9,22	Hidroxil-amin	$1 \cdot 10^{-8}$	8,00	
H_2CO_3	$K_1 \dots$	$3 \cdot 10^{-7}$	6,52	Etil-amin	$5,6 \cdot 10^{-4}$	3,25	
H_2CO_3	$K_2 \dots$	$6 \cdot 10^{-11}$	10,22	Dietil-amin	$1,3 \cdot 10^{-3}$	2,90	
H_3PO_4	$K_1 \dots$	$1,1 \cdot 10^{-2}$	1,96	Anilin	$4,6 \cdot 10^{-10}$	9,34	
H_3PO_4	$K_2 \dots$	$2 \cdot 10^{-7}$	6,70	Piridin	$1,25 \cdot 10^{-9}$	8,90	
H_3PO_4	$K_3 \dots$	$3,6 \cdot 10^{-13}$	12,44	Brucin	$K_1 \dots$	$9 \cdot 10^{-7}$	6,04
H_2SO_4	$K_2 \dots$	$3 \cdot 10^{-2}$	1,52	Brucin	$K_2 \dots$	$2 \cdot 10^{-12}$	11,70

Savak		K_{sav}	$\text{p}K_{\text{s}}$	Bázisok		$K_{\text{bázis}}$	$\text{p}K_{\text{b}}$
H_2SO_3	K_1	$1,7 \cdot 10^{-2}$	1,77	Kinin	K_1 ...	$1 \cdot 10^{-6}$	6,00
H_2SO_3	K_2	$1 \cdot 10^{-10}$	7,00	Kinin	K_2 ...	$1,3 \cdot 10^{-10}$	9,89
H_2S	K_1	$5,7 \cdot 10^{-8}$	7,24	Kokain		$2,6 \cdot 10^{-6}$	5,60
H_2S	K_2	$1,2 \cdot 10^{-15}$	14,92	Kodein		$9 \cdot 10^{-7}$	6,05
Hidrogén-fluorid.....		$3,7 \cdot 10^{-4}$	3,43	Koniin.....		$1 \cdot 10^{-3}$	3,00
Hangyasav.....		$2 \cdot 10^{-4}$	3,70	Morfin		$7,4 \cdot 10^{-7}$	6,13
Borostyánkősav	K_1	$6,5 \cdot 10^{-5}$	4,18	Nikotin	K_1 ...	$7 \cdot 10^{-7}$	6,16
Borostyánkősav	K_2	$5,9 \cdot 10^{-6}$	5,23	Nikotin	K_2 ...	$1,4 \cdot 10^{-11}$	10,86
Citromsav	K_1	$8 \cdot 10^{-4}$	3,10	Papaverin		$8 \cdot 10^{-9}$	8,10
Citromsav	K_2	$5 \cdot 10^{-5}$	4,30	Piperidin		$1,6 \cdot 10^{-3}$	2,80
Citromsav	K_3	$2 \cdot 10^{-6}$	5,70	Sztrichnin	K_1 ...	$1 \cdot 10^{-6}$	6,00
Hidrogén-cianid.....		$7 \cdot 10^{-10}$	9,14	Sztrichnin	K_2 ...	$2 \cdot 10^{-6}$	11,7
Ecetsav		$1,86 \cdot 10^{-5}$	4,73				
Tejsav		$1,5 \cdot 10^{-4}$	3,82				
Oxálsav	K_1	$3,8 \cdot 10^{-2}$	1,42				
Oxálsav	K_2	$3,5 \cdot 10^{-5}$	4,46				
Borkősav	K_1	$9,7 \cdot 10^{-4}$	3,01				
Borkősav	K_2	$9 \cdot 10^{-5}$	4,05				
Benzoésav		$6,86 \cdot 10^{-5}$	4,16				
Fenol.....		$1,3 \cdot 10^{-10}$	9,89				
Pikrinsav		$1,6 \cdot 10^{-1}$	0,80				
Szalicilsav.....		$1,06 \cdot 10^{-3}$	2,97				

2.2.3. A hidrogénion-koncentráció változása titrálás közben

Savak, illetve bázisok titrálásához olyan indikátort kell választanunk, melynek indikátorexponense az ekvivalenciapont közelébe esik. Az átcsapás élessége szempontjából igen fontos azonban tudnunk azt is, hogy a titrálás folyamán milyen az oldat hidrogénion-koncentrációjának változása az ekvivalenciapont környezetében. **Ha ugyanis az ekvivalenciapont környezetében az oldat pH-jának változása nem eléggé ugrásszerű, a titrálás végpontját nem tudjuk pontosan megállapítani,** még akkor sem, ha az átcsapás pontosan az ekvivalenciapontban következik be. Az indikátor helyes megválasztása, valamint az eredmény várható pontossága szempontjából fontos tehát, hogy ismerjük az oldat pH-jának változását a közömbösítés folyamán.

2.2.3.1. A pH változása erős sav, illetve erős bázis titrálása közben

0,1 M HCl titrálása: Vizsgáljuk meg 100 cm^3 0,1 M sósav pH-jának változását 1 M NaOH-dal való titrálás közben. A beálló térfogatváltozást hanyagoljuk el.

A HCl erős sav, tehát 0,1 M oldatban teljesen disszociálnak tételezhető fel. Kiinduláskor az oldat pH-ja: 1

$9,00 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH hozzáadásával az oldatban levő sav 90%-át közömbösítjük, tehát az eredeti oldat hidrogénion-koncentrációja 1/10-ére csökken. Az oldat pH-ja: 2

$9,90 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH hozzáadására az oldat hidrogénion-koncentrációja az eredetinek 1/100-ára csökken, pH-ja: 3

$9,99 \text{ cm}^3$ (vagyis további $0,09 \text{ cm}^3$) 1 M NaOH hatására az oldat hidrogénion-koncentrációja újabb 10-es hatvánnyal csökken, pH-ja: 4

$10,00 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH hozzáadására elérjük az ekvivalenciapontot, az oldat pH-ja tehát megegyezik a tiszta vízával, pH: 7

$0,01 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH-felesleg hatására az oldat NaOH-ra nézve 10^{-4} M lesz, vagyis az oldat pH-ja: 10

$0,10 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH-felesleg az oldat hidrogénion-koncentrációját tovább csökkenti, pH: 11

$1,00 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH-felesleg hozzáadásakor, pH: 12

$10,00 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH-felesleg hozzáadásakor, pH: 13

Az ekvivalenciapont előtt 0,1%-kal ($9,99 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH hozzáadása után) az oldat pH-ja tehát 4, míg 0,1%-kal az ekvivalenciapont után ($0,01 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH-fölösleg) 10-re változik. A pH-ugrás tehát igen jelentékeny. *Ha tehát 0,1 M erős savat erős bázissal 0,1%-nál pontosabban akarunk közömbösíteni, a végpont meghatározására minden olyan indikátort használhatunk, amelyek indikátorexponense $pH = 4$ és 10 közé esik* (metilnarancs, timolftalein). Ennél töményebb (1 M) savaknál a viszonyok még kedvezőbbek. Az ekvivalenciapont környezetében igen kis lúg vagy savmennyiség igen nagy pH-változást idéz elő.

0,01 M HCl titrálása: 100 cm^3 0,01 M HCl pH-ja erős lúggal való titráláskor a következőképpen változik. Hogy a beálló térfogatváltozást elhanyagolhassuk, végezzünk közömbösítést 1 M NaOH-dal. A teljes közömbösítéshez összesen $1,000 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH-ra lesz szükségünk.

A pH változását a következő összeállítás mutatja:

$0,000 \text{ cm}^3$		0%-os		pH = 2
$0,900 \text{ cm}^3$	1 M NaOH	90%-os	közömbösítés	pH = 3
$0,990 \text{ cm}^3$		99%-os		pH = 4

0,999 cm ³	1 M NaOH	99,9%-os	közömbösítés	pH = 5
1,000 cm ³		100%-os		pH = 7
1,001 cm ³	1 M NaOH	0,1%-os	NaOH-fölösleg	pH = 9
1,010 cm ³		1%-os		pH = 10
1,100 cm ³		10%-os		pH = 11
2,000 cm ³		100%-os		pH = 12

Amikor 0,01 M erős savat erős bázissal akarunk titrálni 0,1% pontossággal, csak olyan indikátort használhatunk, amelynek indikátorexponense pH = 5 és 9 közé esik (metilvörös–fenolftalein). 0,01 M-nál hígabb erős savak vagy erős bázisok titrálásánál az átmenet már olyan szűk intervallumra (pH = 6-8) korlátozódik, hogy a megkívánt pontosságú titrálás csak pontosan a semleges pontban átcsapó indikátor használatával és a levegő szén-dioxidjának teljes kizárásával valósítható meg.

2.2.3.2. A pH változása gyenge sav és gyenge bázis közömbösítése alkalmával

A viszonyokat ecetsavnak NaOH-dal való közömbösítésén tanulmányozhatjuk. Vizsgáljuk meg tehát példaképpen a pH változását 100 cm³ 1 M CH₃COOH-nak 1 M NaOH-dal való titrálása közben. A titrálás közben beálló térfogatváltozást itt is hanyagoljuk el. A pontos közömbösítéshez 10 cm³ 1 M NaOH-ra van szükségünk. A pH változása a titrálás elején viszonylag nagy, mivel a keletkező acetát visszaszorítja az ecetsav disszociációját. Az 50%-os közömbösítés környezetében a pH változása kicsivé válik, vagyis az oldat pufferkapacitása itt a legnagyobb. Ezután a pH ismét csökken, majd az ekvivalenciapont környezetében 7 és 10 pH érték között erős ugrás mutatkozik. Az oldat pH-ja már a titrálás elején a metilnaranccs átcsapási intervallumába esik. Csak a fenolftalein átcsapási intervalluma foglalja magában az ekvivalenciapontot, ezért csak a fenolftalein jön tekintetbe a titrálás végpontjának jelzésére.

Gyenge bázisnak erős savakkal való titrálása alkalmával a gyenge savéhoz hasonló a pH-változás, csak annak lefutása fordított. Az ekvivalenciapont ugyanis ezeknél a savanyú tartományba esik. Az átcsapás szélessége a gyenge bázisok titrálásakor is csökken a disszociációs állandó csökkenésével. $K_b = 10^{-9}$ -nél kisebb egyensúlyi állandójú gyenge bázis még 1 M koncentrációban sem mutat éles átcsapást.

*Gyenge savaknak gyenge bázisokkal való titrálása alkalmával az ekvivalenciapont a pH = 7 környezetébe esik. A pH változása a hidrolízis folytán általában kicsi, tehát a titrálás csak kedvező körülmények között végezhető el pontosan. A gyakorlatban emiatt **gyenge savakat mindig erős bázissal, gyenge bázisokat pedig erős savakkal titrálunk.***

2.2.3.3. A pH mérése

A pH mérésére a gyakorlatban két lehetőség adódik. Az egyik lehetőség szerint **a hidrogénion-koncentráció mérhető hidrogénelektrodokból készített koncentrációs elem segítségével, de mérhető üvegelektrodból és fém–csapadék elektrodból álló galvánelem segítségével is.** A hidrogénelektrodból álló galvánelem potenciálkülönbsége az alábbi összefüggés szerint írható le:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_1 + \varepsilon_2 = \frac{0,0592}{2} \log \frac{[\text{H}^+]^2}{1} = 0,0592 \text{ pH}.$$

Az egyenlet átrendezve és figyelembe véve, hogy $-\log [\text{H}^+] = \text{pH}$, a következő összefüggést kapjuk:

$$\text{pH} = \frac{\Delta\varepsilon}{0,0592},$$

azaz **a pH egyenesen arányos a koncentrációs elem potenciálkülönbségével, vagyis az ismeretlen hidrogénion-koncentrációjú oldatból készített hidrogénelektrod potenciáljával.**

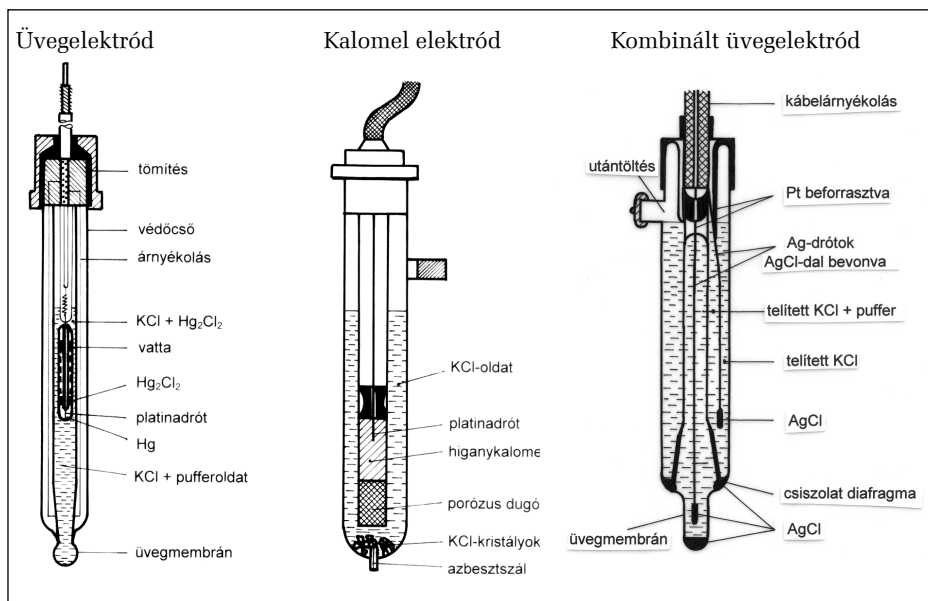
A gyakorlatban a hidrogénelektrodok helyett a könnyebben kezelhető üvegelektrodot használják az ismeretlen hidrogénion-koncentráció meghatározására, amelynek potenciálját fém–csapadék elektródra mint referenciaelektrodra vonatkoztatják. Az üvegelektrod olyan vékony falú üvegmembrán, amelynek belsejében állandó koncentrációjú hígított sósav van. Ismeretlen hidrogénion-koncentrációjú oldatba mártva a membránt annak belső és külső felszíne között potenciálkülönbség alakul ki. Az üvegelektrod potenciálját az $\text{AgCl(s)} | \text{Ag}^+$ másodfajú elektróddal összekapcsolt galvánelemmel határozzák meg, aminek potenciálkülönbsége:

$$\Delta\varepsilon = \text{konstans} + 0,0592 \text{ pH},$$

egyenesen arányos a pH-val, a konstans értéke pedig az üvegelektrod minőségétől függ. A pH-méréshez használt üvegelektrod és kalomelektrod, valamint az üveg- és kalomelektrodot együttesen tartalmazó kombinált elektród szerkezetét a 2.8. ábra mutatja.

A gyakorlati mérés során az elektródák segítségével a készüléket ismert pH-jú pufferekre állítjuk be, ügyelve arra, hogy a beállításra használt puffer és a meghatározni kívánt minta pH-ja hasonló tartományba essen. Precíziós pH-mérőkkel az ismeretlen oldat pH-ját kéttizedes pontossáig lehet mérni.

A pH közelítő mérésére alkalmasak a különböző **indikátorpapírok** is, melyek színüket a pH függvényében változtatják (2.9. ábra). Az univerzál indikátorpapír például savas körülmények között vörös, mely a semleges tartomány



2.8. ábra. Elektrodák



2.9. ábra. Indikátorpapírok

felé folyamatosan sárgába megy át, majd a lúgos tartományban intenzív kék színű lesz. Ismerünk olyan indikátorpapírokat, melyek szélesebb pH-tartományban használhatók, valamint olyanokat is, amelyek egy szűkebb tartományban, de pontosabb pH-mérésre alkalmasak.

2.2.4. Mérőoldatok készítése

Az acidi-alkalimetriás titrálásoknál leggyakrabban a következő mérőoldatokat használjuk: 1 M HCl; 0,5 M HCl; 0,1 M HCl és 1 M NaOH; 0,1 M NaOH; 0,1 M Ba(OH)₂ és alkoholos közegben végzett titrálásoknál, valamint zsírok és olajok vizsgálatánál 0,5 M alkoholos KOH. 0,1 M-nál hígabb mérőoldatot rendszerint nem tartunk készletben, hanem azt töményebb mérőoldatból, esetről esetre hígítással állítjuk elő.

2.2.4.1. 1 M HCl készítése és beállítása

A sósav, mint erős sav, valamennyi bázis titrálására alkalmas. Forralás alkalmával nem illan el, ha az elpárolgó víz folytonos pótlásával megakadályozzuk, hogy nagyon betöményedjék. Így tehát nem kell tartanunk attól, hogy pl. a szénsav elforralása alkalmával HCl is távozik. Elvileg a sósavhoz hasonlóan használható mérőoldatnak a kénsav és a salétromsav is. Mivel azonban a kénsav a sósavnál valamivel gyengébb, salétromsav alkalmazása esetén pedig oxidáció folytán mellékreakciók is végbemehetnek, e két sav alkalmazása korlátozottabb.

1 M HCl készítése. Mivel a tömény sósavoldat nem állandó összetételű, és párolgása miatt nem mérhető meg kellő pontossággal, egyszerű beméréssel nem készíthető belőle pontos mérőoldat. A gyakorlatban úgy járunk el, hogy a közelítőleg ismert koncentrációjú és kellő tisztaságú tömény sósavból a kelletnél valamivel töményebb oldatot állítunk elő, az oldat hatóértékét jól mérhető anyagra beállítjuk, és a szükséghez mérten vízzel annyira hígítjuk, hogy az oldat közelítőleg 1 M legyen. A kész oldat pontos koncentrációját ezután meghatározzuk. A tömény sósav közelítő HCl-tartalmát sűrűségméréssel állapítjuk meg. Evégből a tömény sósav hőmérsékletét 20 °C-ra állítjuk be és megmérjük a sűrűséget. Alkalmas táblázatból kikeressük, hogy a kapott sűrűségnek hány mol/dm³ HCl-tartalom felel meg. 30 tömegszázaléknál töményebb sósavra az értékeket a 2.2. táblázatból olvashatjuk ki:

2.2. táblázat. A sósav sűrűsége és összetétele

Sósav sűrűsége 20 °C-on	HCl-tartalom	
	tömeg%-ban	mol/dm ³ -ben
1,150	30,14	9,505
1,155	31,14	9,863
1,160	32,14	10,22
1,165	33,16	10,59
1,170	34,18	10,97
1,175	35,20	11,34

Sósav sűrűsége 20 °C-on	HCl-tartalom	
	tömeg%-ban	mol/dm ³ -ben
1,180	36,23	11,73
1,185	37,27	12,11
1,190	38,32	12,50
1,195	39,37	12,90
1,198	40,00	13,14

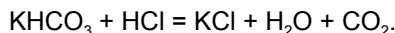
A kapott értékekből kiszámíthatjuk, hogy hány cm³ tömény sósav tartalmazza a HCl 1 mólnyi mennyiségét. Bürettából vagy kellő pontosságú mérőhengerből e mennyiségnél valamivel (2 cm³-rel) többet 1000 cm³-es mérőlombikba töltünk, desztillált vízzel felhígítjuk, majd a hőmérséklet-különbség kiegyenlítődése után vízzel pontosan jelig töltjük. Végül a lombikot üvegdugóval bedugjuk és alaposan összerázzuk.

Az ily módon előállított 1 M HCl a kelleténél valamivel töményebb. Ha pontos oldatot akarunk előállítani, akkor ismert mennyiséget pipettázunk ki belőle, és KHCO₃ segítségével megállapítjuk, hogy a mérőlombikban maradt sósavoldatot mennyi vízzel kell még hígítanunk, hogy pontosan 1 M HCl-at kapjunk. Ezt a vízmennyiséget tiszta bürettából mérjük az oldathoz. Összerázás után titrálással megállapítjuk a kapott 1 M HCl pontos koncentrációját.

1 M HCl beállítása KHCO₃-ra. M_r: 100,19 g. A tiszta KHCO₃ igen alkalmas anyag savak pontos koncentrációjának beállítására. Előnye, hogy:

- nem higroszkópos, és így levegőn minden további nélkül mérhető, valamint
- relatív molekulatömege elég nagy, és így a tömegmérés relatív hibája elhanyagolható.

A kereskedelmi KHCO₃ azonban sohasem teljesen tiszta, és így összetétele nem felel meg pontosan képletének. A tisztátlanabb készítményeket vízben való oldással, szűréssel és alkohollal való kicsapással tisztíthatjuk. A KHCO₃ titrálása közben a következő reakció zajlik le:



A reakció során szénsav szabadul fel. Olyan indikátort kell tehát választanunk, ami szénsavra nem érzékeny, viszont indikátorexponense 3 és 11 közé esik. E célra a metilnarancs és a dimetilsárga felel meg.

Meghatározás: Lemérünk nagyobb mennyiségű (kb. 10 g) KHCO₃-ot, majd visszszáméréssel 2,0-2,5 g-os részleteket mérünk három titrálólombikba. A KHCO₃ részleteket 20-30 cm³ hideg vízben oldjuk, egy csepp metilnarancs-indikátort adunk hozzá, és 1 M HCl-val addig titráljuk, míg az oldat narancsszínű lesz. Ezután a CO₂ eltávolítására két percig forraljuk; az oldat ekkor rendszerint visszasárgul. Teljes lehűlés után átmeneti színűre titráljuk. Az indikátor átcsapása igen éles. A fenti

egyenletből következik, hogy 100,19 g KHCO_3 közömbösítéséhez 1000 cm^3 pontos 1 M HCl szükséges. Ha bemérésünk A g volt, akkor erre $1000 \cdot A / 100,16 \text{ cm}^3$ pontos 1 M HCl-nak kellett volna fogynia. Ha a titrálásnál $B \text{ cm}^3$ mérőoldat fogyott, akkor a mi mérőoldatunk pontos koncentrációja:

$$\frac{1000 \cdot A}{100,19 \cdot B}$$

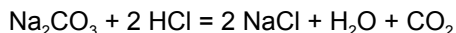
A titrálást még legalább kétszer meg kell ismételnünk.

Hibahatár: $\pm 0,2\%$. A pontos koncentrációt háromtizedes pontossággal adjuk meg.

1 M HCl beállítása Na_2CO_3 -ra. A beállításra használt Na_2CO_3 -nak tisztának és vízmentesnek kell lennie. A felhasznált Na_2CO_3 tisztaságát minden esetben ellenőrizni kell. A készítménynek vízben kristálytisztnak kell oldódnia, kloridot és szulfátot nem szabad tartalmaznia.

A vízmentes Na_2CO_3 erősen higroszkópos anyag, ezért bemérés előtt szárítanunk kell. A tiszta, vízmentes Na_2CO_3 -ot platinatégelybe tesszük, és óvatosan homokfürdőbe ágyazva 1 óra hosszat 300°C -on szárítjuk. Eközben a szóda elveszíti nedvességtartalmát, és az esetleges NaHCO_3 -tartalma átalakul Na_2CO_3 -tá. Magasabb hőmérsékletre hevített Na_2CO_3 egy része CO_2 -ot veszítve átalakul Na_2O -dá, és így használhatatlanná válik. A még meleg tégelyt exszikkátorban hagyjuk kihűlni.

Meghatározás: A kiszárított és lehűlt szódát gyorsan, becsiszolt dugós mérőedénybe öntjük, bedugaszoljuk és analitikai mérleggen pontosan lemérjük. Visszszáméréssel 1,0-1,3 g-os részleteket mérünk három titrálólombikba, ügyelve arra, hogy a mérőedényke fedelét csak rövid ideig tartsuk nyitva. A lemért részleteket $20\text{-}30 \text{ cm}^3$ hideg vízben oldjuk, hozzáadunk egy-egy csepp metilnarancs-indikátort, majd a beállítandó 1 M HCl-oldatunkkal átmeneti színig titráljuk. A végpont végleges megállapítása előtt a CO_2 -ot forralással eltávolítjuk, a rendszerint visszasárgult, lehűtött oldatot óvatosan átmeneti színig titráljuk.



Az egyenlet szerint 1 mól sósav 0,5 mól Na_2CO_3 -tal reagál, tehát 53,00 g Na_2CO_3 -nak 1000 cm^3 pontos 1 M HCl felel meg. A bemért A g szóda közömbösítésére tehát $1000 \cdot A / 53,00 \text{ cm}^3$ pontos 1 M HCl szükséges. Ha a mi oldatunkból $B \text{ cm}^3$ fogyott a közömbösítésre, akkor a pontos koncentráció:

$$\frac{1000 \cdot A}{53,00 \cdot B}$$

Ha a három titrálásból megállapított koncentrációk egymástól $\pm 0,2\%$ -nál jobban eltérnek, a meghatározást meg kell ismételni.

Hibahatár: $\pm 0,2\%$. A koncentrációt háromtizedes pontossággal kell megadni.

2.2.4.2. 0,1 M HCl készítése és beállítása

A 0,1 M HCl készítésénél kiindulhatunk 1 M HCl-ből vagy tömény sósavból. Ha pontosan 1 M HCl áll rendelkezésünkre, akkor ebből 100 cm^3 -t, közelítő pontossággú, de ismert koncentrációjú 1 M HCl-ből pedig $100 / \text{molaritás} \text{ cm}^3$ -t mérünk be pipettával, illetve bürettával 1000 cm^3 -es mérőlombikba, és vízzel jelig feltöltjük. A kapott 0,1 M HCl közelítőleg pontos lesz.

A 0,1 M HCl készítését *tömény sósavból* az 1 M HCl előállításához hasonlóan végezzük. Az ismert sűrűségű HCl-ből itt annyit mérünk bürettából egy 1000 cm^3 -es mérőlombikba, amennyi a HCl molekulatömegének 0,1-részét tartalmazza, illetőleg e mennyiségnél valamivel ($0,2 \text{ cm}^3$) többet.

0,1 M HCl beállítása KHCO_3 -ra. 0,1 M erős sav titrálásánál olyan indikátorok használhatók, amelyeknek átcsapási pontja $\text{pH} = 4$ és 10 közé esik (metilnarancs, fenolftalein). Az indikátorok közül legtöbbször a metilnarancsot és dimetilsárgát részesítjük előnyben, mivel ezek szénsavra kevésbé érzékenyek. 0,1 mólos savak és bázisok titrálásánál azonban ezeknek az indikátoroknak a hibája oly nagy, hogy túllépi a büretta leolvasási hibáját.

Ha metilnarancsra vagy dimetilsárgára beállított 0,1 M sósavunkat a későbbiekben csak metilnarancs vagy dimetilsárga jelenlétében használjuk, a titrálási hiba kiesik. Ha azonban a metilnarancsra beállított mérőoldatunkat fenolftalein-indikátor mellett akarjuk használni, tekintetbe kell vennünk az indikátorhibát, vagyis a mérőoldat *abszolút* koncentrációját is meg kell állapítanunk.

A beállítás menete: A CO_2 -dal töltött exsikkátorban megszáritott KHCO_3 -ból visszaméréssel titrálólombikba mérünk $0,20$ - $0,25 \text{ g}$ -ot, kb. 20 cm^3 hideg vízben feloldjuk, egy csepp metilnarancs-indikátort adunk hozzá, és a beállítandó 0,1 M HCl-val átmeneti színig titráljuk. Az oldatból a CO_2 -ot két percig tartó forralással eltávolítjuk, a folyadékot vízcsap alatt lehűtjük, és a visszasárgult oldatot pontosan átmeneti színre titráljuk. Ha a bemért KHCO_3 tömege $A \text{ g}$ és fogyott $B \text{ cm}^3$ 0,1 M HCl, akkor a 0,1 M HCl pontos koncentrációja metilnarancsra:

$$\frac{1000 \cdot A}{100,19 \cdot B}$$

Hibahatár: $\pm 0,2\%$. A koncentrációt háromtizedes pontossággal adjuk meg.

Hasonló módon állapítjuk meg a 0,1 M HCl pontos koncentrációját fenolftaleinindikátorra is. Ez esetben a CO_2 kifőzését a végpont végleges megállapítása előtt többször meg kell ismételni, vagy a titrálást forralás közben kell befejezni.

Azonos méréseket feltételezve, a két indikátor közötti fogyáskülönbség $0,15 \text{ cm}^3$ -nél nem szokott nagyobb lenni.

A 0,1 M HCl beállítása vízmentes Na_2CO_3 -ra az 1 M HCl beállításához hasonlóan történhet. A Na_2CO_3 higroszkóposságából, valamint a kisebb bemérésből származó hiba itt természetesen nagyobb hibáknak lehet okozója. Egy titráláshoz ugyanis kb. 0,1 g Na_2CO_3 -ot kell bemérni, tehát 0,1 mg tömegmérési hiba a titrálás eredményében 0,1% hibát okoz. Célszerűbb tehát nagyobb beméréssel törzsoldatot készíteni és ennek egyenlő részleteit titrálni. A titrálás folyamán keletkező szénsavat a végpont elérése előtt forralással el kell távolítani.

2.2.4.3. 1 M NaOH készítése és beállítása

A gyakorlatban a NaOH-mérőoldat kevés Na_2CO_3 -tartalma, különösen gyenge savak titrálása alkalmával, nagy hibát és bizonytalan átmenetet okozhat, ezért igyekeznünk kell lehetőleg karbonátszegény, illetve gyakorlatilag karbonátmentes NaOH-mérőoldatot előállítani.

Karbonátszegény 1M NaOH. Szilárd NaOH-ból táramérleggen lemérünk 45-50 g-ot, kevés vízzel gyorsan leöblítjük a felületére tapadt Na_2CO_3 -ot, majd gyorsan 1000 cm^3 -es mérőlombikba visszük, amibe előzetesen 600 cm^3 kiforralt és lehűtött desztillált vizet tettünk. Teljes feloldódás és a hőmérséklet kiegyenlítődése után a lombikot jelig töltjük kiforralt és lehűtött desztillált vízzel.

Az *oldat koncentrációját* ismert koncentrációjú 1 M HCl-val állapíthatjuk meg leggyorsabban. A kapott, közelítőleg mólos lúgból pontosan 20 cm^3 -t titrálólombikba pipettázunk, egy csepp metilnarancsot vagy dimetilsárgát adunk hozzá, és 1 M HCl-val átmeneti színig titráljuk. Ha e célra $A \text{ cm}^3$ 1 M HCl fogy, akkor az oldat koncentrációja:

$$\frac{A}{20,0}$$

A fenti módszerrel előállított lúg nem teljesen karbonátmentes. Az oldat csekély karbonáttartalma azonban a metilnarancs, illetve dimetilsárga átcsapására nincs befolyással. Az oldat Na_2CO_3 -tartalma tehát úgy viselkedik, mintha NaOH lenne. Ha azonban a titrálást fenolftaleinindikátor jelenlétében végezzük, a szénsavtartalom észrevehetővé válik. Fenolftaleinnel végzett titrálásoknál tehát a fenolftaleinre megállapított koncentrációval kell számolnunk. Ha a fenolftalein jelenlétében végzett titrálást az oldat forralása közben fejezzük be, akkor a szénsav az oldatból eltávozik, és így azzal a koncentrációval kell számolnunk, amit a metilnarancsra vagy dimetilsárgára állapítottunk meg.

Ha a titrálást fordítva végezzük, vagyis bemért mennyiségű savat titrálunk NaOH-dal, akkor az állandó savfölség folytán az oldatból a szénsav eltávozik, és így metilnarancs és fenolftalein használata esetén ugyanazt a fogyást kapjuk.

2.2.4.4. 0,1 M NaOH készítése és beállítása

Karbonátszegény 0,1 M NaOH-ot úgy állítunk elő, hogy 100 cm³ karbonátszegény 1 M NaOH-ot kiforralt és lehűtött desztillált vízzel 1000 cm³-re hígítunk. Ha 1 M NaOH nem áll rendelkezésre, akkor 5 g szilárd NaOH-ot – a felületére tapadt Na₂CO₃ leöblítése után – kiforralt és lehűtött desztillált vízzel 1000 cm³-re oldunk.

0,1 M NaOH beállítása 0,1 M HCl-ra. Pontosan 20 cm³ 0,1 M NaOH-ot metilnarancs- vagy dimetilsárga-indikátort használva 0,1 M HCl-val átmeneti színűre titrálunk. A kapott fogyásból kiszámított koncentráció a 0,1 M NaOH metilnarancsra, illetve dimetilsárgára megállapított koncentrációja.

0,1 M NaOH beállítása kristályos oxálsavra. A kristályos oxálsav [(COOH)₂ · 2 H₂O] jól definiált összetételű, nem higroszkópos és jól mérhető. Hátránya, hogy kristályvizet tartalmaz, de ezt közönséges hőmérsékleten, szabad levegőn nem veszti el. Exszikkátorban elmállik ugyan, de kristályvizét már közönséges levegőn visszanyeri.

A koncentráció megállapítása fenolftaleinre. Mivel az oxálsav gyenge sav, közvetlenül csak fenolftaleinre titrálható meg. Kb. 20 cm³ fogyásnak megfelelő mennyiségű oxálsavat (0,12 g) analitikai mérleggel lemérünk, 20 cm³ szénsavmentes desztillált vízben oldjuk, és fenolftalein alkalmazása mellett 0,1 M NaOH-dal megtitráljuk. A bemért oxálsavból (*A* g) és a fogyott mérőoldat cm³-eiből (*B* cm³) kiszámítjuk a lúg koncentrációját:

$$\frac{1000 \cdot A}{63,034 \cdot B}$$

Hibahatár: ±0,2 %.

2.2.4.5. 0,5 M alkoholos KOH készítése

Zsírok, olajok, viaszok, gyanták savszámának, elszappanosítási számának, valamint észterszámának meghatározására alkoholos KOH-mérőoldatot használunk. Oldószernek általában etil-alkoholt alkalmazunk, azonban nehezebben szappanosodó zsíroknál célszerűbb a magasabb forráspontú propil-alkoholt használni. Az oldat készítése során 35 g szilárd KOH-ot 30 cm³ vízben oldunk, és a teljes lehűlés

után 1 dm^3 96%-os alkoholba öntjük. Alapos elkeverés után néhány napig állni hagyjuk. A kivált K_2CO_3 -ról leöntjük és sötét helyen tartjuk. A kapott kb. 0,5 M lúg karbonátmentes, mert a K_2CO_3 alkoholban nem oldódik. Az ily módon előállított lúg lassanként megsárgul, majd megbarnul, szerves savak sói keletkeznek benne, és hatóértéke csökken. Alkalmazása esetén mindenkor vakpróbát is kell vele végezni.

A 0,5 M alkoholos KOH-ot ismert koncentrációjú 0,5 M HCl-ra állítjuk be fenolftaleinindikátor jelenlétében. Célszerű a beállítást a meghatározással egyidejűleg végezni, miközben a beállítandó lúggal ugyanazokat a műveleteket végezzük el, mint magával a meghatározandó oldattal.

2.2.5. Erős savak titrálása

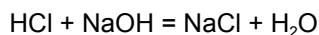
Erős savak titrálásánál az indikátort a titrálandó oldat koncentrációjának megfelelően kell megválasztani. Így 1 M erős sav titrálásánál minden olyan indikátor használható, aminek indikátorexponense $\text{pH} = 3\text{--}11$ közé esik. 0,1 M oldatok esetében e határok 4–10 pH értékre, 0,01 M oldatoknál pedig 5–9 pH tartományra korlátozódnak. 1 M oldatok esetében tehát a dimetilsárgától a timolftaleinig minden indikátor használható. A szénsav zavaró hatása miatt azonban célszerűbb olyan indikátorokat választani, melyek savakra kevésbé érzékenyek ($\text{pK}_i \leq 4$; metilnarancs, dimetilsárga). Ezeknek az indikátoroknak a használatánál a titrálási hiba elhanyagolható.

0,1 M oldatokban ugyancsak használható minden indikátor, aminek átcsapási pontja a dimetilsárga és timolftalein közé esik, azonban a $\text{pH} = 4$ és $\text{pH} = 10$ körül átcsapó indikátorok titrálási hibája már számottevő. Azoknál az indikátoroknál, amelyeknek átcsapási pontja a metilvörös és a fenolftalein közé esik, a titrálási hiba elhanyagolható. Ezeket az indikátorokat azonban a szénsav zavarja, tehát gyakorlatilag karbonátmentes lúgot kell a titrálásnál használni, és a végpont elérése előtt célszerű az esetleg jelen levő szénsavat kiforralni.

0,01 M oldatokban csak olyan indikátorok használhatók, melyeknek átcsapása a metilvörös és fenolftalein átcsapási pontja közé esik. Ezen oldatokban a $\text{pH} = 5$ és $\text{pH} = 9$ körül átcsapó indikátorok titrálási hibája nagyobb a büretta leolvasási hibájánál. A metilvörös vagy fenolftalein jelenlétében végzett titrálásoknál tehát ezekre az indikátorokra megállapított koncentrációval kell számolnunk, vagy külön kísérletben meg kell állapítanunk az indikátorhibát. A semleges pont körül átcsapó indikátorok hibája elhanyagolható. A 0,01 M méretben végzett titrálásoknál gyakorlatilag szénsavmentes lúgot kell használnunk, és a végpont elérése előtt célszerű a szénsavat kiforralni.

2.2.5.1. Sósavoldat HCl-tartalmának meghatározása

A sósav egybázisú, erős sav. Relatív molekulatömege: 36,465 g. 1 cm^3 1 M NaOH 36,465 mg HCl-val egyenértékű.

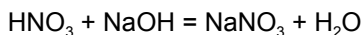


Ismeretlen töménységű sósav körülbelüli HCl-tartalmát sűrűségméréssel állapítjuk meg. Analitikai mérlegben, becsiszolt dugós mérőedénykében annyit mérünk le belőle, hogy vízzel veszteség nélkül mérőlombikba öblítve és ismert térfogatra hígítva, HCl-ra kb. 1 M legyen. Ezen oldat 20,0 cm³-es részleteit metilnarancs-indikátor jelenlétében 1 M NaOH-dal megtitráljuk. 1 M-nál hígabb HCl-at térfogatra is bemérhetünk.

Hibahatár: $\pm 0,2\%$.

2.2.5.2. Salétromsavoldat HNO₃-tartalmának meghatározása

A salétromsav egybázisú erős sav. Molekulatömege 63,016 g. 1 cm³ 1 M NaOH 63,016 mg HNO₃-at mér.



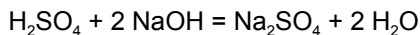
A salétromsav meghatározását mindenben a sósavéhoz hasonlóan végezzük. Tekintettel arra, hogy a tömény salétromsav összetétele pipettázás folytán nem változik, a bemérést méregpipettával is végezhetjük.

A pipettából kb. 1 g savat 100 cm³-es mérőlombikba engedünk, a lombikot pontosan jelig töltjük, összerázzuk, majd a törzsoldat 20,0 cm³-es részleteit metilnarancs hozzáadása után 0,1 M NaOH-dal megtitráljuk. A számítást a metilnarancsra beállított koncentrációval végezzük.

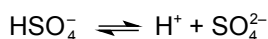
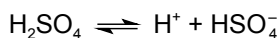
Hibahatár: $\pm 0,2\%$.

2.2.5.3. Kénsavoldat H₂SO₄-tartalmának meghatározása

A kénsav kétértékű erős sav. Molekulatömege: 98,08 g. 1 cm³ 1 M NaOH 49,040 mg H₂SO₄-at mér.



Az 1 M H₂SO₄-nak metilnarancsra való titrálása alkalmával az indikátor átcsapása éles, ha azonban a titrálást 0,1 M oldatban végezzük, már nem kapunk olyan jó színátcsapást. Ennek az az oka, hogy a H₂SO₄, mint kétértékű sav, fokozatosan disszociál:



Az első disszociáció gyakorlatilag teljes, a második azonban lényegesen kisebb ($K_2 = 3 \cdot 10^{-2}$). 0,1 M koncentrációban tehát a titrálást célszerűbb metilvörös-indikátor jelenlétében végezni. Ez esetben az indikátor színátcsapása éles. Metilvörös alkalmazása esetén karbonátmentes lúggal kell dolgoznunk. Ha ilyen nem áll rendelkezésünkre, a végpont elérése előtt az oldatot fel kell forralnunk, hogy a szénsav eltávozzék, majd a teljes lehűlés után a titrálást befejezzük.

Kb. 1 g vizsgálandó (tömény) kénsavat ismert tömegű (becsiszolt dugós) mérőedénykébe mérünk, és desztillált vízzel széles szájú titrálólombikba mossuk. Kb. 50 cm³-re hígítjuk, két csepp metilnarancs-indikátort adunk hozzá és 0,1 M NaOH-oldattal titráljuk.

1 cm³ 0,1 M NaOH-oldat megfelel 4,9040 mg H₂SO₄-nak.

2.2.5.4. Peroxi-diszulfátok meghatározása

Ha a kálium-, nátrium- vagy bárium-peroxi-diszulfát vizes oldatát hosszabb ideig főzzük, a só a következő egyenlet szerint bomlik:



Semleges szulfát és szabad kénsav keletkezik, miközben az oldatból oxigén távozik el. A keletkezett kénsavat 0,1 M NaOH-mérőoldattal megtitrálhatjuk.

Meghatározás: A meghatározandó peroxi-diszulfátból analitikai mérlegem lemérünk kb. 0,25 g-ot. Nagyobb Erlenmeyer-lombikban, kb. 200 cm³ vízben oldjuk, ha szükséges, metilvörös jelenlétében hidegen semlegesítjük, majd felmelegítjük és 20-25 percig forrásban tartjuk. Lehűlés után metilvörös-indikátort adunk hozzá, és a keletkezett kénsavat 0,1 M NaOH-dal megtitráljuk.

1 cm³ 0,1 M NaOH megfelel 13,515 mg K₂S₂O₈-nak, 11,906 mg Na₂S₂O₈-nak, illetve 16,474 mg BaS₂O₈-nak.

2.2.6. Gyenge savak titrálása

Gyenge savak pontos közömbösítése alkalmával az oldat a keletkezett só hidrolízise révén többé-kevésbé lúgos kémhatású. Az ekvivalenciapont pH-ját a következő egyenlet adja:

$$\text{pH} = 7 + 1/2 \text{pK}_s + 1/2 \log c$$

A titráláskor tehát olyan indikátort kell alkalmaznunk, aminek átcsapási pontja az ekvivalenciapont közelébe esik. Az indikátorátcsapás élessége függ az ekvivalenciapont környezetében beálló pH-ugrástól. Az ekvivalenciapont környezetében mutatkozó pH-ugrás annál kisebb, minél kisebb a sav disszociációs állandója és koncentrációja. Ha a sav disszociációs állandója $K_{\text{sav}} = 10^{-9}$ -nél

kisebb, még koncentrált oldatban sem kapunk éles átmenetet. Ennél gyengébb savak tehát nem titrálhatók.

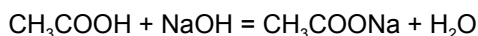
A *több-bázisú savak* semleges sóig való titrálásánál az ekvivalenciapontot a legkisebb disszociációs állandóból az egyértékű savakhoz hasonlóan számítjuk ki. A több-bázisú savakban savanyú só képződéséig való titrálásnál csak akkor várhatunk éles átmenetet, ha a megfelelő disszociációs állandók hányadosa legalább 10 000. Az ekvivalenciapont pH-ját a következő egyenlethől számítjuk ki:

$$\text{pH} = 1/2 (\text{pK}_1 + \text{pK}_2)$$

Két különböző erősségű sav is megtitrálható egymás mellett, ha disszociációs állandójuk viszonya 10 000-nél nagyobb.

2.2.6.1. Ecetsavoldat CH_3COOH -tartalmának meghatározása

Az ecetsav disszociációs állandója $K_s = 1,86 \cdot 10^{-5}$, tehát még 0,01 M oldatban is jól titrálható fenolftalein jelenlétében. Molekulatömege 60,052 g. 1 cm³ 1 M NaOH 60,052 mg CH_3COOH -at mér.

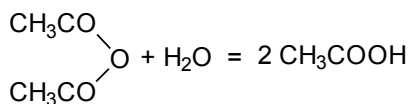


A jégecet CH_3COOH -tartalmát a következőképpen határozzuk meg: Jól záró üvegdugós mérőedénykében lemérünk 3 g jégecet, majd a mérőedénykében annyi kiforralt és lehűtött vízzel hígítjuk, amennyivel csak lehetséges. Veszteség nélkül 500 cm³-es mérőlombikba öblítjük, és szénsavmentes desztillált vízzel jelig töltjük. Ezen oldat 20,0 cm³-es részleteit 0,1 M karbonátmentes lúggal titráljuk, fenolftaleinindikátor jelenlétében.

Hibahatár: $\pm 0,2\%$.

2.2.6.2. Ecetsavanhidrid meghatározása

Az ecetsavanhidrid vízzel nehezen elegyedő folyadék, ami azonban vízzel összekeverve hőfejlődés közben lassanként feloldódik, miközben ecetsavvá alakul:



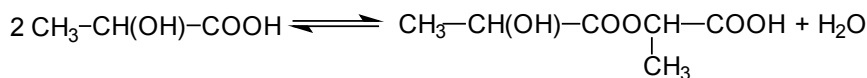
A hidrolízis befejeztével a keletkezett ecetsavat karbonátmentes lúggal, fenolftalein jelenlétében megtitráljuk. Az ecetsavanhidrid oldódását melegítéssel gyorsíthatjuk, azonban ilyenkor a lombikra visszafolyó hűtőt kell szerelnünk, hogy a bomlatlan anhidrid elillanását megakadályozzuk.

Meghatározás: Kis átmérőjű üveg dugós edénykébe bemérünk 1,0 g ecetsav-anhidridet, és az edénykét dugóval együtt széles szájú lombikba levő 25 cm³ vízbe dobjuk. Gyakori rázogatózás közben néhány óráig állni hagyjuk, míg az anhidrid teljesen feloldódik. Az oldatot két csepp fenolftaleinindikátor hozzáadása után karbonátmentes 1 M NaOH-dal megcseppentjük. Az ecetsav-anhidrid molekulasúlyától: 102,1 g · 1 cm³ 1 M NaOH tehát 51,05 mg ecetsav-anhidridet mér.

2.2.6.3. Tejsav titrálása

A közönséges vagy erjedési tejsav (etilidéntejsav) egybázisú, az ecetsavnál valamivel erősebb sav ($K_{\text{sav}} = 1,5 \cdot 10^{-4}$). Molekulasúlyától: 90,08 g · 1 cm³ 1 M nátrium-hidroxid 90,08 mg tejsavat mér.

A gyógyszerkönyvi készítmény etilidéntejsavon kívül még dilaktilsavat (anhydrotejsav) is tartalmaz. A koncentrált tejsavoldatban ugyanis a tejsav egy része észterszerű anhidriddé alakul, ami azonban még tartalmaz szabad karboxilcsoportot, és így sav gyanánt viselkedik.



A gyógyszerkönyvi tejsav 55-63% tejsavon kívül 30% dilaktilsavat tartalmaz. Ha a készítményt közönséges hőmérsékleten lúggal titráljuk, akkor nemcsak a tejsavat, hanem a dilaktilsavat is megcseppentjük. A lúgfogyásból számított tejsavtartalom kb. 75%-nak felel meg. Ha a megcseppentett oldathoz fölös lúgot adunk és vízfürdőn melegítjük, a dilaktilsav észterszerű kötése felbomlik, és a felszabaduló karboxilcsoport újabb lúgot köt meg.



A fölös lúgot sósavval visszatitráljuk. Ebből a lúgfogyásból számítható ki a tejsav-anhidrid-tartalom, az előbbi és mostani lúgfogyás különbségéből pedig a tejsavtartalom. A szénsav hatásának kiküszöbölésére célszerű az utóbbi titrálást úgy végezni, hogy a lúgos folyadékhoz fölös savat adunk, a szénsavat kifózzuk, és a savanyú oldatot lúg-mérőoldattal visszatitráljuk. A titráláshoz karbonátmentes lúgot kell használni, melynek koncentrációját ugyanolyan körülmények között kell meghatároznunk, mint ahogy a titrálást végeztük. Indikátornak fenolftaleint használunk.

Meghatározás: Táramérleggel 100 cm³-es mérőlombikba mérünk 10,0 g tejsavat, és vízzel jelig töltjük. Alapos összerázás után az oldat 20,0 cm³-ét jó minőségű üvegből készült lombikba pipettázzuk, és 2 csepp fenolftaleinindikátor

hozzáadása után karbonátmentes 1 M NaOH-dal megtitráljuk. E célra fogy $A \text{ cm}^3$ 1 M NaOH.

A semlegesített folyadékhoz további $10,0 \text{ cm}^3$ 1 M NaOH-ot adunk, és vízfürdőn 1 óra hosszat melegítjük. Ezután az oldathoz $10,0 \text{ cm}^3$ 1 M HCl-at adunk, a szénsavat kiforraljuk, és két csepp fenolftalein hozzáadása után a sósavfölsöleget 1 M karbonátmentes lúggal visszatitráljuk. E célra fogy $B \text{ cm}^3$ 1 M NaOH.

Mivel 1 cm^3 NaOH 90,08 mg tejsavat és 162,0 mg anhidrotejsavat mér, a második titrálás alapján a dilaktilsav-tartalom $B \cdot 162,0 \text{ mg}$ a lemerített 2 g tejsavban. Az első és a második titrálás különbsége adja a tiszta tejsavra fogyott lúg cm^3 -eit. Eszerint 2 g tejsavban van $(A - B) \cdot 90,08 \text{ mg}$ tiszta tejsav.

2.2.6.4. Borkósav és borkő titrálása

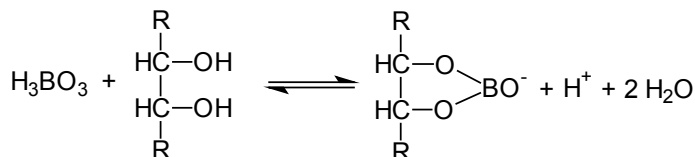
A borkósav kétbázisú gyenge sav. A disszociációs állandók: $K_1 = 9,7 \cdot 10^{-4}$ és $K_2 = 9 \cdot 10^{-5}$. A két disszociációs állandó viszonya nem éri el a 10000-t, tehát a titrálás csak normális só képződéséig végezhető el. Az ekvivalenciapont pH-ja akkora, mint egy $K_{\text{sav}} = 9 \cdot 10^{-5}$ egyensúlyi állandójú gyenge savé. A titrálást tehát fenolftaleinindikátor jelenlétében kell végezni. A molekulatömeg: 150,08 g. 1 cm^3 1 M NaOH tehát 75,04 mg borkósavat mér.

Meghatározás: kb. 1,5 g borkósavat pontosan lemérünk, 40 cm^3 szénsavmentes desztillált vízben oldjuk, 2 csepp fenolftaleinindikátort adunk hozzá, és 1 M karbonátmentes NaOH-dal megtitráljuk.

Hibahatár: $\pm 0,2\%$.

2.2.6.5. Bórsav és alkálilborátok H_3BO_3 -tartalmának meghatározása

A bórsav önmagában olyan gyenge sav ($K_1 = 6 \cdot 10^{-10}$), hogy vizes oldatában a metilnarancs nem pirosodik meg. Többértékű alkoholokkal azonban lényegesen erősebb komplex savakat alkot. Ha tehát bórsav oldatához glicerint, mannitot vagy invertcukrot (glükóz + fruktóz) adunk, belső-komplex képződése folytán közepes erősségű, egybázisú savvá alakul, és fenolftalein jelenlétében lúggal titrálható.



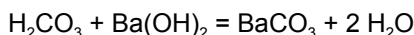
Meghatározás: 20 cm^3 kb. 0,1 M bórsavhoz $6-8 \text{ cm}^3$ invertcukor-oldatot adunk, és fenolftaleint adva hozzá, karbonátmentes 0,1 M NaOH-dal gyenge rózsaszínűre titráljuk. Ha az oldat újabb 10 cm^3 invertcukor hatására elszíntelene-

dik, ismételten átmeneti színűre titráljuk. A végpont helyességét invertcukorral újból ellenőrizzük. Molekulatömeg: 61,84 g. 1 cm³ 0,1 M NaOH tehát 6,184 mg H₃BO₃-at mér. Hibahatár: ±0,3%.

A fenti módszer alkalmazásával a bórsavat más erős sav mellett úgy titráljuk meg, hogy metilnarancs- vagy metilvörös-indikátor jelenlétében megtitráljuk az erős savat, majd az oldathoz mannitot vagy invertcukrot adunk, és fenolftalein jelenlétében megtitráljuk a bórsavat.

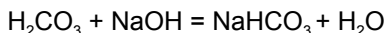
2.2.6.6. Szénsavoldat CO₂-tartalmának meghatározása

A szénsav (H₂CO₃) kétbázisú gyenge sav. Disszociációs állandói: K₁ = 3·10⁻⁷ és K₂ = 6·10⁻¹¹. Második disszociációs állandója tehát annyira kicsi, hogy mint kétbázisú sav, NaOH-dal nem titrálható meg. Ha azonban gondoskodunk róla, hogy a titrálás folyamán keletkező karbonátionok az oldatból csapadékképződés útján eltávozzanak, akkor a titrálás fenolftaleinindikátor alkalmazásával elvégezhető. Így Ba(OH)₂ mérőoldat alkalmazása esetén a titrálás simán elvégezhető, mert a keletkező BaCO₃ csapadék alakjában kiválik az oldatból.



1 cm³ pontos 0,1 M Ba(OH)₂-oldat 2,2 mg CO₂-ot mér.

A szénsav első és második disszociációs állandójának viszonya: K₁:K₂ = 0,5·10⁴, tehát bikarbonátképződésig való titrálása csak összehasonlító oldat alkalmazása esetén végezhető el pontosan, mivel az egyenértékponthoz bekövetkező pH-változás nem eléggé ugrásszerű. A reakció egyenlete:

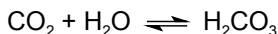


Az ekvivalenciapont pH-ját a következő összefüggésből számítjuk ki:

$$\text{pH} = 1/2 (\text{pK}_1 + \text{pK}_2) = 1/2 (6,25 + 10,22) = 8,4.$$

Ez az érték a fenolftalein átcsapási tartományába esik. A fenolftalein rózsaszíne azonban az előírt koncentrációjú indikátor alkalmazása esetén, már 7,7 pH-értéknél megjelenik. Ha tehát a titrálást a szokásos koncentrációjú indikátorral a rózsaszín megjelenéséig végezzük, az oldatban még titrálatlan szénsav marad. Ennek mennyisége 7,7 pH-nál a szénsav mennyiségének 5%-át is elérheti.

A szénsav közömbösítése nem pillanatszerű reakció. A szénsav ugyanis a vízben jórészt CO₂ alakjában van jelen, és csak kis része hidrolizál H₂CO₃-ra. Ez utóbbi a lúggal pillanatszerűen reagál, azonban a CO₂-ből csak lassan képződik utána.



Ezért a H_2CO_3 valójában jóval erősebb sav, mint az az előbbi disszociációs állandóból adódna. Ha ugyanis a tömeghatás törvénye kifejezésében a valódi H_2CO_3 -koncentrációt helyettesítjük, úgy az első disszociációs állandó értéke a következő lesz:

$$K_{(d)} = \frac{[\text{H}^+] \cdot [\text{HCO}_3^-]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = 1,3 \cdot 10^{-4}$$

A gyorsan megtitrált oldat rózsaszíne tehát néhány perc múlva újból eltűnik. A titrálást csak akkor tekinthetjük befejezettnek, ha a fenolftalein rózsaszíne 5-10 percen belül nem tűnik el.

Meghatározás: Az üveg dugós palackban lévő $100,0 \text{ cm}^3$ oldathoz $0,5 \text{ cm}^3$ híg fenolftaleint (350 mg/dm^3) adunk, és $0,1 \text{ M}$ NaOH-dal éppen rózsaszínűre titráljuk. Ha az oldat öt percen belül elszíntelenedik, néhány csepp $0,1 \text{ M}$ NaOH-dal állandó rózsaszínűre titráljuk. Mivel az oldat rázogatása alkalmával szén-savvesztés állhat elő, a titrálást célszerű úgy megismételni, hogy az első titrálásnál fogyott lúgmennyiséget egyszerre adjuk az oldathoz, és ha az oldat szintelen marad, állandó rózsaszínűre titráljuk. (Töményebb fenolftalein alkalmazása esetén összehasonlító oldatot használunk.) 1 cm^3 $0,1 \text{ M}$ NaOH megfelel $4,4 \text{ mg}$ CO_2 -nak.

Hibahatár: $\pm 1\%$.

2.2.6.7. Foszforsav és alkálifoszfátok meghatározása

A foszforsav disszociációja három fokozatban megy végbe:



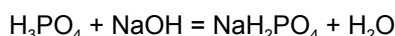
A foszforsav tehát mint egybázisú sav elég erős, mint kétbázisú sav gyenge, és mint hárombázisú sav igen gyenge. A foszforsav mint egybázisú sav és mint kétbázisú sav is megtitrálható acidimetriásan. Harmadik disszociációs állandója azonban annyira kicsi, hogy normális só képződéséig nem titrálható meg közvetlenül. Ennek megfelelően a foszforsav titrálási görbéjén az 1. és 2. folyamatnak megfelelően két határozott ugrást észlelünk a $\text{pH} = 4,4$, illetve $9,6$ értékeknél. A harmadik folyamatnak megfelelő pH -ugrás oly kicsi, hogy alig észrevehető.

A foszforsav mint egybázisú sav. Az ekvivalenciapont a $\text{p}K_1$ és $\text{p}K_2$ értékéből a következőképpen számítható ki:

$$\text{pH} = 1/2 (\text{p}K_1 + \text{p}K_2) = 1/2 (1,96 + 6,7) = 4,4$$

Ez az érték a metilnarancs és a dimetilsárga átcsapási tartományába esik. Az indikátor átcsapása azonban az oldat gyenge pufferhatása folytán nem elég éles, úgyhogy a titrálásnál könnyen 1-2% hibát követhetünk el. Összehasonlító oldat használata esetén a hibát 0,5%-nál kisebbre csökkenthetjük.

Meghatározás: Csiszolt dugós mérőedénykében lemérünk 1,0 g tömény foszforsavat. Veszteség nélkül 100 cm³-es mérőlombikba öblítjük, és kiforralt és lehűtött desztillált vízzel jelig töltjük. Az oldat 20,0 cm³-es részletéhez 2 csepp metilnarancs-indikátort adunk, és karbonátmentes 0,1 M NaOH-dal addig titráljuk, míg az oldat színe megegyezik egy azonos indikátormennyiséggel megfestett 0,05 mólos KH₂PO₄ összehasonlító oldat színével (6,8 g KH₂PO₄/1000 cm³).

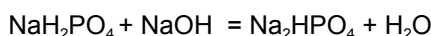
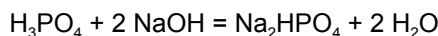


A foszforsav molekulatömege: 98,00 g. 1 cm³ 0,1 M NaOH 9,8 mg H₃PO₄-at mér. Hibahatár: ±0,5%.

A foszforsav mint kétfázisú sav. Az ekvivalenciapont pH-ja 9,6. Az oldatot tehát az ekvivalenciapontban a *fenolftalein* erősen vörösre színezi. Ha a titrálást a fenolftalein gyenge rózsaszínének megjelenéséig végezzük, a foszforsavnak kb. 7%-a titrálatlanul marad. Némileg kedvezőbbek a viszonyok, ha az oldatot a végpont elérése előtt NaCl-dal félig telítjük. Ez ugyanis a Na₂HPO₄ hidrolízisét visszaszorítja, és így a titrálás fenolftalein jelenlétében kb. 1% pontossággal elvégezhető. A NaCl ugyanis ionjai hidrátburkának kialakítására sok vizet köt meg, és így ennek aktivitását csökkenti, ami a hidrolízis visszaszorulását eredményezi:



Meghatározás: A foszforsav vagy primer foszfát oldatához fenolftaleinindikátort adunk, és annyi szilárd NaCl-ot oldunk fel benne, hogy az ekvivalenciapont közelében az oldat NaCl-ra félig telített legyen (100 cm³ végtérfogatra 18 g NaCl). Karbonátmentes 0,1 M NaOH-dal gyenge rózsaszínig titráljuk.



1 cm³ 0,1 M NaOH megfelel 4,9 mg H₃PO₄-nak, 12,0 mg NaH₂PO₄-nak, ill. 13,61 mg KH₂PO₄-nak.

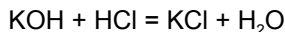
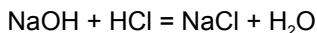
Hibahatár: ± 1%.

2.2.7. Erős és gyenge bázisok titrálása

Az erős savak és erős bázisok titrálási görbéjének szimmetriájából következik, hogy az indikátor megválasztása szempontjából az *erős bázisok* titrálásánál is ugyanazok a szabályok érvényesek, mint az erős savaknál. 1 mólos lúgok titrálásánál tehát mindazok az indikátorok használhatók, melyeknek átcsapási pontja a dimetilsárga és a timolftalein átcsapási pontja ($pK_i = 3-11$) közé esik. 0,1 M lúgoknál mindazok az indikátorok használhatók, amelyek indikátorexponense $pH = 4$ és 10 közé esik. Dimetilsárga, metilnarancs és timolftalein alkalmazása esetén azonban az indikátorhiba már számottevő. Azoknál az indikátoroknál, melyek átcsapási pontja a metilvörös és a fenolftalein közé esik, az indikátorhiba elhanyagolható. 0,01 M lúgok titrálásánál csak azok az indikátorok használhatók, melyek átcsapási pontja $pH = 5$ és 9 közé esik.

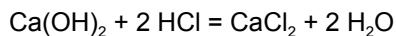
2.2.7.1. Káliklóg, nátronlóg és meszesvíz titrálása

A KOH és NaOH erős bázisok. Molekulatömegük: KOH = 56,104 g, NaOH = 40,005g.



Meghatározás: A szilárd alkáliákból jól záró üveg dugós mérőedénykében lemérjük kb. a molekulatömeg 0,1 részének megfelelő mennyiséget. Kiforralt és lehűtött desztillált víz kis részletében gyorsan feloldjuk és veszteség nélkül 100 cm^3 -es mérőlombikba öblítjük, majd a lombikot a hőmérséklet teljes kiegyenlítése után jelig töltjük. Az oldat $20,0 \text{ cm}^3$ -es részleteit, jelzőül metilnarancs-indikátort használva, 1 M HCl-val megtitráljuk. Ily módon eljárva a lóg karbonáttartalmát is megtitráljuk. 1 cm^3 HCl megfelel 56,10 mg KOH-nak, illetve 40,01 mg NaOH-nak. Hibahatár: $\pm 0,2\%$.

A meszesvíz a Ca(OH)_2 telített oldata. A Ca(OH)_2 látszólag közepes erősségű bázis, ezért fenolftalein jelenlétében célszerű titrálni. A tiszta meszesvíz karbonáttartalma elhanyagolható, mivel a CaCO_3 vízben oldhatatlan és így az oldatból leülepszik.

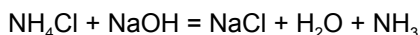


Meghatározás: $50,0 \text{ cm}^3$ tiszta meszesvizet titrálólombikba pipettázunk, 2 csepp fenolftaleint adunk hozzá, majd 0,1 M HCl-val megtitráljuk. A telített meszesvíz közönséges hőmérsékleten 0,15-0,17% Ca(OH)_2 -ot tartalmaz. 1 cm^3 0,1 M HCl megfelel 3,705 mg Ca(OH)_2 -nak, illetve 2,804 mg CaO-nak. Hibahatár: $\pm 0,2\%$.

2.2.7.2. Ammóniameghatározás

Az ammónia mint egyértékű bázis ($K = 1,75 \cdot 10^{-5}$) 0,1 M és 0,01 M oldatokban metilnarancs jelenlétében, 1 M oldatban pedig metilvörös jelenlétében sósavval titrálható. Az illékonyága miatt beálló esetleges veszteségeket úgy kerülhetjük el, hogy a meghatározandó próbához fölös és ismert mennyiségű 0,1 M HCl-at adunk, és a savfölösleget metilvörös-indikátor jelenlétében karbonátmentes 0,1 M NaOH-dal visszatitráljuk. Az összes 0,1 M HCl térfogatából levonva a visszamérésre fogyott 0,1 M NaOH térfogatát, megkapjuk az ammónia közömbösítésére fogyott 0,1 M HCl-at. Molekulatömeg: $\text{NH}_3 = 17,032$ g, $\text{N} = 14,008$ g, $\text{NH}_4\text{OH} = 35,048$ g, 1 cm^3 0,1 M HCl megfelel 1,703 mg NH_3 -nak, 1,401 mg N-nek, illetve 3,505 mg NH_4OH -nak.

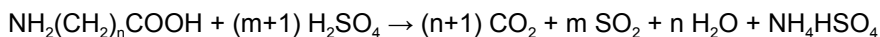
Az ammóniumsók NH_4^+ -tartalmának meghatározása. A szabad ammónia meghatározásánál gyakoribb eset az ammóniumsók ammóniatartalmának meghatározása. Ebben az esetben úgy járunk el, hogy erős lúg (NaOH, KOH) csekély feleslegével sóiból szabaddá tesszük az ammóniát, ismert mennyiségű, fölös savba desztilláljuk, és a savfölösleget visszatitráljuk.



Az ammónia ledesztillálására a *Kjeldahl-féle* nitrogénmeghatározásnál (lásd később) alkalmazott desztilláló berendezéseket használhatjuk. Az ammónia áthajtása után a palackban lévő savat karbonátmentes lúggal visszatitráljuk.

1 cm^3 0,1 M HCl 1,7032 mg NH_3 -t; 5,3496 mg NH_4Cl -ot; 8,0048 mg NH_4NO_3 -ot és 6,6070 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ot mér.

Kjeldahl módszere szerves vegyületek nitrogéntartalmának meghatározására. A módszer azon alapszik, hogy a szerves vegyületek tömény kénsavval való főzése (roncsolása) alkalmával a bennük megkötött nitrogén ammónia alakjában lehasad, illetőleg a kénsavból keletkező SO_2 hatására ammóniává redukálódik, és a kénsav fölöslegével nem illékony NH_4HSO_4 -tá, ill. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -tá alakul. A roncsolás befejezése után a keletkezett NH_4HSO_4 -ból, ill. az $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ból az ammóniát erős lúggal felszabadítjuk, majd ismert mennyiségű savba desztilláljuk át. A savfölösleget lúggal visszatitráljuk. Eközben a kénsav bomlásakor ($\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{SO}_2 + \text{O}$) keletkezett atomos oxigén a szén CO_2 -dá oxidálja. Aminosavak esetén a reakció a következőképpen általánosítható:



Roncsolás: A tömény kénsavas roncsolást katalizátorok (CuSO_4 , Se) és forráspontnövelő anyagok (K_2SO_4) jelenlétében végezzük. Hosszú nyakú, 250-500 cm^3 -es Kjeldahl-lombikba visszaméréssel bemérünk 0,15-0,20 g fehérjét tartalmazó szerves anyagot. A lombik nyakára tapadt anyagot kb. 8 g finoman aprított K_2SO_4 -tal



2. 10. ábra. A Kjeltec-nitrogénelemző ammóniadesztilláló része különböző nagyításban. Az ábrán felül az ammónia vízgőzdesztillációja, alul pedig az átdesztillált ammónia meghatározása látható

és 20 cm^3 (NH_3 -mentes) koncentrált H_2SO_4 -val a lombikba öblítjük. Ha a roncsolható anyag 1 g-nál több szárazanyagot tartalmaz, úgy minden további 1 g szárazanyagra 5 cm^3 koncentrált H_2SO_4 -at adunk még hozzá. A roncsolás gyorsítására 1 g finoman elporított kristályos CuSO_4 -ot (vagy 0,05 g elporított Se-t) és a forrás közben esetleg beálló felhabzás megakadályozására egy kis üveggyöngyöt adunk a lombikba. A lombikot fülkében ferdén állványba fogjuk, szájába kis tölcserít teszünk, majd kis lánggal melegíteni kezdjük. Miután az anyag habzása gyengül, a lángot erősítjük, de vigyázzunk arra, hogy a láng ne melegítse a lombik oldalát. A lángot úgy szabályozzuk, hogy a kénsav enyhén forrjon, és a kénsavgőzök a lombik nyakában, illetve a tölcserén kondenzáljanak. A lombik tartalma először szenedés folytán rendszerint megsötétedik, majd kb. 1-2 óra múlva kitisztul és világossárga lesz. A lombik nyakára tapadt elszenesedett részeket lóbálással a kénsavba öblítjük. A kénsav forralását a folyadék kitisztulása után még 20 percig folytatjuk. Ha roncsolás közben a kénsav mennyisége túlságosan csökkenne, az elpárolgott mennyiséget pótoljuk.

Desztillálás: Az ammónia desztillálását az ábrán látható speciális eszközzel, az ún. Parnas-féle ammóniadesztilláló berendezéssel vegezzük. A desztillátum

felfogására egy 200 cm³-es Erlenmeyer-lombikot használunk, amibe 25,0 cm³ 0,1 M HCl-at pipetázunk. Az átdesztilláló ammóniát 0,1 M HCl helyett bórsavban is felfoghatjuk. A bórsav annyira gyenge sav, hogy metilnarancsra vagy metilvörösre hatástalan, az átdesztillált ammóniát tehát 0,1 M HCl-val közvetlenül megtitrálhatjuk. E módszernek az az előnye, hogy a meghatározáshoz egy mérőoldat is elegendő. Hogy a bórsav az ammóniát tökéletesen megkösse, nagy feleslegben kell alkalmaznunk. Szedőnek desztillált vizet használunk, melybe annyi bórsavat teszünk, amennyit a víz és a desztillátum fel tud oldani.

A savfölszelet metilvörös vagy metilvörös-metilénkék keverékindikátor jelenlétében karbonátmentes 0,1 M NaOH-dal visszatitráljuk, a bórsavban elnyeletett ammóniát pedig 0,1 M HCl-val határozzuk meg. A roncsolásnál, valamint a desztillálásnál alkalmazott kémszereknek ammóniamentesnek kell lenniük. Célszerű az alkalmazott kémszerekkel vakpróbát végezni, és az erre fogyott sósavmennyiséget korrekcióba venni. A 0,1 M HCl minden cm³-e 1,401 mg N-t mér. A N·6,25 szorzat a vizsgált anyag fehérjetartalmát adja. A 2.10. ábrán a Kjeltac 2400 automata nitrogénelemző ammóniadesztilláló egysége látható különböző nagyításban.

2.2.8. Nitrátmeghatározás

A nitrátok fejlődő hidrogén hatására ammóniává redukálódnak:



Ha a redukción savanyú közegben végezzük, az ammónia a sav fölszégével ammóniumsóvá alakul. Az oldatból az ammónia erős lúggal felszabadítható. Lúgos közegben végzett redukción alkalmával a redukción és a desztilláción egyszerre végezhető.

Nitrátmeghatározás savanyú redukciónal. A nitráttartalmú anyagot kénsavas közegben vasporral ammóniává redukáljuk, és meglúgosítás után a keletkezett ammóniát ismert mennyiségű sósavba desztilláljuk. A kémszerek, különösen a vas nitrogéntartalma miatt vakpróbát is kell végeznünk. Ha a meghatározandó anyag jelentős mennyiségű nitritet tartalmaz, a redukción lúgos, illetve semleges közegben kell végeznünk, vagy pedig a nitritet KMnO₄-tal előzetesen nitráttá kell oxidálni. E célból az 5 cm³ 1:2 arányban hígított H₂SO₄-val megsavanyított próbához fölös mennyiségben KMnO₄-ot adunk és 40 °C-ra melegítjük. A meghatározást az alábbiak szerint végezzük.

Meghatározás: Analitikai mérlegben lemérünk 1,2-1,5 g KNO₃-ot vagy ennek megfelelő mennyiségű vizsgálandó anyagot, és mérőlombikban pontosan 100 cm³-re oldjuk. Az oldat 10,0 cm³-es részletét 250 cm³-es Kjeldahl-lombikba pipetázunk, hozzáadunk 3 g vasport, 10 cm³ 1:2 arányban hígított kénsavat és egy üvegyöngyöt. A függőlegesen állványba fogott lombik nyakába vízzel töltött

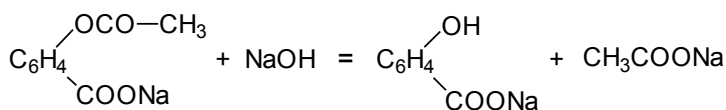
és beforrasztott csövű tölcsért illesztünk. A lombik tartalmát kezdetben óvatosan melegítjük, majd kb. 5 perc múlva forrásba hozzuk. 30 perc múlva a redukció befejeződik. Ekkor a tölcsért és a lombik nyakát leöblítjük, és a lombik tartalmát 100-150 cm³-re hígítjuk. A desztillációt és a titrálást a Kjeldahl-féle ammóniameghatározásnál ismertetett módon végezzük.

Nitrátmeghatározás lúgos redukcióval. E módszerrel egy munkamenetben nemcsak a nitrátok, hanem a nitritek nitrogéntartalma is meghatározható. Ha a meghatározandó anyag ammóniumsókat is tartalmaz, akkor külön próbában lúgos desztillációval meghatározzuk az ammóniatartalmat, és az eredményt levonjuk a redukciós desztillációval kapott nitrogéntartalomból.

Meghatározás: 250-500 cm³-es Kjeldahl-lombikba visszaméréssel bemérünk 0,12-0,15 g KNO₃-ot. 100 cm³ vízben oldjuk, majd két g finoman elporított Dewarda-ötvozetet (50% Cu, 5% Zn, 45% Al) adunk hozzá. A lombikba egy üvegyöngyszemet adunk, és a lombikot desztillációs berendezéssel kötjük össze. Szedőnek 200 cm³-es Erlenmeyer-lombikot használunk, melybe 20,0 cm³ 0,1 M HCl-at pipettázunk. 50-60 cm³ kb. 2 M NaOH-ot csepegtetünk a lombikba, majd enyhe melegítéssel megindítjuk a redukciót. Ha a gázfejlődés túlságosan erős, a lángot kissé gyengítjük; kb. 1 óra múlva a redukció befejeződik. Ekkor a folyadék 1/3 részét ledesztilláljuk. A szedőben levő savat metilvörös-indikátor jelenlétében 0,1 M karbonátmentes NaOH-dal visszatitráljuk. Vakpróbával megállapítjuk az alkalmazott vegyszerek ammóniatartalmát, és a lúgfogyásnál korrekcióba vesszük. 1 cm³ 0,1 M HCl 6,2008 mg nitrátot mér.

2.2.9. Acetilszalicilsav (aszpirin) meghatározása

Az acetilszalicilsav egyidejűleg sav is és észter is. A régebbi vagy nedvesen tárolt készítmény csekély fokú bomlás folytán gyakran tartalmaz kevés szabad ecetsavat és szalicilsavat. Ha tehát az ilyen készítményt közvetlenül megtitráljuk lúggal, nem a valódi acetilszalicilsav-tartalmat kapjuk. Ha azonban a semlegesre titrált készítményt további lúgfölösleg mellett melegen elszappanosítjuk, úgy minden mól acetilszalicilsavra 1 mól lúg fogy:



A teljesen tiszta acetilszalicilsav esetében az első titrálásnál éppen annyi lúg fogy, mint az elszappanosításnál. Bomlott készítménynél az első titrálásnál több lúg fogy, mint a másodiknál, és a bomlás foka a két titrálásból kiszámítható.

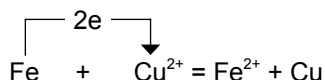
Meghatározás: Kb. 0,4 g acetilszalicilsavat 200 cm³-es, jó minőségű üvegből készült lombikba mérünk, 10 cm³ semlegesített alkoholban oldjuk, és fenolfta-

lein jelenlétében karbonátmentes 0,1 M NaOH-ot adunk hozzá. Nátronmeszes csővel bedugaszolt visszafolyó hűtőt erősítünk a lombik nyakára, és a folyadékot 5 percig forraljuk. Ezután a nátronmeszes csővel még mindig elzárt lombikot lehűtjük, és a lúgfölösleget 0,1 M HCl-val visszatitráljuk. Az elszappanosításra fogyott 0,1 M lúg minden cm^3 -e 18,015 mg acetilszalicilsavat mér.

2.3. Oxidációs és redukációs titrálási módszerek

2.3.1. Oxidáció-redukció

Elektrokémiai értelemben *oxidációnak* nevezzük azokat a folyamatokat, amelyek során valamely ion vagy atom elektronokat veszít, vagyis pozitív töltéseinek száma nő. Ezzel szemben *redukciós* folyamatoknak nevezzük azokat a folyamatokat, amelyekben valamelyik ion vagy atom elektronokat vesz fel, vagyis pozitív töltéseinek száma csökken. Minden oxidáció redukcióval kapcsolatos; ha tehát egy atom vagy ion elektronokat ad le (oxidálódik), az elektront egy másik atomnak vagy ionnak szükségképpen fel kell vennie (redukálnia kell). Egy atom vagy ion oxidálhatóságának, illetve redukálhatóságának mértéke annak elektronaffinitása. Minél nagyobb ugyanis egy atom vagy ion elektronaffinitása, annál könnyebben egyesül az elektronnal, vagyis annál könnyebben redukálható; viszont minél lazábban van megkötve az elektron az illető atomban vagy ionban, annál könnyebben le tudja azt adni, vagyis annál könnyebben oxidálódik. Ha például egy vasdarabot Cu^{2+} -ionokat tartalmazó oldatba mártunk, a vas felületére fém-réz válik ki, miközben a vas Fe^{2+} -ionok alakjában oldatba megy:



A fém-vas tehát oxidálódik, míg a Cu^{2+} -ionok redukálódnak. A folyamatot két részfolyamatra bonthatjuk:



2.3.2. Redoxindikátorok

Az oxidációs-redukációs titrálásoknál, mint minden térfogatós módszernél, fontos, hogy a titrálás végpontját pontosan meg tudjuk állapítani. Ezért alkalmazzák

már régóta oxidimetriás mérőoldatnak a KMnO_4 -ot (permanganometria) és a KI-os I_2 -oldatot (jodometria), redukálószernek pedig a KI megsavanyított oldatát. A KMnO_4 legkisebb fölöslege ugyanis könnyen fölösmerhető intenzív színéről, míg az elemi I_2 keményítőoldattal könnyen jelezhető. Más oxidáló- és redukálóanyagokkal a meghatározást gyakran közvetett módon végezzük, vagyis a kémszert főlélegben alkalmazzuk, és a fölösleget jodometriásan vagy permanganometriásan visszamérjük. Ismerünk azonban olyan redoxindikátorokat is, melyeknek színátcsapása határozott redoxpotenciálnál következik be, anélkül, hogy valamelyik kémszerre specifikus lenne.

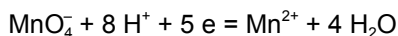
A KMnO_4 láthatósági határa: Ha valamilyen színtelen oldatot 0,1 M KMnO_4 -oldattal titrálunk, a mérőoldat fölöslegét akkor vesszük észre, ha 100 cm^3 folyadékra számítva $0,02 \text{ cm}^3$ 0,1 M KMnO_4 -tal titrálunk. Ez a mérőoldat-mennyiség még éppen a büretta leolvasási hibájával azonos nagyságrendű, és így elhanyagolható. Ha azonban a titrálást nagyobb térfogatban vagy hígabb mérőoldattal végezzük, meg kell állapítanunk az indikátorhibát. Ez úgy történik, hogy a megtitrált oldattal egyező térfogatú desztillált vízhez annyi KMnO_4 -mérőoldatot adunk, hogy színe a megtitrált oldat színével megegyezzen. E mérőoldat-mennyiséget a fogyásból levonjuk.

2.3.3. Permanganometria

A KMnO_4 erősen savanyú közegben erősen oxidál, miközben mangán(II)-sóvá redukálódik. Az MnO_4^- -ion ugyanis öt elektront vesz fel, miközben a benne levő VII-vegyértékű mangán II-vegyértékűvé redukálódik. Mondhatjuk azt is, hogy a két molekulatömegnyi KMnO_4 öt oxigént fordít oxidációra:

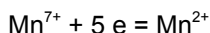


Vagy ioneqyenletben:



Redoxpotenciálja erősen kénsavas oldatban $\epsilon^\circ = +1,52 \text{ V}$.

A reakció lényege tehát:

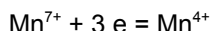
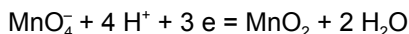


A reakcióegyenletekből látható, hogy a permanganát oxidáló hatása nagymértékben függ az oldat hidrogénion-koncentrációjától.

Gyengén savanyú vagy gyengén lúgos közegben a KMnO_4 csak három oxigént fordít oxidációra:



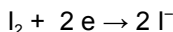
Ionegyenletben:



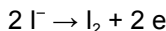
Ha azt akarjuk, hogy a reakció egyértelműen folyjék le, nagy savfölségről kell gondoskodnunk. A permanganáttal való titrálásnál külön indikátort nem kell használnunk, mert a mérőoldat csekély fölsége is felismerhető az oldat gyenge ibolyaszínéről.

2.3.4. Jodometria

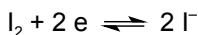
A jodometria sokoldalúsága egyrészt az elemi jód oxidáló hatásán, másrészt a jodidion redukálóképességén alapszik. Redukálóanyagok az elemi jódnak elektronokat adnak át, miközben jodidionok keletkeznek:



Erősen oxidálóanyagok semleges vagy savanyú közegben a jodidionoktól elektronokat vonnak el, és elemi jódot tesznek szabaddá:



A jódnak jodidionná való átalakulása tehát megfordítható folyamat, és így a két egyenlet összevonható:



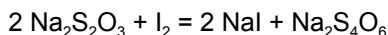
Hogy melyik irányba tolódik el a jodid–jód rendszer egyensúlya, attól függ, hogy milyen a reakcióban részt vevő anyagok redoxpotenciálja. A jodid–jód rendszer redoxpotenciálja (+0,62 V) körülbelül középre esik, és független az oldat hidrogénion-koncentrációjától. Az ennél nagyobb redoxpotenciálú anyagok tehát jodidion-tartalmú oldatból jódot tesznek szabaddá, a kisebb redoxpotenciálú anyagok pedig az elemi jódot színtelen jodidionná redukálják. Ha a reakció kvantitatív és elég gyors, a szabaddá tett jód mennyiségéből, illetve az anyag jód fogyasztásából megállapítható ennek mennyisége.

A jodometriás módszereket tehát két csoportba oszthatjuk: **Redukáló** (a jód–jodid rendszernél kisebb redoxpotenciálú) **anyagokat** ismert titerű jódoldattal titrálunk (**jodimetria**). Az eredetileg barna színű jódoldat (mely a jód oldatban tartására KI-ot is tartalmaz) a titrálás folyamán elszíntelenedik, és a reakció vég-

pontját arról ismerhetjük fel, hogy a mérőoldat kis feleslegétől az oldat borsárga színű lesz. A végpont észlelését keményítőindikátorral érzékenyebbé tehetjük.

Oxidáló (a jód–jodid rendszerénél nagyobb redoxpotenciálú) **anyagokat** úgy határozhatunk meg, hogy KI-ot vagy NaI-ot adunk hozzá, amikor az oxidáló- anyaggal ekvivalens mennyiségű jód válik szabaddá. Ezt valamilyen alkalmas redukálószer pontosan beállított oldatával megtitráljuk (ez a **jodometria**). Az oldatban levő elemi jód meghatározására a nátrium-tioszulfát oldatát használjuk.

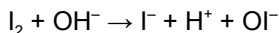
A **nátrium-tioszulfát** ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) semleges vagy savanyú közegben a következő egyenlet szerint hat a jódra:



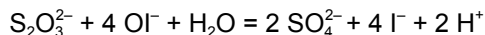
A jód tehát a tiokénsavat tetrationsavvá oxidálja. A jódnak az egyenlet szerinti redukciója csak semleges vagy gyengén savanyú közegben megy végbe kvantitatíve. Savas közegben a tioszulfátionon oxidálóanyagokra rendkívül érzékeny SH-csoport alakul ki, mely a I_2 -nak könnyen átadja hidrogénjét, és a keletkező szabad gyökök párosával egyesülnek tetrationsát-ionokká. A különben irreverzibilis folyamat standard redoxpotenciálja $\text{pH} = 2\text{--}10$ között:

$$\varepsilon^\circ = +0,25 \text{ V.}$$

Ha a titrálendő jóddoldat többé-kevésbé lúgos, úgy a jód egy része hipojodit alakjában van jelen az oldatban:



A hipojodit oxigénje azonban a tiokénsavat már nem tetrationsavvá, hanem kénsavvá oxidálja:



Lúgos közegben tehát a jód sokkal kevesebb $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -ot fogyaszt, mint semleges vagy savanyú közegben. Ha tehát jóddoldatot tioszulfáttal akarunk titrálni, ügyelnünk kell arra, hogy az oldat pH-ja bizonyos maximális értéknél ne legyen nagyobb. E maximális pH-értékek különböző koncentrációjú jóddoldatokban a következők:

0,1 M I_2 oldatban $\text{pH max.} = 7,6$

0,01 M I_2 oldatban $\text{pH max.} = 6,5$

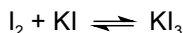
0,001 M I_2 oldatban $\text{pH max.} = 5,0$

Ha azonban a titrálást fordítva végezzük, vagyis lúgos $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oldatot titrálunk jóddoldattal, úgy a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oldatban levő OH^- -ionok zavaró hatása nem érvényesül, mivel a $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + \text{I}_2$ reakció sebessége nagyobb, mint a $\text{I}_2 + \text{OH}^-$ reakcióé.

Ha jodometriás titrálás után a tioszulfáttal megtitrált oldatot további analízisre akarjuk felhasználni, úgy tekintetbe kell venni, hogy az oldatban levő tetrationát bomlékony, és a bomlás termékei szintén fogyasztanak jódot. A titrálások végpontját a jóddoldat színének eltűnése jelzi. 0,1 M vagy ennél töményebb oldatban e szín eltűnése elég élesen észlelhető. Hígabb vagy színes oldatban célszerű keményítőt használni indikátorul.

2.3.4.1. Jodometriás indikátorok

A jodometriás titrálások végpontja felismerhető a jód színének első fellépéséről vagy eltűnéséről. A jodometriás titrálásokban szereplő jóddoldat elemi jód mellett KI-ot is tartalmaz, és így az oldatban mindig keletkezik komplex trijodidion (I_3), mely intenzív barna színű.



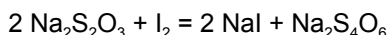
Ezért még az $5 \cdot 10^{-5}$ M KI-os I_2 -oldat is észrevehetően sárga, és így 0,05 M vagy ennél töményebb oldatokkal való dolgozás esetén a reakció végpontja külön indikátor nélkül is észlelhető. Ha azonban hígabb vagy színes oldatban titrálunk, úgy célszerű keményítőoldatot használni indikátornak. Az elemi jód ugyanis a keményítővel intenzív kék színeződést ad, ami még igen híg oldatban is észrevehető. Így még 10^{-5} M koncentrációban is felismerhető a jód. A jódkeményítő láthatósági határa tehát jóval nagyobb, mint az elemi jódé. A gyakorlat szempontjából rendkívül fontos, hogy a jódkeményítő reakció érzékenysége csak jodidionok jelenlétében és hideg oldatban nagy. Jodidmentes vagy meleg oldatban a keményítő nem használható indikátornak. Legmegfelelőbb, ha az oldat $4 \cdot 10^{-5}$ M jodidionokra nézve. Ennél kisebb koncentráció mellett az érzékenység lényegesen csökken, míg a jodidkoncentráció növelése alig van befolyással az érzékenységre. Erős savak (HCl, H_2SO_4) és semleges sók az érzékenységet növelik, míg a vízben oldható szerves vegyületek nagy része (alkohol, glicerin, cukor) az érzékenységet csökkenti. Már 20% metil- vagy etil-alkohol jelenlétében a KI-os jód saját színe élénkebb, mint a jódkeményítőé. A keményítőt csak a titrálás végén adjuk az oldathoz, akkor, amikor a jód sárga színe már alig észrevehető. Töményebb jóddoldat ugyanis kicsapja a keményítőt. A keményítőoldat hosszabb állás után a penészcsírák elszaporodása folytán tönkremegy, ezért a keményítőindikátort vagy frissen kell készíteni, vagy konzerválószerrel (szalicilsav) kell tartóssá tenni. Ha 100 cm³ vízhez 5 cm³ keményítőindikátort és egy kis csepp 0,1 M I_2 -oldatot adunk, az oldatnak tiszta kék színt kell mutatnia. Ha az oldat ibolyás vagy vöröses színárnyalatot mutat, a keményítőindikátor nem használható.

Keményítőoldat készítése: Ha a keményítőoldatra csak ritkábban van szükségünk, akkor minden titráláshoz frissen készítjük. A késhegynyi (0,02-0,04 g) finoman elporított burgonyakeményítőt kémcsőben 3-5 cm³ vízzel alaposan ösz-

szerázzuk, hogy tejszerű folyadék álljon elő. Másik kémcsőbe kétharmadig vizet teszünk és felforraljuk. A keményítőtejet gyors mozdulattal a forró vízhez öntjük, és az oldatot még egyszer felforraljuk. A keményítő eközben elcsirizedik és az oldat kitisztul. A lehűlt oldatból egy titráláshoz 1-2 cm³-t használunk.

2.3.4.2. 0,1 M Na₂S₂O₃ mérőoldat

Vizes oldatban a Na₂S₂O₃ a következő egyenlet szerint reagál az elemi jódal:



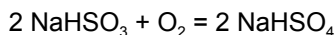
Eszerint egy atomtömegnyi mennyiségű jód a nátrium-tioszulfát molekulatömegnyi mennyiségével reagál (Na₂S₂O₃ · 5 H₂O = 248,20 g). A kristályvíztartalmú nátrium-tioszulfát 20 °C-on 23-69% nedvesség mellett tömegét nem változtatja, és összetétele megfelel a sztöchiometrikusnak. Annak ellenére, hogy a kereskedelemben analitikai célokra forgalomba hozott nátrium-tioszulfát igen tiszta, illetve a szennyezett készítmény többszöri átkristályosítással könnyen megtisztítható, mégsem készíthető belőle egyszeri beméréssel pontos mérőoldat, mert a desztillált vízben levő szén-sav a Na₂S₂O₃-ból tiokénsavat tesz szabaddá, ami ismert módon kénessavra és elemi kénre bomlik.



Ezek szerint a tioszulfát hatóértékének növekednie kellene, mivel a tioszulfátból keletkező biszulfit molekulánként két jódot fogyaszt:



Különösen régebbi tioszulfátoldatoknál tapasztalhatjuk, hogy az oldat hatóértéke kénkiválás közben csökken. Ez arra vezethető vissza, hogy a levegő CO₂-ja által a fentiek szerint szabaddá tett szulfít a levegő oxigénjének hatására lassan-ként szulfáttá oxidálódik:



A tioszulfátoldatban kénbacilusok szaporodhatnak el, melyek a tioszulfátnak szulfittá való bomlását és a szulfít oxidációját gyorsítják.

A koncentrációváltozás tehát részben kémiai, részben bakteriológiai eredetű. A kémiai eredetű bomlást lelassíthatjuk, ha megakadályozzuk az oldat gyors savanyodását. E célból kevés Na₂CO₃-ot adunk az oldathoz. A kénbaktériumok elszaporodását amil-alkohollal vagy izobutil-alkohollal lassítjuk. A koncentrációváltozás az első 8-14 napon jelentős, később a jól konzervált oldat hónapokon

keresztül tartja összetételét. A 0,01 M oldat eltarthatósága jóval kisebb, ezért nem készítünk nagyobb készletet belőle, hanem használat előtt a 0,1 M oldatból készítjük hígítással.

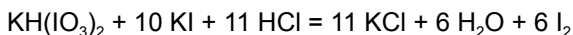
0,1 M Na₂S₂O₃-oldat készítése. A fentiek figyelembevételével a tioszulfát bemérését nem érdemes analitikai mérleggel végezni. Mivel az oldat hatóértéke idővel csökken, valamivel többet mérünk be, mint a relatív molekulatömeg tizedrésze. Jó táramérleggel vagy kézimérleggel lemérünk 25 g Na₂S₂O₃ · 5 H₂O-t, veszteség nélkül 1000 cm³-es mérőlombikba visszük, hozzáadunk kb. 0,2 g vízmentes Na₂CO₃-ot, 10 cm³ izobutil-alkoholt (vagy amil-alkoholt), és forralással CO₂-mentesített, majd gyorsan lehűtött desztillált vízzel jelig feltöltjük. Az oldat beállítását 2-3 napi állás után végezzük. Végleges hatóértékét 2 hét múlva állapítjuk meg. A kész oldatot krómkénsavval, vízzel és a mérőoldattal kiöblített üveg dugós üvegben, lehetőleg sötét helyen tartjuk. Ha az oldat az idők folyamán megromlott, amit a sok kén kiválásáról ismerünk fel, az oldatot kiöntjük, és az üveget krómkénsavval kitisztítjuk.

A 0,1 M Na₂S₂O₃ mérőoldat beállítása történhet szilárd jódra, kálium-bijodátra [KH(IO₃)₂], kálium-jodátra (KIO₃), kálium-bromátra (KBrO₃) vagy kálium-pirokromátra (K₂Cr₂O₇).

Beállítás szín-jódra: Kis átmérőjű, jól záró üveg dugós edénykébe bemérünk 0,25-0,30 g jódot. A lemérés után az edény fedelét csak pillanatokra megnyitva 2-3 g finoman porított, tiszta KI-ot és 0,5 cm³ vizet adunk hozzá. A koncentrált KI-oldatban a I₂ gyorsan feloldódik. Teljes feloldódás után 20 cm³ desztillált vizet adunk hozzá, majd az így kapott I₂-oldatot a beállítandó 0,1 M Na₂S₂O₃-oldattal megtitráljuk. A titrálás végpontjának jelzésére keményítőindikátort használunk, amit közvetlenül a végpont előtt adunk az oldathoz. A 0,1 M Na₂S₂O₃-oldat pontos koncentrációját 3-4 titrálás középértékéből állapítjuk meg. Ha B g jódra A cm³ 0,1 M Na₂S₂O₃-oldat fogyott, akkor az oldat pontos koncentrációja:

$$\frac{B}{A \cdot 0,12692}$$

Beállítás KH(IO₃)₂-ra: A KH(IO₃)₂ savanyú közegben a KI-ből I₂-ot tesz szabaddá:



A KH(IO₃)₂ egyenértéktömege a molekulatömeg 1/12-ed részével egyenlő:

$$1/12 \text{KH}(\text{IO}_3)_2 = 32,495 \text{ g}$$

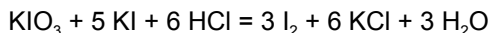
A KH(IO₃)₂ tisztán előállítható, kristályvizet nem tartalmaz, nem higroszkópos és 100 °C-nál nem magasabb hőmérsékleten 2 óra hosszat (vagy exsikkátorban 24 óra hosszat) szárítva, összetétele pontosan megfelel képletének. A nem

megbízható készítményt célszerű forró vízből néhányszor átkristályosítani. A $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ -nak mint beállítóanyagnak hátránya, hogy egyenértéktömege kicsi, és így a tömegmérés hibája erősen befolyásolja a koncentrációbeállítás pontosságát. E hibán úgy segíthetünk, hogy nagyobb beméréssel törzsoldatot készítünk belőle.

500 cm³ $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ beállítóoldat előállításához bemérünk analitikai mérleggel 1,6248 g szárított szilárd $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ -ot, veszteség nélkül 500 cm³-es mérőlombikba mossuk, majd teljes feloldódás után vízzel jelig töltjük. Alapos összerázás után az oldat 20,0 cm³-es részletét titrálólombikba pipetázzuk, 0,5-1,0 g KI-ot adunk hozzá, 10 cm³ 10%-os HCl-val megsavanyítjuk, és 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -tal borsárga színig titráljuk. 2–3 cm³ keményítőoldat hozzáadása után éppen színtelenre titráljuk. A tioszulfát koncentrációját három mérés középértékéből határozzuk meg. Ha a titráláshoz A cm³ fogyott, akkor az oldat pontos koncentrációja:

$$\frac{2,0}{A}$$

Beállítás KIO_3 -ra: A KIO_3 savanyú közegben KI-oldattal a $\text{KH}(\text{IO}_3)_2$ -hoz hasonlóan reagál, miközben egy molekulatömegnyi mennyisége három molekula jódot szabadít fel.



A KIO_3 egyenértéktömege a molekulatömeg hatodrésszével egyenlő:

$$1/6 \text{KIO}_3 = 35,669 \text{ g.}$$

Viszonylagosan alacsony egyenértéktömege miatt célszerűbb a KIO_3 -ból is pontos oldatot készíteni a tioszulfát beállításához, mégpedig úgy, hogy 1,7835 g KIO_3 -ot 500,0 cm³-re oldunk. Az oldat 20,0 cm³-éhez 0,8-1,0 g KI-ot adunk, sósavval vagy kénsavval megsavanyítjuk, és a beállítandó 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oldattal megtitráljuk. A végpont jelzésére keményítőoldatot használunk. A tioszulfát koncentrációját 3-4 titrálás középértékéből számítjuk. Ha a titráláshoz A cm³ tioszulfát fogyott, akkor az oldat koncentrációja:

$$\frac{2,0}{A}$$

Beállítás 0,1 M KBrO_3 oldatra: A KBrO_3 a megsavanyított KI-oldatra a KIO_3 -hoz hasonlóan hat, vagyis a molekulatömegnyi KBrO_3 három molekula jódot tesz szabaddá.

2.3.4.3. 0,1 M I₂ mérőoldat

A szín-jód vízben csak csekély mértékben oldódik, ezért 0,1 M oldat közvetlenül nem készíthető belőle. Jól oldódik azonban KI fölöslegében, amivel részben káliumtrijodiddá (KI₃) alakul:



Ha az oldatot olyan redukálóanyaggal hozzuk össze, amely jódot fogyaszt, a fenti egyensúly az alsó nyíl irányába eltolódik, és ugyanannyi jód szabadul fel, mint amennyit feloldottunk. A KI a jód gőznyomását is csökkenti, és így az üveg dugós üvegben, sötét helyen tartott KI-os I₂-oldat sokáig megtartja koncentrációját.

A jód atomtömege: I = 126,920 g. A tiszta jódból pontos beméréssel teljesen pontos mérőoldat készíthető, melynek koncentrációbeállítása fölösleges. Üveg dugós mérőedénykében lemérünk pontosan 12,692 g tisztított és elporított jódot, veszteség nélkül 1000 cm³-es mérőlombikba rázzuk, amibe előzetesen táramérlegesen 25 g jódmentes KI-ot mértünk. Ezután 30-35 cm³ desztillált vizet öntünk a lombikba, és addig rázogatójuk, míg a jód teljesen feloldódik. A kapott tömény jóddoldatot csak akkor hígítjuk fel, mikor már a jód utolsó nyomai is feloldódtak, mert a hígítást idő előtt végezve, a fel nem oldódott jódrészecskék csak napok múlva oldódnak fel. Miután a lombikot desztillált vízzel jelig töltöttük, alaposan összerázzuk. Az oldat azonnal kész használatra, és sötét helyen, üveg dugós üvegben tartva, főleg ha dugóját kevésszer nyitogatjuk, sokáig változatlanul eltartható.

0,1 M I₂ oldat beállítása 0,1 M Na₂S₂O₃-ra: A beállítandó J₂ oldat 20,0 cm³-ét titrálólombikban levő 30 cm³ vízhez pipettázzuk, és pontosan beállított 0,1 M Na₂S₂O₃-tal megtitráljuk. Ha e célra A cm³ 0,1 M Na₂S₂O₃ fogyott, akkor 0,1 M I₂-oldat pontos koncentrációja:

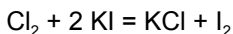
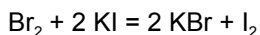
$$\frac{A}{200}$$

2.3.4.4. Oxidálóanyagok által szabaddá tett jód mérése

2.3.4.4.1. Szabad halogének meghatározása

Jód: Az elemi jód KI-oldatban feloldva tioszulfáttal közvetlenül megtitrálható. A végpont jelzésére keményítőindikátort használunk. Kloroformban, szén-tetrakloridban stb. oldott jódot úgy határozunk meg, hogy kb. négyszeres mennyiségű híg KI-oldattal összerázzuk, és ismételt rázogatózás közben addig titráljuk, míg a kloroformos fázis éppen elszíntelenedik.

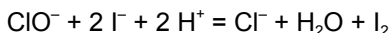
Bróm és klór: E két halogén közvetlenül nem titrálható tioszulfáttal, mivel ezt majdnem kvantitatíve szulfáttá oxidálják. Ha azonban e halogének vizes oldatához fölös mennyiségben KI-ot adunk, ekvivalens mennyiségű jódot válik ki, ami tioszulfáttal titrálható.



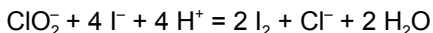
A klór és bróm vizes oldatban is elég illékony, és kényelmesen pipettázni sem lehet, célszerű tehát a bemérést tömeg szerint végezni, úgy, hogy a jó táramérlegesen üveg dugós lombikban kitaráljuk 1 g KI-nak néhány cm^3 vízzel készült oldatát, azután hozzáöntjük a kívánt mennyiségű klóros vizet vagy brómos vizet, és újra megmérjük. A kivált jódot 0,1 M tioszulfáttal megtitráljuk. Indikátornak keményítőt használunk. A telített klóros vízből kb. 15 g-ot, a telített brómos vízből pedig kb. 5 g-ot mérünk be. 1 cm^3 0,1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ megfelel 3,5457 mg klórnak, illetve 7,9916 mg brómnak.

2.3.4.4.2. Hipokloritok meghatározása

Savanyú közegben KI-oldattal a hipokloritok a következő egyenlet szerint reagálnak:



A kivált jódot tioszulfáttal megtitrálható. Régebbi hipoklorit-oldatoknál vagy nyirkos klóros mésznél gyakran tapasztalhatjuk, hogy híg kénsavval vagy sósavval való savanyítás után nagyobb fogyást kapunk, mint ha a savanyítást ecetsavval végeztük volna. Ennek az az oka, hogy a hipokloritok vízzel lassanként kloritokká alakulnak. A kloritok ecetsavas közegben csak igen lassan reagálnak KI-dal, míg ásványi savak jelenlétében az átalakulás néhány perc alatt teljessé válik:



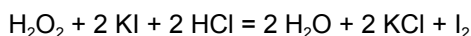
Tiszta hipokloritok tehát ecetsav és kénsav jelenlétében ugyanannyi jódot tesznek szabaddá. Ha ecetsavval való savanyítás után azonnal végezzük a titrálást, csak a hipokloritokat mérjük, ha pedig híg kénsavval vagy sósavval való savanyítás után 2-3 perc múlva titrálunk, a (hipoklorit + klorit)-tartalmat mérjük. Ha a gyakorlatban fehéritésre használt hipokloritok aktív klórtartalmát akarjuk meghatározni, a savanyítást ásványi savakkal végezzük, mivel a klorittartalom is fehéritőleg hat. A kiválasztott jóddal ekvivalens klór adja az oldat aktívklór-tartalmát.

Klóros mész aktívklór-tartalma: Üveg dugós bemérőedénykében lemérünk pontosan 5 g klóros meszet, és 5 cm^3 vízzel porcelánmozsárban addig dörzsöljük,

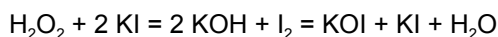
míg homogén pépet nem kapunk. Az elegyet veszteség nélkül 500 cm³-es mérőlombikba öblítjük, vízzel jelig töltjük és alaposan összerázzuk. A homogén oldatból 50,0 cm³-t titrálólombikba pipettázunk, 1-1,5 g KI-ot adunk hozzá, 30 cm³ 10%-os H₂SO₄-val (vagy HCl-val) megsavanyítjuk, és 2 percnyi várakozás után a kivált jódot 0,1 M Na₂S₂O₃-tal megtitráljuk. Indikátornak keményítőt használunk. 1 cm³ 0,1 M Na₂S₂O₃-nak megfelel 3,5457 mg klór. Az eredményt az eredeti anyag százalékos aktívklór-tartalmára számítjuk át.

2.3.4.4.3. Hidrogén-peroxid meghatározása

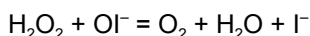
A hidrogén-peroxid savanyú közegben KI-ból jódot választ ki:



Az átalakulás lassan megy végbe, úgyhogy a titrálás előtt az elegyet legalább fél óra hosszat állni hagyjuk. A molibdénsav a reakcióra katalizátorként hat, és így ennek jelenlétében a titrálás minden várakozás nélkül azonnal elvégezhető. Igen fontos, hogy a hidrogén-peroxidot a KI hozzáadása előtt savanyítsuk meg, mert ellenkező esetben reprodukálhatatlan eredményeket kapunk. A



reakció szerint ugyanis hipojodit keletkezik, ami a még változatlan H₂O₂-ot elbontja:



Meghatározás: 1 g tömény (30%-os) vagy 10 g hígított (3%-os) hidrogén-peroxidot 100 cm³-es mérőlombikba mérünk, vízzel jelig töltjük, majd összerázzuk után a törzsoldatból 10,0 cm³-t üveg dugós lombikba (jódszámlombik) mérünk. Az oldatot 10 cm³ 10%-os kénsavval megsavanyítjuk, 1 g KI-ot és három csepp 1 M ammónium-molibdátot adunk hozzá, és 0,1 M Na₂S₂O₃-tal megtitráljuk. 1 cm³ 0,1 M Na₂S₂O₃ megfelel 1,70081 mg H₂O₂-nak. Ha a meghatározást ammónium-molibdát katalizátor nélkül végezzük, a KI hozzáadása után legalább fél óráig ledugaszolva állni hagyjuk az elegyet.

2.3.4.4.4. Permanganátok jodometriás meghatározása

A permanganátok savanyú közegben KI-ból jódot tesznek szabaddá a következő egyenlet szerint:

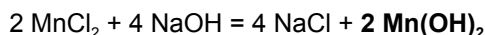


A felszabaduló jód tioszulfáttal megtitrálható. A titrálást permanganátoldatnak pontos tioszulfátra vagy tioszulfátoldatnak pontos permanganátoldatra való beállításánál használjuk. A módszert olyan redukálóanyagok meghatározásánál is értékesítjük, amelyeket permanganát fölöslegével oxidálunk. A fölös permanganátot jodometriásan mérhetjük vissza.

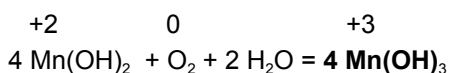
Meghatározás: 20,0 cm³ kb. 0,1 M KMnO₄-oldathoz 10 cm³ 10%-os H₂SO₄-at és 1 g KI-ot adunk, majd vízzel 50 cm³-re hígítjuk. A kivált jódot 0,1 M Na₂S₂O₃-tal megtitráljuk. 1 cm³ 0,1 M Na₂S₂O₃ megfelel 3,1605 mg KMnO₄-nak.

2.3.4.4.5. Vízben oldott oxigén meghatározása Winkler szerint

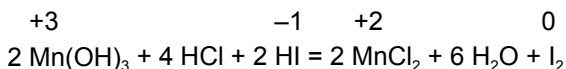
A vízben oldott oxigén jodometriás meghatározásának lényege az, hogy lúgos oldatban a mangán(II)-hidroxid az oldott oxigén hatására mangán(III)-hidroxiddá oxidálódik, ez pedig savanyítás után KI-ből az oxigénnel egyenértékű jódot tesz szabaddá, ami azután tioszulfáttal megtitrálható. Ha tehát az oldott oxigént tartalmazó vízhez mangán(II)só-oldatot és nátronlúgot adunk, először mangán(II)-hidroxid-csapadék keletkezik:



Ha a csapadék feleslegben van, az oldott oxigénnel egyenértékű része mangán(III)-hidroxiddá oxidálódik:



A lúgos, csapadékos oldatban KI-ot oldva és a folyadékot sósavval megsavanyítva a keletkező hidrogén-jodid a mangán(III)-hidroxidot mangán(II)sóvá redukálja, miközben jód válik ki:



A keletkezett szín-jód mennyisége tehát a mangán(III)-hidroxiddal egyenértékű.

Vegyszerek: 10 g tiszta, kristályos mangán(II)-kloridot (MnCl₂ · 4 H₂O) 20 cm³ desztillált vízben oldunk. 10 g tiszta, nitritmentes szilárd nátrium-hidroxidot 20 cm³ desztillált vízben oldunk. A meghatározást kb. 250 cm³-es jól záró, üveg-dugós kémszerüvegben végezzük, aminek dugóját célszerű ferdén lecsiszolni, hogy buborékmentesen tölthessük meg. A színültig töltött és bedugaszolt kémszerüvegbe férfő víz térfogatát pontosan ismernünk kell. Evégből táramérlegesen meghatározzuk az üres és száraz kémszerüveg tömegét dugóval együtt, majd desztill-

lált vízzel színültig töltjük, buborékmentesen ledugaszoljuk, szárazra töröljük és tömegét megmérjük. A többlet a palackba férő víz tömege.

Meghatározás: Az ismert térfogatú mintavevő üveget fenékgig érő üvegcsövön keresztül megtöltjük a vizsgálandó vízzel úgy, hogy a víz legalább háromszor kicserélődjék benne. Ha valamilyen állóvíz vagy folyóvíz meghatározott mélységéből kell mintát venni, különleges mintavevő berendezéseket használunk, melyek a víz többszöri kicserélődését biztosítják. Csapból a mintát üvegcsővel felszerelt gumicsővel vesszük úgy, hogy a víz a mintavevő üvegig levegővel ne érintkezhessek. A teljesen megtöltött üvegbe hosszú és keskeny szárú, 1 cm^3 -es kétjelű pipetta segítségével 1 cm^3 lúgot, majd 1 cm^3 mangán(II)-kloridot rétegezzük az edény aljára úgy, hogy a pipetta hegye majdnem az üveg fenekéhez érjen. Az így kiszorított 2 cm^3 vizet utóbb a számításnál figyelembe vesszük, és levonjuk a megmintázott víz térfogatából. Ezután a palackot késedelem nélkül, óvatosan bedugaszoljuk, vigyázva, hogy légbuborék ne maradjon benne. Ezt könnyen elérhetjük, ha a dugót előzetesen megnedvesítjük. Ezután a palackot több ízben felfordítjuk, miközben dugóját leszorítva tartjuk. Ha a palack tartalma elegyedett, félretesszük, hogy a keletkezett pelyhes csapadék leülepedjék. Ha a leülepedett csapadék fölött levő folyadék barnás színű és nem teljesen tiszta, a palack tartalmát még néhányszor összerázzuk. Ha az elegyet szükségtelenül sokáig rázzuk, a csapadék pelyhességét elveszti, porszerű lesz és lassan ülepedik. Miután a csapadék leülepedett, hosszú szárú, vízzel nedvesített pipettával 5 cm^3 50 tömeg%-os kénsavat adunk hozzá. Az üveget újból lezárva, a folyadékot többszöri lóbálással elegyítjük. 1-2 perc múlva 0,5 g durván porított KI-ot adunk hozzá, elkeverjük, és a palack tartalmát nagyobb lombikba öblítjük át. A kivált jódot, indikátorul keményítőt használva, 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -oldattal megtitráljuk. 1 cm^3 0,01 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ megfelel 0,08 mg oxigénnek, illetve $0,056\text{ cm}^3$ normál állapotú oxigéngáznak. A kapott oxigéntartalmat 1 dm^3 vizsgálandó vízre számítjuk át. Az eredmény kiszámításánál a próbához adott nátrium-hidroxid- és mangán(II)-klorid-oldatok térfogatát (2 cm^3) levonjuk a palack térfogatából.

2.3.4.5. Jodometriás cukormeghatározás

Ha valamilyen redukálócukor oldatát **Fehling-oldattal** forraljuk, az oldatban lévő II-vegyértékű réz I-vegyértékűvé redukálódik, mely vörös színű réz(I)-oxid alakjában kicsapódik. (A Fehling-oldat nátronlúgos réz(II)-szulfát-oldat, amely a $\text{Cu}(\text{OH})_2$ oldatban tartására Seignette-sót tartalmaz.) A Fehling-oldat erősen lúgos kémhatása miatt a cukormolekula az oxidáción kívül hasadást is szenved, ezért a cukrok Fehling-oldat-fogyasztása nem sztöchiometrikus, hanem a cukor anyagi minőségén kívül az oldat lúgosságától, a hevítés idejétől és módjától, valamint a koncentrációtól is függ. Pontosan betartott kísérleti körülmények között azonban egy bizonyos cukorféleség meghatározott mennyisége mindig ugyanannyi Fehling-oldatot fogyaszt. A különböző cukrokra e fogyasztások táblázatba foglal-

hatók, melyeknek segítségével az ismeretlen koncentrációjú, de ismert minőségű cukrok százalékos cukortartalma meghatározható. A **Schoorl** által kidolgozott cukormeghatározási módszernél a különböző cukorféleségeket azonos koncentrációjú Fehling-oldattal és azonos munkamenetben redukáljuk. Schoorl pontosan bemért Fehling-oldattal dolgozik, és a redukció után megmaradt réz(II)-ionok mennyiségét jodometriásan határozza meg.

Schoorl A-oldat: 69,28 g kristályos réz(II)-szulfátot desztillált vízzel 1000 cm³-re oldunk. Schoorl B-oldat: 346 g Seignette-sót (K-Na-tartarát) és 100 g nátrium-hidroxidot vízzel 1000 cm³-re oldunk. A két oldatot külön edényben tartjuk el. A B-oldat tárolására szolgáló üveg dugós edény dugóját vazelinnal lehetőleg könnyen bekenve óvjuk meg a beragadástól.

Meghatározás: Jó minőségű üvegből készült 200-300 cm³-es Erlenmeyer-lombikba bemérünk 10,0 cm³ Schoorl A- és 10,0 cm³ Schoorl B-oldatot, hozzámérünk a meghatározandó cukoroldatból annyit, amennyi kb. 70-90 mg cukrot tartalmaz, és annyi vizet adunk hozzá, hogy az összes térfogat mindig 50 cm³ legyen. A lombikot olyan azbesztlapra állítjuk, melyen 6 cm átmérőjű kerek kivágása van, és jól szabályozható Bunsen-égővel forrásba hozzuk (a lángot úgy kell szabályozni, hogy a folyadék kb. 3 perc alatt forrásba jöjjön), majd pontosan 2 percig forraljuk (e forralási idő valamennyi cukornál, még a tejcukornál is elegendő). Forrás közben a lombik szájára kis tölcsezt rakunk, és a folyadékot csak kis lánggal melegítjük, hogy a folyadék térfogata bepárlódás folytán ne változzék lényegesen.

A lombik tartalmát ezután vízcsap alatt gyorsan lehűtjük. Ha a meghatározást jodometriásan akarjuk végezni, hozzáadunk 3 g KI-ot kevés (legfeljebb 10 cm³) vízben oldva, az oldatot 10 cm³ 25%-os kénsavval (1 térf. konc. H₂SO₄ + 6 térf. víz) megsavanyítjuk, és a kivált jódot 0,1 M Na₂S₂O₃-oldattal megtitráljuk, míg a csapadékos folyadék sárga színű nem lesz. Ekkor néhány cm³ keményítő-indikátort adunk hozzá és tovább titráljuk, míg a jódkeményítő kék színe éppen eltűnik, és a réz(I)jodid savósárga színe előtűnik. A jól megtitrált oldat színe néhány percig állandó marad.

Teljesen hasonló körülmények között a Schoorl-oldatokkal vakpróbát végzünk az oldatok koncentrációja megállapítására. A vakpróbát is forralni kell, mert cukor nélkül is redukálódik kevés két vegyértékű réz. Ha a vakpróbára fogyott tioszulfát térfogatából levonjuk a főkísérletnél fogyott tioszulfát térfogatát, megkapjuk a redukált réznek megfelelő tioszulfát térfogatát. Ebből a Schoorl-féle táblázat segítségével kiszámítjuk a keresett cukor mennyiségét.

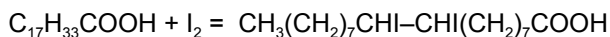
2.3.4.6. Zsírok és olajok jódszámának, illetve jód-brómszámának meghatározása

Az állati és növényi eredetű zsírok és olajok nagyobb szénatomszámú zsírsavak glicerinsztereinek elegyéből állnak, melyek rendszerint csekély mennyiségű szabad zsírsavakat és el nem szappanosítható, alkoholszerű vegyületeket tartalmaznak.

A glicerinnel észterezett zsírsavak közül leggyakoribbak a sztearinsav ($C_{17}H_{35}COOH$), a palmitinsav ($C_{15}H_{31}COOH$) és az olajsav ($C_{17}H_{33}COOH$), de ezeken kívül a linolsav ($C_{17}H_{31}COOH$), linolénsav ($C_{17}H_{29}COOH$), valamint csekélyebb mennyiségben a vajsav, valeriánsav, kapronsav, kaprilsav stb. glicerineszterei is előfordulnak a zsírokban és olajokban. Az észterek különböző keverési arányban képezik a természetes zsírok és olajok fő tömegét. A szilárd, konzisztens zsírokban a sztearinsavas és palmitinsavas glicerineszterek dominálnak, a félfolyékony zsírokban és az olajokban az olajsavas glicerineszterek képezik a fő tömeget, míg a száradó olajok fő alkotórészei a linolsavas és linolénsavas glicerineszterek. Az azonos eredetű zsírok és olajok összetétele az előállításuktól és tárolásuktól származó kis ingadozásokon belül eléggé állandó.

A telítetlen zsírsavak (olajsav, linolsav, linolénsav) és ezek glicerineszterei a molekulájukban levő kettős kötésekre halogént képesek addicionálni. A megkötött jód mennyiségét a *jódszámmal* jellemezzük. **A jódszám az a grammokban kifejezett jódmennyiség, amelyet 100 g zsír vagy olaj meghatározott kísérleti körülmények között megkötni képes.**

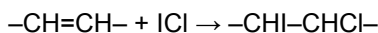
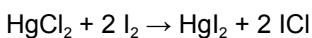
Ha az *egy telítetlen kettős kötést* tartalmazó olajsavra jód hat, a következő kémiai átalakulás megy végbe:



Egy molekulatömegnyi olajsav két atomtömegnyi jódot köt meg, egy molekulatömegnyi (kb. 884 g) olajsavas glicerineszter tehát hat atomtömegnyi ($6 \cdot 127$ g) jódot addicionál. 100 g olajsavas glicerineszterre eszerint 86,2 g jód esik. A tiszta olajsavas glicerineszter jódszáma tehát 86,2.

Hasonló módon számítva a *két telítetlen kettős kötést* tartalmazó linolsavas glicerineszter jódszáma tehát 173,6. A *három telítetlen kettős kötést* tartalmazó linolénsavas glicerineszter jódszáma 260 körül van. A palmitin- és sztearinsav jódszáma nulla, mivel telítetlen kettős kötést egyik sem tartalmaz. Ezek szerint a zsírok általában alacsonyabb jódszámúak, az olajok jódszáma közepes, a száradó olajoké pedig nagy.

A jódszám meghatározása: A jód önmagában csak lassan reagál a telítetlen zsírsavakat tartalmazó zsírokkal, illetve olajokkal, és a kapott termékek összetétele és a megkötött jód mennyisége is nagyon ingadozó. Nagyon jól reprodukálható, állandó értékeket kapunk azonban, ha a szén-tetrakloridban vagy kloroformban oldott zsírra olyan alkoholos jóddoldat hat, melyben két atom jódra számítva legalább egy molekula higany(II)-klorid is van oldva. A jód ugyanis a higany(II)-kloridból csekély mennyiségű klórt tesz szabaddá, ami a jód fölöslegével jód-kloridot alkot. Ez utóbbi azután a telítetlen zsírsavakban levő kettős kötéssel simán reagál:



Kellő várakozási idő betartása, valamint víz és KI hozzáadása után a jódfölösleg tioszulfát mérőoldattal visszatitrálható.

Alkoholos jóddoldat készítése: 25 g jódot 500 cm³ 95 térfogat%-os alkoholban oldunk. Üveg dugós edényben tartjuk.

Alkoholos higany(II)-klorid-oldat készítése: 30 g higany(II)-kloridot 500 cm³ 95 térfogat%-os alkoholban oldunk, ha szükséges, megsűrjünk, és üveg dugós edényben tartjuk. A két oldatot külön-külön tartjuk el. Használat előtt egyenlő térfogatukat elegyítjük.

Meghatározás: Szilárd zsírokból bemérünk 0,8-1,0 g-ot egy 250 cm³-es üveg dugós Erlenmeyer-lombikba (jód számlombik), hozzáadunk 15-20 cm³ tiszta széntetrakloridot, és hozzápipettázunk pontosan 30,0 cm³ alkoholos jód-higany(II)-klorid-oldatot. A lombikot megnedvesített dugóval bedugjuk. Ha a folyadék a kevergetéskor nem lesz teljesen tiszta, még kevés széntetrakloridot (kloroformot) adunk hozzá. A jódmennyiségnek annyinak kell lennie, hogy a reakció végén az oldat még barna színű legyen. A jódozás alatt az elegyet közvetlen napfénytől óvjuk. Célszerű a lombikot sötét helyen tartani. 2 óra alatt a reakció befejeződik. Ekkor az elegyhez 15 cm³ 10%-os KI-oldatot adunk, és 100 cm³ vízzel felhígítjuk. Ha vörös csapadék válik ki (HgI₂), a KI kevés volt, ilyenkor még utólag annyit teszünk hozzá, hogy a csapadék feloldódjék. Ezután gyakori rázogatas közben annyi 0,1 M Na₂S₂O₃-oldatot adunk hozzá, hogy a vizes folyadék és a széntetrakloridos fázis csak gyengén sárga színű legyen. Ekkor keményítőindikátort adunk az elegyhez, és alapos rázogatas közben színtelenre titráljuk.

Vakpróba: A főkísérlettel egyidejűleg zsír, illetőleg olaj nélkül az alkalmazott kémszerekkel vakpróbát végzünk, mellyel egyszersmind a jóddoldat koncentrációját is beállítjuk. A jóddoldat koncentrációja ugyanis idővel csökken. Száradó olajoknál a hosszú várakozási idő miatt a kísérlet elején és a kísérlet végén is végzünk vakpróbát. A két vakpróba középértékéből számítjuk a jóddoldat koncentrációját.

A vakpróbára és a főkísérletre fogyott 0,1 M Na₂S₂O₃ térfogatának különbsége a zsír, illetve olaj által elfogyasztott jóddal egyenértékű. 1 cm³ 0,1 M Na₂S₂O₃ megfelel 12,692 mg jódnak. A jódszámot megkapjuk, ha az elfogyott jód mg-okban kifejezett mennyiségének százszorosát osztjuk a bemért olaj vagy zsír mg-okban kifejezett mennyiségével.

2.4. Csapadékos titrálási módszerek

A csapadékos titrálási módszereknél a meghatározandó alkotórészt oly mérőoldattal titráljuk, ami azt oldhatatlan csapadék alakjában kiválasztja. A csapadék teljes leválasztásához szükséges mérőoldat térfogatából következtethetünk a meghatározandó alkotórész mennyiségére. Térfogatoss meghatározásra csak azok a csapadékos reakciók alkalmasak, amelyeknél a csapadék összetétele jól definiált, a reakció elég gyors, a kiváló csapadék oldhatósága elég kicsi, és a reakció végpontját jól tudjuk

észlelni. A végpont észlelésére a reakciók specifikus volta miatt nem használhatunk olyan általános indikátorokat, mint a neutralizációs vagy oxidimetriás meghatározásoknál tettük, hanem jóformán minden meghatározási módszernél külön indikátortípust kell alkalmazni. Számos egyértelműen lefolyó kvantitatív csapadékos reakciót nem tudunk térfogatos meghatározásra hasznosítani az indikátor hiánya miatt.

A csapadékos titrálások *ekvivalenciapontját* a kivált csapadék oldhatósági szorzata szabja meg. Ha ugyanis pl. AgNO_3 - és NaCl -oldat egyenértékű mennyiségét összeöntjük, a keletkező AgCl -csapadék felett lévő oldat a csapadék kismértékű oldhatósága miatt Ag^+ -ionokat és Cl^- -ionokat is tartalmaz. A tömeghatás törvénye értelmében ezek koncentrációiból alkotott szorzat, az *oldhatósági szorzat*, a koncentrációk abszolút értékétől független állandó szám.

$$[\text{Ag}^+] \cdot [\text{Cl}^-] = L = 10^{-10}$$

Az ekvivalenciapontban azonban az Ag^+ -ionok és Cl^- -ionok koncentrációja egymással is egyenlő, tehát

$$[\text{Ag}^+] = [\text{Cl}^-] = 10^{-5}$$

Az oldhatósági szorzat a tárgyalt egyszerű esetben formális analógiát mutat a víz ionszorzatával. Savak, illetve lúgok titrálásánál az ekvivalenciapontban az oldat hidrogén- és hidroxidion-koncentrációja egyenlő egymással és az ionszorzat négyzetgyökével. Az analógia teljesebbé válik, ha a pH fogalmához hasonlóan itt is bevezetjük az ionexponens (pI): Az ionexponens az ionkoncentráció tízes alapú negatív logaritmus.

$$\text{pAg} = -\log [\text{Ag}^+]; \quad \text{pCl} = -\log [\text{Cl}^-]$$

Az oldhatósági szorzat negatív logaritmusát véve, a következő kifejezést kapjuk:

$$\text{pAg} + \text{pCl} = -\log L \approx 10$$

Az ekvivalenciapontban pedig:

$$\text{pAg} = \text{pCl} = -1/2 \log L \approx 5$$

Ha tehát akár kloridionokat titrálunk AgNO_3 mérőoldattal, akár ezüstionokat NaCl mérőoldattal, a titrálást akkor kell befejeznünk, ha az oldat ionexponense ezen ionokra nézve öt. Hasonló körülmények között jodidionos oldatot titrálva AgNO_3 mérőoldattal az ekvivalenciapontban az ionexponensnek nyolcnak kell lennie, mivel az AgI oldhatósági szorzata:

$$L_{\text{AgI}} = 10^{-16}$$

2.4.1. Néhány módszer a csapadékos titrálások végpontjának jelzésére

Titrálások K_2CrO_4 -indikátorral Mohr szerint: Ha a titrálás folyamán kiváló csapadék fehér vagy csak gyengén színezett, a végpont jelzésére olyan indikátort használhatunk, ami a meghatározandó ionnal vagy lecsapószer fölöslegével élénk színű, nehezen oldható csapadékot ad. Példa erre a halogenidek argentometriás meghatározása K_2CrO_4 -indikátor jelenlétében Mohr szerint. Ha valamilyen klorid oldatát K_2CrO_4 jelenlétében titráljuk, úgy előbb AgCl válik ki, mivel ez oldhatatlanabb, mint az Ag_2CrO_4 . Ha azonban az oldatban levő összes kloridot lecsaptuk, az AgNO_3 első cseppjének fölöslegétől vörösbarna Ag_2CrO_4 csapadék válik le, amiről a titrálás végpontja észrevehető. A meghatározás természetesen csak semleges közegben sikerül, mert az Ag_2CrO_4 savanyú közegben feloldódik, míg lúgos közegben Ag_2O , esetleg Ag_2CO_3 keletkezik.

Titrálások vas(III)-só indikátorral Volhard szerint: A csapadékos titrálások végpontjának jelzésére olyan indikátort is használhatunk, ami a mérőoldat fölöslegével intenzív színű, oldható vegyületet alkot. Az indikátor színváltozásának természetesen itt is az ekvivalenciapont közelében kell bekövetkeznie. A Volhard-féle ezüsttitrálásoknál mérőoldatnak ammónium- vagy kálium-rodanidot használunk, míg a végpont jelzésére vas(III)-só-oldatot alkalmazunk. Ha ezüst-sóoldathoz vas(III)só jelenlétében rodanid mérőoldatot csepegtetünk, oldhatatlan ezüst-rodanid-csapadék keletkezik, amelynek oldhatósága oly kicsi ($L = 10^{-12}$), hogy az oldatban színes vas(III)-rodanid nem keletkezhet. Az ekvivalens mennyiségű rodanid hozzáadása után azonban az első csepp mérőoldat-fölöslegtől az oldat intenzív vörös színű lesz. Mivel az ezüst-rodanid oldhatóságát híg savak alig befolyásolják, valamint a vas(III)-rodanid is érzéketlen savakkal szemben, a Volhard-féle módszer a Mohr-félével ellentétben, savanyú közegben is alkalmazható.

Indikátornak vas(III)-ammónium-szulfát (vastimsó)-oldatot használunk, amit annyi híg salétromsavval savanyítunk meg, hogy az oldat barna színe világossárgára változzék (10 g vastimsót 80 cm³ vízben és 10 g 25%-os salétromsavban oldunk). 100 cm³ titrálendő oldatra 4-6 cm³ indikátort használunk. (Használhatjuk indikátornak a vastimsó telített oldatát is, amihez annyi salétromsavat adunk, hogy az oldat barna színe sárgára változzék. Az így kapott kb. 30%-os oldatból 100 cm³ titrálendő oldathoz 2 cm³-t adunk.)

2.4.2. 0,1 M NaCl mérőoldat készítése

A nátrium-klorid (egyenértéktömeg 58,454 g) tisztán előállítható, nem higroszkópos, összetétele megfelel a képletével kifejezett összetételnek, és a belőle készült oldat tetszés szerinti ideig, változás nélkül eltartható. A nátrium-klorid mérőoldat tehát kiválóan alkalmas ezüstionok pontos meghatározására, valamint ezüst-nit-

rát mérőoldat beállítására és ellenőrzésére. A sóból 1 dm^3 $0,1 \text{ M}$ mérőoldathoz $5,8454 \text{ g}$ -ot mérünk be, és vízzel $1000,0 \text{ cm}^3$ -re oldjuk.

2.4.3. $0,1 \text{ M AgNO}_3$ mérőoldat készítése

A finoman elporított, tiszta ezüst-nitrátot nagy óraüvegen vékony rétegben kiterítjük, és szárítószekrényben, pormentes helyen $130 \text{ }^\circ\text{C}$ -on 3-4 óra hosszat szárítjuk. Kihűlés után lemérünk belőle pontosan $16,9888 \text{ g}$ -ot, mérőlombikban 1000 cm^3 -re oldjuk. A portól és közvetlen napfénytől védett oldat csiszolt dugós üvegedényben tetszés szerinti ideig változatlanul eltartható. A kész oldatot $0,1 \text{ M NaCl}$ -ra állítjuk be.

A mérőoldat beállítása Mohr szerint: $20,0 \text{ cm}^3$ $0,1 \text{ M NaCl}$ -oldathoz 1 cm^3 K_2CrO_4 -indikátort adunk, és a beállítandó $0,1 \text{ M AgNO}_3$ mérőoldattal alapos rázogatás közben maradandó vörösbarna színeződésig titráljuk.

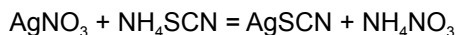
2.4.4. $0,1 \text{ M NH}_4\text{SCN}$ (KSCN)-oldat készítése és beállítása

A mérőoldat készítésénél úgy járunk el, hogy a molekulatömege $0,1$ részénél valamivel többet lemérünk táramérlegben [NH_4SCN -ből $8,50 \text{ g}$ -ot (molekulatömeg: $76,120 \text{ g}$); KSCN -ből $10,50 \text{ g}$ -ot (molekulatömeg: $97,176 \text{ g}$)], és 1 dm^3 -re vízzel oldjuk.

A mérőoldat beállítása: $20,0 \text{ cm}^3$ ismert koncentrációjú $0,1 \text{ M AgNO}_3$ -oldathoz 10 cm^3 10% -os HNO_3 -at és $2-4 \text{ cm}^3$ salétromsavas vas(III)-ammónium-szulfát indikátort adunk. A beállítandó $0,1 \text{ M}$ rodanidoldattal állandó rázogatás közben addig titráljuk, míg az oldat éppen észrevehetően vörösbarna lesz, és a színeződés újabb alapos összerázás után sem tűnik el.

2.4.5. Az ezüst csapadékös meghatározása

Volhard módszere: Az ezüstionokat tartalmazó salétromsavas oldatot vas(III)só indikátor jelenlétében ammónium-rodanid mérőoldattal addig titráljuk, míg alapos összerázás után a folyadék vas(III)-rodanid keletkezése folytán vörösbarna színű lesz.



A titrálandó oldat savtartalma tág határok között ingadozhat, azonban $0,3 \text{ M HNO}_3$ -nál ne tartalmazzon kevesebbet. A szokásos titrálási térfogatok mellett általában $10-20 \text{ cm}^3$ 2 M HNO_3 -val savanyítunk. A savanyításra használt salétromsavnak nitrogén-oxidokat nem szabad tartalmaznia, mert ezek az ammónium-rodanidot elroncsolják. Célszerű tehát az alkalmazott savat előzetesen kifőzni. A titrálás végpontja közelében a folyadékot igen erélyesen kell rázogatnunk, mert a kivált ezüst-rodanid csapadék jelentős mennyiségű ezüstöt köt meg adszorpció útján,

ami csak erős rázogatósra deszorbeálódik. Éppen ezért a titrálásokat célszerű jól záró üvegdugós edényben végezni.

A titrálás pontossága 0,1 M oldatok alkalmazása esetén, ha a titrálást alapos rázogatós közben fejezzük be, 0,01-0,02%. 1 cm³ 0,1 M NH₄SCN megfelel 10,788 mg ezüstnek.

2.4.6. Kloridionok meghatározása

Meghatározás Mohr szerint: A meghatározandó oldatnak semleges kémhatásúnak kell lennie, mert savanyú közegben a reakció végpontját jelző ezüst-kromát oldódik, lúgos közegben pedig ezüst-oxid, esetleg ezüst-karbonát válhat ki. Az oldat pH-jának 6,5–10,5 közé kell esni. Indikátornak 100 cm³ titrálendő oldatra 2 cm³ 5%-os semleges K₂CrO₄-oldatot használunk. Mivel az ezüst-kromát oldhatósága a hőmérséklettel nő, a titrálást csak szobahőmérsékletű oldatban végezhetjük.

Meghatározás: Kb. 0,07 g kloridiont tartalmazó semleges vagy semlegesített oldathoz 1 cm³ 5%-os K₂CrO₄-oldatot adunk, vízzel kb. 50 cm³-re hígítjuk, és 0,1 M AgNO₃-oldattal, állandó rázogatós közben, maradandó vörösbarna színeződésig titráljuk. 1 cm³ 0,1 M AgNO₃ megfelel 3,5457 mg Cl⁻-nak; 5,8454 mg NaCl-nak; 7,4553 mg KCl-nak, ill. 3,6465 mg HCl-nak. A titrálás pontossága ± 0,1 %.

Ivóvizek kloridtartalmának meghatározása: A vizsgálandó víznek mindenekelőtt neutrálsvórossal megállapítjuk a kémhatását. Ha az oldat savanyú (az indikátor vörös színt mutat), kevés KHCO₃-ot adunk hozzá, ha erősen szódatartalmú vízről van szó (szikes talajok vize), előbb néhány csepp HNO₃-val megsavanyítjuk, majd bikarbonáttal közömbösítjük. A vizsgálandó víz 100,0 cm³-ét 1-2 cm³ 5%-os K₂CrO₄ indikátor mellett 0,01 M AgNO₃-tal gyengén barnásvörös színűre titráljuk, majd az oldat térfogatát desztillált vízzel 150 cm³-re töltjük fel, és erélyes rázogatós közben végpontig titráljuk.

2.4.7. Jodidionok meghatározása

Titrálás indikátor nélkül: Híg jodidoldatoknak ezüst-nitrát mérőoldattal való titrálása alkalmával az oldatban levő fölös jodidionok peptizálólág hatnak a keletkező AgI-csapadékra, ezért az oldat tökéletes kitisztulása csak az ekvivalenciapontban következik be, amikor a jodidionok teljesen elfogynak az oldatból. A kitisztulási pontig való titrálás híg és tiszta jodidok oldatában igen pontos eredményeket ad. A kiindulási oldat jodidion-koncentrációja legfeljebb 0,04 M lehet.

Meghatározás: Kb. 0,25 g I⁻-ot tartalmazó tiszta jodidoldatot vízzel 60-70 cm³-re hígítunk és üvegdugós edényben, alapos rázogatós közben 0,1 M AgNO₃-oldattal óvatosan titráljuk. Az ekvivalenciapont elérése előtt kb. 1%-kal az AgI-csapadék koagulálni kezd, a fölötte levő folyadék azonban zavaros marad. Ettől kezdve cseppenként titráljuk tovább, minden csepp hozzáadása után alaposan

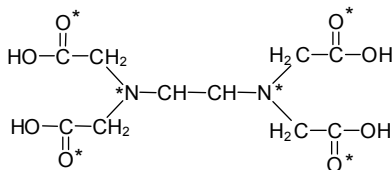
összerázva a folyadékot. Az ekvivalenciapontban a csapadék fölött levő folyadék hirtelen kitisztul. Tiszta, idegen sótól mentes jodidoldatban ily módon igen pontos eredményeket kapunk. Egy cm^3 0,1 M AgNO_3 -oldat megfelel 12,692 mg I^- -nak.

2.5. Komplex vegyületek képződésén alapuló módszerek

2.5.1. Komplexometria. Kelatometria

A komplexometria a mérendő komponensek és a komplexometriás reagensek között kellő stabilitással bíró komplexek kialakulásán alapszik. Szükséges, hogy a keletkező komplex nagy stabilitású legyen, ugyanis ettől függ a titrálási görbe meredeksége, azaz a titrálás végpontjának élessége. Lényeges, hogy a mérőoldat mennyisége a komplexképződésben részt vevő alkotórészrel a titrálás folyamán, illetőleg annak végpontjában sztöchiometriásan egyértelmű legyen, azaz a komplex a titráláskor sztöchiometriás összetételben keletkezzék, illetve a titrálás végpontjában sztöchiometriás összetételűvé válják. Lényeges még, hogy a titrálás végpontja jól észlelhető, lefutása pedig gyors legyen. A komplexek stabilitását a stabilitási állandóval, ami a disszociációállandó reciproka, illetőleg ennek logaritmusával jellemezzük. Vizes oldatokban mind az egyfunkciós, mind a többfunkciós ligandumokkal is stabil komplexeket képezhetünk, a többfunkciós ligandumokkal képzett komplexeket azonban nagyobb stabilitás jellemzi.

Az etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA) vízben kevésbé oldódó, négyértékű sav:



Ezért képletét rövidítve gyakran H_4Y -nal jelölik, ahol az Y^{4-} az etilén-diamin-tetraacetátion. A savas hidrogének közül kettő könnyen, kettő pedig nehezen disszociál (az egyes savexponensek értéke: $\text{pK}_1 = 2,0$; $\text{pK}_2 = 2,7$; $\text{pK}_3 = 6,2$; $\text{pK}_4 = 10,3$), ezért mint kétértékű sav közepes erősségű. A vegyületnek különös jelentőséget ad az a körülmény, hogy a *-gal megjelölt atomjai könnyen leadható elektronpárral rendelkeznek, és így komplexképzésre hajlamos (elektronakceptor) fémionokkal igen stabil belső komplexeket (kelát komplexek) alkot. A komplexképzésre való hajlamosságra jellemző, hogy nemcsak az átmenetifémek ionjaival, hanem még a zárt elektronoktettel rendelkező alkáliföldfémek ionjaival (Mg^{2+} , Ca^{2+} , ...) is képes komplexeket alkotni. E komplexek erősségét a stabilitási állandó exponensének ($\text{pK} = -\log K$) értékeiből ítélni lehet meg (2.3. táblázat).

2.3. táblázat. Néhány fém komplex stabilitási exponense

Me ⁿ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Cr ³⁺	Fe ³⁺
pK	8,6	10,6	13,7	16,2	18,0	18,3	18,5	24	25

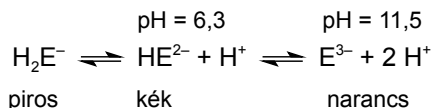
Mivel a komplexképző etilén-diamin-tetraecetsav molekula egyidejűleg sav is, a fémkomplexek stabilitása a pH-nak is függvénye. Ez abban nyilvánul meg, hogy minél jobban eltolódik a pH a savas tartomány felé, a fémkomplexek annál inkább elbomlanak fémionra (Meⁿ⁺) és etilén-diamin-tetraacetátra. E bomlás annál kisebb, minél stabilabb komplexről van szó. Ezért a Fe³⁺ és Cr³⁺ még savas közegben is állandó komplexeket adnak, míg a kétértékű kation komplexek savas közegben rendszerint elbomlanak. Az etilén-diamin-tetraecetsav másik fontos tulajdonsága, hogy mint hatfogú ligandum, a fémionnal egy lépésben ad komplexet, amikor is azonnal kialakul az oktaéderes (néha tetraéderes) elrendeződés. Az etilén-diamin-tetraacetát tehát a fémiont rákolló módjára teljesen körülöleli, amikor öt darab öttagú stabilis kelátgyűrű alakul ki.

Az etilén-diamin-tetraecetsavnak ez az erős komplexképző hajlama adta az ötletet arra, hogy ezt az anyagot fémionok komplexképzésén alapuló meghatározására alkalmazzák. E célra a vízben jól oldódó és az ipar által vízlágyítási célra forgalomba hozott nátriumsót (Na₂H₂Y · 2 H₂O) alkalmazzuk, mely különböző neveken, hazánkban Komplexon(III) néven kerül kereskedelmi forgalomba.

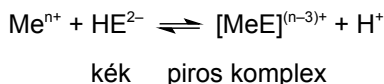
2.5.1.1. Komplexometriás indikátorok

Komplexonnal való titrálás közben tehát, ha a pH megfelelően van megválasztva, a fémion-koncentráció eleinte lassan, később erősen változik, míg végül az egyenértékpontban ugrásszerűen igen kis értékre csökken. A végpont jelzésére olyan fémindikátorok alkalmasak, amelyek a meghatározandó fémionnal laza, színes komplexet alkotnak. A fémionmentes indikátor színe eltérő a fémkomplexétől. A titrálás során a Komplexon(III) először a szabad fémionokat köti meg, azután a színes indikátorkomplexre kerül sor. A Komplexon(III) erősebb komplexet alkotván a fémionnal, mint a fémindikátor, a színes komplexből elvonja a fémiont, és így színváltozás következik be, ami a titrálás végpontját jelzi. A komplexometriás titrálásokhoz az Eriokrómfekete T és a Murexid fémindikátorok használatosak.

Eriokrómfekete T: kémiai neve: 1',2'-dioxi-5-nitro-(1,2')-azonaftalin-4-szulfon-savas-Na (rövidítve NaH₂E). A fémionokkal négyfogú ligandum gyanánt viselkedik. A fémionmentes színezékion (H₂E) a pH-tól függően más és más színt mutat:



A pH = 6,3–11,5 intervallumban stabilis kék forma fémionokkal piros színű komplexet ad:



A színezék indikátortulajdonságai tehát pH = 6,3–11,5 intervallumban érvényesülnek. Komplexometriás titrálásokra legalkalmasabb azonban a pH = 9–10 intervallum, amit NH₃ + NH₄Cl pufferrel egyszerűen meg lehet valósítani. Az indikátor vizes oldatban lassan bomlik, ezért finoman elporított KNO₃-tal keverve szilárd formában vagy szódás propil-alkoholos oldatban alkalmazzák.

Szilárd indikátor készítése: 50 g finoman elporított KNO₃-ot 0,1 g Eriokrómfekete T szilárd színezékkal alaposan elkeverünk. Egy titráláshoz kb. 0,3 g indikátorkeveréket használunk.

Propil-alkoholos Eriokrómfekete T indikátor készítése: 1 g szilárd Eriokrómfekete T indikátort 30 cm³ vízben oldunk, melyhez 1 cm³ 1 M Na₂CO₃-oldatot adunk. Oldódás után izopropil-alkohollal 100 cm³-re egészítjük ki. Egy titráláshoz 4-6 csepp indikátort használunk.

I. Pufferoldat pH = 9–10 beállítására: 0,83 g NH₄Cl-ot kevés vízben oldunk, 11,3 cm³ koncentrált NH₄OH-ot adunk hozzá és vízzel 100 cm³-re hígítjuk. Egy titráláshoz 5 cm³ oldatot használunk. E puffermennyiség legfeljebb 0,01 mol/dm³-es oldatokkal való titrálás esetén elegendő. Töményebb oldatok titrálásakor több NH₄Cl-ot, illetve NH₄OH-ot kell alkalmaznunk a pufferkapacitás növelése céljából, különben könnyen előfordulhat, hogy egyes fémhidroxidok [Mg(OH)₂] kicsapódnak. 0,05 mol/dm³ koncentráció körül 100 cm³ titrálási térfogatra 0,25 g szilárd NH₄Cl-ot és 10 cm³ 10%-os NH₄OH-ot célszerű a közel semleges oldathoz mérni.

Murexid (ammóniumpurpleát): Erősen lúgos közegben (pH > 12) a murexid ibolyaszínt mutat. Fémionok (Ca²⁺-ion) hatására lazacvörös komplexet ad. Titrálásakor a Komplexon(III) kivonja a fémiont a komplexből, és a murexid saját színe tűnik elő. Az indikátort Ca²⁺, Cu²⁺ és Ni²⁺ komplexometriás titrálásánál alkalmazzuk. Utóbbi két iont híg NH₄OH-oldattal tartjuk oldatban.

Murexidindikátor készítése: 50 g finoman porított KNO₃-ot (vagy NaCl-ot) 1 g murexiddel elkeverünk. Egy titráláshoz kb. 0,1 g keveréket használunk. Használatos a murexid telített vizes oldata is indikátornak.

II. Pufferoldat: 2 g NaOH-ot 50 cm³ kiforralt és lehűtött vízben oldunk. A kb. mólós oldatot célszerű belül paraffinozott edényben tartani. Az oldatból néhány cm³-t alkalmazunk egy titráláshoz, hogy a titrálendő oldat biztosan erősen lúgos (pH > 12) legyen.

2.5.1.2. Komplexon(III)-mérőoldat készítése

A titrálásokat 0,1 mólos, 0,05 mólos, 0,01 mólos vagy 0,001 mólos Komplexon(III)-mérőoldattal szoktuk végezni (molekulatömeg = $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y} \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 372,2$ g). A vízkeménység meghatározásához legtöbbször a kb. 0,01 mólos oldatot használjuk. Ezt úgy készítjük, hogy 3,8 g Komplexon(III)-hoz 800 cm^3 vizet és 0,86 g NaOH-ot adunk, majd oldódás után vízzel 1 dm^3 -re feltöltjük. Az oldat hatóértékét MgSO_4 -ra állítjuk be. 1 cm^3 pontos 0,01 mólos Komplexon(III)-oldat 0,01 mmol fémiot mér.

MgSO₄-törzsoldat készítése: A kristályos $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ rendszerint sztöchiometrikus összetételű, és egyszerű beméréssel pontos oldat készíthető belőle. 0,01 mólos MgSO_4 -oldat készítéséhez 2,4649 g-ot mérünk le, és vízzel 1000 cm^3 -re oldjuk.

A 0,01 mólos Komplexon(III)-oldat beállítása: $20,0 \text{ cm}^3$ MgSO_4 -törzsoldatot titrálólombikba pipettázunk, 5 cm^3 (NH_3 - NH_4Cl) I Pufferoldatot adunk hozzá, és vízzel kb. 50 cm^3 -re hígítjuk. Késhegyny (kb. 0,3 g) Eriokrómfekete T szilárd indikátorkeverék hozzáadása után a beállítandó 0,01 mólos Komplexon(III)-mal addig titráljuk, míg az oldat színe pirosból az ibolyáskék színárnyalaton keresztül égszínkébe csap át. A végpont közelében a titrálást lassan végezzük. A mérőoldat hatóértékét célszerű $0,01 \text{ mmol/cm}^3$ -ben megadni.

Magnézium-komplexonát törzsoldat: A titrálás eredménye alapján készíthetünk magunknak Mg-komplexonát törzsoldatot egyenértékű MgSO_4 -törzsoldat és Komplexon(III)-mérőoldat összeöntésével (indikátor nélkül).

2.5.1.3. Kalcium és magnézium együttes mennyiségének megállapítása. A víz összes keménységének meghatározása

A komplexometriás kalcium-magnézium-meghatározás főként a víz összes keménységének meghatározása szempontjából nagy jelentőségű. A titrálás $\text{pH} = 9-10$ körüli értéknél Eriokrómfekete T indikátor jelenlétében elvégezhető. A Komplexon(III) ugyanis a Ca^{2+} -ionokkal, az indikátor viszont a Mg^{2+} -ionokkal alkot erősebb komplexet. A titrálás során tehát a Komplexon(III) először a Ca^{2+} -ionokat köti meg, és csak ezután egyesül a Mg^{2+} -ionokkal. Végül a titrálás végpontja körül kiszorítja a komplexből az indikátort, és ezért az oldat színe pirosból kékbe csap át. A titrálás Mg^{2+} -ionok nélkül nem végezhető el, mert a Ca^{2+} -ionok Eriokrómfekete T-vel nem adnak komplexet.

Meghatározás: $50,0 \text{ cm}^3$ vízmintához $1-5 \text{ cm}^3$ (NH_3 - NH_4Cl) I pufferoldatot, és egy kis kanálka Eriokrómfekete T indikátorkeveréket adunk, majd 0,01 mólos Komplexon(III)-mal addig titráljuk, míg a szín pirosból kékbe csap át. 1 cm^3 0,01 mólos Komplexon(III)-oldat megfelel 0,4008 mg Ca-nak, ill. 0,2432 mg Mg-nak.

Magnéziumion-mentes vízben a titrálás nem megy. Ha az oldat kevés Mg^{2+} -ionot tartalmaz, a színátcsapás nem elég éles. A színátcsapást élesebbé tehetjük, illetve a meghatározást Mg^{2+} -ion mentes oldatban is elvégezhetjük, ha a meghatá-

rozandó oldathoz 10-20 csepp Mg-komplexonát törzsoldatot adunk. A Ca^{2+} -ionok ugyanis egyesülve a Komplexon(III)-mal, szabaddá teszik a Mg^{2+} -ionokat. Ezek viszont az Eriokrómfekete T indikátorral egyesülnek piros színű komplexszé. Titrálás közben azonban az Eriokrómfekete T kék színe éppen akkor jelenik meg, amikor az oldathoz a Ca^{2+} -ionokkal egyenértékű Komplexon(III)-at adunk.

2.5.1.4. A kalcium komplexometriás meghatározása

A kalcium szelektíven meghatározható magnézium mellett is, ha a végpont jelzésére murexidindikátort alkalmazunk, és természetesen erősen lúgos közegben dolgozunk. A murexid ugyanis gyengébb komplexképző anyag révén, a Mg^{2+} -ionokat már meg sem köti, de a Ca^{2+} -ionokkal piros színű komplexet alkot. Komplexon(III)-mal való titrálás alkalmával egyenértékű mérőoldatot adunk az oldathoz. A módszer tehát alkalmas egy vízminta kalciumsók okozta keménységének közvetlen meghatározására.

Meghatározás: 50 cm³ vizsgálandó vízmintát titrálólombikba mérünk, hozzáadunk 2-5 cm³ 1 M NaOH-ot (II. Puffer) és kb. 0,1 g szilárd murexidindikátort, majd 0,01 mólos Komplexon(III)-oldattal addig titráljuk, míg az oldat lazacvörös színe kékesibolyába csap át. Az oldatot lúgosítás után azonnal titrálni kell, mert állás közben a levegő vagy a lúg esetleges CO_2 -tartalma következtében CaCO_3 válhat ki. 1 cm³ 0,01 mólos Komplexon(III)-oldat 0,4008 mg Ca-ot mér.

2.5.1.5. A vas(III)-ionok komplexometriás meghatározása

A vas(III)-ionok jelenlétében, gyengén savas közegben, a variamin-kék B indikátor kékesibolya oxidációs szint mutat. Ha az oldathoz Komplexon(III)-at adunk, ez a vas(III)-ionokat megköti, és az oldat redoxipotenciálja a variamin-kék B átcsapási potenciáljánál negatívabbá válik. Az indikátor tehát elszíntelenedik. A variamin-kék e viselkedése alapján alkalmas vas(III)-ionok komplexometriás meghatározásának végpontjelzésére.

Meghatározás: A kb. 20 cm³ 0,01 mólos gyengén savas vas(III)-só oldathoz kezdődő csapadék kiválásig NaOH-oldatot adunk, majd annyi koncentrált hangyasavat, hogy a csapadék feloldódjék. 1-2 cm³ hangyasavat adunk még hozzá feleslegben, és az oldatot 40-50 °C-ra melegítjük. Ezután 1 csepp 1%-os variamin-kék B indikátort adunk hozzá, és az oldatot azonnal titráljuk addig, amíg annak színe kékesibolyából a vas(III)-komplexonátnak megfelelő tiszta sárga színbe nem vált. 1 cm³ 0,01 mólos Komplexon(III)-oldat megfelel 0,5585 mg vasnak. A titrálás szulfoszalicilsav indikátor jelenlétében is elvégezhető.

3. fejezet

Az ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometria és elválasztási módszerek élelmiszerek analízisében

Az utóbbi időben végbement analitikai módszerfejlesztések nagy változásokat hoztak az élelmiszer-analitika területén is. Sorozatban dolgoztak ki olyan érzékeny módszereket, amelyekkel nagyon hasonló tulajdonságú vegyületeket lehet szétválasztani és ng/kg vagy pg/kg mennyiségben meghatározni. Anélkül, hogy a módszerek között rangsort akarnánk felállítani, úgy gondoltuk, hogy a részletes élelmiszer-analitika tárgyalása előtt ismertetjük az élelmiszer-analitikában széles körben alkalmazott ultraibolya-látható spektrofotometria, a kromatográfia és az elektroforézis alapjait.

3.1. Ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometria

A molekula vagy az atom alapállapotban a legalacsonyabb energiaszintjén tartózkodik, és akkor kerül gerjesztett állapotba, ha megfelelő energiájú elektromágneses sugárzást abszorbeál. A gerjesztett molekula vagy a gerjesztett atom energiaszintjét energia kibocsátása (emittálása) közben képes csökkenteni. Mindkét esetben az abszorbeált vagy emittált sugárzás hullámhossza jellemző az anyagi minőségre, intenzitásának változása pedig jellemző a vizsgált komponens relatív vagy abszolút mennyiségére.

A fehérfény különböző hullámhosszúságú fénysugarak keveréke, melyet a spektroszkópiai vizsgálatoknál hullámhossz szerint komponenseire kell bontani azért, hogy az analitikai vizsgálatokban alkalmazható monokromatikus fényhez jussunk. A monokromatikus fény egy nagyon szűk hullámhossztartományú fotónokat tartalmazó fénynyaláb.

Az ultraibolya-látható (UV-VIS) abszorpciós spektrofotometria a legelterjedtebb vizsgálati módszerek közé tartozik; az ultraibolya-látható spektrofotométerek minden laboratóriumokban megtalálhatók. Alkalmazásuk viszonylag kevés szakértelmet igényel, a készülék megfizethető, a minta-előkészítéshez, valamint az analitikai vizsgálatokhoz szükséges vegyszerek és eszközök könnyen és olcsón beszerezhetők.

Az elektromágneses sugárzás hullámhossza a gammasugárzástól indul és az ultraibolya, a látható és közeli infravörös sugárzáson keresztül a rádióhullámokig

tart. Az UV és a látható fény kölcsönhatásba léphet a mintával, mely kölcsönhatás lehet abszorpció (a vizsgálandó komponens fényt nyel el), vagy lehet emisszió (azaz a gerjesztett atomok vagy ionok energiát bocsátanak ki). A távoli ultraibolya (10–180 nm), az ultraibolya (180–380 nm) és a látható (380–780 nm) sugárzás a vegyértékelektronok gerjesztésének eredményeként, a külső elektronátmenetek révén jön létre. Az elektromágneses sugárzás hullámhossza és az energiája között az alábbi összefüggés írható fel (Planck-egyenlet):

$$E_2 - E_1 = \Delta E = h \cdot \nu.$$

Mivel $\mu = c/\lambda$, ezért:

$$E_2 - E_1 = \Delta E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda},$$

ahol:

E_1 – kezdeti állapot energiaszintje (J)

E_2 – végállapot energiaszintje (J)

ΔE – kezdeti és a végállapot energiaszintje közötti különbség (J)

h – Planck-állandó ($6,624 \cdot 10^{-34}$ J·s)

ν – elektromágneses sugárzás frekvenciája ($\text{Hz} = \frac{1}{s}$)

c – fény sebessége (levegőben $3 \cdot 10^8 \frac{m}{s}$)

λ – fény hullámhossza (nm)

A fenti összefüggésből következik, hogy ha ismerjük az elektromágneses sugárzás hullámhosszát, abban az esetben az előző egyenletek segítségével számítható az elektromágneses sugárzás frekvenciája, valamint az energiaváltozás nagysága.

A spektroszkópiai módszereket egyrészt atom- és molekula-spektroszkópi-ai módszerekre oszthatjuk, annak megfelelően, hogy az analitikai információ atomoktól vagy molekuláktól származik, másrészt az elektromágneses sugárzás hullámhossza szerint is csoportosíthatjuk. Az ultraibolya és látható fény elnyelésekor a molekulák elektroneloszlása megváltozik, az elektronjaik kisebb energiájú pályákról nagyobb energiájú pályákra ugranak, azaz gerjesztődnek. Egy molekula azon részét vagy részeit, amelyekben az elektronátmenetek létrejönnek, kromofóroknak hívjuk. Azt az energiatartományt, amelynél az adott kromofór elnyel, elnyelési sávnak nevezzük, melynek hullámhossztartománya a kromofór anyagi minőségétől függ, ezért jellemző a vizsgálandó komponens minőségére.

Amikor a keresett komponenst tartalmazó oldatot besugározzuk, és a fény-elnyelést ábrázoljuk a besugárzó fény hullámhosszának függvényében, akkor az abszorpciós spektrumot kapjuk. Az abszorpciós spektrum a minőségi információkon kívül mennyiségi információkat is hordoz, mivel ha a vizsgálandó mintát

besugározzuk egy I_0 intenzitású, adott hullámhosszú (monokromatikus) fényvel, annak intenzitása a fény abszorpciója miatt lecsökken I -re. Az abszorpciót egy mértékegység nélküli mennyiséggel, az abszorbanciával lehet kifejezni.

Az UV-VIS színképtartomány abszorpciós sávjai szélesek, a különböző atomcsoportokra jellemző sávok egymással átfedésben is lehetnek, ezért az UV-VIS abszorpciós spektrofotometria nem alkalmas minőségi azonosításra, mennyiségi analízisre viszont széles körben használt módszer. A mennyiségi meghatározás alapja a Lambert–Beer-törvény, amely a meghatározandó komponens koncentrációja (c) és az abszorbancia (A) közötti összefüggést írja le.

$$A = \lg \frac{I_0}{I},$$

ahol A az abszorbancia, I_0 a besugárzó fény kezdeti intenzitása, I pedig a besugárzó fény végső intenzitása. Az abszorbancia a következő módon is kifejezhető:

$$A = \alpha \cdot l \cdot c,$$

ahol A az abszorbancia, α az abszorpciós koefficiens, l az optikai úthossz (a küvetta szélessége, c pedig a mérendő komponens koncentrációja).

Az abszorpciós koefficiens annak a valószínűségnek a mértéke, amely valószínűséggel a fényútba eső molekulák a fotonokat elnyelik, mely az anyagi minőségre jellemző állandó, és független a koncentrációtól. Az abszorpciós koefficiens az analitikai vizsgálat alatt konstansnak tekinthetjük, valójában viszont a mérendő komponens minőségén és állapotán kívül az alkalmazott fény hullámhosszána a függvénye. Mivel a vizsgálatok során ugyanazt a monokromatikus fényt alkalmazzuk, így az abszorpciós koefficiens gyakorlatilag állandónak tekinthető.

Az I/I_0 viszonyt transzmittanciának (T) (áteresztésnek) nevezzük, melynek százszorosa a százalékos fényátbocsátó képesség (transzmisszió %). A vizsgált oldat transzmittanciája (T) a beeső elektromágneses sugárzás azon része, amely a mintán áthalad. Értéke 0 és 1 (0 és 100 %) között változhat. Ha a monokromatikus fény az oldaton áthaladva teljes mértékben abszorbeálódik, akkor a transzmittancia értéke 0,

$$T = \frac{I}{I_0},$$

ahol T a transzmittancia, I_0 a besugárzó fény kezdeti intenzitása, I pedig a besugárzó fény végső intenzitása. Az előző egyenletekből adódik, hogy a transzmittancia az abszorbancia negatív logaritmus, azaz $A = -\lg T$.

Egy adott hullámhosszú és adott intenzitású monokromatikus fényvel a vizsgálandó mintát átsugározva az alkalmazott fény részben a mintában elnyelődik (abszorbeálódik), részben áthalad rajta (transzmittálódik), a maradék része pedig visszaverődik (reflektálódik). Így felírhatjuk a következő egyenletet:

$$I_0 = I_T + I_A + I_R,$$

ahol I_0 a besugárzó fény intenzitása, I_T a transzmittált fény intenzitása, I_A az abszorbeált fény intenzitása, I_R pedig a reflektált (visszavert) fény intenzitása.

A Lambert–Beer-törvényt csak akkor alkalmazhatjuk, ha a következő feltételek is teljesülnek: Csak viszonylag híg oldatok ($<10^{-3}$ mol/dm³) esetében alkalmazható. A kromofór csoport kémiai reakciói a Lambert–Beer-törvénytől való eltérést okozhatják. Az oldószercserre megváltoztatja a molekulák energiaállapotait, így megváltozhat az abszorpcióhoz szükséges energia nagysága, azaz megváltozhat az abszorpciós spektrum is. A Lambert–Beer-törvényben eltérést okozhat, ha nem az elnyelési spektrum abszorpciós maximumánál végezzük a mérést.

A Lambert–Beer-törvény nem alkalmazható, ha a vizsgálandó oldat jelentős mennyiségű kolloidrészcskét tartalmaz. A vizsgálandó oldat hőmérsékletének változása befolyásolhatja az energiaszinteket, ezért az elektronátmenetek energiájának nagysága megváltozhat. Csak a közel megegyező hőmérsékleten végzett mérések adatai hasonlíthatók össze. Fontos tudni, hogy az abszorbancia additív tulajdonság, ezért ha a vizsgált oldatban több, egymás mellett előforduló kromofór komponens található, akkor azok fényabszorpciója összeadódik.

Az ultraibolya-látható abszorpciós spektrofotometria mind szervetlen, mind szerves összetevők vizsgálatára alkalmas. Mivel ezek száma szinte végtelen, ezért elkerülhetetlen, hogy az elsősorban folyadék halmazállapotú mintákban lévő különböző kromofór csoportok sávátfedési problémákat okozzanak. Ha az elemzendő komponensnek van elnyelése az UV-VIS tartományban, amely nem rendelkezik jelentős zavaró tényezővel, akkor közvetlenül vizsgálható. Ha viszont a meghatározandó komponensnek nincs olyan elnyelése, amely közvetlenül elemezhető, akkor keresnünk kell egy olyan fényelnyelést mutató kromofór csoportot, amely sztöchiometriai reakcióba tud lépni a meghatározni kívánt komponenssel, és ezáltal egy spektrofotometriásan elemezhető vegyületet képez.

3.1.1. Az UV-VIS spektrofotométer felépítése

Az UV-VIS spektrofotométer fontosabb részei a sugárforrás, az optikai rendszer, a detektor és a vezérlő-értékelő egység.

A sugárforrás

A sugárforrás az alkalmazott hullámhossztartományban biztosítja a megfelelő fényintenzitású fénysugárzást, mely az analitikai vizsgálatok teljes időtartama alatt stabil fényintenzitást biztosít. Az UV-VIS spektrofotométereket a 160–1100 nm hullámhossztartományban használjuk analitikai vizsgálatok kivitelezésére. A hullámhossztartomány alsó részén, a vákuum ultraibolya- és az ultraibolya-tartományban (160–380 nm) deutérium lámpát, míg a felső részén és az infravörös-tartomány alsó részében is (350–2500 nm) volfrámlámpát használunk. Mivel 200 nm hullámhossz

alatt az üveg elnyeli a sugárzást, ezért a deutériumlámpához kvarc kilépőablakot használunk. A 350 nm fölötti hullámhossztartományban izzószálas lámpát használunk, amely az egész tartományban folytonos spektrumot ad. Az izzószálas lámpánál egy lezárt és evakuált üveggömbbe spirállá tekert volfrám izzószálat helyeznek, melyet működés közben izzásig hevítenek elektromos árammal.

Mintatartó (küvetta)

A mintatartó (küvetta) a fényforrás és a detektor között helyezkedik el. A küvetta a legtöbb esetben egy centiméter szélességű négyzet alapú hasáb. Fényáteresztő anyagból készítik, amely a legtöbbször kvarc, üveg, esetleg műanyag lehet. A kvarcküvetttát 190 nm-től 4000 nm hullámhosszig, az üvegeküvetttát 350 nm-től 3000 nm-ig használhatjuk. Az üvegből készült eszközök az ultraibolya sugárzást (<350 nm) elnyelik, ezért ezek csak a látható tartományban használhatók. A küvettták szemközti oldalai tökéletesen párhuzamosak, amelyek a fénysugárral derékszöget zárnak be.

Optikai rendszer

Az optikai rendszer feladata a kisugárzott fény felbontása. Fényfelbontó egységként általában monokromátort vagy színszűrőket használunk. Az egyszerűbb készülékek használnak színszűrőket, melyek fő típusai az abszorpciós és az interferencia-szűrők. Az abszorpciós szűrők készülhetnek zselatinból, üvegből, folyadékból vagy műanyagból. A szűrős spektrofotométerek egy szűrősorozatot tartalmaznak, amellyel kiválaszthatjuk a megfelelő hullámhossztartományt.

Detektor

A detektor feladata, hogy megmérje az abszorpciót megelőzően (I_0) és azt követően (I) a sugárforrásból kibocsátott fény intenzitását. A különböző gyártók különféle olyan típusú detektorokat alkalmaznak, mint a fotodiódák, a fotoemissziós csövek, a fotoelektron-sokszorozó csövek és a szilárdtestdetektorok. A fotodióda a ráeső fényt alakítja át elektromos árammá, melynek nagysága arányos a beeső fény intenzitásával. A diódasoros detektorokban több, lineárisan kapcsolt fotodióda található, melyek száma akár több ezer is lehet.

A fotoemissziós csövek evakuált burkolatban található fotokatód-fotoanód kombinációk, melyekben a beeső fény elektromos jelet állít elő, ezek nagysága arányos a beeső fény intenzitásával. A fotoemissziós csövekben a fotokatódot olyan anyagból készítik, mely felületébe a becsapódó fotonok hatására, a fotonok számával arányosan fotoelektronok lépnek ki, amelyek a fotoanód felé vándorolva elektromos áramot hoznak létre.

A fotoelektron-sokszorozó csövek és a szilárdtestdetektorok a beeső fény hatására szintén a fényintenzitással arányos elektromos jelet adnak. A fotoelektron-sokszorozó csövek egy viszonylag szűk hullámhossztartomány detektálására képesek, a szilárdtestdetektorok viszont, egy időben, számos hullámhossztarto-

mány detektálására képesek. A diódasoros detektorokhoz hasonlóan nemcsak egy hullámhossztartomány intenzitásának mérésére alkalmasak, hanem vagy több egyedi hullámhossztartomány egyidejű mérését, vagy a vizsgált minta fényelnyelésének spektrumát is képesek detektálni.

3.1.2. Az UV-VIS spektrofotométerek különböző típusai

A spektrofotométerek a vizsgálathoz alkalmazható hullámhossztartomány szerint lehetnek az ultraibolya hullámhossztartományban működők, a látható hullámhossztartományban működők, az infravörös hullámhossztartományban működők és ezek kombinációja. Az optikai rendszerben alkalmazott fényfelbontás típusa szerint lehetnek prizmás, rácsos vagy szűrős rendszerűek, a spektrométer működési elve szerint pedig egyfényutas készülékek vagy kétfényutas készülékek.

A normál rutin-laborvizsgálatok során általában oldat formában vizsgáljuk a mérendő mintákat, melynek során közelítően 10^{-5} - 10^{-3} mól/dm³ koncentrációjú oldatokkal dolgozunk. A folyékony halmazállapot eléréséhez a mérést megelőzően valamilyen típusú minta-előkészítő tevékenység szükséges.

3.1.2.1. Egyfényutas spektrofotométerek

Mind az egyfényutas, mind a kétfényutas készülék esetében szükséges referenciaanyag alkalmazása, mely lehet tiszta oldószer vagy minta nélküli oldat (vakoldat). Az egyfényutas készüléknél az oldatokat egymás után mérjük meg, míg kétfényutas készüléknél a spektrofotométer a fénysugarat felváltva vezeti át a minta- és a referenciaoldaton, kiküszöbölve az alapoldat (vakoldat) elnyelését. A modern készülékek holografikus homorú-rácsos polikromátort és diódasoros detektort alkalmaznak, mely utóbbi megközelítően 10-20 msec alatt a mérést a teljes spektrumra vonatkozóan elvégzi.

3.1.2.2. Kétfényutas spektrofotométerek

A kétfényutas spektrofotométerben egy deutérium- vagy egy volfrámlámpát használunk, melynek fénye a forgatható optikai rácsra vetődik, így ki tudjuk választani az alkalmazandó hullámhosszt. A fényútban a nem kívánt színek kirekesztésére elhelyeznek egy színszűrőt. Egy szaggató kettéválasztja a fénysugarat, melyek közül az egyiket a mintát tartalmazó küvettán vezetjük át, míg a visszaverődő fénysugár a referenciaküvettán (vakoldaton) halad át, mely csak oldószert, extrahálóoldatot vagy nagy tisztaságú vizet tartalmaz. A sugárforrás fényét a szaggató (chopper) egy másodperc alatt többnyire néhányszor szaggatja, ezáltal váltogatja a fényút menetét, és a két fényúton történő elemzéssel automatikusan külön-külön hasonlítja össze a mért abszorbanca- (vagy transzmittancia-) értékeket. Általában ugyanazzal a detektorral mérjük a fénysugarak intenzitását.

A kétfényutas spektrofotométerek előnyei az egyfényutas készülékekhez képest a következők: Az egyfényutas készülékekbe a mintát és a referenciaoldatot felváltva kell behelyeznünk, ami nehezíti a mérést. Amennyiben több hullámhossz alkalmazásával szeretnénk elvégezni a mérést, akkor minden egyes hullámhosszt külön kell beállítani. A kétfényutas spektrofotométerekben automatikusan változtathatjuk az alkalmazott hullámhosszat, ezen túl a mintaoldat automatikus korrekciója a referenciaoldat mérésével egy időben történik, így a vizsgálatok pontosabbak. A kétfényutas spektrofotométerekkel automatikus hullámhosszpásztázás és folyamatos spektrumanalízis is megoldható.

Az UV-VIS molekulaabszorpciós spektrofotometria előnyei és alkalmazási területei a következők: Az ultraibolya és látható fénysugár alkalmazásával lehetőség van az élelmiszer- és élelmiszeralapanyag-minták különböző szerves és szerves komponenseinek azonosítására és mennyiségi meghatározására. Az UV-VIS spektrofotometria sokkal szélesebb körű elemzést tesz lehetővé, mint bármely más analitikai módszer, ezért az élelmiszerek és élelmiszer-alapanyag nagyszámú komponensének analízisét tudjuk ezzel a mérési módszerrel elvégezni. A 10^{-6} – 10^{-4} M koncentrációtartományban viszonylag nagy érzékenység jellemzi, viszonylag jó a szelektivitása és pontossága, valamint jellemző rá az 1-3%-os precizitás, ezen túl könnyű a kezelhetősége és egyszerűen megoldható az adatgyűjtés.

3.2. Elválasztási módszerek élelmiszerek analízisében

3.2.1. Kromatográfia

3.2.1.1. A kromatográfia elvi alapjai

A kromatográfiai módszerek kialakulása a múlt század elejére tehető, amikor Tswett orosz analitikus növényekből, szerves oldószerekkel extrahált, egyneműnek hitt festékanyagokat meszkővel töltött oszlopon négy különböző színű vegyülettel tudott szétválasztani. Módszerét színírásnak nevezte el, mely a továbbiakban kromatográfia néven vonult be az analitikai kémiába. A kromatográfia egy olyan fizikai elválasztási módszer, melynek során a különböző, de nagyon hasonló tulajdonságú komponensek egy állófázis és egy mozgófázis között oszlanak meg, mely megoszlás az alapja a szétválasztásnak. Az állófázis lehet szilárd anyag vagy nagy viszkozitású, szilárd hordozóra felvitt folyadék, míg a mozgófázis folyadék vagy gáz.

3.2.1.1.1. A kromatográfiai módszerek csoportosítása

A kromatográfiai módszerek csoportosíthatók az elválasztás mechanizmusa szerint, amely azt mutatja, hogy az elegy komponensei milyen erő hatására kötőd-

nek fokozatosan az állófázishoz. A kötődést okozhatja az adszorpció, a megoszlás, az ionok kicserélődési képessége, a molekulaszűrőn való áthatolóképeség és a biokémiai affinitás. A kötődéskor többféle erőhatás is jelentkezhet: az adszorpció mellett ioncsere, a gélszűrés mellett pedig pl. az adszorpció. **Az állófázis alakja** szerint háromdimenziós oszlopkromatográfia és kétdimenziós (réteg- és papír-) kromatográfia különböztethető meg. **A fázisok halmazállapota szerint** a kromatográfiai eljárások lehetnek gáz-szilárd (angol rövidítése GSC), folyadék-szilárd (LSC), gáz-folyadék (GLC) és folyadék-folyadék (LLC) kromatográfia.

Az adszorpciós kromatografáláskor a szétválasztandó elegy egyes komponensei a nyugvó adszorbens felületén megkötődnek, a továbbvándorló oldószer-től, a kevésbé erősen adszorbeálódó oldott anyagoktól elkülönülnek. **A megoszlásos kromatográfiában** az állófázis felületén adszorbeált folyadék van. A mozgófázis az adszorbeált folyadékkal nem vagy csak kevésbé elegyedik. Az elválasztandó oldott anyagok, különböző mértékű oldhatóságuknak megfelelően, megoszlanak a nyugvó és mozgó folyadék között. Az az oldott anyag, mely a nyugvó folyadékban sokkal jobban oldódik, mint a mozgóban, teljesen átmegy a mozgófázisból az álló, adszorbeált folyadékba.

Az ioncserélő kromatográfiánál a nyugvó és a mozgófázis ionjai egymás között kicserélődnek. A megkötött anyagok az ioncserélő oszlopról az ionkoncentráció és a pH-változásával eluálhatók. **A gélkromatográfiában** a különböző méretű komponenseket duzzasztott gélszemcsékből álló molekulaszűrő segítségével választjuk szét. **A gázkromatográfiában** a légnemű állapotban lévő vizsgálati elegyet semleges vivőgáz segítségével visszük be a kromatográfiai kolonnába, ahol a gázmolekulák az adszorbens felületén más-más időtartamig kötődnek, majd szétválnak.

Összefoglalva tehát a kromatográfiai elválasztási módszerek csoportosíthatók az állófázis alakja szerint (oszlopkromatográfia, vékonyréteg-kromatográfia), a mozgófázis halmazállapota szerint (gázkromatográfia, folyadékkromatográfia, szuperkritikus folyadékkromatográfia), illetve mindkét fázis alapján (folyadék-szilárd-, folyadék-folyadék-, gáz-folyadék-, gáz-szilárd kromatográfia). Az elválasztás elve alapján ismert adszorpciós kromatográfia, megoszlásos kromatográfia, ioncserés kromatográfia, méretkizárásos kromatográfia és affinitás-kromatográfia.

3.2.1.1.2. A kromatografálás mechanizmusa

A különböző komponensek szétválasztása során azok az álló- és a mozgófázissal szemben tanúsított tulajdonságaik alapján, a szétválasztani kívánt komponensek a kromatografálási eljárás során különböző sebességgel haladva, az állófázist különböző időben hagyják el, ill. különböző távolságra jutnak el a kiindulási ponttól. A komponensek koncentrációviszonyait a két fázis között a megoszlási állandóval lehet kifejezni, mely a fázisok anyagi minőségétől független, csak a hőmérséklettől függ.

A kromatográfia tehát szorpción és deszorpción alapuló elválasztástechnikai módszer, melynek során az elválasztandó anyagok egy keskeny kezdeti zónáról különféle adszorbenseken, folyadék- vagy gázáramlás hatására, eltérő sebességgel mozdulnak el. Az élelmiszer-analitikában és a preparatív elválasztástechnikában az oszlopkromatográfia kiemelkedő jelentőségű, melynek segítségével hasonló szerkezetű frakciók választhatók el egymástól, preparatív oszlopkromatográfiával pedig **egy-egy anyag igen nagy tisztaságban izolálható**. A különböző élelmiszer-komponensek szétválasztására és meghatározására mind a folyadék-szilárd, mind a folyadék-folyadék kromatográfia elterjedt. Az elválasztást előidéző hatások alapján az adszorpció, a megoszlásos és az ioncserés elválasztások a legjelentősebbek. Mindhárom esetben követelmény, hogy az állófázis oldhatatlan legyen a mozgófázisban, az állófázis irreverzibilisen ne kösse meg az elválasztandó anyagokat, ne bontsa el azokat, és ne lépjen reakcióba a mozgófázis komponenseivel.

Az eljárás során az oszlopon az elválasztandó anyagok különböző erővel kötődnek, majd a mozgófázis áramoltatásával kötődésük erősségétől függően deszorbeálódnak, az oszlop további részében pedig ismét adszorbeálódnak az állófázisra. Ez a folyamat folytatódik az oszlop teljes hosszában, melynek során jelentős eltolódások jönnek létre a szétválasztani kívánt komponensek között, aminek következtében az elválasztandó komponensek különböző időpontban elkülönülve jelennek meg az oszlop végén. E fejezet végén az oszlopkromatográfiáról található összeállítás, hogy a tisztelt Olvasó lássa, hogy a kromatográfiás elválasztási folyamatok rendkívül bonyolultak, munkai igényesek, és hogy kivitelezésük nagy tudást és gyakorlatot igényel. A további fejezetek az egyéb kromatográfiás módszereket is részletesen tartalmazzák.

3.2.1.1.3. Oszlopkromatográfia

A szétválasztás háromdimenziós oszlopon történik. A fázisok halmazállapota szerint az oszlopkromatográfiás eljárások lehetnek gáz-szilárd, folyadék-szilárd, gáz-folyadék és folyadék-folyadék kromatográfia. **Az oszlopkromatográfia eszközei** üvegből, fémből vagy műanyagból készült csövek, kapillárisok, melyben a beforrasztott porózus üvegre rétegezzük az adszorbenst, az acélcsővekbe préseljük azt, vagy maga a cső fala szolgál az állófázis megtartására. Az oszlopkromatográfiás eljárások felölelik a kromatográfiás eljárások mindazon területét, ahol a töltet háromdimenziós oszloppal kombinálható, tehát a kromatográfiás módszerek nagy része manapság már oszlopkromatográfia. A vizsgálandó komponensek az oszlopon különböző erők hatására jutnak át, mely lehet a mozgó, folyadékfázis pumpával, nagy nyomáson történő áramoltatása, vagy gázadagolás palackból, ahonnan kontrollált nyomású gázhoz lehet jutni. Normál vagy kis nyomáson végzett eljárásnál a mozgófázis önként átszivároghat az oszlopon, melyet vákuummal kell (lehet) elősegíteni, vagy túlnyomásos eljárást lehet alkalmazni. A kromatografáló csövek változatos átmérőjűek és hosszúságúak, ezért a méreteket a vonatkozó

speciális fejezetben tárgyaljuk. Az oszlopok hőmérsékletét vízköpennyel vagy termosztáttal lehet szabályozni.

A **kromatográfiás oszlopok töltete** (állófázis) a kromatográfiás céltól függően nagyon sokféle lehet, az oszlop töltése pedig lehet száraz és nedves. **Száraz töltéskor** az adszorbenst lassanként, rétegezve szórjuk az oszlopba, és az oszlopot vibrátorral vagy döngöléssel tömörítjük. **Nedves töltéskor** az oszlopot félig megtöltjük oldószerrel, és az adszorbenst ugyanezzel az oldószerrel feliszapolva töltjük az oszlopba. A különféle kromatográfiás oszlopoknál speciális eljárásokat alkalmaznak az oszlop töltetének kialakítására.

Az oszlopból távozó **frakciókat**, folyadék mozgófázis esetében, frakciószedő berendezések **segítségével kémcsövekbe szedhetjük**. A kör alakú, kémcsöveket tartalmazó frakciószedő elforgatható, időkapcsoló és térfogat-szabályozó berendezéssel, esetleg cseppszámlálóval ellátott, és mintegy 20-200 kémcső található benne.

Az **oszlopkromatográfia metodikája**. Folyadékkromatográfia esetén a kromatografálendő anyagokat tömény oldattá alakítjuk, de ha az elválasztandó anyagokat az oszlop erősen adszorbeálja, hígabb oldatokkal is dolgozhatunk. A szétválasztandó anyagok oldatát óvatosan öntve töltjük be az oszlopba, hogy az adszorbens ne keveredjen föl, ügyelve arra, hogy az oszlopnak nem szabad kiszáradnia. **A kromatogram kifejlesztése** során az oszlopon tiszta oldószert vagy oldószerelegyet engedünk át. A kifejlődést befolyásolja az oldószert átfolyási sebessége, ezért az optimális szétválasztáshoz be kell állítani az oldószert átfolyásának megfelelő sebességet. **A színes anyagok** szétválasztásának figyelemmel kísérése a legegyszerűbb, a **színtelen anyagok elválásának észlelése** ibolyántúli fényben, fluoreszkáló adszorbens használatával, a színtelen anyagok színes származékokká alakításával, a kiválasztandó anyaghoz megközelítően azonos tulajdonságú színes indikátorokkal vagy a vizsgált anyag színreakcióba vitelével lehetséges.

Preparatív oszlopkromatográfia esetében a keverékek alkotóit elválaszt-hatjuk, ha az egész oszlopot rövid korongokra vágjuk és a kis egységeket külön-külön eluáljuk, majd az anyagok elhelyezkedéséről a bepárlási maradék alapján győződünk meg. A poláros adszorbens eluálása történhet etil- vagy metil-alkohollal, ecetsavval vagy piridinnel, az aktív szén eluálása benzollal vagy kloroformmal. Oldható adszorbens használatakor a vizsgálandó anyagot oldószeres kirázással különíthetjük el. A gázkromatográfiás eljárások során alkalmazandó lépéseket a vonatkozó fejezet tartalmazza.

Az oszlopkromatográfiás elválasztások során általában az **elúciós kromatográfia**t alkalmazzuk, melynek során a kromatogram kifejlesztését nem fejezzük be a sávok szétválasztásával, hanem az oszlop oldószeres mosását tovább folytatjuk, melynek során az egyes anyagok folyamatosan a szüredékbe kerülnek, és külön-külön fogjuk fel őket. Az eluotrop sor szerint egyre polárosabb oldószereket alkalmazva a szüredéket szakaszosan felfogjuk, a kromatografálás lefolyását pedig grafikusán ábrázoljuk. Ennek során a vízszintes tengelyre az átfolyt oldószert

térfogata, a függőleges tengelyre pedig a bepárlási maradék tömege kerül. Szükség esetén a sűrűség, a törésmutató, az optikai forgatóképesség és egyéb tulajdonságok is kerülhetnek az ordinátára. A kromatogramokkal, a mennyiségi és a minőségi értékeléssel kapcsolatos tudnivalók a vonatkozó fejezetekben találhatóak.

3.2.1.2. Adszorpciós kromatográfia

Adszorpció

A heterogén rendszerek határfelületén működő erők hatására az egyik fázis a felületén a vele érintkező másik fázis molekuláit kisebb-nagyobb mértékben képesek megkötni. A fázis felületén a komponens koncentrációja nagyobb, mint a folyékony fázisban: a jelenség az **adszorpció**. Az az anyag, amelynek felülete a másik fázis molekuláit megköti, az **adszorbens**, a felületen megkötött anyag pedig az **adszorptívum**.

Az **adszorpció** során az adszorbens felületén lévő molekulák és az adszorptívum molekulái között erők hatnak, melyek az adszorptívum molekuláinak egy részét az adszorbens felületére vonzzák. **Adszorpciókor** az erők az adszorptívum molekuláinak hőmozgása ellenében munkát végeznek, ami az **adszorpciós hő** alakjában szabadul fel. Az adszorbeált molekuláknak az adszorbens felületéről való eltávolítása, a **deszorpció**, lehűléssel jár, az adszorpció tehát exoterm, a deszorpció pedig endoterm folyamat.

Az adszorpció **dinamikus jelenség**, melynek során az adszorbeált felületi réteg és az adszorbeálatlan molekulák között kicserélődés megy végbe. Az adszorptívum molekulái a hőmozgás következtében részben deszorbeálódnak, az adszorbeálatlan molekulák pedig az adszorpciós erők hatására megkötődnek. Bekövetkezik az **adszorpciós egyensúly**, melynek során az időegységenként megkötött molekulák száma azonos a felületről leváló molekulák számával.

Adszorpció szilárd-gáz halmazállapotú határfelületen

Gáz-halmazállapotú anyagok adszorbeálására használják a faszenet, a különféle aktív szénfajtákat (csont-, vér-, cukor-, benzoésav-, mogyoró- és dióhéjszén), az alumínium-hidroxidot és a különböző természetes derítőszerkeket. Az adszorbeált anyag mennyisége annál nagyobb, minél nagyobb az adszorptívum koncentrációja, gázoknál pedig minél nagyobb a gáz nyomása. Az adszorbeált gázmennyiség annál kisebb, minél magasabb a rendszer hőmérséklete, ezért a rendszer kellő hőmérsékletre való hevítésével az adszorpció megszüntethető, és a magas hőmérséklet alkalmas az adszorpcióra alkalmatlan adszorbensek felújítására.

Egy rendszer adszorpciós viszonyai az adszorpciós izotermával jellemezhetők, mely adott hőmérsékleten az adszorptívum nyomása és az adszorbeált mennyiség közötti összefüggést mutatja. A diagram abszcisszáján a gázfázis nyomását, ordinátáján az egységnyi tömegű adszorbens által megkötött normálállapotú gáz térfogatát (fajlagos adszorpció) ábrázolják. Kis nyomásokon a nyomás fokozásának hatására az adszorbeált gázmennyiség rohamosan növekedik, melynek

során a nyomás és a megkötött mennyiség közötti összefüggés lineáris. Nagyobb nyomásértékeken a görbék az abszcissza felé hajlanak, később pedig majdnem párhuzamosak lesznek vele, tehát a gáznyomással az adszorbeált mennyiség nem nő tovább, ugyanis nagy nyomásokon az adszorbens felülete telítődik adszorptívummal, az adszorbeált molekulák az adszorbens felületét molekula vastagságú monomolekuláris réteggel teljesen bevonják.

Egy adszorbens a különböző összetételű légnemű anyagokat különböző mértékben adszorbeálja. A nagyobb molekulatömegű anyagok jobban adszorbeálódnak, mint a kisebbek, és minél magasabb egy légnemű anyag normális forráspontja, annál könnyebben kötődik meg szilárd testek felületén.

Adszorpció szilárd-folyadék határfelületen

A nagy fajlagos felületű szilárd testek egyes folyadékokat és oldott anyagokat is adszorbeálnak. A tiszta folyadék adszorpciója a **lioszorpció**, melynek során az adszorbens felületén folyadékmolekulák kötődnek meg, amik a **lioszférának** nevezett adszorpciós réteget hozzák létre. Ha az adszorbeált réteg vízmolekulákból áll, akkor a lioszféra neve hidroszféra, a létrejött burok pedig a hidrátburok.

A **folyadékadszorpció** a szilárd és folyékony fázis anyagi természetétől függ. A folyadékok, amelyek nedvesítik az adszorbens felületét, jól, amelyek nem nedvesítik, rosszul vagy egyáltalán nem adszorbeálódnak a szilárd fázison. A folyadékok **nedvesítőképessége a határfelületi feszültségtől** függ, ugyanis minél nagyobb a határfelületi feszültség, annál kevésbé nedvesedik az adszorbens.

A **szén és a víz** közötti viszonyokat vizsgálva megállapítható, hogy az adszorbens hidrofób, apoláros jellegű, melyen csak az apoláros oldott anyagok adszorbeálódnak jól. Az apoláros szénen tehát a poláros víz nem kötődik meg. A **szilikagél és a víz közötti** viszonyokat elemezve megállapítható, hogy kicsi a határfelületi feszültség, a szilikagél kiválóan nedvesedik, vízzel érintkezve vastag hidrátburok jön létre, tehát a szilikagél hidrofil, illetve poláros adszorbens.

Az adszorbensek felületére mind az oldott anyag, mind az oldószer adszorbeálódhat, amely **adszorpciós viszony** attól függ, hogy az oldószer és az adszorbens között milyen a határfelületi feszültség, és hogy az oldószer nedvesíti-e az adszorbens felületét. Az adszorbent rosszul nedvesítő oldószerekben oldott anyagok adszorpciója izotermákkal jellemezhető. Az oldott anyagok adszorpciójának mértéke fordítottan arányos a rendszer hőmérsékletével és egyenesen arányos az oldat koncentrációjával. A nagy molekulatömegű anyagok jobban adszorbeálódnak, míg az oldószer kisebb-nagyobb mértékben adszorbeálódik az adszorbens felületén, kiszorítva az oldott anyag molekuláit. Az adszorbens akkor telítődik, ha felületét monomolekuláris adszorptívum réteg fedi be.

Az oldatokban lejátszódó adszorpció **reverzibilis folyamat**. Az adszorpció egyensúly beállása után, ha az oldatot hígítjuk, részleges deszorpció következik be, melynek során csökken az adszorbens felületén megkötött anyag mennyisége. **Ha az oldószer a szilárd fázist jól nedvesíti**, akkor alkalmatlan vízben oldott anya-

gok adszorpciójára. Ha az oldószer nagymérvű adszorpciója miatt az adszorbens felületéről az oldott anyagok teljesen kiszorulnak, **negatív adszorpció** következik be. Az adszorbens és az adszorbeált anyag molekulái között a határfelületi erőkön kívül kémiai kölcsönhatás is kialakul. A **kemoszorpció** nem reverzibilis folyamat.

3.2.1.2.1. Az adszorpciós kromatográfia műveletei

Az adszorpciós kromatográfia során alkalmazhatunk **elúciós módszert, frontális kromatográfiát vagy kiszorításos módszert**. Az adszorbens elrendezése szerint alkalmazhatunk **oszlopkromatográfiát**, amikor egy megfelelően kialakított csőben a por alakú adszorbenst oszlop alakúra tömörítve használjuk, és **vékonyréteg-kromatográfiát** vagy **rétegekromatográfiát**, amikor a por alakú adszorbenst üveg-, műanyag- vagy fémlapra rétegezve használjuk fel.

Az elúciós módszer műveletei a következők: az oldat betáplálása és az oldott anyag adszorbeálódása (zónaképzés), a tiszta oldószer vagy oldószerkelet betáplálása, a zónát alkotó anyagok sávokra való különítése (kifejlesztés), a sávok kioldása az adszorbensből (elúció). A **zónaképzés** során az oldott anyagok egymástól függetlenül adszorbeálódnak. Három (A, B, C) összetevő esetén a zónák első részében mindhárom anyag jelen van, később kettő, és végül egy összetevő zónája figyelhető meg. A **kifejlesztés** az adszorbeált zónában található komponensek szétválasztását célozza. Ennek során az oszlopra megfelelő oldószert öntünk, a tiszta oldószer a zónában az adszorbeált anyag egy részét deszorbeálja, az erősebben adszorbeálódott anyag lassabban halad előre, a kevert zónából egymástól mindig jobban elkülönülő sávok alakulnak ki, melyek a teljes elválás után egy-egy tiszta anyagot tartalmaznak.

Az oldat áthaladása közben az adszorpció és a deszorpció folyamata automatikusan ismétlődik, így az egyes komponensek adszorbeálóképességüktől függően elkülönülnek egymástól. A komponensek szétválasztásának sikere függ az adott rendszeren belül az egyes komponensek adszorpciós tulajdonságaitól, a jellemző izotermáktól. Ha a kifejlesztés közben más oldószert használunk, mint zónaképzéskor, a zóna szélessége megváltozik. A gyengébben adszorbeálódó anyag előrehaladási sebessége nagyobb, az erősebben adszorbeálódóé kisebb. Ezért eredményes kifejlesztés után a zóna anyagai teljesen elkülönülnek egymástól, azaz mindegyik sáv csak egy oldott anyagot tartalmaz.

Az adszorpciós kromatográfia legáltalánosabban használt elmélete a **tányér-elmélet**, a kromatográfiai elválasztás hatékonyságának jellemzésére pedig az **elméleti tányérszám** használatos, mely szerint a kromatográfiai oszlop több olyan rétegből épül fel, amelyekben létrejön a szétválasztandó komponens egyensúlyi eloszlása a mozgó és a stacioner fázis között. Egy-egy ilyen réteg az **elméleti tányér**, melynek értelmében minél nagyobb az elméleti tányérszám, annál tökéletesebb a vonatkozó anyagokra a szétválás.

Összefoglalva tehát az adszorpció során **a folyadék- vagy gázfázisban lévő komponensek egy nagy fajlagos felületű adszorbensen megkötődnek**, melynek

során a megkötődött és a szabad molekulák között folyamatos kicserélődés megy végbe, és kialakul a dinamikus egyensúlyi állapot. Ez az egyensúly akkor következik be, ha az időegység alatt megkötött és az adszorbensről távozó molekulák száma azonos. A szétválasztani kívánt komponensek arányát az álló- és a mozgófázisban, az idő függvényében, az adszorpciós izoterma írja le.

3.2.1.2.2. Adsorbensek és minősítésük

A kromatográfiában használt adszorbensek nagy fajlagos felületű, szemcsés szerkezetű, hidrofób vagy hidrofil tulajdonságú anyagok. Tulajdonságaikat alapvetően meghatározza a szelektivitás, a kapacitás és az aktivitás. A **szelektivitás** azt jelenti, hogy az adszorbens képes a komponensek szelektív adszorpciójára, a **kapacitás** az egységnyi tömegű adszorbens által megkötött anyagmennyiséggel, az **aktivitás** pedig a kötőképesség erősségével jellemezhető. Az ideális adszorbentől elvárható, hogy szelektivitása és kapacitása legyen minél nagyobb, ugyanakkor aktivitása csak a közepeshez közelítsen, mert a nagy aktivitású adszorbensről nehéz a szétválasztani kívánt anyagokat eltávolítani, a gyenge aktivitású adszorbens pedig nem ad számottevő szeparációt.

Az adszorbensek aktivitása kémiai szerkezetüktől és felületük morfológiájától függ. Empirikusan az adszorbenseket növekvő kapacitás, valamint aktivitás szerint sorba lehet állítani, amely sorrend csak egy adott rendszeren belül érvényes. Az ideális adszorbens szelektivitása és szelektív adszorpciós kapacitása nagy, aktivitása közepes. Az elválasztás sikerét nagymértékben befolyásolja a **szemcsenagyság**. Kisebb részecskék esetén gyorsabban áll be az egyensúly és kevésbé zavar a diffúzió hatása. A túl finom részecskék alkalmazásakor nagyon megnő az oszlop ellenállása a folyadék áramlásával szemben. Az előzőek miatt legmegfelelőbb szemcsenagyság 2-15 μm .

Az adszorbensek aktivitási, illetve kapacitási sorozatát a 3.1. táblázat mutatja.

Az adszorbenseket minősíteni lehet az adszorbens kapacitása, aktivitása és egy anyagra vagy csoportra vonatkozó szelektivitása alapján. Közvetett tájékoztatás kapható **az adszorbens kapacitásáról** a kálium-jodidos jódoldat, a kálium-permanganát-oldat, a metilénkék vagy a szudánvörös adszorpciójának vizsgálata alapján. A **szelektivitás** elemzése során a vizsgálandó adszorbent szerves színezékpárral hozzuk össze, majd szelektálóképességét a színezékek eluálthatósága alapján minősítjük. Az **aktivitás** azzal a hőmennyiséggel jellemezhető, amely felszabadul, ha az adszorbens 50 g-ját 65 cm^3 petroléterrel 0 °C-on összekeverjük.

A kromatográfiában adszorbensként alkalmazhatók az alumínium-oxid, a szilikagél, a magnézium-oxid, a kalcium-oxid és -hidroxid, a kalcium- és magnézium-karbonát, a kalcium-szulfát, a természetes szilikátok, a keményítő, a cellulóz, az aktív szenek különböző fajtái és a kémiailag módosított (decil-, oktadecil-, alkán) szilikagélek.

3.1. táblázat. Adsorbensek aktivitási, illetve kapacitási sorozata

Lefelé növekvő aktivitás	Lefelé növekvő kapacitás
Szacharóz	Kalcium-oxid
Keményítő	Kalcium-fluorid
Inulin	Alumínium-oxid
Talkum	Cukorszén
Nátrium-karbonát	Cink-szulfid
Kalcium-karbonát	Króm-oxid
Kalcium-foszfát	Bázisos alumínium-oxid
Magnézium-foszfát	Savas alumínium-oxid
Magnézium-oxid	Floridin
Kalcium-hidroxid	Franconite
Magnézium-szilikát	Aktív szén
Alumínium-oxid	
Aktív szén	
Aktív magnézium-oxid	
Fuller-föld	

Az adszorpciós kromatográfiában leggyakrabban alkalmazott adszorbens a hidrofíl szilikagél, mely a különböző anyagokat azok polaritása sorrendjében köti meg. Az analitikai elválasztást befolyásolják a szemcseméret és a szilikagél felületén megkötött ciano-, amino-, nitro-, hidroxil- stb. csoportok, melyek nagymértékben befolyásolják mind a polaritást, mind a szelektivitást. Ha hosszú szénláncú szénhidrogének vannak a felülethez kötve, annak polaritása jelentősen megváltozik, amikor is a mozgófázis polárosabb lesz, mint az állófázis (**fordított fázisú kromatográfia**). Ha az állófázis polárosabb, mint a mozgófázis, **normál fázisú kromatográfia**ról beszélünk.

3.2.1.2.3. A mozgófázis összetétele

Az oszlop mellett az elválasztást döntően befolyásolja a mozgófázis összetétele is. Alapvető, hogy a mozgófázisban a szétválasztani kívánt komponensek oldódjanak, és tegye lehetővé a komponensek optimális adszorpcióját. A poláros adszorbensen a szétválasztani kívánt komponensek akkor adszorbeálódnak erősebben, ha a mozgófázis polaritása kisebb.

Az adszorbens felületén az oldószer molekulái (**eluálószer**) és az adszorptívum molekulái versengenek a megkötődésért, így az a komponens adszorbeálódik jobban, amelyiknek nagyobb az affinitása az adszorbenshez. Az oldószer **eluotrop sorba** állíthatók. Ennek első tagjai vagy ezek keverékei a kromatográfiaszétválasztáshoz alkalmas zónaképző oldószer, futtatószer, az eluotrop sor

utolsó tagjai a pedig a legjobb eluensek. Apoláris adszorbenseknél az eluotrop sor fordítva érvényes.

A poláros oldószerek eluálóképessége tehát nagyobb, amiről az eluotrop sorba rendezett oldószerek adnak tájékoztatást. A hidrofíli adszorbenseknél az eluotrop sor tagjai növekvő polaritásuk sorrendjében a következők: pentán, hexán, toluol, benzol, etanol, metanol, hangysav és víz. Az eluotrop sor tagjainak elegyítésével az analitikai feladat szempontjából optimális polaritású eluenst lehet előállítani.

A legjobb oldószer kiválasztásakor a következőkre kell figyelemmel lenni: Az oldószerben a szétválasztandó minta oldható legyen. Az a legmegfelelőbb oldószer, amelyből az elegy közepes erősséggel adszorbeálódik, és az egyes alkotók különböző adszorptivitása megfelelően érvényesül. Az eluotrop sor egyes tagjai közötti különbséget csökkenteni kell, ha közeli adszorptivitású anyagokat akarunk szétválasztani. Ilyenkor a sor két-három szomszédos oldószérének keverékét használjuk.

3.2.1.2.4. Az alkalmazott kromatográfias eljárások

Az elúciós kromatográfia mellett a gyakorlatban még a frontális kromatográfia és a kiszorításos kromatográfia terjedt el. A **frontális kromatográfia** esetén a több oldott anyagot tartalmazó elegy átfolyik az előzőleg tiszta oldószerral átnedvesített adszorbens oszlopon. Ezt követően először a tiszta oldószer jelenik meg az oszlop végén, majd az adszorptivitásuktól függően egymást követően az adszorbeált anyagok. A leggyengébben adszorbeálódó anyag jelenik meg először, majd a többi. A kifejlesztés alatt az egyes komponensek csak részlegesen különülnek el egymástól, részben egyidejűleg lépnek ki az oszlopról.

A **kiszorításos kromatográfia** esetén az oldott anyagok az oszlop felső részén zónát képeznek. A kiszorítóoldatot (erősebben adszorbeálódik, mint a zóna anyagai közül bármelyik) áramoltatása következtében a kiszorítóanyag elmozdítja az egyik komponenst, és ugyanezt teszi a kevésbé adszorbeálódóval. A kiszorítás folyamán lefolyó oldatban először az első anyag jelenik meg tisztán, majd a második anyag ugyancsak tisztán, és aztán következik a kiszorítóanyag.

3.2.1.2.5. Nagyhatékonyságú (nagynyomású) folyadékkromatográfia (HPLC)

A **nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia** (angol rövidítése: HPLC) egy olyan automatizált elválasztási eljárás, melynek során a nagy hatékonyságot az oszloptöltet szemcseméretének csökkentésével, a töltet fajlagos felületének növelésével és az alkalmazott nagynyomású mozgófázis áramoltatásával érték el. A berendezés részei az eluens tárolók, a pufferek elegyítésére szolgáló keverő berendezés, a manuális vagy automata mintaadagoló, a származékképző egység, a nagy nyomás kifejtésére alkalmas szivattyúk, a szétválasztást végző nagyhatékonyságú oszlop,

a különféle detektorok és frakciószedők, a jelerősítők, a regisztráló berendezések és a vezérlő számítógép.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia tehát automatizált, nagynyomású kromatográfias eljárás, melyre mind a „nagynyomású”, mind a „nagyhatékonyságú” kifejezést használja a szakirodalom, de valójában nem a nyomáson, hanem főleg a hatékonyságon van a hangsúly, ezért a továbbiakban ezt az elnevezést használjuk. A mozgófázis folyadék, a gyakorlatban használt töltet pedig legtöbbször nagyfokú keresztkötésekkel készített polimerek (sztirol-divinilbenzol kopolimerek, polimetakrilátok) vagy szilikagél alapú mikroszemcsék, esetleg kemény gélek.

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográf felépítése

Puffertárolók. Az oszlopra felvitt minta komponenseire bontása az eluálóoldat folyamatos, nyomás alatti bevezetésével történik. Az eluensek gáztalanítását a tartály légterének ritkításával és az eluensek kiforrálásával oldják meg. Szükségessé válhat, hogy az eluens polaritását, pH-ját, illetve ionerősségét folyamatosan változtassuk, amit két vagy több egymással elegyedő, de eltérő tulajdonságú oldószer összekeverésével lehet elérni. Az **izokratikus** eljárás során a puffer összetétele nem változik, **gradienselúciókor viszont** az eluens összetételét előzetesen meghatározott program szerint változtatják az analízis során.

Szivattyúrendszer. A töltet nagy hidrodinamikai ellenállású, ezért 10-50 MPa (100-500 bar) nyomásra van szükség a mozgófázis áramoltatásához, az újabb készülékek pedig 50-70 MPa nyomáson is dolgozhatnak. Az **optimális szivattyú** pulzálásmentesen szállít, lehetővé teszi a gradienselúcióhoz szükséges gyors folyadékcsere-t, és minimálisak a belső holtterek. A **HPLC-szivattyú** lehet alternáló dugattyús szivattyú és membránszivattyú, melyek pulzáló folyadékáramot hoznak létre, injekciós rendszerű szivattyú, mely lüktetésmentesen áramoltat, és pneumatikus szivattyú, melynél gáznomással működő kisnyomású hengerhez egy nagynyomású henger csatlakozik.

A **mintaadagolók** lehetnek fecskendő-s injektálásúak vagy mintabemérő mikroszelepek, melyeknél a mintát fecskendővel juttatjuk a szelep külső csőspirálisába, majd egy határozott mozdulattal beforgatjuk a feltöltött csőszakaszt az eluensáramba.

Oszlopok és töltetek. Az oszlopok biztosítják a tökéletes elválasztást minimális sáv (csúcs) szélességgel. Nyomásálló, rozsdamentes acélból készülnek, hosszuk 15-50 cm, belső átmérőjük 2,5-4,0 mm. Az analitikai elválasztások során a leggyakrabban a 25 × 4 mm-es oszlopokat használják. Az elválasztás legnagyobb hatékonysággal porózus felületű gyöngyökkel vagy porózus réteggel bevont gyöngyökkel valósítható meg. A legszélesebb körben alkalmazott töltet a módosított szilikagél, ill. az alumínium-oxid. Az **oszlop töltése** 40 μm -nél nagyobb átmérőjű, gömb alakú és 20 μm -nél nagyobb átmérőjű porózus felületű szemcsék esetén történhet **száraz töltési módszerrel, tömési eljárással**, melynek során az

adagokat teflon végű dugattyúval tömörítjük, vagy **zagy formájában**, nagynyomású folyadék segítségével, melynek során tömör töltetté nyomják össze.

A **mozgófázis** komponenseinél a legfontosabb tulajdonságok a forráspont és a viszkozitás, valamint hogy ne mutasson az ultraibolya (UV) tartományban abszorpciót, mert nagyon sok vegyület detektálása az UV-tartományban történik. Mivel a nagy hatékonyságú oszlopok nagy hidrodinamikai ellenállásúak, ezért a szivattyúktól elvárjuk, az áramlási sebesség állandósága mellett, az 1-70 Mpa nyomást. A mintaadagolótól elvárjuk, hogy a minta éles sávban kerüljön az oszlopra, melynek a fecskendő injektorok, ill. a mintabemérő mikroszelepek felelnek meg. Ez utóbbinál a mintát egy külső csőspirálba juttatják, majd egy határozott mozdulattal beforgatják az eluens áramba.

Detektorok és regisztrálóberendezések. Az oszlopot elhagyó eluensben az elválasztott komponensek koncentrációja detektorral folyamatosan követhető, melyek leggyakrabban UV-VIS fotométerek, fluorométerek vagy refraktométerek. A detektorok fontos tulajdonsága a detektorzaj, mely adódhat a műszer elektronikájából, a hőmérséklet és a hálózati feszültség ingadozásából, az áramlási sebesség-változásból és a szivattyú pulzálásából. A kis koncentrációban jelen lévő komponensek kimutatási határának meghatározása miatt ismerni kell a detektor-alapvonal eltolódását. A **kimutatási határ** az a legkisebb mintakoncentráció, amelyet még érzékelni tudunk.

Lineáris dinamikus tartomány az a koncentrációintervallum, amelyen belül a detektor a koncentrációval arányos nagyságú jelet szolgáltat. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfok általában UV-VIS fotométerrel, fluorométerrel, differenciál-refraktométerrel vagy diódasoros detektorral működnek. Az **UV- és látható tartományban működő fotométerek** viszonylag érzéketlenek az áramlási sebesség változására, a hőmérséklet-ingadozásra, és több vegyület érzékeny detektálását teszik lehetővé. A detektálás során a mintáknak az ultraibolya- vagy látható tartományban abszorbeálniuk kell. A deutériumlámpa fénye résen keresztül a monokromátorházba jut, homorú tükör optikai rácsra vetíti, és a kívánt hullámhosszú monokromatikus fény kiválasztható. A látható hullámhossztartományban dolgozó fotométerek alkalmazása esetén az oszlop után a komponenseket színreakcióba vesszük, a reakcióterméket pedig fotometriásan mérjük. Jó példa erre a ninhidrinreakció aminosavakkal, melynek során a képződött kékesibolya színű vegyületet (a prolin és hidroxiprolin esetében sárgát) 570 (illetve 440) nm-en fotometráljuk.

A **differenciál-refraktométer** esetén az érzékelő folyamatosan méri a referenciacellában lévő tiszta, és az analizátorcellában lévő, az elválasztott komponens is tartalmazó eluens törésmutatója közötti különbséget. A **fényelhajlós törésmutató-mérő** lineáris dinamikus tartománya nagyobb, mint a differenciál-refraktométereké. A **fluorimetriás detektorok** az elválasztott komponensek ultraibolya sugárzással keltett fluoreszcens sugárzását mérik. Nem fluoreszkáló vegyületből származékképzéssel fluoreszcenciára képes vegyület készíthető. (Aminosavak pl.

o-ftáldialdehiddel és merkapto-etanollal adnak ilyen típusú vegyületeket.) A **voltammetriás és a konduktometriás detektálás** igen érzékeny és jól használható ionos komponenseknél.

3.2.1.2.6. A kromatogramok értékelése

A kromatogram egy diagram, melynél az idő függvényében olvasható le a minta koncentrációjával arányos detektorjel. Ideális esetben minden komponens szimmetrikus, haranggörbe vagy Gauss-görbe alakkal jellemezhető csúcs formájában lép ki az oszlopból. Minden csúcs a komponens anyagi minőségének jellemzésére alkalmas, amely meghatározott idő eltelte után hagyja el az oszlopot. A minta injektálása és az oszlop végén, a csúcsmaximum megjelenése között eltelt időt **retenciós időnek** nevezzük (t_R), mely adott kromatográfiai viszonyok között jellemző az egyes komponensekre, és amellyel a **minőségi analízis** elvégezhető. Ha az adott retenciós időnél nincs jel, a kérdéses komponens nincs jelen a mintában. Az elválasztásra jellemző a szomszédos csúcsok retenciós idejének különbsége, mely minél nagyobb, annál könnyebben választható el a két komponens egymástól. Minden komponensre jellemző a sávszélesség, mely minél kisebb, annál keskenyebbek a csúcsok és annál jobb az elválasztás.

A **menyiségi értékelés** a csúcsmagasság, illetve a csúcsterület mérésével lehetséges. Csúcsmagasságnak az alapvonaltól a csúcs legmagasabb pontjáig terjedő távolságot tekintjük. A csúcsterület mérésekor a csúcs magasságát szorozzuk a csúcs félmagasságánál mért szélességével. A csúcs magassága, illetve annak területe egyenesen arányos a koncentrációval, ezért ismert koncentrációjú komponens csúcsmagasságához hasonlítva az ismeretlen koncentrációjú komponens csúcsmagasságát, az ismeretlen csúcshoz megfelelő koncentráció számolható. **Belső standard alkalmazásakor** az ismeretlen keverékhez adott koncentrációban ismert vegyületet adunk, így azt belső jelzőként használva függetlenítjük az elemzés pontosságát pl. az injektálás reprodukálhatóságától és egyéb kísérleti paramétereiktől.

3.2.1.3. Megoszlásos kromatográfia

A megoszlásos kromatográfia során **az elválasztás alapja az elválasztandó anyag ismételt ellenáramú megoszlása egy álló- és egy mozgófázis között, melynek során a minta komponensei egymással nem elegyedő folyadékokban (állófázis és mozgófázis) különböző mértékben oldódnak.** Az állófázis egy szemcsés hordozóra felvitt nagy viszkozitású folyadék, a mozgófázis pedig gáz vagy vizes oldatok és szerves oldószerek különböző összetételű elegyei. A fázisok közötti egyensúlyi koncentrációmegoszlás elsősorban a mozgófázis polaritásától függ, ezért a megoszlási hányados a mozgófázis összetételének változtatásával módosítható.

3.2.1.3.1. Megoszlás, megoszlási törvény

A **megoszlás** az a folyamat, amikor valamely anyag egyidejűleg két egymással érintkező, de nem elegyedő oldószerben oldódik, és ekkor az egyensúly beálltával a két oldatban észlelt koncentráció viszonya független a koncentráció abszolút értékétől, állandó. Ha az egyik oldószerben az oldott anyag koncentrációja c_1 , a vele egyensúlyban lévő másik oldószerben c_2 , akkor a megoszlási hányados (K): $K=c_1/c_2$, függetlenül a c_1 , illetve a c_2 abszolút értékétől. A **megoszlási hányados** híg oldatokban csak a résztvevők anyagi minőségétől és a hőmérséklettől függ, viszont független a koncentrációtól.

A **megoszlási törvény akkor érvényes**, ha az adott anyag molekuláris állapota mindkét oldószerben ugyanaz, sem a disszociációs, sem az asszociációs viszonyok nem változnak. A **molekuláris állapot változása** módosítja az összefüggést, ugyanis ha a második oldószerben az oldott anyag molekulái két új molekulára disszociálnak, a megoszlási hányados: $K= c_1/c_2^2$. Ha n molekula asszociál, akkor $K=c_1/\sqrt[n]{c_2}$.

A **mozgófázis halmazállapotától függően** ismert gáz-folyadék kromatográfia (a mozgófázis gáz) vagy folyadék-folyadék kromatográfia (a mozgófázis folyadék). Mindkét elválasztási eljárás alapja az a tény, hogy két egymással nem elegyedő oldószer rendszerben egy komponens oldódása során beálló egyensúly esetén a megoszlási hányados értéke független a koncentrációtól, és csak a hőmérséklet befolyásolja azt.

3.2.1.3.2. A megoszlásos kromatográfia elmélete

Az alkalmazott adszorbens a szilárd hordozó, a rajta megkötött folyadék az állófázis, a másik oldószer a mozgófázis. Az elválasztandó elegy összetevői e két fázis között oszlanak meg. A szilárd hordozó lehet oszlopba töltött porszerű adszorbens, üveglapra felkent vékonyréteg, szűrőpapírlap vagy -csík. Ez alapján az eljárás lehet megoszlási oszlopkromatográfia, rétegekromatográfia és papírkromatográfia.

Az elválasztandó anyagok azonosítása a **retenciós faktor** (R_f) vagy visszatar-tási tényező alapján történik:

$$R_f = \frac{\text{a sáv elmozdulása}}{\text{a folyadékfront elmozdulása}}$$

A **papírkromatográfia esetében az R_f értéke** függ a papír minőségétől, a papírostok irányától, a kifejlesztés módjától (leszálló, felszálló, körkörös stb.), az oldat töménységétől, a zavaró anyagok jelenlététől és a kifejlesztés hőmérsékletétől. Adott oldószerrelegyekre, meghatározott papírral, kísérleti körülmények között, az R_f -értékek viszonylag állandók.

A megoszlási kromatográfiában alkalmazott szilárd fázisú **hordozóanyagok** a két oldószer közül az egyiket adszorbeálják. Ha az állófázis vizes rendszer, akkor az adszorbens a vizet nagymértékben képes megkötni a felületén. Hidrofób anyagok kromatografálása esetén az álló folyadékfázis apoláros oldószer, ezért ilyenkor csökkentett hidrofilitású hordozóanyagot kell használnunk. A hidrofób adszorbensen, hidrofób álló- és hidrofil mozgófázissal végzett megoszlási kromatográfia a **fordított fázisú kromatográfia**.

Az újonnan **kifejlesztett stacioner fázisoknál** a funkciós csoportokat stabil kémiai kötással rögzítik a szilárd hordozó felületére. A hordozó általában szilikagél, melynek felületi OH-csoportjai lépnek reakcióba különböző funkciós csoportokkal. A kémiailag kötött fázisú töltetek szinte teljesen átvették a stacioner folyadékfázisok szerepét, melyek három méretben készülnek: porózus, preparatív célra: 25-40 mikrométeresek; porózus, felületi töltetlen: 25-50 mikrométeresek; porózus, analitikai célra: 5-11 mikrométeresek.

Egyfázisú oldószerelegyként vízzel korlátlanul elegyedő szerves folyadékok (pl. aceton, metil-alkohol, etil-alkohol, hangyasav, piridin stb.) használatosak. Eredetileg vízzel korlátozottan elegyedő folyadékok esetében, hidrofílező komponensek (ecetsav) alkalmazásával, vízzel minden arányban elegyedő 3-4 komponensű elegyeket (pl. etilacetát-jegecet-víz 3:2:3) hoztak létre. **Kétfázisú oldószerelegyként** kiválóan alkalmasak a butanol-víz, butanol-ecetsav-víz és a fenol-víz különböző arányú elegyei.

3.2.1.3.3. Rétegekromatográfia

A rétegekromatográfiát, melynek során az adszorbenst vékony rétegben lemezre visszük, kis mennyiségű anyagok keverékének gyors elválasztására használhatjuk. **Előnyei** a kifejlesztés rövid időtartama, a foltok jó szétválasztási lehetősége, illetve az, hogy a kémiailag ellenálló hordozóanyagon agresszív szerves oldószer is felhasználható. **A rétegekromatográfia eszközei** a rétegekromatográfias lemez, az adszorbens és a kötőanyag. **A rétegekromatográfiára történő előkészítés során** az adszorbenst és a kötőanyagot a szükséges mennyiségű vízzel szuszpenzióvá elegyítjük, a lemezre (üveg, műanyag vagy fémlemez) felkenjük, szobahőmérsékleten szárítjuk, 100-105 °C-os szárítószekrényben 30-45 percig aktiváljuk, majd az aktivált lemezeket exsikkátorban tároljuk. A rétegeket kromatografálás közben csiszolt fedővel ellátott üveg futtatókamrában (üvegcádák) légmentesen lezárjuk, melynek következtében a lemezek az oldószergőzökkel telített térben vannak.

A rétegekromatográfia gyakorlati kivitelezése során először kiválasztjuk a réteget, majd a vizsgálandó oldatot mikropipettával egymástól 20-30 mm-re lévő pontokra felvisszük, ügyelve arra, hogy egy-egy folt 6-8 mm-nél ne legyen nagyobb átmérőjű, majd a lemezt a futtatószer gőzeivel előzetesen telített futtatókamrába helyezük. A rétegre felvitt anyag foltjának előrehaladását a vonatkozó adszorpció izoterma határozza meg. A kromatogram kifejlesztését akkor fejezzük

be, ha az oldószer frontja megközelíti a lemez felső szélét. Szervetlen adszorbensek esetén előhívásra agresszív anyagokat (tömény kénsav, perklórsav, antimonklorid) is lehet alkalmazni.

A **nagyteljesítményű rétegekromatográfia (HPTLC)** esetén az álló szilárd fázis kisebb részecskemérete ($5-7\ \mu\text{m}$ átmérő) és a réteg tömör kialakítása az elválasztási teljesítményt növeli. A **lineáris HPTLC-technika** alkalmazása 10×10 cm-es rétegen 30-50 minta eredményes, mennyiségileg is jól értékelhető vizsgálatát teszi lehetővé.

A **túlnyomásos rétegekromatográfia (OPTLC)** növeli a rétegekromatográfia teljesítőképességét, mert a mozgófázis áramlási sebessége az egész szétválasztás alatt állandó.

3.2.1.3.4. Papírkromatográfia

A **papírkromatográfiában** alkalmazott kromatográfias papír nagy nedvszívó képességű, az állófázis kialakulásához elegendő oldószert tud adszorbeálni, és nedves állapotban is kielégítő szilárdságú. A papír vastagsága a folyadékfelszívó képességét határozza meg. A megoszlási kromatográfia folyadékfázisa víz vagy több, vízzel korlátozottan vagy korlátlanul elegyedő folyadék, de meghatározott pH-jú pufferoldatot is lehet használni. Az oldószerek használatánál figyelemmel kell lenni arra, hogy az **R_f -érték függ az oldószer polaritásától**, ugyanis a hidrofíl anyagok R_f -értéke az oldószer polaritásával együtt nő.

A **papírkromatográfia eszközei** a kromatografálószekevény, mely 50-80 cm magas és 30×60 cm alapterületű saválló acél vagy üveg, a kromatográfias papír, a mintafelvívő mikropipetták, a futtatószer, az előhívó reagensek és egy szárító-szekevény.

A **megoszlási papírkromatográfia** lehet leszálló-, felszálló-, vízszintes csík- és körpapír-kromatográfia. Az elválasztandó elegy koncentrációja az oldatban mindegyik esetben 0,5-2,0% közötti. A felcseppentéshez mikropipettát, szűk kapillárist használunk, ügyelve arra, hogy a szétválasztandó oldat foltja kb. 5 mm átmérőjű legyen, és mintegy 0,01-0,3 mg anyagot tartalmazzon. A felcseppentés során töményítést végezhetünk a papíron a felvitt csepp óvatos beszárításával.

Leszálló kromatográfia esetén a papír végétől 8-10 cm-nyire, egymástól 2-4 cm távolságban helyezük el az egyes anyagkeverékek cseppjeit, nagyobb mennyiségek kromatografálása esetén viszont sávok felvitelt alkalmazunk. A futtatószer tartalmazó edény a kromatografálóberendezés felső részében van, ebbe merül bele a papír vége. Az oldószer részben a kapillaris erő, részben a nehézségi erő hatására lefelé halad a papírban. A kromatogramot addig futtatjuk, amíg a folyadékfront meg nem közelíti a papír végét. Ha az oldószert tovább futtatjuk a papíron, túlcsepegő futtatást hajtunk végre. **Felszálló kromatográfia** esetén az elrendezés a leszálló módszer fordítottja. A papírcsík megcseppentett vége a be-

rendezés alján elhelyezett oldószerbe merül, a futtatószer pedig a kapilláris erők hatására fölfelé halad.

Vízszintes kromatográfia esetén a kiszabott papírcsíkokat vízszintesen helyezük el, az oldószerrel pedig papírnyelv segítségével közvetítjük hozzá. A **körpapír-kromatográfiában** a kromatográfiai papírból 8-10 cm-es sugarú kört vágunk, és az oldószer a megcseppentés helyétől, a középponttól vízszintesen halad a papírban a kerület felé, és az anyagkeverékek egyes alkotói koncentrikus körök alakjában válnak szét. **Nyújtott papírkromatográfia** esetén, ha az oldószerfront eléri a papír szélét, a futtatást megszüntetjük, a kromatogramot megszárazítjuk, és hasonló oldószerrel újra futtatjuk.

A **kétdimenziós papírkromatográfiát** sokkomponensű keverék szétválasztására használjuk, ha R_f -értékeik egymáshoz közel esnek, és egydimenziós futtatással nem érhető el a kívánt elválasztás. Az elválasztani kívánt oldatok elegyét a papír bal alsó sarkába cseppentjük, az első futtatószerrel megfuttatjuk, majd szárítás után 90 fokkal elforgatva ismételten ugyanazzal vagy másik futtatószerrel újabb futtatást végzünk. A futtatás iránya a második esetben tehát az elsőre merőleges.

A **papírkromatogramok értékelése** során a kromatogramot kiemeljük a berendezésből, ha a színes anyagok közvetlenül megfigyelhetők, még nedvesen megjelöljük az oldószerfrontot, becsléssel meghatározzuk a foltok súlypontját és grafitceruzával megjelöljük. Színtelen anyagok esetén ultraiobolya fényben végzett megfigyeléssel, alkalmas előhívószer segítségével vagy a komponenseket színes származékokká alakítva lehet a kromatogramot értékelni. Az előhívószer a papírra gáz, gőz vagy folyadékpermet alakjában vihető fel. Leggyakoribb mód a reagens oldat rápermetezése a kromatogramra, melyet követően az előhívást gyakran melegítéssel kell összekapcsolni. A színes foltokat is körülrajzoljuk és megjelöljük a súlypontjukat, hogy amennyiben később a színükből veszítenének, vagy az teljesen eltűnne, további értékelést is tudjunk végezni.

3.2.1.3.5. Minőségi és mennyiségi meghatározás

Mind a rétegekromatográfiánál, mind a papírkromatográfiánál a **minőségi analízis** az R_f -értékek megállapításával, összehasonlító, azonosító anyagok együtt futtatásával történik. A **mennyiségi analízis** hígítási sorral történő együtt futtatással, denzitométerek segítségével történik. A **denzitométerek** fotométerek, melyek a megvilágított kromatogramon áteső vagy arról visszavert fény intenzitását mérik, regisztrálják. Emellett az értékelés lehetséges kioldás, elúció után is. A **futtatáshoz használt oldószereket** úgy kell megválasztani, hogy a vizsgált anyagok R_f -értékei 0,3–0,7 közé essenek. A **kétdimenziós kromatogramoknál** minden egyes komponens modelloldatából, egydimenziós futtatással, külön-külön mindkét oldószerben meghatározzuk az R_f -értékeket, és kiszámítjuk az illető anyag foltjának várható helyét.

3.2.1.4. Ioncserés kromatográfia

3.2.1.4.1. Az ioncsere mechanizmusa

Az ioncserélő kromatográfia állófázisa egy olyan ioncserélő anyag, amelynek mátrixához elektrolitos disszociációra képes csoportok kötődnek kovalens kötéssel. Azokat az ioncserélőket, amelyek mátrixán **a fix ion negatív töltésű savmaradék, kationcserélőknek, a pozitív töltésű fix ion** tartalmazókat pedig **anioncserélőknek** nevezzük. A fix ionok ellenionjai ugyanolyan töltésű más ionokkal kicserélhetők. Az ioncserés kromatografálás során a szorbens ellenionjait először az oszlopra adagolt minta ionjai váltják fel, majd ezeket, töltéseik nagyságával ellenkező sorrendben, az eluáló pufferoldat ionjai fokozatosan kicserélik. A kicserélés, illetve elválasztás függ a kromatografálás hőmérsékletétől, valamint a mozgófázis ionkoncentrációjától és a pH-tól.

Az ioncserés kromatográfia esetén tehát az állófázis egy polimer szerkezetű szerves vagy szervetlen anyag, amelyen aktív csoportok vannak. Az aktív csoportok nem tudnak a vázról leszakadni, ellenionok is tartoznak hozzájuk, amelyek a mozgófázis hasonló jellegű ionjaival kicserélődhetnek. A **kationcserélő polimer** aromás gyűrűhöz kötött disszociáló (protonleadó) csoportot tartalmaz. Ezek lehetnek $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{PO}_4\text{H}_2$ vagy fenolos $-\text{OH}$, a kicserélhető kation pedig lehet H^+ vagy Na^+ .

A kationcserélők működését az alábbi összeállítás mutatja:

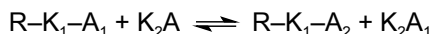


ahol:

- R = az ioncserélő szervetlen vagy szerves polimerváz,
- A_1 = az el nem mozdítható aktív anioncsoport,
- A_2 = a mozgófázis anionja,
- K_1 = a polimerváz eredeti kationja,
- K_2 = a mozgófázisban kicserélt kation.

Az anioncserélő anyagok disszociációra képes különböző rendű kationokat [$-\text{NH}_3\text{OH}$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{OH}$] tartalmaznak, melyekhez anionként OH^- és Cl^- is kapcsolódhat.

Az anioncserélő működését az alábbi összeállítás mutatja:



ahol:

- R = az ioncserélő szervetlen vagy szerves polimerváz,
- K_1 = a gyantavázhoz kötött kationcsoport,

- K_2 = a folyadékfázisban lévő kation,
 A_1 = a gyanta eredeti anionja,
 A_2 = a folyadékfázisban lévő és kicserélt anion.

A folyékony mozgófázisban oldott ionoknak az álló, szilárd fázis disszociációjára képes, funkciós csoportjairól származó ionokkal való reverzibilis kicserélődése sztöchiometrikus, amely a tömeghatás törvénye alapján játszódik le. Az ioncserélő **az aktív helyek disszociációs foka** szerint lehet erősen savas, gyengén savas, erősen bázisos és gyengén bázisos. Az ioncserélő kromatográfiában, **több oldott ion esetén**, az ioncserélő gyanta az egyik iont jobban megköti, mint a többi; a **folyamat szelektív** lehet. Az egyensúly eléréséhez szükséges időtartam hosszabb az adszorpciós kromatográfiánál.

A többértékű ionok erősebben kötődnek a gyantához, az azonos töltetű ionok között a sorrendet pedig a hidratált ion átmérője szabja meg, és az elválasztást befolyásolja a hőmérséklet is. Az oszlopon megkötött ionokat eluálthatjuk olyan oldattal vagy pufferrel, amely hasonló kicserélhető ionokat tartalmaz, amelyeknek affinitása az oszlopon lévő rögzített ionokhoz nagyobb, mint a megkötött anyagé. A kötött ionok kicserélődési állandóik sorrendjében hagyják el az oszlopot. Két ion jól elválasztható, ha a kicserélődési állandóik értéke 20%-kal különbözik egymástól.

3.2.1.4.2. Az ioncserélő gyanták és tulajdonságaik

Az ioncserés kromatográfia legfontosabb eszközei a szerves, szintetikus műgyanták, amelyeknél legelőnyösebb, ha egyféle aktív csoportot tartalmaznak. A kationcserélő és anioncserélő műgyanták szilárd váza leggyakrabban vinil-benzoldivinil-benzol kopolimer. A legfontosabb **szintetikus ioncserélő gyantákat** a 3.2. táblázat mutatja.

Az ioncserélő gyanta **kapacitása** megmutatja, hogy a száraz ioncserélő egységnyi mennyisége hány mol oldott iont tud kicserélni. A kapacitást egységnyi tömegű (g) műgyantára vonatkoztatva milligramm-ekvivalensben adják meg.

Az ioncserélő gyanták a különböző futtatószerkezetekben **duzzadnak**. A polárosabb oldószerek erősebb duzzadást okoznak, a kevésbé poláros oldószerre való áttérés viszont az oszlop összeesését, csatornaképződést, a polaritás növelése pedig az oszlop eltömődését okozhatja. A duzzadóképeséget a térhálós szerkezet változtatásával lehet befolyásolni.

Az analitikai kémiában igen gyakran alkalmazzák a **DOVEX 50 kationcserélő** műgyantát, mely szulfonált polisztirol láncokból áll, és divinil-benzol-hidakkal keresztkötésszerűen van térhálósítva. A térháló sűrűségétől függ, hogy az ioncserélő gyanta funkciós csoportja milyen nagy molekulákkal reagál. A divinil-benzol mennyisége 1-2-4-8-16% lehet, amit a gyanta minőségi mutatói sorában feltüntetnek. Minél sűrűbb a térháló, annál lassúbb az ionok diffúziója, és a kromatográfias egyensúly kialakulása is függ az ioncserélő gyanták részecskenyagságától.

3.2. táblázat. A legfontosabb szintetikus ioncserélő gyanták

Ioncserélő gyanta	Funkciós csoport	Kereskedelmi elnevezés
Erősen savas kationcserélő gyanta	Aromás-SO ₃ H	Amberlite IR 120 Amberlite CG 120 Dovex 50 Zerolit 225 Permutit Q
		Zeokarb
	Aromás-SO ₃ H + -COOH	Zeorex Duolit C
Gyengén savas kationcserélő gyanta	-COOH	Amberlite IRC-50 Amberlite XE-64 Zerolit 225
Erősen bázisos anioncserélő gyanta	Kvaterner bázis	Amberlite IRA-400 Amberlite IRA-401 Amberlite IRA-411 Dovex 1 Dovex 2 Zerolit FF De Acidite
Gyengén bázisos anioncserélő gyanta	Poliamin	Amberlite IR 4-B Amberlite IR 45 Dovex 3 Zerolit G Zerolit H Duolit A
Kevert kation- és anioncserélő gyanta		Amberlite MB-1 Amberlite MB-2 Amberlite MB-3 Biodeminrolit

3.2.1.4.3. Az ioncserés kromatográfia metodikája

Ioncserés oszlopkromatográfia esetében az oszlop homogén méretű szemcsékből áll. Az ioncserélő oszlopot nedves, iszapolós módszerrel töltjük, a gyantát használat előtt az előírt oldószerben duzzasztjuk, a kromatografálást vízes oldatban, elúciós vagy kiszorításos módszerekkel végezzük. Az ioncserélő műgyanta regenerálása az aktív helyre bekötendő iont nagy koncentrációban tartalmazó oldat segítségével történik. A kationcserélő műgyantákat savas oldatokkal (ritkábban Na-ionokkal), az anioncserélőket többnyire lúggal vagy kloridionokkal regeneráljuk.

Ioncserés rétegekromatográfia esetén általában ioncserés készrétégeken történik az elválasztás. Alkalmazzuk fehérjehidrolizátumok aminosav-összetételé-

nek kvalitatív és szemikvantitatív megállapítására, melynek során az egyes aminosavegyek szétválasztására különböző Na-citrát-pufferoldatok használandók. A 3.3. táblázatban e pufferek összetétele látható.

A B-puffer segítségével 16 aminosav egydimenziós elválasztására van lehetőség. Az aminosavak **R_f-értékei növekvő sorrendben**: arginin, lizin, hisztidin, fenil-alanin, tirozin, leucin, izoleucin, metionin, valin, prolin, alanin, glicin, glutaminsav, szerin, treonin, aszparaginsav. (A szerin és a treonin foltja rosszul válik el.) A C-pufferrel az aromás és bázikus aminosavak különíthetők el, a D-puffer a lizin és az ornitin elválasztását teszi lehetővé, az E-puffer pedig a triptofán kimutatására és elválasztására használható.

3.3. táblázat. Az aminosavak Fixion-réteges elválasztásához használható Na-citrát-pufferek (1000 cm³ végső térfogatra)

Jellemzők, illetve adalékok	EP	A	B	C	D	E
pH	3,28	3,28	3,30	5,23	4,25	6,00
Na ⁺ -koncentráció (M)	0,02	0,20	0,400	0,325	0,40	1,50
Citrát-koncentráció (mol·l ⁻¹)	0,067	0,067	0,400	0,117	0,067	0,30
Citromsav H ₂ O (g)	1,4	14,1	84,0	24,6	14,1	7,0
NaOH (g)	0,8	8,0	16,0	14,0	8,0	4,0
NaCl (g)	–	–	–	–	11,7	81,9
HCl, 37%, d: 1,19 (g/cm ³)	1,2	12,3	5,9	6,5	8,4	–
Glicerín (cm ³)	–	100	–	–	–	–
Metil-celloszolv*	–	–	–	–	–	100

* etilén-glikol-monometil-éter. EP = egyensúlyba hozó (ekvilibráló) puffer.

3.2.1.5. Gélkromatográfia

3.2.1.5.1. A gélkromatográfia elmélete

A gélkromatográfia vagy méretkizárásos kromatográfia a molekulatömeg-különbségeken alapuló egyik legelterjedtebb elválasztási módszer. A módszert hívják még gélszűrésnek és molekulaszűrésnek is. A molekulaméret szerinti elválasztás jól illeszthető az előzőekben ismertetett kromatográfiai módszerekhez. A gélkromatográfiai elválasztás során a mozgófázis valamilyen folyadék, a töltet pedig finom eloszlású gél, megfelelő pórusmérettel, ezért **a gél belsejébe csak azok a molekulák tudnak behatolni, amelyek mérete a gél pórusméreténél kisebb**. Amely molekulák behatolnak a gélszemcsék belsejébe, azok tovább maradnak az oszlopon, nagyobb oldószertérfogattal eluálódnak, mint a gélbe behatolni képtelen, a gél pórusainál nagyobb molekulák. Mivel egy gél pórusai mindig inhomó-

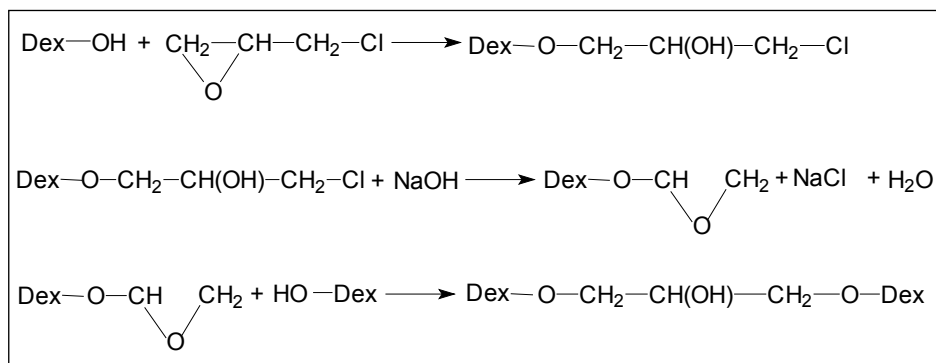
gének, a géلكromatográfia során a gél pórusainál kisebb és nagyobb molekulatömegű tartományba tartozó komponensek egymástól elválaszthatók.

3.2.1.5.2. Gél típusok és a dextranszél

A kromatografálást háromdimenziós rácsot alkotó, térhálós szerkezetű géleken végzik. A térháló mechanikai stabilitást nyújt a gélnek, és a háromdimenziós térháló a gél pórusméretét is meghatározza. A gél mátrixának inertnek kell lennie, azon ioncsoportok nem, vagy csak kismértékben lehetnek jelen. A gélnek mechanikailag és kémiaiilag stabilnak kell lennie, a gél és az elválasztani kívánt anyagok között legfeljebb gyenge, reverzibilis, hidrofób kölcsönhatások alakulhatnak ki. A gél szemcsemérete lehetőleg homogén legyen, hogy az eltérő méret miatt a részecskék közötti csatornák inhomogenitása ne következzen be. A kromatográfiai műveletekhez használt gélek kereskedelmi forgalomban kaphatók, és szinte minden elválasztáshoz megtalálható az optimális gél típus.

Kromatográfiai célra csak a pontosan ismert pórusnagyságú és duzzadt állapotban is megfelelő szilárdságú gél használható. Az e követelménynek megfelelő dextranszélket ismert szemcsenagysággal és vízfelvevő képességgel hozzák forgalomra, ahol előre lehet tudni a gélágy térfogatát, illetve a szétválasztandó frakciók molekulatömegét. A szemcsenagyság 40-300 μm között, a vízfelvevő képesség pedig 1-20 g/cm^3 között változik. A gélágy térfogata 2-40 cm^3/g közötti, a szétválasztandó frakciók molekulatömege pedig elérheti a 800 ezret. Négyszázszáz molekulatömegig a dextranszél- és a poliakrilamid-géleket, e fölött pedig a szefarózzégeket használják.

A géلكromatográfiai eljárás során a gél szemcsék pórusnagysága pontosan ismert és állandó érték, a gélképző anyag pedig nem lép kölcsönhatásba a szétválasztandó komponensekkel. A dextranszél kialakulását a 3.1. ábra mutatja.



3.1. ábra. A dextranszél kialakulása

A dextranszék tulajdonságai

A dextranszék kiindulási anyaga egy oldható poliszacharid, a dextranszék, mely kizárólag glükózrészekből épül fel. A glükózrészek 90%-a α -1,6-glikozidos, 10%-a pedig α -1,3-glikozidos kötéssel kapcsolódik egymáshoz. Az alkalikus dextranszékoldat epiklórhidrin hatására teljes tömegében, hőfejlődés közben hidrogéllé merevedik, melynek során a glükózláncokat glicerinéterhidak kapcsolják össze. A térháló pórusainak nagysága függ a kiindulási dextranszék molekulatömegétől, koncentrációjától és az epiklórhidrin arányától. A dextranszéken kívül olyan szintetikus gélképző anyagok is használatosak a gélkromatográfiában, amelyek megfelelő oldószerrel elegyítve szétválasztásra alkalmas gélkromatográfiás oszloppá duzzaszthatók. Kíváncsi vagyok, hogy a szemcsék közelítsék meg a gömb alakot, és duzzadt állapotban se legyenek túl lágyak. A gél jellemző tulajdonságait a részecskék közötti folyadék térfogata, a duzzadt gél szemcsék belsejében lévő oldószer térfogata és a gélképző anyag saját térfogata határozza meg.

3.2.1.5.3. A gélkromatográfiás eljárás

A gélkromatográfiás eljárás során legelterjedtebben a Sephadex néven forgalomba kerülő dextranszék-készítményeket alkalmazzák. Mindegyik Sephadex-típushoz meghatározott pórusméretek tartoznak, ezért a szétválasztandó molekulák méretének ismeretében kiválasztható az analitikai feladat szempontjából legmegfelelőbb változat. A duzzadt állapotban lévő Sephadex gélnél felléphet mikrobiológiai romlás, ezért a duzzadt gél, tartósítás céljából, ki is lehet szárítani.

Analitikai elválasztásra a 10-50 cm hosszú és az 1-2 cm belső átmérőjű oszlopokat, míg preparatív célokra akár több méteres, 10-20 cm belső átmérőjű oszlopokat is használnak. A mozgófázis speciális oldat vagy puffrendszer, melynek oszlopon keresztül történő áramoltatását speciális szivattyúk biztosítják.

A gélkromatográfiás analízis során az első lépés a gélágykészítés, melynek során a száraz gélkeletet a megfelelő oldószerben duzzasztják. A duzzasztás ideje szobahőmérsékleten akár 24 óra is lehet. Az oszlopkészítés során a duzzasztott gél az eluálószerrel homogéneen elkeverjük, buborékmentesen oszlopba töltjük, üleptjük, majd néhány órán át a mozgófázissal átmoszuk. A mintafelvételnél ügyelünk arra, hogy a gélágyat ne keverjük fel, és hogy a minta térfogata ne legyen nagyobb a gélágy térfogatának 5%-ánál.

3.2.1.5.4. Géloszlop-kromatográfia

A géloszlop-kromatográfiás eljárás során a duzzasztott gél a megfelelően előkészített oszlopba töltjük, és az alkalmazni kívánt oldószerrel többször átmoszuk. Az oldószer folyamatos felvitele vagy szivattyúval, vagy az oldószer tartály megfelelő magasba helyezésével, gravitációs úton valósítható meg. Ennek során szükség van összekötő csővezetésekre, és az eluátum gyűjtéséhez frakciószedő be-

rendezésre. Az elúció során általában perisztaltikus pumpával áramoltatjuk a mozgófázist, az oszlopról távozó eluátumot pedig frakciószedő segítségével üvegcsövekbe gyűjtjük. Az oszlopról távozó anyagok mennyiségét legtöbbször átfolyó küvettás fotométerrel, az UV-tartományban mérjük. A detektor a vizsgált oldat jellemző tulajdonságát automatikusan méri és regisztrálja.

3.2.1.5.5. Gélréteg-kromatográfia

A **gélréteg-kromatográfias** eljárás során csak különlegesen finom szemcsézettségű Sephadex-készítmények használhatók. Az elválasztás szempontjából a 0,5 mm vastagságú gélrétegek bizonyultak a leghasználhatóbbnak. Ügyelni kell arra, hogy a kromatografálás alatt a réteg nem száradhat ki, valamint gondoskodni kell a futtatószer be- és kivezetéséről és a réteg megfelelő dőlésszögének kialakításáról.

3.2.1.5.6. A géلكromatográfia alkalmazása

A géلكromatográfia legfőbb alkalmazási területei a gyors molekulatömeg-mérés, a molekulatömeg alapján történő preparatív csoportseparálások, az egyes csoportok preparatív frakcionálása, és a peptidok, valamint a fehérjék géلكromatográfias tisztítása. Aminosavak is szétválaszthatók géلكromatográfiával, azonban e módszer pontossága, illetve hatékonysága meg sem közelíti az ioncserés oszlopkromatográfias vagy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias meghatározását. A géلكromatográfia alkalmazható tehát gélszűrésre, fehérjék és aminosavak kromatográfias szétválasztására, molekulatömeg-meghatározásra és a fehérjék sóatlanítására.

Gélszűrés

A **gélszűrés** során a gélrendszerre anyagok elegyét visszük fel, ahol az egyik komponens kis molekulából, a másik komponens rendkívül nagy molekulából áll. A nagy molekulák a szemcsék közötti térben gyorsan haladnak át a gélágyon, a kis molekulák pedig behatolnak a gélszemcsék belsejébe. A módszer alkalmas kolloidok sóatlanítására és molekulacsoportok molekulatömeg szerinti szétválasztására.

A **kromatográfias alkalmazás** során a szétválasztandó elegy komponenseinek molekulái között csak csekély különbség van. Az elválasztás annál sikeresebb lesz, minél hosszabb az oszlop. A módszer alkalmas fehérjék és nagyobb molekulatömegű zsírsavak trigliceridjeinek szétválasztására.

Molekulatömeg-meghatározás

A **molekulatömeg-meghatározás** esetében a duzzadt géloszlopok pórusain keresztül az **azonos molekulatömegű (méretű) anyagok hasonló módon haladnak keresztül**. Ha az ismeretlen anyag ismert molekulatömegű komponenssel azonos

módon halad át az oszlopon, **következtetést vonhatunk le az ismeretlen anyag molekulatömegére** vonatkozóan. Ehhez szükség van ismert molekulatömegű anyagokra, melyek lehetnek természetes vagy mesterséges **azonosítóanyagok**. A **természetes anyagok** általában jól definiált molekulatömegű és tisztán előállítható fehérjekészítmények, a **mesterséges hitelesítőanyagok** polivinilszarmazékok, melyek különböző molekulatömegű polisztirolmolekulákból állnak. A 3.4. táblázat a molekulatömeg-meghatározáshoz szükséges fehérjesorozatot mutatja.

3.4. táblázat. Gélkromatográfia molekulatömeg-meghatározáshoz használható fehérjesorozat

Fehérje	Molekulatömeg (Dalton)
Citokrom c	13 000
Ribonukleáz-A	13 600
Mioglobin	17 000
Tripszininhibitor (szójabab)	21 500
Alfa-kimotripszin	22 500
Tripszin	24 000
Kimotripszinogén A	25 000
Pepszin	35 500
Tojásalbumin	45 000
Szérumalbumin (monomer)	67 000
Glicerinaldehid-foszfát-dehidrogenáz	117 000
Szérumalbumin (dimer)	134 000
Aldoláz (élesztő)	137 000
γ -globulin (humán)	140 000
Alkoholdehidrogenáz (élesztő)	150 000
Kataláz	230 000

3.2.1.6. Gázkromatográfia

A gázkromatográfias elválasztások során **a mozgófázis gáz-halmazállapotú, az állófázis pedig lehet folyadék- vagy szilárd halmazállapotú**. Az elválasztás a vizsgálati anyag komponenseinek két különböző fázis közötti megoszlásán vagy adszorpcióján alapul. Ennek alapján két különböző eljárást különböztetünk meg: az adszorpció gázkromatográfiát, ahol az állófázis szilárd (GSC), és megoszlásos gázkromatográfiát, ahol az állófázis folyékony halmazállapotú (GLC). A szétválasztás az adszorpció esetén az adszorbeáló közeg szilárd töltetének felületén, megoszláskor a szilárd hordozón lévő, nehezen illó folyadékokból álló nagy felü-

letű filmben játszódik le. A gázkromatográfia esetén a gyakorlatban szinte kizárólag az elúciós eljárásokat alkalmazzuk.

3.2.1.6.1. A gázkromatográfia elmélete

Az adszorpciós, illetve megoszlási egyensúly dinamikus jellege következtében különféle gázok molekulái adott hőmérsékleten és adott gázkoncentráció esetén különböző átlagidőtartamig tartózkodnak a szilárd vagy folyékony adszorbens felületén, majd a gázmolekulák szerkezetüktől függően különböző időtartam után deszorbeálódnak. Ha az adszorbenssel töltött kromatográfiás oszlopon gázelegyet áramoltatunk át, a csőből először a leggyengébben adszorbeálódó komponens lép ki, majd a növekvő erősségű adszorpció sorrendjében a többi. Az egyes komponenseknek különböző a tartózkodási idejük a kromatográfiás oszlopban, ezért különböző idő (retenciós idő) elteltével jelennek meg az oszlop végén. A retenciós időt az oszlop hőmérséklete, az oszlop töltetaktivitása, a készülék méretei és a vivőgáz sebessége befolyásolja.

3.2.1.6.2. Gázkromatográfiás készülék működése

A kromatográfiás oszlopba állandó sebességgel semleges gázáramot, vivőgázt vezetünk, és a vivőgázáramba mérjük és adagoljuk be a vizsgálandó anyagot gáz- vagy elgőzöltetett folyadékminta alakjában. A vizsgálandó elegy a vivőgázzal a kolonnába jut, ahol komponensei a vivőgáz eluáló hatására, kötőképességüktől függően, különböző sebességgel haladnak előre. Megfelelő töltet és elegendő hosszú oszlop esetén a minta teljesen szétválik, alkotórészei egymás után jelennek meg a vivőgázban. A kolonnából kilépő vivőgázt detektoron vezetjük át, ami az egyes komponensek megjelenésekor az alkotórészek mennyiségével arányos jelet ad. A detektorban kapott jel regisztrálóberendezés segítségével grafikusán ábrázolható, melynek során megkapjuk a szétválasztásra jellemző kromatogramot. A gázkromatogramon látható csúcsok helyéből a komponensek minőségi azonosításához kapunk segítséget, míg a csúcsmagasság és a haranggörbe alatti terület alapján mennyiségi értékelést végezhetünk.

A gázkromatográf részei a vivőgázrendszer, a mintaadagoló berendezés, a kromatografáló oszlop (kolonna), a kromatográfiás érzékelőberendezés (detektor) és a regisztrálóberendezés.

A vivőgáz

A **vivőgáz** sem a vizsgálati anyaggal, sem az oszlop töltetével nem léphet kémiai kölcsönhatásba, mely célnak leggyakrabban a nitrogén, a hidrogén, a hélium, az argon, a szén-dioxid, és speciális esetekben néha a levegő vagy az oxigén felel meg. Ezek közül a hidrogén és a hélium rendelkezik a legnagyobb hővezető képességgel. A hidrogén esetében rendkívüli módon előny, hogy kis viszkozitás

miatt kicsi az oszlop nyomásesése, viszont nagyobb az elillanási veszély és fennáll a robbanás lehetősége. A hélium előnye, hogy nem tűzveszélyes, de rendkívül drága. A nagy tisztaságú nitrogén használata igen elterjedt, mert nagyobb molekulatömege miatt jobb az elválasztás, viszonylag olcsó, egyszerűen tisztítható, és kezelése biztonságos. Az argon kémiai semlegessége és nagy tisztasága miatt rendkívül kedvelt vivőgáz. A szén-dioxidot jobbra csak a preparatív gázkromatográfiában alkalmazzuk.

A vivőgázt leggyakrabban palackból, nyomáscsökkentő szelepen keresztül nyerjük, melynek tartozéka egy gáztisztító feltét is, amely megköti a nedvességet, az oxigént és más nem kívánatos anyagokat. A vivőgáz áramlási sebességének állandó értéken tartása a gázkromatográfiás elemzés szempontjából alapvető. Az áramlási viszonyokat műszerekkel, a nyomást manométerrel, az áramlási sebességet szakaszosan használható szappanhártyás sebességmérővel mérik. Ennek során egy kalibrált üvegcsőben a gázáram hatására szappanhab képződik, és a szappanhártya előrehaladását stopperórával mérve a gáz minőségétől függetlenül a térfogati sebességet kapjuk.

Előmelegítő, mintaadagoló

A vizsgálandó anyagot gáz, folyadék vagy szilárd halmazállapotban tápláljuk a készülékbe, mert a kromatografáló oszlopba csak légnemű mintát lehet bejuttatni. Az adagoló és az oszlop közé **előmelegítőt kell iktatni**, melynek segítségével a minta elpárologtatható. Ennek hőmérséklete 30-50 °C-kal magasabb, mint az oszlopé. Az adagolt minta térfogata legyen a lehető legkisebb. A gáznemű minták térfogata 0,1-5 cm³, folyékony minták térfogata 1-10 μl, a nagyon ritkán alkalmazott szilárd betáplálásakor maximum 1-10 mg legyen. A gáznemű minták adagolására injekciós fecskendő, bemerőpipetta, higanyos gázbüretta, a folyékony minták adagolására különleges fecskendők használhatók, ahol mikrométer csavarral lehet a térfogatot szabályozni. A tüvel egy szilikongumból készült réteget (szeptum) kell átszűrni, mely ezt követően összezáródva megakadályozza a betáplált anyag visszaáramlását. Sorozatvizsgálatok céljaira különböző rendszerű automatikus mintaadagolókat is szerkesztettek, mellyel a vizsgálati anyagot a gázkromatográf kellően felmelegített adagolóterébe kell fecskendezni.

A mintabeviteli eljárások közül külön meg kell említeni a **split és a splitless injektálást**. A split-splitless injektálást kapilláris oszlopoknál alkalmazzák, amikor split (lefúvatos) injektálás esetén a mintának csak egy része kerül az oszlopra, így a kapilláris oszlopon is pillanatszerű lesz az injektálás, mert a minta nagyobb részét az erős gázáram kifújja az injektorból. A splitless (lefúvatos nélküli) injektálást kis koncentrációk kimutatásakor alkalmazzák, melynek során a betáplált minta szinte teljes mennyisége az oszlopra kerül.

A split injektálás esetén tehát a gőz állapotú mintának csak kis része jut be az oszlopba, a nagyobb része pedig meghatározott térfogati sebességgel a split ágon távozik. Az oszlopra kerülő anyag mennyiségét a vivőgáz áramlási sebessége

és a split ágon történő áramlási sebesség aránya szabja meg, amit split aránynak hívnak. A 100:1 split arány esetén a minta 1%-a jut az oszlopba, 99%-a pedig a split csatlakozáson keresztül kikerül a rendszerből.

Splitless injektáláskor nagyobb mennyiségű minta kerül az oszlopba, ami nem teszi lehetővé a pillanatszerű injektálást, így csökkenti az elválasztás hatékonyságát. Az elválasztandó komponenseket ezért fókuszálni kell az oszlop elején úgy, hogy az oszlop hőmérséklete legalább 20 °C-kal kisebb a minta legillékonyabb komponensének a forráspontjánál. A split ág az injektáláskor zárva van, a vivőgáz az injektor gőzterét ráviszi a kolonnára, ahol a komponensek fókuszálódnak. Ezt követően a split ág kinyílik, az injektorban maradt komponensek távoznak, majd az induló hőmérsékletprogrammal kezdődik a komponensek elválasztása az oszlopon.

Oszlopok

A gázkromatográf lelkét a **kromatografálóoszlopok** alkotják, melyek lehetnek **töltött oszlop, kapilláris** (üres cső) vagy **töltött kapilláris kolonnák**. A töltött kolonnák üvegcsőből, alumíniumból, rézből, saválló acélból készülnek, belső átmérőjük 2-4 mm, alakjuk egyenes, U, W, spirál vagy lapos spirál, hosszuk pár méter. A kapilláris kolonnák alumínium-, réz-, saválló acél-, üveg- vagy műanyag- (poliamid, nylon) csövek, melyek bírják a magas hőmérsékletet. A csövek belső felületét felmaratással vagy vékony, szilárd hordozóréteg felvitelével növelik. Belső átmérőjük 0,2-1 mm közötti, hosszuk 10-100 m, kivételes esetben több száz méter, melyet orsóra vagy egyéb tartóra tekernek fel. A kapilláris kolonnák előnye a jobb elválasztóképesség, a lerövidíthető analízisidő, és hogy a mérés alacsonyabb hőmérsékleten is elvégezhető. A kapilláris kolonnák hátránya kis kapacitásuk, hogy a szokásos mintamennyiségnek tizedrészét tudják feldolgozni, és hogy speciális gázelosztót kell beépíteni a készülékbe, hogy a kolonnán a gáz áramolni tudjon. A kolonnák belépőnyílása a mintaadagolóhoz, kilépővége pedig a detektorhoz csatlakozik. Egy gázkromatográfiás készülékbe többféle, különböző típusú töltettel ellátott kolonna is beépíthető, és a különböző kolonnákat lehet sorba vagy párhuzamosan kapcsolni.

Töltetek

A **kromatografáló oszlop töltete** az adszorpciós gázkromatográfiában felületaktív, rendszerint szemcsés anyag, mely nagy fajlagos felületű és kémiaailag indifferent. Apoláros töltőanyag az aktív szén, mely különböző molekulaméretű gázok vagy különböző szénhidrogének szétválasztására alkalmas. A poláris adszorbensek közül említést érdemelnek a szilikagél, az alumínium-oxid, a különféle alumínium-szilikátok, melyek a molekula aszimmetriája, polaritása által meghatározott belső energiáknak megfelelően választják szét a gázokat.

A **megoszlási gázkromatográfiában** (folyadék-gáz rendszer) a kapilláris kromatográfiás oszlopok hordozóanyag nélkül tartalmazzák az álló folyadékfázist,

mely a cső belső felületéhez tapad, a töltött oszlopokban pedig szemcsés hordozóanyag van, melyet a megfelelő folyadékkal nedvesítenek. A nedvesítőfolyadék az állófázis, amelyben a szétválasztás lejátsszódik. Ennek a kromatografálás hőmérsékletén folyékonyknak kell lennie, legyen kémiailag közömbös, tartósan megmaradjon a hordozó felületén, illékonyága lehetőleg minél kisebb, oldóképessége pedig minél nagyobb legyen. A különböző szilikonolajok különösen széles hőmérséklet-tartományban használhatók gázkromatográfiás állófázisként.

Az állófázis (hordozó) bármilyen szemcsés anyag lehet, mely mechanikailag elég szilárd és kopásálló, nagy fajlagos felületű és pórusos szerkezetű. Leggyakrabban 0,10-0,25 mm-es szemcsészettségű hordozóval dolgozunk. A folyékony állófázis felvitele illékony szerves oldószeres oldatból történik állandó keverés, majd elgőzölgtetés, esetleg vákuumos elpárolgotatás segítségével. A kialakuló folyadékfilm vastagsága 0,1-0,5 μm .

Termosztát

A termosztáttal a rendszert szobahőmérséklettől 400 °C-ig temperálhatjuk, melynek során a kiválasztott hőmérsékletet $\pm 0,5$ °C pontossággal be kell tartani. Termosztálni kell az oszlopot, a mintaadagoló berendezést és a detektort. A mai készülékek légtermosztáttal vagy fémtömb-termosztáttal működnek. A légtermosztátok egyszerű szerkezetűek, gyorsan felfűthetők és lehűthetők, különböző térfogatúak, spirálkolonnák esetén 3-5 literesek, a beépített fűtőteljesítményük 800-2000 W. A fémtömbtermosztátok (általában alumíniumtömbből készülnek) izoterm munkamódszereknél használhatók előnyösen. A kromatografálóoszlop a fémtömb furatában, két tömb között helyezkedik el, vagy fémhengerre van tekereselve. Nagy hőkapacitása miatt a hőmérséklet-ingadozás csekély.

A programozott fűtés kromatogramjavító hatású, ezért a korszerű készülékekben a hőmérsékletet a vizsgálat alatt meghatározott program szerint lehet változtatni, mely kis hőkapacitású légtermosztátokkal valósítható meg. A hőmérséklet-változtatás általában 0,2-20 °C/perc sebességgel végezhető. Néhány újabb készüléktípusnak mély hőmérsékletű termosztátja is van, mellyel -100 és -180 °C között is végezhető elemzés.

Detektorok

A detektorok feladata a kolonnából kilépő vivőgázáramban megjelenő komponens folytonos, gyors és érzékeny észlelése. A detektor a komponens megjelenésekor valamilyen **fizikai vagy kémiai tulajdonság megváltozását érzékelve elektromos jelet ad, mely regisztrálható** és értékelhető. A detektorok nagyobb része csak a kolonnából kilépő komponens mennyiségéről ad tájékoztatást, míg a specifikus detektorok egyes elemeket (N, P, S) tartalmazó vegyületekre szelektívek. Egyes készülékeknek egyidejűleg két, esetleg három detektor párhuzamos működtetése is lehetséges.

A detektorok működése lehet „pillanatnyi” (differenciális) vagy „összegző” (integráló) jellegű. A differenciális detektor a komponensek által okozott pillanatnyi változást méri, míg az integráló típusú érzékelő a detektorba addig belépett összes minta mennyiségét adja meg. Manapság már csak a pillanatnyi változásokat észlelő detektorokat alkalmazzák, melyek jele a kromatogramon egymás utáni csúcsok sorozatából áll (differenciál-kromatogram). **A négy legfontosabb detektortípus a hővezetőképesség-mérő, a lángionizációs, az elektronbefogási és a lángfotometriás detektor.**

A **hővezetőképesség-mérő detektor** mérőcellája furatokkal ellátott fémgömb, amelyen a vivőgáz áramlik keresztül. A furatokon volfrámszál van kifeszítve, amit elektromos árammal fűtenek. A huzalok ellenállása a hőmérséklettel erősen változik; ha a vivőgázban komponens jelenik meg, a gázáram hővezető képessége csökken, és a fűtött szál hőmérsékletének és ellenállásának növekedése jól mérhető. Az egyik furaton a palackból származó tiszta, a másikon a kolonnából érkező, komponenseket tartalmazó vivőgáz áramlik, melyek közötti hővezető képesség változását differenciális módszerrel mérjük.

Az **ionizációs detektor** működésének alapja a gázok villamos vezetőképessége. Közöséges hőmérsékleten és nyomáson a gázok tökéletes szigetelők, azonban ha elektromos töltésű atomokat, molekulákat vagy szabad elektronokat hozunk létre a gázban, azok a külső elektromos erőtér hatására elmozdulnak, a gáz vezetővé válik. Lángionizációs érzékelő (FID) egy utánkeveréses hidrogénégő, melynél a láng két elektród között alakul ki, amelyre 100-300 V feszültséget kapcsolnak. A hidrogénláng 2000-2200 °C hőmérsékletén kismértékben a hidrogén is ionizálódik, ami állandó alapáramot ad. Ha a kolonnából szerves anyag jut a detektorba, akkor a hidrogénlángban elégye ionok keletkeznek, melynek hatására a gáz vezetőképessége, az ionáram jelentősen megnő. A lángot határoló két elektród között keletkező ionáram megfelelő erősítés után regisztrálható. A lángionizációs detektorok szinte minden szerves vegyületre érzékenyek. A nitrogén- és foszfor-érzékeny detektorok speciális feladatok megoldására alkalmasak.

A gázkromatográfiában a radioaktív sugárzással működő **elektronbefogási detektor** (elektroncsapda, ECD) alkalmazása a legelterjedtebb. A detektorban lévő sugárforrás hatására a vivőgázban szabad elektronok és nagy tömegű pozitív ionok keletkeznek, melyek a megfelelő elektród felé vándorolnak. Ha a detektorba olyan vegyület jut, ami képes anionná alakulni, az az elektronokat negatív ionok képződése közben befogja, az ionáram csökken, a detektor pedig az eredeti ionáram csökkenését jelzi. Sugárforrásként általában β -sugárzó izotópokat (^{63}Ni vagy trícium) használnak, melyek aktivitása $4 \cdot 10^8$ - $70 \cdot 10^8$ Bq.

A **lángfotometriás detektor** (FPD) a foszfor- és kéntartalmú vegyületek szelektív kimutatására alkalmas. A lángban gerjesztett minta által kisugárzott fényből interferenciaszűrővel kiválasztja a foszforra (526 nm) vagy a kénre (394 nm) jellemző hullámhosszú sugarat, melynek intenzitását fotometriás úton, elektron-sokszorozó segítségével méri.

Regisztrálóberendezések

A gázkromatográfiában korábban alkalmazott regisztrálóberendezések vonalíró elektronikus potenciométerek voltak, melyek kétszatórnás változata kétdetektoros értékelést tett lehetővé. Ma már kizárólag elektronikus integrátorokat vagy megfelelően megválasztott számítógépes szoftvereket alkalmazunk az értékelésre, melyek összegzik a görbe alatti területet, mérik a csúcs retenciós idejét, és regisztrálják az eredményeket.

3.2.1.6.3. A gázkromatográfia néhány alkalmazása az élelmiszer-analitikában

A gázkromatográfias módszereket ma már az élelmiszer-analízis sok területén alkalmazzák. Így többek között gázkromatográfiával határozzák meg az antioxidánsokat, a tartósítószerkeket, a szermaradványokat, az íz- és aromaanyagokat, valamint az illó vagy illóvá tehető komponenseket (alkoholok, aldehidek, zsírsavak, észterek), valamint újabban használható aminosav-meghatározásra is az aminosavak észterszármazékainak analízise során. A gázkromatográf nehezen illó, illó származékká nem alakítható és hőlabilis anyagok (szénhidrátok, egyes vitaminok) vizsgálatára nem alkalmas. Ezen utóbbi komponensek analízisét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával lehet elvégezni.

3.2.1.7. Réteg- és papírkromatográfia

3.2.1.7.1. A rétegekromatográfia alapjai

A kromatográfias módszerek közül a rétegekromatográfia a planáris módszerek csoportjába tartozik. Valójában egy „**planáris oszlopról**” van szó, ezért az oszlop-módszerek és a planáris módszerek között elvi alapokat tekintve gyakorlatilag alig van különbség. A tartófelületet üveg, alumínium vagy műanyag lemezek adják, melyeken az állófázis egy-két tized mm vastagságban van felvíve. Az állófázis lehet alumínium-oxid, szilikagél vagy valamilyen ioncserélő anyag. Az állófázis egyik pontjára visszük fel a szétválasztani kívánt keverékeket, majd a réteget eluensbe állítva kifejlesztjük az elválasztást. A mozgófázis a kapilláris erők hatására az állófázisba felszívódik, és megtörténik az anyagkeverék komponenseinek szétválasztása. A komponensek zónát, ill. foltot képeznek, melyek a **retenciós faktor** alapján azonosíthatók. A retenciós faktort (R_F) megkapjuk, ha a felcseppentési ponttól lemérjük a folt középpontja közt lévő távolságot, és azt elosztjuk a felcseppentési ponttól mért mozgófázis által megtett úttal. A definíciónak megfelelően az **R_F értéke nulla és egy közé esik**, mely alapján az ismeretlen komponens az ismert komponens R_F értékéhez hasonlítva beazonosítható. Ha a minta nem mozdul el a startponttól, akkor R_F értéke nulla, ha az oldószer a fronttal együtt halad, akkor egy. Az R_F értékét kéttizedes pontossággal adjuk meg.

A rétegekromatográfia kis mennyiségű anyagok keverékének gyors elválasztására használható. **Előnyei** a kifejlesztés rövid időtartama, a foltok jó szétválasztási lehetősége, és hogy a kémiaiilag ellenálló hordozóanyagon agresszív szerves oldószer is felhasználható. **A rétegekromatográfia eszközei** a rétegekromatográfiai lemez, az adszorbens és a kötőanyag. **A rétegekromatográfiára történő előkészítés során** az adszorbent és a kötőanyagot a szükséges mennyiségű vízzel szuszpenzióvá elegyítjük, a lemezre (üveg, műanyag vagy fémlemez) felkenjük, szobahőmérsékleten szárítjuk, 100-105 °C-os szárítószekrényben 30-45 percig aktiváljuk, majd az aktivált lemezeket exsikkátorban tároljuk. A rétegeket kromatografálás közben csiszolt fedővel ellátott üveg futtatókamrában (üvegekádak) légmentesen lezárjuk, melynek következtében a lemezek az oldószergőzökkel telített térben vannak.

A rétegekromatográfia során először kiválasztjuk a réteget, a vizsgálandó oldatot mikropipettával egymástól 20-30 mm-re lévő pontokra felvisszük, ügyelve arra, hogy egy-egy folt 6-8 mm-nél ne legyen nagyobb átmérőjű, majd a lemezt a futtatószer gőzeivel előzetesen telített futtatókamrába helyezük. A rétegre felvitt anyag foltjának előrehaladását a vonatkozó adszorpciós izoterma határozza meg. A kromatogram kifejlesztését akkor fejezzük be, ha az oldószer frontja megközelíti a lemez felső szélét. Szerves adszorbensek esetén előhívásra agresszív anyagokat (tömény kénsav, perklórsav, antimon-klorid) is lehet alkalmazni.

A kromatografálás során az első lépés **a réteg kiválasztása, előkészítése, aktiválása**, majd következik a mintafelvitel a réteg aljától számítva 1,5-2,0 cm-re foltban vagy sávban. Ezt követi a futtatás a lemez felső szélétől kb. két cm-re, majd a kiemelés és a szárítás, és végül a foltok előhívása, illetve a minőségi és mennyiségi értékelés.

A rétegekromatográfia során legtöbbször **függőleges kifejlesztést és felszálló technikát** alkalmazunk. A felszálló kifejlesztésnél a mozgófázis a réteglap alsó végén helyezkedik el. A lineáris kifejlesztés lehet egy- vagy kétdimenziós és többszörös kifejlesztésű is. Egydimenziós esetben a komponensek csak egy irányban vándorolnak, **kétdimenziós kromatográfiánál** pedig az első kiterjesztéssel mérőlegesen egy újabb kromatografálást végzünk. Többszörös kifejlesztés esetén a kifejlesztést azonos vagy különböző mozgófázissal megismételjük.

A rétegekromatográfia segítségével anyagokat tudunk beazonosítani, ill. félkvantitatív értékelést tudunk végezni. A **félkvantitatív értékelést** denzitóméterrel, vagy a foltok kioldását követően fotometriás elemzéssel végezzük. A színtelen vagy UV fénnel sem kimutatható vegyületek analízisének szármarzékképző színreagenseket használunk.

Az oszlopkromatográfia felbontóképessége ugyan jelentősen nagyobb, mint a rétegekromatográfiáé, ennek ellenére **a rétegekromatográfiának számos előnye van** az oszlopkromatográfiával szemben. A rétegekromatográfiával elválasztott vegyületek vizuálisan értékelhetők, a szétválasztott vegyületek kimutatására szelektív és specifikus színreakciók alkalmazhatók, így a sok komponens mellett néhány vegyület specifikusan kimutatható. Oszlopkromatográfiai elválasztáskor egyes

komponensek értékelhetetlenül, irreverzibilisen az oszlophoz kötődnek; rétegekromatográfiás elválasztáskor viszont a minta összes komponenséről áttekintést kapunk. A rétegekromatográfiában a kromatográfiás feltételek megváltoztatása rövid időt vesz igénybe, és fő előnye az is, hogy a legtöbb rétegekromatográfiás módszer egyszerű, olcsó berendezésekkel, rövid idő alatt ad értékes adatokat néha bonyolult anyagkeverékek esetében is.

A rétegekromatográfiás analízis során a hordozók megválasztásával lehetőség van **megoszlási, adszorpciós és ioncserés rétegekromatográfiás** vizsgálatokra is. A papírkromatográfia manapság már háttérbe szorult, ezzel szemben rendkívüli módon elterjedtek a 0,25-0,50 mm vastag **kent rétegek**, melyeket megfelelő aktiválás után lehet analitikai célokra felhasználni. A kent rétegek mellett nagyon sok cég gyárt **kész réteglapokat**, melyek készítéséhez hordozólapnak üveglemezt és műanyag- vagy alumíniumfóliát használnak. A kész réteglapok könnyen tárolhatók, darabolhatók, egyszerűen dokumentálhatók, és egyenletes homogén réteget adnak.

A vizsgálandó oldott anyagmintákat cseppenthetjük pontban vagy sávban, megfelelő mikropipettával vagy kapillárisal. A cseppentés során meleg levegővel a foltokat vagy sávokat beszárítjuk, mellyel a felcseppentett anyag mennyiségét széles határok közt változtathatjuk. A felcseppentés után a réteglapokat csiszolt fedelű futtatókádba állítjuk, melynek az aljára töltjük a futtatószerkeletet. Az oldószerkelet megfelelő távolságra jutása után a réteglapot a kádból kiemeljük, és a megszáradt rétegen a szétválasztott anyagokat saját színük, UV-fluoreszcenciájuk vagy megfelelő reagenssel való bepermetezés után, esetleg melegítéssel kombinálva mutatjuk ki.

A rétegekromatográfiában végezhetünk kétdimenziós futtatást is, sőt az egyik dimenzióban **rétegelektroforézist** is alkalmazhatunk. A **kétdimenziós futtatással** a komponensek szétválását, beazonosítását és mennyiségi meghatározását javíthatjuk.

A **nagyteljesítményű rétegekromatográfia (HPTLC)**, a **lineáris HPTLC-technika** és a **túlnyomásos rétegekromatográfia (OPTLC)** elve korábban már ismertetésre került.

3.2.2. Tömegspektrometria alkalmazása az élelmiszer-analitikában

Az előző fejezetekben számos, kromatográfiás elválasztások során alkalmazható detektor és azok legfontosabb tulajdonságai is ismertetésre kerültek, de nem ejtettünk szót a tömegspektrometriáról, mert arra, annak jelentősége miatt, egy külön részt kívántunk szentelni. A részletesebb ismertetés előtt azonban célszerű megismernedni néhány általánosan alkalmazott rövidítéssel, illetve a rövidítések mögött rejlő magyar és angol megnevezéssel.

AC: affinitás-folyadékromatográfia (affinity chromatography).

APCI: atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (Atmospheric Pressure Chemical Ionization).

API: légköri nyomású atmoszférikus ionizáció (Atmospheric Pressure Ionization).

- APPI: atmoszférikus nyomású fotoionizáció (Atmospheric Pressure Photoionization).
- CC: királis folyadékkromatográfia (Chiral Chromatography).
- CD: vezetőképesség-detektor (Conductivity Detector).
- CI: kémiai ionizáció (Chemical Ionization).
- ECD: elektrokémiai detektor (Electro-Chemical Detector).
- EI: elektronütköztetési ionizáció (Electron Impact).
- ELSD: elpárologtatással egybekötött fényszórásos detektor (Evaporative Light Scattering Detector).
- ESI: elektropray-ionizáció (Electrospray Ionization).
- FLD: fluoreszcenciás detektor (Fluorescent Detector).
- GC-MS: gázkromatográf tömegspektrométerrel (GC Mass Spectrometry).
- GLC: gáz-folyadék kromatográfia (Gas-Liquid Chromatography).
- GSC: gáz-szilárd kromatográfia (Gas-Solid Chromatography).
- HPLC-MS: HPLC tömegspektrométerrel (HPLC Mass Spectrometry).
- IEC: ioncserés folyadékkromatográfia (Ion-Exchange Chromatography).
- IT: ioncsapda tömeganalizátor (Ion Trap).
- LLC: folyadék-folyadék kromatográfia (Liquid-Liquid Chromatography).
- LLOQ: mérési alsóhatár (Lower Limit Of Quantitation).
- LOD: kimutatási határ (Limit Of Detection).
- LSC: folyadék-szilárd kromatográfia (Liquid-Solid Chromatography).
- MALDI: mátrix-segített lézer deszorpció és ionizáció (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization).
- MSD: tömegspektrometriás detektor (Mass Spectrometry Detector).
- NP-HPLC: normál fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography).
- NSD: nitrogén-kén detektor (Nitrogen-Sulphur Detector).
- Q: kvadrupól tömeganalizátor (Quadrupol Mass Analyser).
- RD: radiokémiai detektor (Radiochemical Detector).
- RID: törésmutató detektor (Refractive Index Detector).
- RP-HPLC: fordított fázisú nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (Reverse-Phase HPLC).
- RP-IP-HPLC: fordított fázisú ionpár kromatográfia (Reverse-Phase Ionpair HPLC).
- SEC: méretkizárásos folyadékkromatográfia (Size Exclusion Chromatography).
- SIM: egy kiválasztott iont detektáló üzemmód (Single Ion Monitoring).
- TOF: repülési idő analizátor (Time Of Flying).
- ULOQ: mérési felsőhatár (Upper Limit Of Quantitation).
- UV-VIS: ultraibolya-látható abszorbancia detektor (Ultraviolet-Visible Absorbance Detector).

3.2.2.1. A tömegspektrometria elve

A tömegspektrométerrel atomokat, molekulákat, molekulatöredékeket mérünk azon az alapon, hogy a mintából előállított részecskéket fajlagos tömegük (m/z ; tömeg/töltés) alapján elválasztjuk, melyet követően a komponensek beazonosíthatóak, és a mennyiségük pontosan mérhető. A módszer kis mintaigénye miatt rendkívül érzékeny, széles tömegtartományra alkalmazható, ezért gázkromatográffal (GC-MS) és nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal (HPLC-MS) kapcsolva az élelmiszerek nyomnyi mennyiségű komponensei, esetleg szennyezőanyagai gyorsan és pontosan meghatározhatók.

A tömegspektrometriás mérés során molekulákból és atomokból ionokat állítunk elő, az így nyert részecskéket pedig a tömeg/töltés arányuk különbözősége alapján elektromágneses térben szétválasztjuk, azonosítjuk és mennyiségüket meghatározzuk. Az ionokat fény-, elektromos, kémiai vagy kinetikus energia segítségével hozzuk létre, melyeket az ionoptika segítségével egy nyalábban bejuttatunk a tömegspektrométerbe, ahol a tömeganalizátor segítségével, tömeg/töltésértékük alapján szétválaszthatók. Az ionok intenzitását egy detektor méri; az ionáram intenzitását a fajlagos tömeg függvényében ábrázolva megkapjuk a tömegspektrumot, melynek segítségével minőségi és mennyiségi meghatározás egyaránt végezhető.

A tömegspektrométer részei a mintabeviteli rendszer, az ionforrás, mely vákuumban vagy légköri nyomáson működik, a vákuumrendszer, melynek részei az ionoptika, a tömeganalizátor és a detektor, az adatfeldolgozó rendszer pedig a tömegspektrumot hozza létre.

A tömegspektrométerrel mindenfajta halmazállapotú minta vizsgálható, mert a gáz-, a folyadék- és a szilárd minta is ionizálható. Közvetlen mintabevített választunk akkor, ha a minta egykomponensű, sokkomponensű élelmiszerek esetében viszont a tömegspektrometriás analízist mindig megelőzi a kromatográfiás elválasztás (GC, HPLC), melynek során a komponensek teljesen vagy részben elkülönülnek, és ezt követően kerül a minta a tömegspektrométerbe. Az analízis során az illesztőegységek biztosítják a kapcsolatot a kromatográf és az ionforrás között.

3.2.2.2. A tömegspektrométer felépítése

3.2.2.2.1. Ionforrások

2.2.2.2.1.1. Ionizáció vákuumban

Elektronütköztetési ionizáció

Az elektronütköztetési ionizáció (EI) során a molekula pártlan számú gyökkation (M^+) keletkezése közben elektronokkal ütközik, az ion tömege így azonos az eredeti molekuláéval. Az elektronok egy izzó volframszál-katódból származnak, az

elektronok koncentrációját az izzószál hőmérsékletével, energiáját pedig a gyorsító feszültség nagyságával lehet változtatni. A lejátszódó folyamat: $M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^-$.

A folyamat során az elektronok energiájuk jelentős részét a molekuláknak adják át, mely nemcsak ionizációra, hanem gerjesztésre is felhasználható. Az ionok a gerjesztés mértékétől függően széthasadhatnak, vagy belső átrendeződés következhet be bennük. Az általánosan használt, 70 eV energiájú elektronok jól reprodukálható tömegspektrumot adnak, melyeken a molekulaionok a molekula tömegéről, a molekulatöredékek (fragmentumok) pedig a molekula szerkezetéről adnak információt. Túl nagy gerjesztési energia esetén sok molekulatöredék keletkezik, ezért a molekulaion már nem is detektálható. Ilyen esetben az ionizációs energiát 20 eV-ra csökkentik, ami elég az ionizációhoz, de csökkenti a fragmentumok mennyiségét, és a molekulaion is detektálhatóvá válik.

Ezzel a módszerrel, mivel az ionizáció gázhalmazállapotban történik, nagyobb molekulák és hőre bomlékony anyagok nem vizsgálhatók. A módszer jól alkalmazható viszont a gázkromatográfhoz, mert ott gáznemű anyagok távoznak a kromatográfiás oszlopról.

Kémiai ionizáció

A kémiai ionizáció (CI) során a hasonló felépítésű ionforrás ellenére az ionizáció mechanizmusa eltérő. A kémiai ionizáció során, az ionizáció előtt, a minta ammónia, metán vagy izobután reagensgázzal elegyedik, így az elektronok főként a mintánál nagyobb koncentrációban jelen lévő reagensgáz molekuláit ionizálják, melyet követően a vizsgálandó anyag, ezekkel az ionokkal ütközve, ion-molekula reakciók során ionizálódik. A legtöbbször egy protontranszfer játszódik le, melynek során a molekulaion tömege nő, a mintából protonált minta keletkezik. A protonált minta gerjesztési energiáját a protonaffinitás-különbség szabja meg. Ezt a módszert lágyionizációs módszernek is nevezik, mely az elektronütköztetési ionizációnál jóval kíméletesebb eljárás, mert kisebb mértékű fragmentációt okoz. A módszerrel jól lehet mérni molekulaionokat, a szerkezetéről azonban kevesebb információt szolgáltat. A kémiai ionizációs módszerrel illékony, hőstabil vegyületek vizsgálhatók, ezért kiválóan alkalmazható a gázkromatográfiában.

3.2.2.2.1.2. Ionizáció légköri nyomáson

Elektrospray-ionizáció

A légköri nyomáson működő, atmoszférikus ionizációs technikák (API) közül az elektrospray-ionizáció (ESI) a folyadékkromatográfiás módszerek fejlődésével együtt alakult ki. A mérés során egy nem illékony vegyületet poláros, illékony vegyületben oldunk, ezt követően az oldatot egy nagyfeszültségű kapillárison keresztül juttatjuk a légtérbe, ahol a folyadék felszínén az elektromos tér hatására töltéstöbblet képződik, melynek során a kapilláris csúcsáról cseppecskék szakad-

nak le és egy aeroszol keletkezik. Ezt egy fűtött kapillárison átvezetve az illékony poláros vegyület elpárolog, a cseppek mérete a töltés változatlanul maradása mellett csökken, így felületi töltéssűrűségük megnő, instabillá válnak, végül ionokra esnek szét, melyek tömegspektrométerben szétválaszthatók.

Elektrospray-lágyionizációs technika alkalmazásával megállapítható a molekula tömege, a fragmensekből pedig a molekula szerkezete. Alkalmas könnyen protonálódó csoportot tartalmazó aminok, aminosavak, peptidok, fehérjék analizésére, és nagy előnye, hogy bármilyen analizátorral kombinálható. A nagy molekulatömegű (1000 Daltonnál nagyobb) anyagok esetében a többszörös protonálódás következtében többszörösen töltött ionok is képződhetnek. Az elektrospray-lágyionizációs technikával apoláros, protonálódásra nem képes vegyületek nem vizsgálhatók.

Atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció

Az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció (APCI) során is porlasztással hozzuk létre a cseppeket, de a porlasztás során nem alkalmazunk nagyfeszültséget, így a porlasztás és az ionizáció egymástól független. Az APCI-ionizáció során az oldószermolekula-ionok a koronakisülés folyamán jönnek létre, melyek molekulaionok képződése közben reakcióba lépnek a mintamolekulákkal. A folyamatban molekulaionok jönnek létre. Az atmoszférikus nyomású kémiai ionizáció kisebb, poláros, ill. nemionos molekulák vizsgálatára is alkalmas.

Atmoszférikus nyomású fotoionizáció

Az atmoszférikus nyomású fotoionizáció (APPI) folyamán a mintához az UV-tartományban jelentős fényelnyeléssel rendelkező adalékanyagot (pl. toluol) kevernek, majd az oldatot a porlasztás közben UV-fénnyel besugározzák, melynek következtében gerjesztett adalékmolekulák keletkeznek, melyek ionizálják a mintamolekulákat. Az atmoszférikus nyomású fotoionizációval kis, apoláros molekulák vizsgálhatóak.

Mátrix-segített lézerdeszorpció és ionizáció

A mátrix-segített lézerdeszorpció és ionizáció (MALDI) vákuum ionizációs technika ma már légköri nyomáson is használható eljárásá fejlődött. Az alkalmazás során a mintát olyan mátrixoldattal keverik össze (legtöbbször 5-dihidroxi-benzoesav vagy α -ciano-4-hidroxi-fahéjsav oldata), mely képes a lézerfény elnyelésére, majd az oldatot, a mintatartóra történő rászárítást követően, lézerrel sugározzák be. A lézer-fény abszorpciót követően először a mátrix molekulái gerjesztődnek, majd ezek a gerjesztett molekulák ionizálják a mérendő minta molekuláit. A folyamat során egy lépésben megy végbe a lézerdeszorpció és ionizáció, melynek következtében molekulaionok képződnek. A módszerrel 300 kDa-nál nagyobb molekulatömegű poláros vagy polárossá alakítható molekulákat lehet, fmol koncentrációban, bonyolult összetételű keverékekből vizsgálni, melynek során nincs szükség bonyolult tisztítási és elválasztási műveletekre.

3.2.2.2.2. Tömegspektrométerek

Kvadrupol tömeganalizátor

A kvadrupol tömeganalizátor **négy párhuzamosan elhelyezett fémrúdból áll, melyekre úgy kapcsolunk egyen- és váltófeszültséget**, hogy a szemben elhelyezkedő elektródák potenciálja egyező, az egymás mellettié pedig különböző lesz. A gyorsító feszültség hatására az ionok hosszanti irányban lépnek be a rudak közé, majd fajlagos tömegüktől függően, a folyamatosan változó elektromágneses tér hatására, elektromos pályára állnak. Mivel az elektródák töltése folyamatosan változik, ezért az ionokat a velük azonos töltésű elektródok taszítani, az ellentétes töltésűek vonzani fogják, így az ionok oszcillálva haladnak előre az elektródák között. A váltó- és egyenfeszültség szabályozásával elérhető, hogy az analizátoron csak egy tömeg/töltés értékkel rendelkező ion jusson át, a többiek pedig az elektródákba ütközzenek. Ezért a kvadrupol analizátort tömegszűrőnek is nevezik, mely működhethet folytonos pásztázással a teljes tömegspektrumok rögzítésével (Scan üzemmód) vagy egyedi iondetektálással [SIM (Single Ion Monitoring) üzemmód]. A készülékek méréshatára, alacsony felbontás mellett, pár ezer Dalton, felépítésük viszonylag egyszerű, könnyen vezérelhető, gyorsak, így jól illeszthetők a GC-hez vagy HPLC-hez.

Ioncsapda tömeganalizátor

Az ioncsapda tömeganalizátor (IT) három henger alakú, szimmetrikus elektródából, egy gyűrűből és két lezárósapkából áll, melyek hiperbolikus felülettel rendelkeznek, és melyekre egyen- és váltófeszültséget kapcsolnak. Az elektroncsapda belsejében háromdimenziós, változó kvadrupol tér alakul ki, melyben az ionok fajlagos tömegük szerint különböző pályákra állva csapdába esnek. A kvadrupol térből az ionok növekvő tömeg/töltés arányában lépnek ki, miközben a csapdában egymás erőterében eltérülhetnek, ami jelentősen befolyásolhatja az ioncsapda dinamikus tartományát. Ennek megakadályozására héliumgázt vezetnek az ioncsapdába, ami javítja az érzékenységet és a felbontást.

Az ilyen típusú IT tömeganalizátor nagy előnye a tandem tömegspektrometria és a többszörös tömeganalízis végzése (MS/MS, MSⁿ). A csapdázást követően a tárolt anyaionok energiáját növelik, ennek következtében az egymással és a héliumatomokkal való ütközés során az anyaionok részekre esnek szét, és a képződött termékionok adják az MS/MS spektrumot. A termékionok izolálásával, majd azok további fragmentálásával az analízis folytatódhat, melynek során nyerhetjük a további spektrumokat. Ha csak a meghatározni kívánt vegyületre jellemző fragmension koncentrációját mérjük, a módszer szelektivitása és érzékenysége is növelhető.

A kvadrupol analizátorhoz hasonlítva az IT érzékenyebb, gyorsabb a pásztázási sebesség, szélesebb tömegtartományban alkalmazható, nagyobb a tömegfelbontás, és lehetőség van MS/MS mérésre is, a minta mennyisége azonban behatárolja a mennyiségi meghatározás pontosságát.

Repülési idő analízátor

A repülési idő analízátor (TOF) alkalmazásakor az ionok gyorsító feszültség (U) hatására elindulnak az analízátorhoz, melynek során a töltésükkel azonos kinetikus energiára tesznek szert az elektrosztatikus térben. Az azonos töltésű (z) ionok az elektrosztatikus gyorsítás után azonos kinetikus energiával rendelkeznek:

$$zU = \frac{1}{2}m_1v_1^2 = \frac{1}{2}m_2v_2^2 = \frac{1}{2}m_nv_n^2.$$

Az ionok az analízátorba belépve erőtermentes repüléscsőbe kerülnek, ahol kinetikus energiájuk nem változik, ezért a különböző tömegű, azonos kinetikus energiával rendelkező ionok különböző sebességgel repülve elkülönülnek, és különböző időben érik el a detektort. A nagyobb tömegű részecskék lassabban, a kisebb tömegűek gyorsabban repülnek, mert a repülési idő a meghatározott ionforrás–detektor távolság és a gyorsítófeszültség esetén csak a fajlagos tömegtől (m/z) függ.

Ezzel a módszerrel az egymillió Dalton méretű molekulák is vizsgálhatók, ebben az esetben a felbontás 10 és 20 ezer Da között van. A TOF analízátorokat általában MALDI ionforrással kombinálják, melynek során a készülék az ionokat pásztázás nélkül, impulzusszerűen detektálja, ami megnöveli az érzékenységet, és a nagyon rövid repülési idő miatt (10^{-5} - 10^{-7} s) rendkívül gyors működést tesz lehetővé. Összefoglalva: A MALDI ionforrásban impulzusszerűen előállított ionok az U gyorsítófeszültség hatására belépnek az erőtermentes repülési csőbe, ahol fajlagos tömegük alapján elkülönülnek.

3.2.2.2.3. Vákuumrendszer

A tömegspektrométerek, a légköri nyomáson működő ionforrások kivételével, vákuumban működnek, melyet kétfokozatú vákuumrendszer állít elő. Az elő- és középvákuumnak megfelelő nyomásérték (10^3 - 10^3 mbar) rotációs szivattyúval, a nagyvákuum (10^3 - 10^9 mbar), ahol az ionizáció, a tömeganalízis és a detektálás megy végbe, diffúziós vagy turbómolekuláris szivattyúkkal érhető el. A megfelelő vákuum nagyon fontos, mert a levegőben lévő gázok és anyagok zavarják a tömeganalízist és a detektálást, ugyanis az ezekkel történő ütközés és egyéb kölcsönhatás az energia megváltozásával jár, a részecskék haladási iránya is változik, ezért fajlagos tömegük pontosan nem mérhető.

Néhány alapfogalom

A **tömegspektrum** az ionok relatív intenzitása és fajlagos tömege közötti kapcsolatot mutatja a legintenzívebb ionok intenzitásának százalékában kifejezve. A **báziscsúcs** és **bázision** a tömegspektrumban lévő legintenzívebb csúcs és a neki megfelelő ion. A **névleges tömeg** a jelen lévő elemek legnagyobb természetes gyakoriságú izotópjai egészekre kerekített tömegének összege. A **monoizotópos tömeg** a jelen lévő elemek legnagyobb természetes gyakoriságú izotópjainak pontos tömegének

összege. Az **átlagos** (kémiai) **tömeg** a jelen lévő elemek tömegének a természetes izotópeloszlásuknak megfelelő összege. A **tömeganalizátor felbontása** (R) azt mutatja, hogy az analizátor milyen tömegkülönbséggel tud két iont elválasztani. $R=m/\Delta m$. Mivel kevés monoizotópos elem ismert, az elemek a természetben izotópjaik keverékei formájában fordulnak elő, ezért a különböző izotópokból felépülő ionok jól elkülönülő csúcsként jelennek meg a tömegspektrumon.

3.2.2.3. GC-MS és HPLC-MS kapcsolt technikák

A **GC-MS, HPLC-MS kapcsolt technikák** többkomponensű, összetett minták alkotórészeinek minőségi és mennyiségi meghatározására alkalmasak. A tömegspektrometriás analízis történhet offline üzemmódban, amikor az elválasztott komponenseket összegyűjtve együtt injektáljuk a tömegspektrométerbe, ill. online üzemmódban, amikor az elválasztott komponenseket juttatjuk be az ionforrásba, és felvesszük a komponensek tömegspektrumát. Mindkét technikát hangolni kell az elválasztás és a tömeganalízis sebességével. Az intenzitásadatokból nyerjük a kromatogramot, amely minőségi és mennyiségi analízisre és szerkezetvizsgálatra egyaránt alkalmas.

Gázkromatográfia – tömegspektrometria (GC-MS) csatolt technika

A gázkromatográfiával kombinált tömegspektrometria (GC-MS) alkalmas többkomponensű, összetett minták jellemzésére, mint amilyenek az élelmiszerek. A módszer rendkívül érzékeny, mintagénye minimális, alkalmazási lehetősége rendkívül kiterjedt, összegezve minden olyan élelmiszer-komponens vizsgálható vele, mely nem hőérzékeny, illékony vagy illékonyra tehető. A hagyományos gázkromatográfiás analízis során az EI-ionizációhoz szükséges vákuumhoz el kell távolítani a nagy feleslegben lévő vivőgázt, és össze kell hangolni a GC és az MS működésének sebességét.

A kapilláris GC és az MS közvetlenül összekapcsolható, mert a pár tized mm belső átmérőjű kapilláris oszlopokon átáramló vivőgáz mennyisége az MS vákuum rendszerét nem zavarja, így a kapilláris közvetlenül beköthető a MS-be. A GC-MS alkalmazásakor a GC-vel történik a komponensek szétválasztása, a tömegspektrométerben az elkülönült komponensek ionizációja, az elektromos vagy mágneses térben a komponensek fajlagos tömeg szerint még jobb szétválasztása, a detektorban mérjük az ionáram-intenzitás – fajlagostömeg-kapcsolatot, végül megkapjuk a tömegspektrumot, melynek segítségével minőségi és mennyiségi meghatározást tudunk végezni.

Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia – tömegspektrometria (HPLC-MS) csatolt technika

A HPLC-MS technika alkalmazásával hőérzékeny vegyületek vizsgálata is elvégezhető, mert a folyadékkromatográf működési hőmérséklete, feladattól és készülőktípustól függően, 40-50 °C körül van. A HPLC-MS technika alkalmazása esetén egyrészt a hőmérséklet, másrészt a HPLC-nél alkalmazott mozgófázis miatt

több problémát is meg kell oldani. Ennek során a folyadékkromatográf alacsony hőmérsékletét és légköri nyomását össze kell hangolni az MS magas ionforrás-hőmérsékletével és a rendszer alacsony nyomásával. A folyadékkromatográfiánál alkalmazott puffereket az MS illesztőegység és az MS ionforrás nem tudja kezelni, ezért ilyen esetekben a kapcsolt technika nem alkalmazható. Folyadékkromatográfiával nem illékony, nagy molekulatömegű anyagok is analizálhatók, az MS-nél viszont az illékonyság elemei fontosságú, a detektálható tömeg pedig függ az analizátor típusától.

Napjainkban már a HPLC-MS kapcsolt technikához nincs szükség bonyolult illesztőegységre, és az atmoszférikus nyomáson működő technikáknál (ESI, APCI, APPI) az eluent közvetlenül be lehet vezetni az MS-be. Minden esetben meg kell találni az optimális illesztési paramétereket, az analizátor és az ionforrás optimális kombinációját. Poláros mintáknál előnyös az ESI, míg kevésbé poláros vegyületeknél az APCI ionizáció. A mozgófázis összetétele és mennyisége megszabja az ionizáció hatékonyságát, ezért a hagyományos folyadékkromatográfiánál, 0,5-2,0 ml/perc áramlási sebesség esetén, folyadékosztót is be kell illeszteni az ionforrás elé. Az előzőekben felsorolt problémák ellenére a HPLC-MS-t napjainkban egyre elterjedtebben alkalmazzák olyan élelmiszer-összetevők analizésére, mint a vitaminok, az íz- és zamatanyagok, az antioxidánsok, a szénhidrátok, az aminosavak, a peptidok és a nukleinsavak.

3.2.3. Elektroforézis és izoelektromos fókuszálás

3.2.3.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása

Az **elektroforézis** során töltéssel rendelkező anyagok vándorolnak az elektromos térben, mely jelenség analitikai vagy preparatív célokra használható. Az elektroforézis anyagok egyszerű szétválasztására, minőségi vagy mennyiségi meghatározására, a részecskék mozgékonyasága alapján anyagok jellemzésére használható. Az elektroforézis olyan elválasztási folyamat, amelyben **a szeparálandó komponensek elektromos erőterben különböző sebességgel vándorolnak**. A részecske vándorlási sebességét az elektrolitoldatban főképpen annak töltése és az elektromos tér erő szabja meg. A mozgás sebessége függ a részecske alakjától és nagyságától is, ezért az azonos töltésű, de különböző alakú vagy nagyságú molekulák, vagy azonos nagyságú vagy alakú, de eltérő töltésű részecskék ennek alapján elválaszthatók.

Az elválasztandó molekulának magának is lehet töltése, vagy a töltést eredményezheti a molekula felületére adszorbeálódott ion. A töltéssel rendelkező részecskéknek a közegben való mozgását gátolja a súrlódási ellenállás, amely a részecske átmérőjével és az oldat viszkozitásával arányos. A mozgást gátolhatja még az elektrolitoldat, melynek az elválasztandó anyag molekuláival ellentétes előjelű ionjai burokszerűen körülveszik a részecskéket. Ez az ionfelhő hidrátburkot vonz

magához, mely gátolja a részecskék mozgását. A fékezőerő annál nagyobb, minél nagyobb a puffer ionerőssége, ezért a vizsgálandó molekula vándorlási sebessége elektromos erőterben az ionerősség növekedésével csökken.

Az **elektroforézis** tehát valójában anyagkeverékek analitikai vagy preparatív elválasztására szolgáló eljárás, mely **az egyes komponensek elektroforetikus mozgékonyságának különbségén alapszik**. A mintaadagolás módja szerint lehet szakaszos vagy folyamatos üzemű, az elválasztáshoz alkalmazott közeg minősége szerint pedig megkülönböztethetünk szabad és szilárd hordozón végzett elektroforézist (a hordozó lehet papír, keményítő, agar, cellulóz-acetát, porózus üveg vagy poliakrilamid-gél). A használt feszültség nagysága alapján ismerünk kis-, közép- és nagyfeszültségű elválasztásokat.

Az elektroforézisnek két alapvető módszere van: A Tiselius-elektroforézis vagy vándorló határfelületek módszere, és a **zónaelektroforézis**. A **Tiselius-elektroforézis** során az U-alakú csőben levő fehérjeoldat pufferben oldott, eltérő mozgékonyságú fehérjéket tartalmaz. A nagyobb mozgékonyságú fehérjék és a kisebb mozgékonyságú fehérjék tiszta oldata egymástól elkülönül. A módszer anyagkeverékek jellemzésére és mennyiségi meghatározására szolgál.

A **zónaelektroforézis** során a vizsgálandó anyag oldatát keskeny sáv (zóna) alakjában visszük be az elektrolitoldatba. Ha az anyagok mozgékonyága eléggé eltérő, akkor a komponensek tökéletesen szétválaszthatók. Az elválasztáskor elkülönült sávok keletkeznek, melyeket egymástól tiszta oldószert választ el. Ezzel a módszerrel az egyes anyagok rendkívül tisztán állíthatók elő.

A **stabilizált zónaelektroforézisnél** az anyagot nemcsak az oldatban (a foltok elmosódnak), hanem valamely hordozóanyagon vándoroltatjuk. A részecskék mozgékonyága a hordozóanyagokban kisebb, ezért a részecske a hordozóanyagban hosszabb utat tesz meg, mert a hordozó szerkezete zezugos vándorlásra kényszeríti a részecskét.

A **papírelektroforézis** során a papírban felitatott pufferoldatban történik a vizsgálandó anyag elválasztása. Az eljárás során kisfeszültség esetén 100-300 V, közép-feszültségnél 300-1500 V, nagyfeszültség esetén 2000-3000 V egyenfeszültséget alkalmazunk. A papírcsíkot az elektroforézis folyamán zárt, nedves kamrába helyezük, ahol a papír két vége a pufferrel megtöltött elektródedénybe ér. A papírelektroforézis-elválasztást befolyásolhatja a puffer áramlása, a papír minősége és az elektrooszmózis. Az elektroforézisnél ugyanazokat a papírokat alkalmazzuk, mint a papírkromatográfiánál. Az analízis során célszerű a vizsgálandó oldatot a papírcsík közepén elhelyezni, mert az elektroforézis folyamán az elektródokon lejátszódó elektrolízis következtében pH-eltolódások játszódhatnak le. A papírelektroforézis időtartama 3-16 is óra lehet.

Két dimenzióban végezve az elválasztást jelentősen növelhető az elválasztás határfoka. Mivel a különböző pufferekben a mozgékonyságok eltérők, a második futtatáskor az első futtatáskor együtt elmozduló anyagok egymástól szétválaszthatók. A **folytonos elektroforézis vagy elektrookromatográfia** esetén az elektromos

erőter irányára merőlegesen elektrolitot áramoltatunk, a vizsgált anyag oldatát a felvitel helyén állandóan pótoljuk, melynek során a szétválasztott frakciók legyezőszerű sávokban különülnek el.

Keresztező (crossing) papírelektroforézist alkalmazva két különböző anyagot visznek fel a papírhordozó két pontján. Az elektroforézis folyamán a két anyag útja egymást keresztezi, és amennyiben egymással reakcióba lépnek, a találkozás helyén reakciótermék képződik, ezért a vándorló anyagok útja megváltozik. Ha nincs reakció, az anyagok irányváltoztatás nélkül vándorolnak tovább. **Az immunelektroforézis** során az antitesteket vándoroltatjuk a felvitt immunszérum irányába, és vizsgáljuk a csapadék keletkezésének tényét.

A papíron kívül **elektroforézisre használhatók még** a cellulózacetát-membránok, a szemcsés anyagokból készült oszlopok, rétegek, az üvegpör, a műanyagpör [polivinil-klorid vagy poli(vinil-klorid) és poli(vinil-acetát) kopolimerje], a keményítő, a cellulózpor és a hidratált gélrészecskék (Sephadex, agaróz).

A **gélelektroforézises** technikák közül a **keményítőgél-** és **poliakrialamidgél-** elektroforézis a legelterjedtebb. A natív állapotban oldhatatlan keményítő részleges savas hidrolízissel szobahőmérsékleten gél képző terméké alakítható, ami magasabb hőmérsékleten elfolyósodik. A keményítőgél-réteget vízszintes vagy függőleges helyzetben lehet alkalmazni. Ismert technikák még az **agar-**, illetve **agarózgél-elektroforézis**.

A **poli(akrilamid)gél-elektroforézis** alkalmas fehérjék és nukleinsavak vizsgálatára. A gélt akrilamidból és N,N'-metilén-biszakrilamidból (BIS) készítik vinilpolimerizációval, katalizátorok és iniciátorok jelenlétében. Az akrilamid és a BIS mennyiségének növelése keményebbé és törékenyebbé, a koncentrációk csökkentése viszont lágyabbá és rugalmasabbá teszi a gélt. Kémiai polimerizálásra az ammónium-perszulfát-N,N,N',N'-tetrametil-etilén-diamin (TEMED) rendszert alkalmazzák.

A poli(akrilamid)gél-hordozó pórusai révén aktívan részt vesz az elválasztásban. Minél nagyobb a gélkészítéshez felhasznált akrilamid-monomer mennyisége, annál kisebb a gélben az átlagos pórusméret, a makromolekulák mozgékonyasága viszont fordítottan arányos a pórusmérettel. A fehérjék relatív vándorlási sebességének logaritmusát a molekulatömeg függvényében ábrázolva egyenest kapunk, amely összefüggés a molekulatömeg meghatározására alkalmas.

A **gélelektroforézis két elterjedt technikája** a gélpálcikákban (rudakban) végzett „diszk”-elektroforézis és a lapelektroforézis. A **diszkelektroforézis során** a gélt kb. 5 mm átmérőjű üvegcsővekben állítjuk elő, melynek során a függőlegesen álló cső alsó részébe kis pórusú elválasztógél, ennek tetejére pedig a nagy pórusú gyűjtőgél kerül. A gyűjtőgélben a fehérjék koncentrációja során a mintát a gyűjtőgél felszínére visszük, majd a csöveket óvatosan feltöltjük elektródpufferrel. A **lapelektroforézis egyik előnye** a gélpálcikákhoz képest az, hogy a géllapokon egyszerre több anyag analízise lehetséges.

Gélelektroforézis során alkalmazott egyéb anyagok elősegítik pl. a fehérjék oldódását, esetleg a nagyobb komplex molekulák disszociációját idézik elő. A fehérjék oldására 3-12 mol/dm³ koncentrációjú karbamidoldatot használnak, amely a hidrogénkötéseket bontja. A diszulfidhidak bontására szolgál a β-merkaptotetanol és a ditiotreit, és detergens (nátrium-dodecil-szulfát (nátrium-lauril-szulfát, SDS) is használatos, mely elősegíti az oldódást, komplexet képez a fehérjékkel, melynek következtében a komplexeknek nagy negatív töltésük lesz. Ez utóbbi esetben a fehérjék eredeti töltése nem érvényesül, a mozgékonyág megközelítően lineárisan alakul a molekulatömeg logaritmusával, tehát ez a módszer alkalmas a **molekulatömeg-meghatározásra**.

Az elektroforézises technikák hatékonyságának növelésére **gradiens zóna-elektroforézist** is alkalmaznak. A **sűrűséggradiens** esetében az oldat sűrűsége az oszlopban lefelé növekszik. Az elválasztáskor különböző összetételű (3,50%, 4,75%, 7,0% és 10,0%) akrilamidtartalmú géleket rétegzünk egymásra, majd a futtatást a csökkenő porozitás irányában végezzük. A módszerrel 3-4 óra alatt rendkívül nagy felbontás érhető el, hisz ez a módszer jelentős mértékben eltérő molekulatömegű anyagok analízisére is alkalmas.

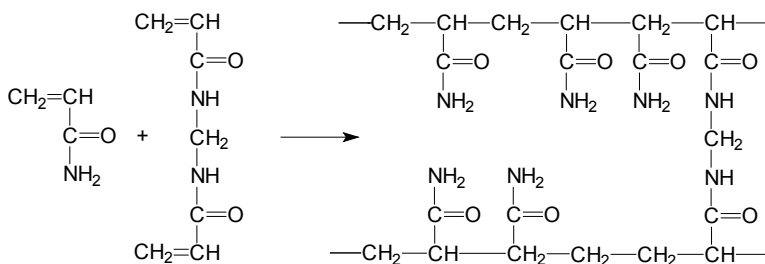
A **pH-gradiensben** a fehérjék addig vándorolnak, amíg el nem érik az izoelektromos pontjuknak megfelelő pH-sávot. Mivel ott töltésüket elveszítik, azzal együtt mozgékonyáguk is megszűnik. A pH-gradiens előállítható speciális amfolitokkal. A pH-gradienssel végzett elektroforézist **izoelektromos fókuszálásnak** nevezik.

Az analitikai eljárások közül a múlt század nyolcvanas éveiiig legelterjedtebb volt a papírelektroforézis, manapság azonban a poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE) szinte teljesen háttérbe szorította a többi módszert. A PAGE alkalmazásának legszembetűnőbb oka nagy felbontóképessége, hisz míg a papírelektroforézissel a szérumfehérjéket csak 5-7 frakcióra, addig a PAGE-sel akár 50-60 frakcióra is szét lehet választani. Fentiek miatt a papír-, a cellulóz-acetát-membrán-, a keményítő-, az agar-gél elektroforézises technikákkal nem foglalkozunk, röviden ismertetjük viszont a PAGE alapjait.

3.2.3.2. Poliakrilamid-gél elektroforézis (PAGE)

A poliakrilamid, az akrilamid és az N,N'-metilén-bisz-akrilamid (BIS) térhálós szerkezetű polimerizációs terméke; a térhálósító BIS a poliakrilamid-láncokba beépülve szabad funkciós csoportjaival, a szomszédos láncokkal is képes reagálni (3.2. ábra).

A hálószerkezet kialakulásával polimer gélgomolyagok keletkeznek, melyekben a poliakrilamid-láncok a maximális entrópiának megfelelően szabálytalan alakot vesznek fel. Az akrilamid- és a BIS-koncentráció, valamint a polimerizáció foka megszabja az átlagos pórusnagyságot, a pórusnagyság pedig megszabja az azokon még átszűrődő molekulák maximális tömegét.



3.2. ábra. Az akrilamid és a BIS reakciója

A poliakrilamid-gél előnye a kémiai stabilitás és indifferencia, a nagyfokú transzparencia, a tág határokon belül megválasztható pórusnagyság, az adszorpció és az elektrooszmózis hiánya és a legtöbb oldószerben való oldhatatlanság. Fentiek miatt **a PAGE szinte valamennyi fehérje elválasztására és analizésére alkalmas**; jól szeparálhatók vele mind a neutrális, mind a bázikus, mind a savanyú karakterű fehérjék, mert a poliakrilamid-gél teljes mértékben inert, nem változtatja meg az elválasztandó fehérjemolekulák natív tulajdonságait. Ha a gél és a puffer összetételét jól választjuk meg, bármilyen molekulatömegű, illetve tulajdonságú fehérjét a legjobb felbontóképességgel tudunk elválasztani.

A poliakrilamid-gél elektroforézis folyamata a következők szerint összegezzhető. A szétválasztani kívánt fehérjekeverék a **mintagélbe** kerül, amely nagypórusú, kis akrilamid-koncentrációjú gél. Az alatta levő réteg, a **gyűjtő- vagy elosztógél**, szintén nagypórusú, benne koncentrálódik az elektroforézis első fázisában az elválasztandó anyag. Az elválasztógél kisebb pórusú, melyben a molekulakeverék frakcióira szeparálódik. A gélekben különböző pufferoldatok vannak, melyek a vezető-, illetve követőionokat tartalmazzák. A különböző összetételű gél- és elektródpufferek következtében a molekulákkal együtt kétféle ion vándorol az elektromos erőtér hatására; a gélben lévő puffer vezető ionjai, az ún. **vezetőionok**, és az elektródpufferből származó ún. **követőionok**.

Az elválasztás kezdetén a minta- és a gyűjtőgélben csak vezetőionok találhatóak, a követőionok pedig kizárólag az elektródpufferben vannak. Az áram bekapcsolásakor a vezetőionok nagyobb mozgékonyosságuk következtében a gyűjtőgélben a molekulák és a követőionok előtt mozognak, egy kisebb vezetőképességű zónát hagyva maguk mögött. Mivel **a vezetőképesség és az elektromos térerő fordítottan arányos**, a kisebb vezetőképességű zóna nagyobb térerőt kap, ami a szétválasztani kívánt molekulákat és a követőionokat felgyorsítja, melyek a vezetőionok mögött azonos sebességgel vándorolnak. Amint a vándorló fehérjezóna a gyűjtő- és az elválasztógél határára ér, megváltozik a pH és a pórusnagyság. Az elválasztógél pH-jának hatására többszörösére növekszik a követőionok disszoci-

ációja és így mozgékonyága, ezáltal sebességük majdnem eléri a vezetőionokét, meghaladja minden fehérjemolekula mozgékonyágát, melynek következtében a követőionok a fehérjék előtt, a vezetőionok mögött fognak haladni.

A PAGE alapvető vegyületei az akrilamid és a bisz-akrilamid, a katalizátorok, melyek a térhálós szerkezet kialakításáért felelősek, a különféle detergenssek, melyek a PAGE alkalmazási lehetőségeit tovább bővítik és tökéletesítik, és a pufferoldatok, melyek az elválasztásnál az optimális pH-t és a különböző ionokat szolgáltatják. A különböző gélkészítési technikák ismertetése nem tartozik szorosan a tárgyhoz, ezért ettől eltekintünk. Azt csak megemlítjük, hogy a korábban alkalmazott **pálcikaalakú géleket a laptechnika szinte teljes egészében kiszorította**, mert ez utóbbi sok minta párhuzamos futtatására alkalmas, az elektroforézis folyamán keletkezett hő elvezetése biztosabb, kétdimenziós elválasztásra is lehetőséget ad, a denzitometriás kiértékelés is pontosabb, a dokumentálás könnyebb, és könnyen alkalmazható az autoradiográfiás módszer is.

4. fejezet

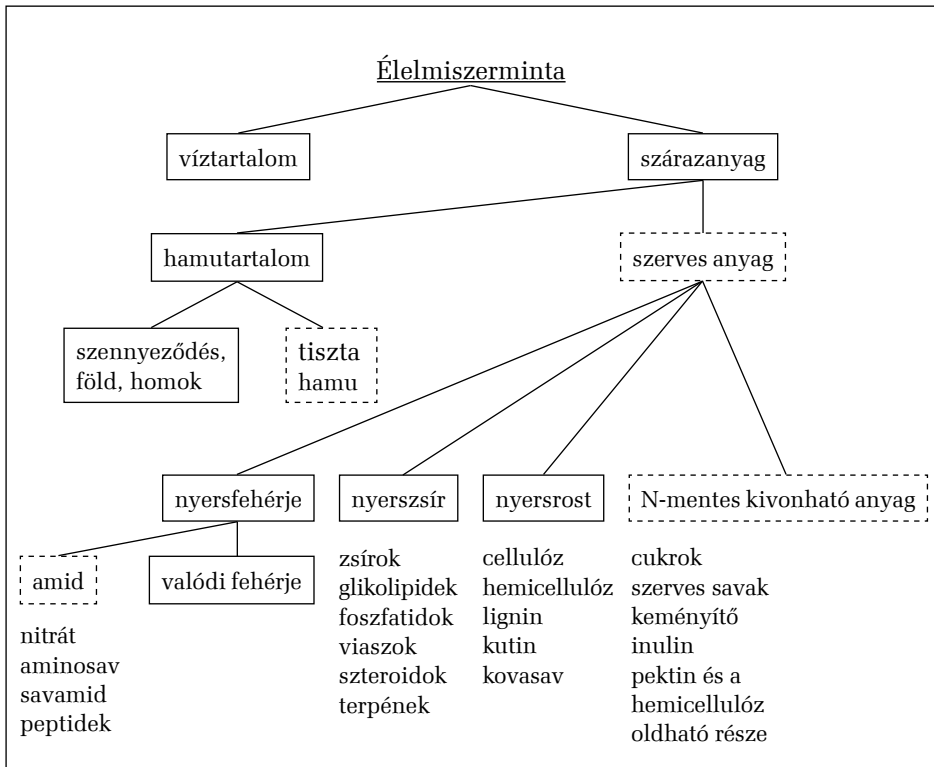
Élelmiszerek összetételének meghatározása

Az emberi és az állati test, valamint a növények 95%-a szénből, oxigénből, hidrogénből és nitrogénből áll, a maradékot pedig kb. 12-15 létfontosságú elem alkotja. Az ezekből felépülő szerves anyagok a fehérjék, a szénhidrátok és a zsírok. Az élőlények csoportjainak hasonló a felépítése; az összetételben a leglényegesebb különbség az, hogy az állati szervezet nem tartalmaz cellulózt vagy más rostot alkotó anyagot. Mind az állatok, mind a növények tömegének 70-80%-át a víz teszi ki, ami az élet nélkülözhetetlen anyaga, hisz minden életjelenség vizes közegben végbemenő kémiai-biokémiai reakciók sorozata. A fejlődéssel párhuzamosan mind az állatokban, mind a növényekben csökken a víztartalom, és a szárazanyagban nő a zsírok aránya. A víz eltávolítása után visszamaradó szárazanyag fehérjékből, cukrokból, poliszacharidokból, lipidekből, valamint szerves és szervetlen kötésű ásványi anyagokból áll. Ezen utóbbiak alkotják a magasabb rendű állatok csontjának szilárd vázát.

Napjainkban még mindig a múlt század elején kidolgozott módszereket használják élelmiszerek táplálóértékének meghatározására, aminek során az élelmiszereket alkotó anyagokat tulajdonságaik alapján főbb csoportokba sorolják. A vizsgálati műveletek során szárítással meghatározzák a szárazanyag-tartalmat, hamvasztással a hamutartalmat, Kjeldahl módszerével a nitrogéntartalmat, zsírolószerrel való extrahálással a zsírtartalmat, valamint híg savval és lúggal való főzéssel a nyersrosttartalmat. A szerves savakat és a szénhidrátokat számítással határozzák meg úgy, hogy a szárazanyagból levonják az előbbi frakciók összegét, így megkapják a nitrogénmentes kivonható anyagokat, melyek közé tartoznak a cukrok, a szerves savak, a keményítő, az inulin, valamint a pektin és a hemicellulóz oldható része.

A múlt század eleje óta az élelmiszer-analitikai módszerek sokkal gyorsabbak és érzékenyebbek lettek, az élelmiszerek táplálóértékének meghatározása azonban a makroösszetételt illetően elviekben nem sokat változott. Az élelmiszerek összetételét, a klasszikus módszerek szerinti felosztását a 4.1. ábra tartalmazza. Az összeállításban a folyamatos vonallal bekeretezett komponenst méréssel, a szaggatott vonallal bekeretezettet pedig számítással határozzuk meg.

Az élelmiszer minőségének megállapítása céljából végzett vizsgálat a **min-tavétellel** kezdődik, amely során a minősítendő anyagnak azt az egyértelműen elkülöníthető részét, aminek jellemzői egységesek, **tételnek** hívjuk. Az egy tételhez tartozó élelmiszer azonos fajtájú, azonos termő- vagy termelési helyről származik, egy évben termett vagy termelték, és egy tárolóhelyen raktározták.

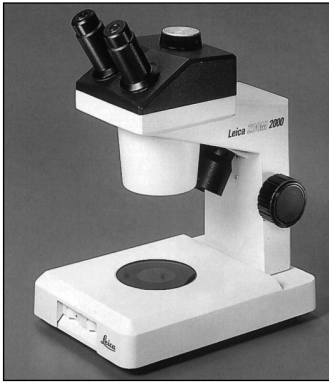


4.1. ábra. Az élelmiszer-komponensek csoportosítása

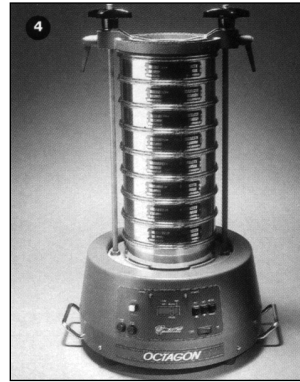
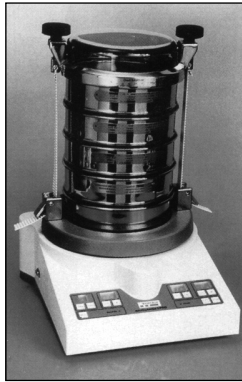
Vásárolt élelmiszer esetén egy szállítmány állhat egy vagy több tételből is. Hogy a vizsgálandó tétel homogenitásáról meggyőződjünk, a tételt két vagy több mintavételi alpra bontjuk. A **mintavételi alap** egyetlen helyéről vett mintát **elemi mintának** nevezzük. Egy mintavételi alpból annak nagyságától függően több elemi minta is vehető; ilyen esetben az elemi minták egyesítésével nyerjük az összesített vagy átlagmintát. Az elemi vagy összesített mintáknak csak egy részét küldjük el vizsgálatra, amit **laboratóriumi mintának** hívunk. Hivatalos mintavételkor – a felmerülő minőségi viták eldöntéséhez – **ellenmintát** veszünk, melynek összetétele és tulajdonságai a laboratóriumi mintáéval azonosak. A mintavétel jellege szerint lehet:

- **hivatalos mintavétel**, amelyet hatósági jogkörrel rendelkező, hivatalos személy végez a termék minőségének ellenőrzésére,
- **kereskedelmi mintavétel**, amikor az élelmiszer adásvételében érdekelt valamennyi fél, vagy az egyik fél és egy hivatalos személy van jelen a mintavételnél,
- **üzemi mintavétel**, amelyet a gyártó végez az élelmiszer minőségének megállapítása és folyamatos ellenőrzése céljából, és

Sztereomikroszkóp



Szitasorozatok rázógéppel összekapcsolva



4.2. ábra. Laboratóriumi eszközök I.

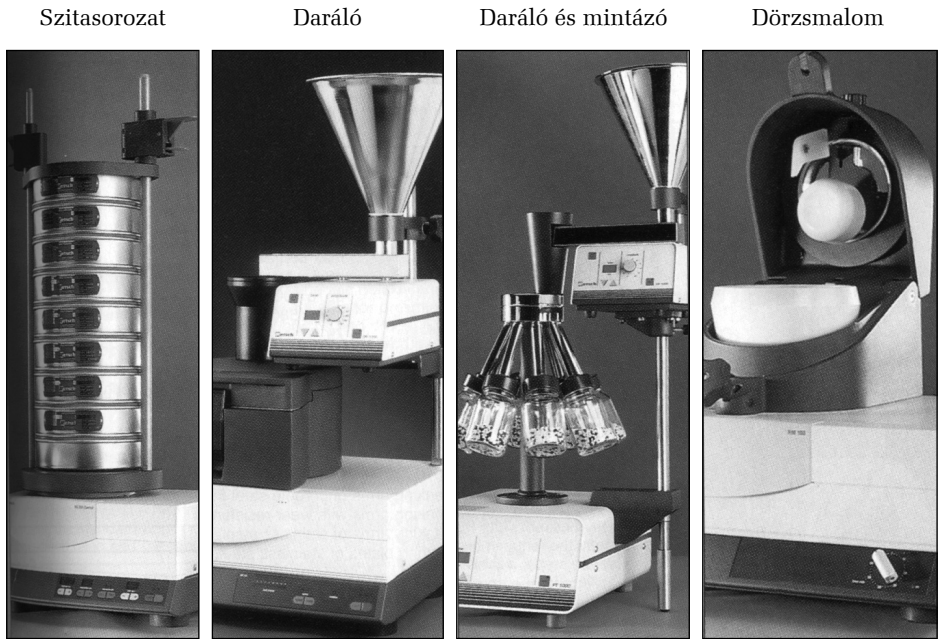
– **tájékoztató mintavétel**, amelyet a minőség tájékoztató jellegű megállapítása céljából vesznek.

A mintavétel végrehajtását szabványok írják elő. Lényeges, hogy a laboratóriumi minta jól reprezentálja a mintavételi alap átlagos minőségét; minél koncentráltabb és minél homogénebb egy minta, annál kevesebb elemi minta szükséges a jó átlagminta kialakításához. A laboratóriumi minta legalább 500-600 g szárazanyagot tartalmazzon, ami még akkor is elegendő, ha nagyszámú komponens meghatározására kerül sor. Az egyes élelmiszer-féleségekből a következő mintamennyiségeket kell a laboratóriumba beküldeni:

- magvak és darák, ipari eredetű alapanyagok, ipari keverékek, élelmiszer-kiegészítők, malomipari lisztek, darák: 1 kg,
- nyersanyagok, gyökér és gumós élelmiszer-alapanyagok: 2,5-3 kg,
- tej és tejtermékek, hús és húskészítmények: 1-2 kg.

A mintát úgy kell csomagolni, hogy annak szárazanyag-tartalma a laboratóriumba érkezésig ne változzon, valamint meg kell akadályozni a minta romlásnak indulását. A mintát a lehető legrövidebb időn belül juttassuk el a laboratóriumba, különösen akkor, ha mikrobiológiai vizsgálatot is végeztetünk.

A laboratóriumba beérkező mintát érzékszervi bírálatnak vetjük alá, amelynek során vizsgáljuk a külső megjelenést, a színt és a szagot, az egyneműséget, az aprítottságot, az egészségi állapotot, a szennyezettséget, ezen belül a gyomnövények, az állati kártevők, a por, a föld, a gombás fertőzöttség és az idegenanyag mennyiségét és arányát. (E vizsgálatokhoz segítségünkre lehet a 4.2. ábrán látható sztereomikroszkóp). Szemes termények és egyéb magvak esetében vizsgáljuk az egyneműséget, idegen magvak, sérült, romlott, pörkölődött, égett, penészes szemek előfordulását, a csutka, a léha, a toklász, a pelyva és a szárrészek jelenlétét, valamint a gyomnövények mennyiségét, különös tekintettel a mérgező vagy káros



4.3. ábra. Laboratóriumi eszközök II.

gyommagokra. Ipari keverékek esetén, a fentiekén túl, vizsgáljuk a fizikai megjelenési formát (finom őrlemény, decsés, pellet), az egész gabonaszemek jelenlétét, összeállt csomókat, raktári kártevőket és a minta száraz, nyirkos vagy vizes állapotát. (E vizsgálatokhoz segítségünkre lehetnek a különféle szitasorozatok, melyek segítségével a szemcseméret-eloszlás is meghatározható, lásd 4.3. ábra.) A fentiekén túl meghatározzuk a vizsgált anyag színét és szagát. Az észlelt szag lehet a vizsgálati anyagra jellemző vagy dohos, penészes, erjedt, savanyú, befűledt, szúrós, avas, vajsavas, pörkölődött, égett, idegen vagy jellegtelen.

Szükség szerint koncentrátumok, ipari alapanyagok, valamint préselt és morzsázott termékek esetén elvégezhetjük a szemcseméret-meghatározást megfelelően kiválasztott szitasorozattal, majd kiszámíthatjuk a különböző frakciók százalékos mennyiségét.

Az előző vizsgálatokat követheti a mikroszkópos vizsgálat, amely egy külön tudományág, és amelynek tárgyalása nem tartozik a könyv feladatkörébe.

A minőség megállapítását célzó vizsgálatok közül elsőként a mikrobiológiai vizsgálatokat végezzük el, mert a vizsgálati anyag mikrobiológiai állapota folyamatosan változhat. Az élelmiszer mikrobiológiai állapota igen sokoldalúan befolyásolhatja annak felhasználhatóságát, mert hatással van az élelmiszer értékére, felhasználhatóságára, a tárolhatóságra és a konzerválhatóságra. Az élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálata is külön tudomány, amelynek tárgya nem tartozik a könyv feladatkörébe.



4.4. ábra. Különböféle típusú darálók és homogenizátorok

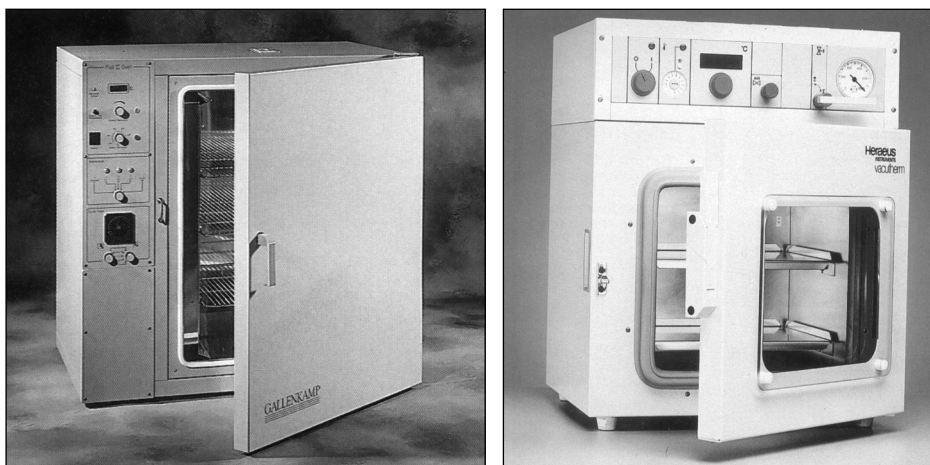
A különböző mintákat a vizsgálatokat megelőzően aprítani kell, melynek során különféle darálókat és homogenizátorokat használunk. A legtöbb vizsgálat-hoz elegendő, ha a minta 98%-a átesik a 0,2 mm lyukméretű szitán. A 4.4. ábrán különféle, laboratóriumban használatos darálók és homogenizátorok láthatók.

4.1. Nedvességtartalom-meghatározás

A nedvességtartalom-meghatározás leggyakrabban alkalmazott módja az, hogy a mintát 103 °C-on szárítószekrényben (4.5. ábra) a tömegállandóság eléréséig szárítjuk, majd a mért értékekből számítással határozzuk meg a szárazanyag-, illetve a nedvességtartalmat. A 14-20% víztartalmat meghaladó és emiatt nem darálható anyagokat két fázisban szárítjuk meg. Az előszárítás hőmérséklete 55-60 °C, amely után a mintát szobalevegőn hagyjuk kiegyenlítődni, lemérjük, ezt követően aprítjuk, és az újra bemért mintát 103 °C-on tömegállandóságig szárítjuk. Az élelmiszerek illékony anyagai a szárítás során elillanhatnak, ezért ezeket az anyagokat a nedves mintából kell meghatározni.

4.1.1. Nedvességtartalom meghatározása előszárítás nélkül

A homogenizált szilárd mintákból legalább 150 g-ot olyan méretűre darálunk, hogy 10%-nál több ne maradjon fenn az 1 mm lyukbőségű rostán. Ismételt homogenizálás után 2 g őrleményt mérünk be 1 mg-os pontossággal (m), majd egyenletesen szétterítjük a szárítóedényben. Ezután 0,2 mg-os pontossággal lemérjük



4.5. ábra. Szárítószekrény és vákuum-szárítószekrény

a szárítóedényt a fedelével és a 2 g mintával együtt (E), majd az edényt nyitott fedővel 103 °C-ra (± 2 °C) melegített szárítószekrénybe helyezük, és 4 órán keresztül száradni hagyjuk. Szárítás után az edény fedelét zárjuk és exsikkátorban lehűtjük, majd 0,2 mg pontossággal lemérjük (Sz). A nedvességtartalmat a következő képlettel számítjuk ki és tömeg%-ban adjuk meg:

$$\text{nedvességtartalom \%} = \frac{E - Sz}{m},$$

ahol: E – a minta és a szárítóedény tömege szárítás előtt,

Sz – a minta és a szárítóedény tömege szárítás után,

m – a szárításra bemért minta tömege g-ban.

A minta nedvességtartalmát két, párhuzamos mérés középértékeként, egytizedes pontossággal adjuk meg. A meghatározás pontossága $\pm 0,6\%$.

4.1.2. A nedvességtartalom meghatározása előszárítással

Legalább 500 g nagy nedvességtartalmú mintát mérünk le táramérlegen 0,01 g pontossággal (e), és 60-70 °C-on tömegállandóságig szárítjuk. Ezt követően szobahőmérsékleten nyitott edényben 2 órán át hűlni hagyjuk, majd lemérjük (M). A lehűlt minta szárazanyag-tartalmát a 3.1.1. pontban leírtak szerint meghatározzuk, a nedvességtartalmat a következő képlettel számítjuk ki és tömeg%-ban fejezzük ki:

$$\text{nedvességtartalom \%} = 100 \left(1 - \frac{M \cdot sz}{e \cdot m}\right),$$

ahol: e – az első szárításra bemért minta tömege g-ban,

M – az első szárításra bemért minta szárítás után g-ban,

m – aprítás és őrlés után a 2. szárításhoz bemért minta tömege g-ban,

sz – a 2. szárításra bemért minta tömege szárítás után g-ban.

A minta nedvességtartalmát két párhuzamos vizsgálat középértékeként, egytizedes pontossággal adjuk meg.

4.2. Az ásványi alkotórészek meghatározása

4.2.1. A nyershamu és a sósavban oldhatatlan hamutartalom meghatározása

4.2.1.1. A nyershamutartalom meghatározása

A hamutartalom meghatározása céljából a mintát izzítógelyben laboratóriumi főzőlapon, majd izzítókemencében 550 °C-on elhamvasztjuk addig, amíg a hamu fehér, ill. szürkésfehér nem lesz. Amennyiben a hamu sok ásványi anyagot (nehézfém) tartalmaz, akkor színe sötétszürke is lehet. Ha a hamu formában visszamaradó szerves anyagok mennyiségét levonjuk a szárazanyag-tartalomból, akkor megkapjuk a szerves anyagok mennyiségét.



4.6. ábra. Különböző típusú izzítókemencék

Az eljárás menete a következő: mérjük be 5 g vizsgálati anyagot (m_0) 1 mg pontossággal, és tegyük be a már előzőleg legalább 30 percig 550 °C-on kiizzított, exsikkátorban lehűtött és 0,2 mg pontossággal lemerített hamvasztótégelybe (m_2). Helyezzük a mintát elektromos főzőlapra, és fokozatosan égessük el elszenesedésig, ezt követően tegyük a tégelyt 550 °C-os hőmérsékletű izzítókemencébe (4.6. ábra), és ott három órán keresztül izzítva szénrészecskéktől mentes hamut kapunk. Ha további 1 órán keresztül izzítva még mindig előfordulnak szénrészecskék a hamuban, akkor hagyjuk lehűlni, és néhány csepp desztillált vízzel való nedvesítés után további egy órán át hamvasztjuk. Exsikkátorban való lehűlés után mérjük le a hamu és a tégely együttes tömegét 0,2 mg pontossággal (m_1). A nyershamutartalmat a következő képlettel számíthatjuk ki tömeg%-ban kifejezve:

$$\text{nyershamu \%} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \cdot 100,$$

ahol: m_0 – a vizsgálatához bémért minta tömege (g),

m_1 – a tégely és a minta tömege hamvasztás után (g),

m_2 – a tégely tömege (g).

A nyershamutartalmat két párhuzamos mérés középértékeként, egytizedes pontossággal adjuk meg.

4.2.1.2. A sósavban oldhatatlan hamutartalom meghatározása

A sósavban oldhatatlan hamutartalom meghatározásakor a mintát elhamvasztjuk, a hamut sósavban forraljuk, az oldhatatlan maradékot szűrjük, szárítjuk, hamvasztjuk, és lehűlés után mérjük. A vizsgálati eljárás a következő: miután az előzőekben leírtak szerint meghatároztuk az élelmiszer hamutartalmát, a hamut mossuk át 75 cm³ 3 M-os sósavval egy 400 cm³-es főzőpohárba, lassan forrásba hozzuk és 15 percig enyhén forraljuk. Hamumentes szűrőpapíron szűrjük a meleg oldatot, és meleg vízzel a maradékot kloridmentesre mossuk. Tegyük a szűrőpapírt tartalmával együtt a már előzőleg kiizzított, lehűtött és 0,2 mg pontossággal lemerített hamvasztótégelybe (m_2). Ezt követően először szárítjuk, majd kiizzítjuk 550 °C-on. Exsikkátorban való lehűlés után 0,2 mg pontossággal mérjük (m_1). A sósavban oldhatatlan hamutartalmat a következő képlet szerint számítjuk és tömeg%-ban fejezzük ki:

$$\text{sósavban oldhatatlan hamutartalom \%} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \cdot 100,$$

ahol: m_0 – a vizsgálatra bémért minta tömege (g),

m_1 – a tégely és a sósavban oldhatatlan hamu tömege (g),

m_2 – a tégely tömege (g).

A sósavban oldhatatlan hamutartalmat két párhuzamos vizsgálat középértékeként, egytizedes pontossággal adjuk meg.

4.2.2. Az ásványi alkotórészek meghatározása spektroszkópiai módszerekkel

Spektroszkópiai módszereknek nevezzük az elektromágneses sugárzás és az anyag kölcsönhatásán alapuló analitikai eljárásokat. Két fő ága közül az **emissziós eljárás** a fénykibocsátáson, az **abszorpciós eljárás** pedig a fényelnyelésen alapszik. Mindkét eljárás alapja az a felismerés, amely szerint az atomok és molekulák elektronrendszerében az elektronoknak pontosan meghatározott energiaértékei vannak, aminek következtében energiafelvétel vagy -leadás csak meghatározott (diszkrét) energiamennyiségek formájában mehet végbe. Gerjesztés során az energiaközlés hatására egy elektron magasabb szintre kerül, amelyet követően – mivel a gerjesztett állapot instabil – az elektronok fölös energiájukat leadva alapállapotba jutnak (rekombináció). A gerjesztés és a rekombináció azonban csak akkor szolgáltat analitikai információt, ha az energialeadás fény formájában történik. Az emittált (kisugárzott) fény energiáját a következő képlet szerint számolhatjuk:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda},$$

ahol: h – Planck-féle állandó ($6,625 \cdot 10^{-34}$ J · s),

ν – az emittált fény rezgésszáma (frekvenciája) (s^{-1}),

λ – az emittált fény hullámhossza (nm),

c – a fény terjedési sebessége ($3 \cdot 10^8$ m/s; 300 000 km/s).

Az energiaszintek közötti lehetséges elektronátmenetet ábrázolva kapjuk az ún. termdiagramot. A termdiagramon minden gerjesztési állapot közötti energia-különbségnek megfelel a fény jól megkülönböztethető hullámhossza. A legalsó szintnek megfelelő energiakülönbség adja az ún. alapvonalat, amely a kérdéses elemre a legjellemzőbb és a legintenzívebb. A fontosabb elemek alapvonalait a 4.1. táblázat tartalmazza.

A molekulák esetében az elektronok energiaállapotai mellett módosulnak a forgási és rezgési energiák is, azonban ezek energiái az elektronok energiájához képest nagyságrendekkel kisebbek. Az elektromágneses spektrum optikai tartománya az, amit a makro- és mikroelemek mennyiségének meghatározására fel tudunk használni. **A kibocsátott vagy az elnyelt fény hullámhossz szerinti**

felbontása után nyerjük a színeképet, amelynek értékelésével a színeképelemzés foglalkozik. Vonalas színeképet kapunk atomos gázok vagy gőzök gerjesztése esetében, sávos színeképet molekulák gerjesztésekor, folytonos színeképet adnak az izzó, szilárd testek vagy folyadékok. **Atomokat – mivel a fény emittálására és abszorbeálására is képesek – emisszióban és abszorpcióban is vizsgálhatunk, molekulákat viszont (mivel a gerjesztés során legtöbbször elbomlanak) abszorpció módszerekkel tudunk analizálni.**

4.1. táblázat. Néhány elem alapvonala

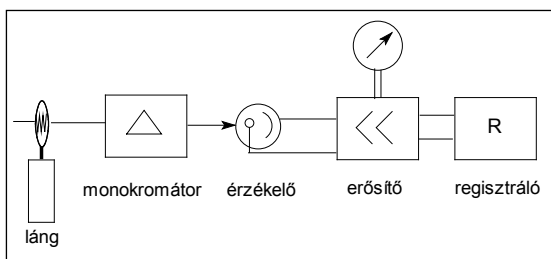
Nátrium	589,0 és 589,6 nm
Kálium	766,5 nm
Kalcium	422,7 nm
Magnézium	285,2 nm
Réz	324,7 nm
Cink	213,9 nm
Vas	248,3 nm
Mangán	279,5 nm

4.2.2.1. Emissziós színeképelemzés

4.2.2.1.1. Lángfotometria

A lángfotometria a lángban történő gerjesztéssel végzett mennyiségi színeképelemzés. Az eljárás során a mintát lángba porlasztjuk, majd az emittált fény erősségét spektrális felbontás után közvetlenül mérjük. A lángba beporlasztott anyagból az oldószer elpárolog, majd a gőzállapotban lévő fémsó termikusan disszociál. A kapott szabad atomok és gyökök, esetleg molekulák gerjesztődnek, egy részük ionizálódik. A lángba jutó részecskék elpárolgását és disszociációját elősegíti a magas hőmérséklet, a kis mennyiségű anyag adagolása és a viszonylag hosszú idejű lángban való tartózkodása. Gázhalmazállapotban egyensúly áll be a molekulák, az atomok és az elektronok között. **Az eljárás során a gerjesztődött atomok által kisugárzott fény intenzitását mérjük.** A lángfotométer elvi felépítését a 4.7. ábra mutatja.

A folyamat menete összefoglalva a következő: az oldószer (ami legtöbbször víz) elpárolgása, szilárd köd keletkezése, párolgás, disszociáció, gerjesztődés és emisszió. **Az emittált fény különböző lencséken, prizmákon keresztüljutva színképvonalakat hoz létre, amelyek közül kiválasztjuk a mérendő elem alapvonalát. Ennek intenzitása arányos a koncentrációval, tehát e módszerrel minőségi és mennyiségi analízist is tudunk végezni.** Ha pl. a színeképben azonosítani tudjuk az 589,6 nm-es hullámhosszú vonalat, ez azt jelenti, hogy a mintában volt



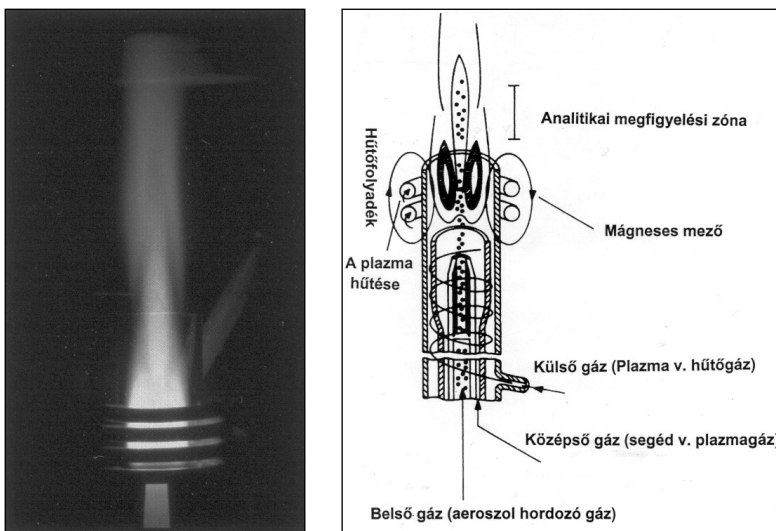
4.7. ábra. A lángfotométer elvi felépítése

nátrium, mert ez a hullámhossz kizárólag a nátriumatomok $3p \rightarrow 3s$ elektronátmenetének megfelelő sugárzás hullámhossza. Amennyiben több elemet akarunk a mintából meghatározni, mindig ki kell választani a mérendő elem alapvonalának megfelelő karakterisztikus hullámhosszt. A lángfotometria az 5 eV-nál kisebb gerjesztési energiájú elemek mennyiségi meghatározását teszi lehetővé, hisz a levegő-acetilén vagy a levegő-propánbután gáz hőmérséklete nem elegendő a nagyobb gerjesztési energiájú elemek magasabb energiaszintre történő kerüléséhez.

A lángfotometriát sok környezeti hatás zavarja. Az érzékenységet rontja a gerjesztés mellett végbemenő nagyfokú ionizáció, és zavarólag hathat az önabszorpció is (amikor a láng magasabb hőmérsékletű belső részein kibocsátott sugárzást a láng külső, hidegebb részén lévő atomok elnyelik), amelynek során csökken a karakterisztikus hullámhosszú fénysugár intenzitása. A fentiekén túl zavarhatják a meghatározást a mátrixhatás következtében olyan oxigéntartalmú anionok, mint a szilikát vagy foszfát; a szerves anyagok hidroxil- és cianidcsoportok jelenlétében pedig folytonos háttérsugárzást adnak, amelyek a mérési eredményeket meghamisíthatják.

4.2.2.1.2. Plazmaemisszió

Az induktív csatolású plazma (ICP) két-három menetből álló tekercsbe vezetett nagyfrekvenciás árammal, legtöbbször argonatmoszférában létesített plazmát jelent, amelynek hőmérséklete 6000-8000 K (4.8. ábra). A mérendő elem oldatát az ICP-méréstechnika során perisztaltikus pumpával juttatjuk be a ködkamrába, ahonnan a vivőgázzal porlasztva jut a plazmaégőbe. A plazmagáz a vízűtött nagyfrekvenciás tekercs belsejében ionizálódik, aminek következtében a tekercs belsejében az elektronszám rendkívüli módon megnövekszik, az elektronok mozgási energiája akkorára nő, hogy az argonatomokkal ütközve azokról elektronokat szakít le. **A nagyfrekvenciás plazmában történő mérés rendkívüli előnye, hogy gyakorlatilag nem kell a mátrixhatással számolni,** és a lángfotometriánál fennálló zavaró körülmények is minimálisak. A kis gerjesztési energiájú alkálifémek a nagyméretű ionizáció miatt viszont nem vagy csak nehezen mérhetők ICP-vel.



4.8. ábra. A plazma és szerkezete

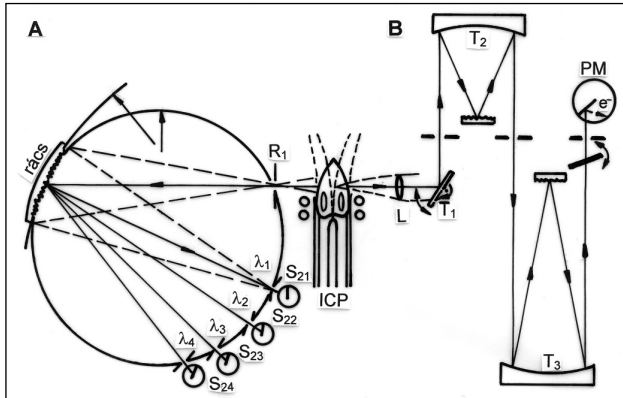
A módszer érzékenysége rendkívül nagy, kedvező esetben elérheti a néhány század $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ot is. A plazma egyidejűleg sugározza a mintában lévő valamennyi elem karakterisztikus vonalait, így megfelelő berendezéssel plazmaemissziós spektrométerrel 20-40 elem mérhető egyidejűleg (4.8. ábra).

A kisugárzott fény mérése történhet monokromátoros vagy polikromátoros elrendezésben. A monokromátorba jutott fényből tükrök és rácsok segítségével kiválasztjuk a kívánt hullámhosszú fényt, amelynek intenzitását valamilyen fénymérő berendezésben mérjük. A berendezés segítségével a plazmát elhagyó spektrumból tehát kiválasztjuk a keresett hullámhosszt, azaz a fényt monokromatikusá tesszük. A polikromátoros berendezésben a belépőre érkező fényt az optikai rács – a prizmahoz hasonlóan csak annál nagyobb felbontásban – összetevőire bontja, amelyek intenzitását egy fotomultipliernek nevezett berendezés méri. A polikromátoros elrendezés segítségével számítógépes értékeléssel pár cm^3 mintából 40-50 elem minőségi és mennyiségi analízise végezhető el fél perc alatt (4.9., 4.10. ábra).

4.2.2.2. Abszorpciós színeképelemzés

4.2.2.2.1. Atomabszorpciós fotometria

Az abszorpciós színeképelemzés az atomok és vegyületek fényelnyelésének mérésén alapuló analitikai módszer, amelynek alapja, hogy a különböző atomok és vegyületek az összetett fény más és más hullámhosszú sugarait abszorbeálják. A fényabszorpció az atomokra és vegyületekre nézve szelektív, tehát az anyag minőségére

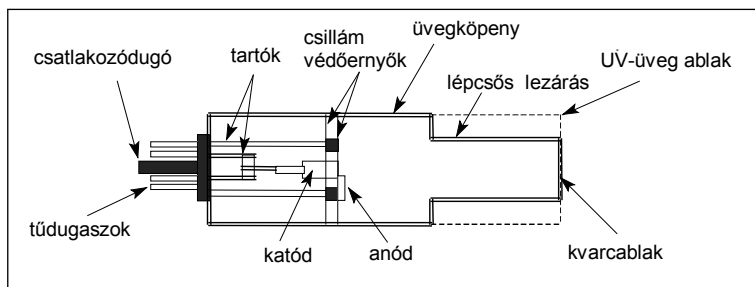


4.9. ábra. A kisugárzott fény mérése polikromátoros (A) és monokromátoros (B) elrendezésben



4.10. ábra. Egy Perkin Elmer indukció csatolású plazmaemissziós fotométer (ICP)

ad információt; a fényelnyelés mértéke pedig az anyag koncentrációjával arányos, ezért az abszorpció mértékéből a vizsgálandó anyag mennyiségére is következtetni lehet. Az abszorpciós mérések közül **az atomabszorpciót elsősorban fémek kis mennyiségének pontos meghatározására alkalmazzák**; szinte minden élelmiszer szempontjából fontos fém- és nehézfémnyom meghatározható ezzel a technikával. **Az atomabszorpció olyan analitikai módszer, amely a gáz-halmazállapotú atomok fényelnyelését méri, az atomok ugyanis képesek mindazon hullámhosszágú fény elnyelésére, amelyet önmaguk is ki tudnak bocsátani.** A szabad atomok csak a rájuk jellemző hullámhosszú fényt képesek abszorbeálni, azt, amely a megfelelő elektronátmenethez szükséges, ezért ha egyetlen hullámhosszú sugárzást bocsátunk át az atomgőzön, akkor ezt csak egyetlen elem atomjai képesek elnyelni.

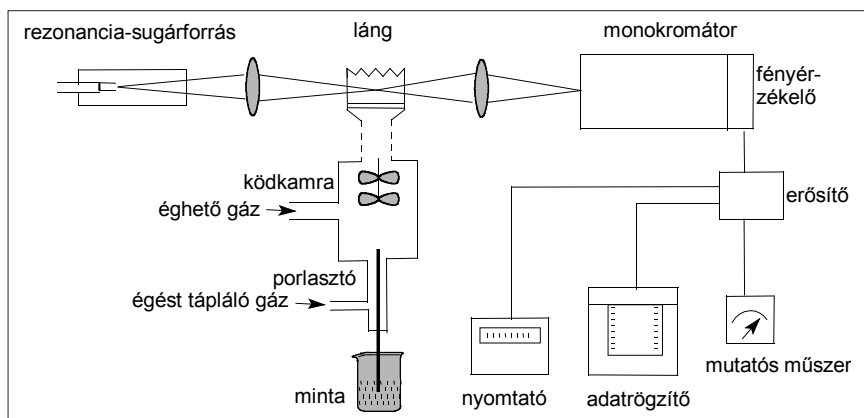


4.11. ábra. A vájtkatódlámpa felépítése

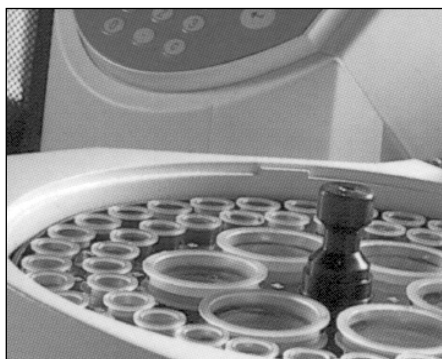
A karakterisztikus sugárzás előállítására az ún. vájtkatódlámpák (4.11. ábra) **alkalmasak, amelyeknek henger formájú üreges katódja a mérendő elem-ből készül.** A vájtkatódlámpa valójában egy kis nyomáson működő kisülési cső, amely csakis a katódfém alapvonalát sugározza igen nagy intenzitással. Kis áramerősséget átbocsátva a katódon, arról fématomok kerülnek a gáztérbe, amelyek ott ütközéssel gerjesztődnek, majd ismét alapállapotba jutva, az elektronátmenetnek megfelelő fényt kisugározzák. **A kisugárzott fényt átbocsátják a mérendő elemet tartalmazó atomos gőzökön, amelyek közül csak a mérendő atomok képesek ezt a fényt abszorbeálni, hisz ez ezek alapvonalát gerjeszti.** Így pl. a magnéziumlámpa csak a 285,2 nm-es hullámhosszú sugárzást bocsátja ki, amelyet csak a magnéziumatomok képesek abszorbeálni. **A fényelnyelés mértéke arányos a meghatározandó atomok számával, azok koncentrációjával.** A módszer szelektív és nagy érzékenységű, kellő számú vájtkatódlámpával gyakorlatilag 30-60 fémes elem egymást követő meghatározását teszi lehetővé. Az atomos gőzök előállítása szempontjából kétfajta eljárás ismeretes: **atomizáció lángban** és **elektrotermikus** vagy más elnevezéssel **grafitküvettás atomizáció.**

Az atomos gőzök lángba juttatása a lángfotometriához hasonlóan történik, aminek során a mérendő anyagot a levegő a ködkamrába juttatja, amely ott az éghető gázzal keveredik, és együttesen viszik tovább a lángig. A lángban megtörténik a vájtkatódlámpa által kisugárzott fény abszorpciója, amelynek mértékét a fényérzékelő méri. Az érzékelő a jelet kijelzi a nyomtatóba vagy az adattároló komputerhez juttatja el (4.12., 4.13., 4.14. ábra).

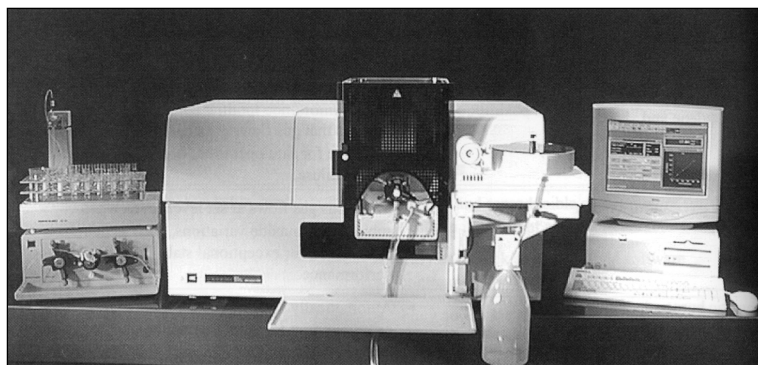
A lángot leggyakrabban az acetilén levegőben vagy az acetilén dinitrogén-oxidban történő égetésével állítják elő. A dinitrogén-oxid–acetilén láng magasabb hőmérsékletű, kevesebb benne a zavaró hatás, jelentősebb viszont az ionizáció. E lángot a nagyobb gerjesztési energiával rendelkező elemek meghatározásánál használják. Az atomabszorpciós méréssel egy elem meghatározása egy mintából 5-10 másodpercig tart, ezért a módszer alkalmas nagyszámú minta gyors mennyiségi analizisére. A módszerrel a jól mérhető elemekre a kimutatási határ 0,01 mg/kg.



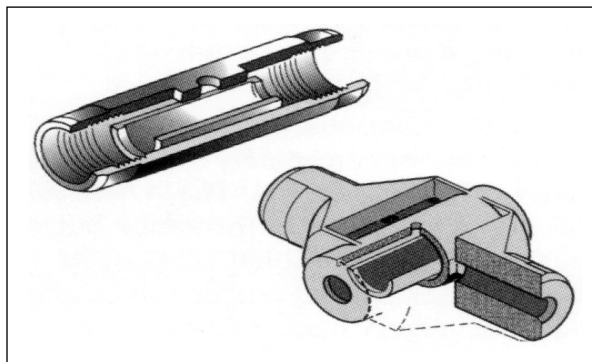
4.12. ábra. Az atomabszorpciós fotométer felépítése



4.13. ábra. Automatikus mintaadagoló



4.14. ábra. Egy Perkin Elmer atomabszorpciós spektrofotométer



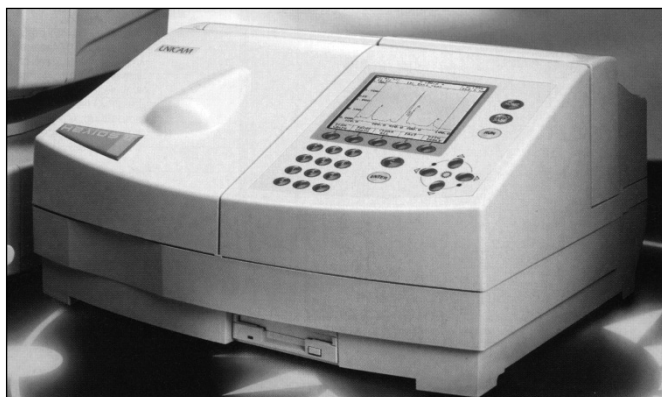
4.15. ábra. Grafitküvetta

A grafitküvétás atomizáláskor nemesgáz atmoszférában tartott, elektromos árammal felmelegített grafitküvétát használunk, amelyen keresztülhalad a vájtkatódlámpa által kibocsátott sugárzás. A nagy ellenállású grafitküvétát (4.15. ábra) kisfeszültségű (10 V) és nagy áramerősségű (80-100 A) árammal felmelegítjük, amelynek során be tudjuk állítani a pontos hőmérsékletet, ami lehetővé teszi az optimális mérési paraméterek kialakítását. A meghatározás során elsőként az oldószert párologtatjuk el, az ezt követő előkezelés során a szennyező- és zavaróanyagok eltávolítása következik, majd végül az atomizáció során a mérendő elem atomos gőzének előállításával elvégezzük a tényleges mérést.

Az elektrotermikus atomizálás rendkívüli előnye, hogy az elemek egyedi fűtési programja segítségével a zavaró hatások nagyrészt kiküszöbölhetők. A módszer érzékenyebb és pontosabb, mint a láng esetében, hátránya viszont, hogy lassabb és drágább. A grafitküvétás mérés technikával a mérendő elemek kimutatási határa $1 \mu\text{g}/\text{kg}$.

4.2.2.2. Ultraibolya és látható abszorpciós fotometria

A témakört részletesen tárgyaltuk a korábbiakban, de mivel az abszorpciós módszerekhez tartozik, a lényegét itt is röviden összefoglaljuk. A vegyületek kémiai kötése gerjesztéséhez az ultraibolya és a látható színek tartomány energiája elégséges. A σ -kötést a 180 nm-nél kisebb hullámhosszú, a π -kötést pedig a 180 nm-nél nagyobb hullámhosszú fény gerjeszti, amiből az is következik, hogy a módszer leginkább a különféle szerves vegyületek meghatározására alkalmazható. **A hullámhossz függvényében felvett fényelnyelés mértéke adja az abszorpciós spektrumot vagy színeképet**, amelyben az egyes kötéstípusokhoz jellegzetes elnyelési tartományok rendelhetők, amelyek alapján a vegyületek azonosíthatók. A különböző vegyületek spektruma egymástól annyira különbözik, hogy a különbség alapján a vegyületek egymástól elválaszthatók. A meg-



4.16. ábra. Látható és ultraibolya-tartományban működő fotométer

határozás során a spektrumok felvételét nem abszorbeáló oldószerben feloldott anyagokkal végezzük, úgy, hogy a mintaoldat elnyelését az oldószerhez mint vakértékhez hasonlítjuk. A leggyakrabban használt oldószer a víz, az alkohol, a hexán és a benzol. **A vegyület fényelnyelése során mért intenzitáscsökkenés logaritmusának arányos a mérendő elem koncentrációjával**, amit abszorbanciának hívunk. A **Lambert–Beer-törvény** alapján az abszorbancia a következő képlettel fejezhető ki.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l,$$

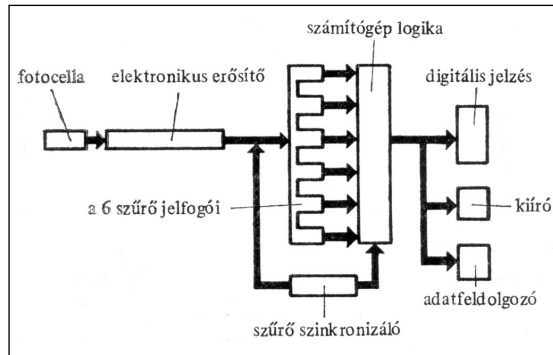
ahol: I_0 – a belépő fény intenzitása,
 I – a mintaoldatot elhagyó fény intenzitása,
 l – a fény útja az oldószerben,
 c – koncentráció (mol/dm^3),
 ε – a moláris abszorpciós koefficiens.

A fenti képlet segítségével, **ha megmérjük az abszorbanciát, a koncentráció számolható**. Az abszorbancia mérésére olyan fotométereket használunk, amelyekben a mérendő vegyület abszorpciós maximumának megfelelő hullámhossz beállítható (4.16. ábra). Erre azért van szükség, mert az abszorpciós maximumon a legérzékenyebb a mérés.

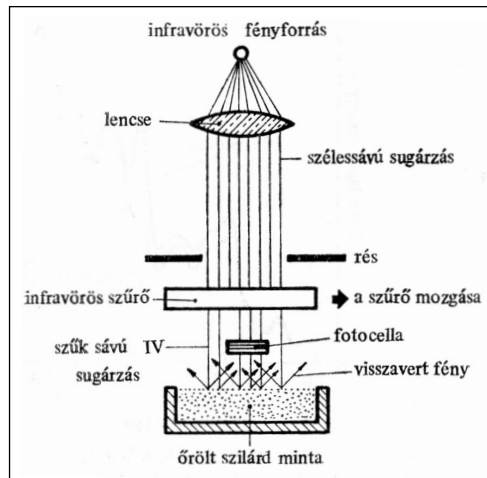
Az ultraibolya-tartományban végzett mérés, az UV-spektroszkópia szerves vegyületek beazonosítására és mennyiségi meghatározására is alkalmazható.

4.2.2.3. Infravörös spektroszkópia

Az infravörös spektroszkópiát az utóbbi időben kiterjedten használják élelmiszerek fehérje-, zsír-, szénhidrát- és nedvességtartalmának meghatározására. A mód-



4.17. ábra. Az infravörös sugárzás alapján mérő készülék elvi felépítése



4.18. ábra. Az élelmiszer összetételének meghatározása az infravörös sugárzás reflexiója alapján

szerek pontossága talán még nem éri el a klasszikus és jól bevált módszerekét, azonban a minta-előkészítés és a mérés kivitelezésének egyszerűsége miatt az ilyen típusú módszerek elterjedése várható a gyakorlatban. **Az infravörös spektroszkópia a molekulák rezgési és forgási állapotában bekövetkező változásokat méri**, hisz ezek is a kvantumfeltételek által meghatározottak, ezért információt nyújtanak a szerkezetre. A rezgési energia változásait az infravörös fény elnyelése okozza, melynek hullámhossztartománya 2500–15000 nm között van (4.17., 4.18. ábra). Az infravörös spektroszkópia azonban praktikus okokból nem a hullámhosszal, hanem a hullámszámmal dolgozik, amely a centiméterben kifejezett hullámhossz reciproka, ami az infravörös-tartományra 600–4000 cm^{-1} .

A rezgési színekép a molekulán belüli atomok vagy atomcsoportok egymáshoz viszonyított rezgésének eredménye, melyek normál-, illetve csoportrezgések lehetnek. A **normálrezgés** lehet **vegyértékrezgés**, ami a két atom vegyértékkötése irányában történik, **deformációs rezgés**, amely a vegyértékszög változásaival jár, és **vázrezgés**, amely az egész vázra kiterjed. A csoportrezgések meghatározott funkciós csoportok rezgései, amelyek a szerves vegyületeknél leggyakrabban az alábbiak lehetnek cm^{-1} -ben kifejezve:

alkén	(1640–1670)	keton	(1700–1720)
karbonsav	(1700–1725)	észter	(1720–1750)
alkin	(2100–2200)	alkán szénhidrogén	(2900–3000)
aromás szénhidrogén	(3000–3100)	alkohol	(3100–3400)

Az infravörös spektrum felvételéhez a szilárd anyagot alkáli-halogenidekkel (NaCl, KBr) porrá őrölve pasztillákba préselik, folyadékok esetében pedig két nátrium-klorid ablak között vékony filmet képeznek. Az említett alkáli halogenideknek nincs infravörös abszorpciója. Ezt követően **felveszik az infravörös spektrumot a 400–4000 cm^{-1} hullámszámtartományban, majd azonosítják a mérendő vegyületet a hullámszámokhoz rendelhető funkciós csoportok megállapításával. A funkciós csoportok számának és helyzetének spektrumból történő megállapítása után összeállítható az ismeretlen molekula szerkezeti képlete.** Az infravörös spektroszkópia tehát használható ismeretlen szerves anyagok molekulaszervezetének megállapítására és a funkciós csoportok alapján élelmiszerek összetételének meghatározására.

4.2.2.4. Válogatott fejezetek

4.2.2.4.1. Az ember ásványianyag-ellátottságának vizsgálata

Az energia- és fehérjetartalom mellett az élelmiszer-receptúrák összeállításánál esetenként figyelemmel kell lenni az ember korcsoport, nem és fiziológiás állapot szerinti makro- és mikroelem-ellátottságának biztosítására. Az ásványianyag-hiány fiziológiai, súlyosabb esetben anatómiai rendellenességekhez vezethet, és súlyosan károsíthatja az ember egészségét.

Az ember ásványianyag-ellátottságáról a **haj- és véranalízis** útján tájékozódhatunk, hisz a pigmentált hajban és a vérben lévő elemek jól jelzik a szervezet ásványianyag-ellátottságát. A vér- és hajanalízis közötti különbség az, hogy a vérben lévő mikroelem-szint csak a mintavétel időpontjában, ill. azt a néhány nappal megelőző intervallumban fennálló ásványianyag-ellátottsági szintet tükrözi; a hajban meghatározott értékek viszont a haj növekedésének idejére adnak információt. A véranalízis tehát a pillanatnyi viszonyokra, a hajanalízis pedig egy hosszabb időtartamra ad információt az ásványianyag-ellátottságról. A vér

ásványianyag-tartalmát a szervezet saját tartalékaiból ásványianyag-hiányos ellátottság esetén is igyekszik fenntartani, így a vérből meghatározott koncentrációk csak a szervezet ásványianyag-ellátottságának viszonylag nagy ingadozásait követik. A fentiek miatt többen a hajanalízist előnyben részesítik a véranalízissel szemben.

Csak a pigmentált haj alkalmas az ásványianyag-ellátottság vizsgálatára, és az is lényeges, hogy a haját semmiféle kozmetikummal ne kezeljék. A hajban lévő ásványi anyagok mennyiségét befolyásolja a haj színe (a sötétebb színű haj általában több ásványi anyagot tartalmaz), a haj fajtája, az évszak, a biológiai állapot és a kor.

A hajanalízis menete a következő: megfelelően megtisztított hajból elektromos nyírógéppel mintegy 1-5 g mintát veszünk. Desztillált vízzel mossuk, szárítjuk, melynek során távoznak a haját szennyező szerves anyagok, majd petroléterben ismételten mossuk, szárítjuk, melynek során távoznak a szerves szennyeződések is. A tisztított mintát a mérendő elemek fajtájától függően 450-550 °C-on hamvasztjuk, meghatározzuk hamutartalmát, majd a hamut híg salétromsavban feloldjuk. Az oldatból a kálium- és nátriumtartalmat lángfotometriával, a kalcium-, magnézium-, vas-, mangán-, cink-, réz- és kobalttartalmat atomabszorpciós mérés technikával, az acetilénlángban atomabszorpcióval nem mérhető fémeket induktív csatolású plazmaemisszióval, a foszfort pedig foszfovanado-molibdát formában spektrofotometriásan határozzuk meg.

A haj mangán- és foszfortartalmának meghatározása. A mosással megtisztított haj öt g-ját elektromos kemencében elhamvasztjuk, melynek során a hamvasztás kezdetén a kemence hőmérsékletét óránként 50 °C-kal emeljük, majd 450 °C-on egy éjszakán át hamvasztjuk. A haj hamutartalmát 0,1 mg pontossággal lemérjük, majd hozzáadunk 5 cm³ 5 M-os salétromsavoldatot és a hamut enyhe rázogatással feloldjuk, majd 20 cm³ desztillált vizet adunk hozzá. Az oldatot szűrőpapíron egy 50 cm³-es mérőlombikba szűrjük, jelre töltjük, és ebből az oldatból megfelelő hígítás után atomabszorpciós módszerrel határozzuk meg a mangánt 297,5 nm-en. A mennyiségi meghatározáshoz olyan kalibrálóoldatot használunk, amely a mangánt a hajban várható koncentráció körül tartalmazza.

A foszfortartalom meghatározása során az 50 cm³-es mérőlombikban lévő törzsoldatot kétszeresére hígítjuk, melynek során 5 cm³ törzsoldathoz hozzáadunk 1 cm³ színeképző (molibdo-vanadát) reagenst, majd 4 cm³ vizet hozzáadva jól összerázzuk. A kapott sárga színű oldatot 460 nm-en 1 cm-es küvettában vakoldattal szemben fotometráljuk. A mennyiségi meghatározáshoz olyan foszfortartalmú kalibrálóoldatokat használunk, amelyben a foszfor koncentrációja a haj várható foszfortartalma körül van. A haj tényleges mangán- és foszfortartalmának kiszámításakor figyelemmel kell lenni a haj pontos bemérésére és az analízis során elvégzett hígításokra.

4.2.2.4.2. A tehéntej ásványianyag-tartalma és annak megváltozása a tőgygyulladás következtében

A tőgygyulladás hatására a tehéntej összetétele lényegesen megváltozik a normális tej összetételéhez képest. Az összetételében megváltozott tej ipari és táplálkozásbiológiai értéke lényegesen kisebb a normális tejénél, mert csökken a gyulladással összefüggő származó tej hőstabilitása, erjedőképessége, pufferkapacitása, a belőle készült alvadék szilárdsága és savóleadó képessége, megnyúlik az oltós alvadási ideje, nagyobb lesz a *reduktáz*, *proteináz* és *lipáz* aktivitása, valamint a szabad zsírsavak mennyisége. Kisebb lesz a tej zsír- és fehérjetartalma, megváltozik a fehérjefrakciók mennyisége és aránya, csökken a vitamin- (különösen az A- és C-vitamin-) tartalma. A tej kazein-tartalmának csökkenésével kevesebb lesz az ún. sajtkitermelési százalék, nő a savó zsír- és fehérjetartalma. A masztitiszes tej részarányának meghatározására különböző istállópróbák (*kataláz*-próba, brómtimol-próba, white-side-próba, mastitest-próba vagy CMT-próba) terjedtek el. Ezek a próbák a tej kémhatásának megváltozásán, illetve a tej megemelkedett sejtartalmának kimutatásán alapulnak. Jelentős mértékben megváltozik a tej laktóz- és ásványianyag-tartalma is tőgygyulladás hatására. A laktóztartalom 4,9%-ról 3,3%-ra, a káliumtartalom 1300 mg/kg-ról 600-700 mg/kg-ra csökken, a nátriumtartalom 400 mg/kg-ról 1500 mg/kg-ra, a kloridion-tartalom 1000 mg/kg-ról 1700-1800 mg/kg-ra nő – a mastitest-próba alapján – + + + és + + + + keresztes tejben a negatív tejhez képest. Hasonló, bár talán nem ennyire szembetűnő változások történnek a többi makro- és mikroelem-tartalomban is, azaz az egészséges tőgyből származó tej több szárazanyagot, laktózt, káliumot, foszfort, cinket és rezet, ezzel szemben kevesebb nátriumot, kloridot, kalciumot, vasat és mangánt tartalmaz.

Az előzőekből nyilvánvaló, hogy ha az ásványianyag-tartalom alapján akarjuk a tőgygyulladást kimutatni, akkor a kloridion-tartalomra, a nátrium- és káliumtartalomra kell koncentrálnunk, esetleg az összes makro- és mikroelemet bevonhatjuk az értékelésbe.

4.2.2.4.2.1. A tej kloridion-tartalmának meghatározása

A tehéntej tőgygyulladás hatására megnövekedett kloridion-tartalmát egyrészt Volhard szerint, másrészt potenciometriásan, kloridion-szelektív elektróddal is meg lehet határozni.

Volhard szerint vizsgálva a kloridion-tartalmat meghatározott mennyiségű tejhez ismert mennyiségű ezüst-nitrát-oldatot adunk, és Fe(III)-ammónium-szulfát indikátor jelenlétében az ezüst-nitrát-felesleget ammónium-rodanid mérőoldattal visszaitráljuk. A módszert a 2.4.1. fejezetben korábban már ismertettük. A tej kloridion-tartalmát 100 cm³ tejre vonatkoztatva g-ban az alábbi képlettel számolhatjuk ki:

$$c = \frac{(a - b) \cdot 0,00355 \cdot 100}{m},$$

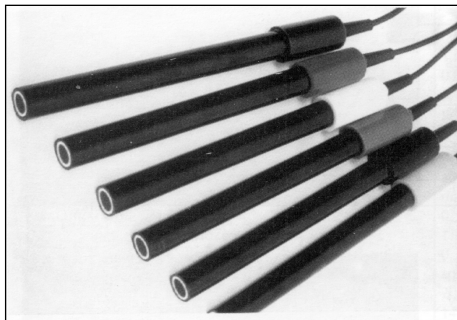
ahol: a – a 10 cm^3 tejhez adott $0,1 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú AgNO_3 -oldat mennyisége (cm^3),

b – a titráláskor fogyott $0,1 \text{ mol/dm}^3$ koncentrációjú ammónium-rodanid-oldat mennyisége (cm^3),

m – a bemért tej mennyisége (cm^3),

$0,00355$ – kloridion-egyenérték (g).

A tej kloridion-tartalmának meghatározását **potenciometriásan**, kloridion-szelektív elektróddal is elvégezhetjük (4.19. ábra). A meghatározáshoz szükséges egy potenciométer vagy pH-mérő készülék, egy kloridion-szelektív membránelektród és egy vonatkoztatási kalomelektród. A vizsgálat során egy 100 cm^3 -es főzőpohárban 10 cm^3 tejet 90 cm^3 desztillált vízzel elegyítünk, az oldatot 2-3 percig kevertetjük, majd kloridion-szelektív- és vonatkoztatási elektród segítségével leolvassuk az elektródpotenciált (E). A meghatározáskor ismert kloridion-koncentrációjú oldatokkal elkészítjük a kalibrálóegyenest, amelynek segítségével a leolvasott elektródpotenciál-értékekből felvett $\lg[\text{Cl}^-]$ - E függvény alapján a minta kloridion-koncentrációja meghatározható. A kapott értékeket a hígítással megszorozva megkapjuk a tej kloridion-tartalmát.



4.19. ábra. Különféle típusú ionszelektív elektródák

4.2.2.4.2.2. A tej nátriumtartalmának meghatározása

A tej megnövekedett nátriumtartalmát lángfotometriásan, illetve ionszelektív membránelektród segítségével is meghatározhatjuk. A lángfotometriás meghatározás során a vizsgálandó tejmintát beszárítjuk, majd elhamvasztjuk. A hamut híg salétromsavban feloldjuk, és az oldat megfelelő hígítása után a nátriumion-koncentrációt lángfotometriásan mérjük. A lángfotometriás mérés hullámhossza 598 nm . A tejből készült oldat intenzitásértékeit megfelelő koncentrációjú kalibrálóoldatok intenzitásértékeihez viszonyítjuk. A kalibrálóoldatok intenzitásértékeiből kalibrálóegyenest készítünk, amelynek segítségével az ismeretlen nátriumion-koncentráció meghatározható.

A tej nátriumtartalmát meghatározhatjuk ionszelektív membránelektrod segítségével is, amely eljáráshoz szükségünk van egy potenciométerre vagy pH-mérő készülékre, a nátriumion-szelektív membránelektrodra és egy vonatkoztatási kalomelelektrodra. A vizsgálati eljárás során hasonló módon járunk el a kloridtartalomnál leírtakhoz, azzal a különbséggel, hogy nátriumion-szelektív membránelektrodával mérjük meg a tej elektrodpotenciálját. Ezt követően ismert nátriumion-koncentrációjú oldatokkal kalibrálóegyenest készítünk; az elektrodpotenciál-értékeket a nátriumion-koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoljuk, majd az így kapott kalibrálóegyenes segítségével meghatározható a nátriumion-koncentráció.

4.2.2.4.2.3. A tej ásványi alkotórészeinek meghatározása

A tej és tejtermékek kálium- és nátriumtartalmát lángfotometriával vagy ionszelektív membránelektrodával, kloridion-tartalmát klasszikus módszerekkel vagy potenciometriásan, kalcium-, magnézium-, cink-, réz-, vas-, mangán-, kobalt-, nikkel-, ólom-, kadmium-, arzén-, ón... tartalmát pedig atomabszorpciós spektrofotométerrel, illetve induktív csatolású plazmaemissziós fotométerrel határozzuk meg. A vizsgálat során a tejből 50 cm^3 -t mérünk be 1 mg -os pontossággal porcelán vagy kvarc hamvasztótégelybe, majd a tégely tartalmát $103\text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$) hőmérsékletű szárítószekrényben tömegállandóságig szárítjuk. Ezt követően izzítókemencében annak hőmérsékletét óránként $30\text{ }^\circ\text{C}$ -kal emelve $450\text{ }^\circ\text{C}$ -on elhamvasztjuk, a lehűlt hamuhoz 10 cm^3 5 M -os HNO_3 -oldatot adunk, majd 50 cm^3 -es mérőombikba szűrjük, jelre töltjük, és ebből a törzsoldatból hígítunk az atomabszorpciós és az ICP-méréshez. A mérési hullámhosszokat a 4.2. táblázat tartalmazza:

4.2. táblázat. A tej ásványi alkotórészeinek meghatározására használt hullámhosszok (nm)

Elem	Atomabszorpció	ICP
Kalcium	422,7	393,4
Magnézium	285,2	279,5
Cink	213,9	213,9
Réz	324,7	324,7
Vas	248,3	238,2
Mangán	279,5	257,6
Kobalt	240,7	238,8
Nikkel	232,0	231,6
Molibdén	217,0	230,4
Kadmium	228,8	214,4
Arzén	193,1	189,0
Stroncium	460,7	407,8
Bárium	553,5	455,4

A mintából mért abszorbancaértékeket, illetve intenzitásokat a megfelelő koncentrációjú kalibrációs sorozathoz hasonlítva kiszámítható az aktuális koncentráció.

4.2.2.4.2.4. A masztitiszes tej részarányának meghatározása elegytejből az ásványianyag-tartalom alapján

A módszer alkalmas az egészséges tejhez hozzáfejt tőgygyulladásos tőgyből származó tej kimutatására és mennyiségének meghatározására. A módszer a tej tőgygyulladás hatására bekövetkező kémiai összetételének megváltozásán alapszik (4.3. táblázat).

4.3. táblázat. A tej összetételének megváltozása tőgygyulladás hatására

A vizsgált komponens	A vizsgált csoportok a mastitest-próba alapján				
	Negatív	+	++	+++	++++
Laktóz g/100 g	4,920	4,570	3,990	3,420	3,350
Száranyag g/100 g	11,640	11,440	11,330	10,890	10,820
Kálium mg/kg	1327,000	1169,000	911,000	700,000	627,000
Nátrium mg/kg	372,000	678,000	954,000	1246,000	1559,000
Klorid mg/kg	1090,000	1317,000	1554,000	1770,000	1773,000
Kalcium mg/kg	911,000	975,000	990,000	1052,000	1136,000
Foszfor mg/kg	833,000	811,000	742,000	680,000	654,000
Magnézium mg/kg	122,300	121,400	119,800	117,400	118,000
Cink mg/kg	4,740	4,220	4,060	3,800	3,780
Vas mg/kg	1,010	1,900	2,930	3,560	3,110
Réz mg/kg	0,322	0,302	0,283	0,266	0,245
Mangán mg/kg	0,106	0,131	0,157	0,210	0,198

Amennyiben egy olyan faktort képezünk, ahol a számlálóban csak azok a komponensek szerepelnek, amelyek csökkennek, a nevezőben pedig csak azok, amelyek nőnek a tőgygyulladás hatására, akkor az így kapott faktor a normális tejre számolva 7-8-szor több, mint a + + +, illetve + + + + keresztes minták esetében. Az ismeretlen tejmintá *f* faktorának kiszámítása alapján meghatározható az egészséges tejhez kevert kóros összetételű tej mennyisége.

Mivel a módszer a tej ásványianyag-tartalmának meghatározásán alapszik, az alkalmazott eszközök és vegyszerek megegyeznek a korábban leírtakkal. Az ásványianyag-tartalomra kapott adatokból az *f* faktor számolása során a laktóz- és a kloridtartalmat tömeg%-ban, a képletben feltüntetett többi elemet pedig mg/kg-ban adjuk meg. Az így számolt *f* faktor a következő:

$$f = \frac{K \cdot P \cdot Zn \cdot Cu \cdot \text{laktóz}}{Na \cdot Fe \cdot Cl}$$

A számolás eredményeképp a különböző betegcsoportokra kapott faktorokat a 4.4. táblázat tartalmazza.

4.4. táblázat. A különböző betegcsoportokra kapott faktorok

Vizsgált csoportok a mastitest-próba alapján	Átlag	Szélső értékek
Negatív	190,80	132-301
+	24,90	16,7-37,0
++	4,62	2,87-7,44
++	1,00	0,66-1,51
++++	0,76	0,50-1,15

A 4.5. táblázat az egészséges tejhez különböző arányban hozzákevert kóros tejminták befolyását mutatja az *f* faktor alakulására az elegytejben.

4.5. táblázat. Az egészséges tejhez kevert masztitisztes tej hatása az *f* értékére

Az egészséges tej %-os aránya	Az 1, 2, 3 és 4 keresztes tej %-a	f +	f ++	f +++ és f ++++
95	5	168,3	146,5	128,8
90	10	148,5	116,4	89,5
85	15	131,3	92,0	62,8
80	20	117,9	73,4	44,7
75	25	104,1	59,1	33,3
70	30	93,1	59,1	33,3

A táblázat alapján a kóros összetételű tej %-os mennyisége az *f* faktor segítségével meghatározható. Még pontosabb eredményeket érhetünk el, ha az *f* faktort ábrázoljuk az egészséges tejhez hozzákevert kóros összetételű tej százalékának függvényében. Az így kapott kalibrációs egyenes segítségével a kóros összetételű tej részaránya közvetlenül leolvasható.

4.2.2.4.3. Szeléntartalom meghatározása fluorimetriás módszerrel

Mivel a szeléntartalom rendkívül érzékeny a roncsolási körülményekre, ezért a szeléntartalom meghatározásánál nedves roncsolással végezzük a feltárást. Az

így roncsolt minta savas oldatához 2,3-diamino-naftalin reagensoldatot adunk, és a kapott piazszelenol-komplexet fluorimetriásan mérjük. A fluorimetriás mérés során a gerjesztési hullámhossz 380 nm, a mérési hullámhossz 519 nm.

A meghatározás során egy 250 cm³-es csiszolatos gömblombikba a szeléntartalomtól függően 2-5 g mintát mérünk be, melyhez 20 cm³ koncentrált salétromsavat adunk és két napon át állni hagyjuk. Ezt követően 2 cm³ koncentrált perklórsavat adunk a rendszerhez, és csiszolatos spirálhűtő segítségével homokfürdőn 180 °C-on 16 órán át hevítjük, majd 1 cm³ koncentrált kénsav hozzáadása után az elegyet óvatosan melegítve bepároljuk. Az oldatot lehűtve 1 cm³ koncentrált sósavat adunk hozzá, vízfürdőn 10 percig melegítjük, majd a roncsolmányt desztillált vízzel 100 cm³-es főzőpohárba mossuk át, mintegy 50 cm³ végtérfogatra. Az elroncsolt oldathoz 5 cm³ maszkírozó oldatot (mely Na-oxalátot, Na-fluoridot, EDTA-t és hidroxil-ammónium-kloridot tartalmaz) adunk, a pH-t ammónium-hidroxid-oldattal 2,0-re állítjuk be, hozzápipettázunk 5 cm³ 0,1% 2,3-diamino-naftalin oldatot és 2 órán át sötétben állni hagyjuk. A komplex kialakulása után az oldatot desztillált vízzel rázótlcsérbe mossuk, 2 × 5 cm³ ciklohexánnal extraháljuk, majd az egyesített szerves fázisokat a vakpróbával szemben 20 percen belül fluorimetriáljuk 380 nm gerjesztési és 519 nm emissziós hullámhosszakon. A megfelelően elkészített kalibrációs görbe segítségével, amelyben 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 és 1,0 μg/cm³ szelénkoncentrációt ábrázolunk a hozzá tartozó emisszióértékekkel, az ismeretlen szeléntartalom számolható. A minta szeléntartalmát mg/kg vagy μg/g mértékegységben adjuk meg.

4.2.2.4.4. Kéntartalom-meghatározás élelmi anyagokból induktív csatolású plazmaemisszióval

A módszer alkalmas különböző szárazanyag-tartalmú élelmiszerek összes kén-tartalmának meghatározására. A különböző vizsgálandó mintákat 100-300 °C-os hőmérsékleten 100-150 bar nyomáson salétromsavval elroncsoljuk, majd a feltárt oldatból megfelelő hígítás után a kén-tartalmat ICP-módszerrel meghatározzuk. Mivel a hagyományos roncsolási módszereknél a kén-tartalom nagy része a rendszerből elszökik, ezért egy komputer által vezérelt, nagynyomású roncsolóberendezésben, hőmérsékletprogram segítségével végezzük a minta roncsolását (4.20. ábra).

Ennek során 20 perc alatt 50 °C-ról 100 °C-ra, majd újabb 20 perc alatt 100 °C-ról 160 °C-ra melegítjük a mintát, és két órán át 160 °C-on tartjuk. Ezt követően 1 órán át 160 °C-ról 40 °C-ra hűtjük, és az így kapott oldatot megfelelő módon hígítva alkalmazzuk az ICP-s kénmeghatározásra. Ennek során a 182,03 nm-en mért intenzitásértékből a különböző koncentrációjú kalibrálóoldatok segítségével meghatározható az oldat kén-tartalma. A megfelelő hígítások figyelembevételével kiszámítható a minta eredeti kén-tartalma.



4.20. ábra. Nagynyomású roncsoló hőmérséklet programozással

4.2.2.4.5. Ionszelektív elektródok alkalmazása az élelmiszer-analitikában

4.2.2.4.5.1. Az ionszelektív elektródák alkalmazása

Az elmúlt évtizedekben számos ionra fejlesztettek ki olyan szelektív membrán-elektrodokat, melyek az ionkoncentráció gyors meghatározását teszik lehetővé. Az ionszelektív elektróddal való mérés a potenciometriás módszerek közé tartozik. A méréshez az ionszelektív elektródon kívül még egy referenciaelektrodra is szükség van, és e két elektróda együttesen alkotja a mérőrendszert. A pH-mérésnél használt kombinált elektróddal ellentétben az ionszelektív mérés technikájában nem kombinált elektródokat használnak, hanem külön ionszelektív és külön referenciaelektrod alkalmazására kerül sor. **Az ionszelektív elektród potenciálja a mintában lévő mérendő ion aktivitásától függ, amely potenciál nagyságát a Nernst-féle képlettel lehet leírni:**

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \ln a,$$

ahol: E – az elektród potenciálja,
 E_o – az elektród normálpotenciálja,
 R – egyetemes gázállandó ($8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$),
 T – abszolút hőmérséklet (K),
 n – a mérendő ion töltésszáma,
 F – Faraday-féle állandó (96 496 Coulomb),
 a – a mérendő ion aktivitása (mol/dm^3).

A referenciaelektrod és az ionszelektív elektród potenciáljának különbségét egy mérőeszköz méri, amely feszültségérték arányos a mérendő ionaktivitással.

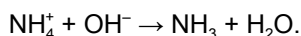
Az elektród legfontosabb része egy ionszelektív membrán, amelynek anyaga a mérendő ion rosszul oldódó vegyületéből áll, ami a szilárdtest-elektrodok esetében lehet szervesen oldódó, üvegelektrodok esetében speciális üveg, mátrixelektrodok esetében pedig szerves ioncserélő anyag. Az elektród mintába merülésekor **a membrán felületén egyensúlyi állapot áll be az oldott ionokra vonatkozóan**. Minél nagyobb a mintában lévő ionok aktivitása, annál több mérendő ion található a membrán felületén, amelyek a membránt feltöltik. Az elektrodok szelektivitása a membrán csökkenő oldhatóságával növekszik. A keresztérzékenységet és az elektrodmérgeződésekkel olyan anyagok okozzák, amelyek a membrán anyagával reagálva a mérendő ionnál kevésbé oldható anyagot tudnak képezni. Azok az ionok, amelyek a membrán anyagával jobban oldódó anyagot adnak, mint a mérendő ion, a mérést csak igen nagy feleslegben zavarják, de nem okozzák az elektród mérgeződését.

Az ammóniumionok koncentrációjának mérése esetén (és más ionok koncentrációjának mérésekor is) a referenciaelektrod potenciáljának függetlennek kell lennie a minta anyagától, hisz **az ionszelektív elektród potenciálját mindig a referenciaelektrod potenciáljához méri**. A referenciaelektrod az úgynevezett normál hidrogénelektrod, ami platinakorommal bevont fém-platina elektród, amely 1 mol/dm^3 koncentrációjú sósavoldatba merül, miközben $0,1 \text{ MPa}$ nyomású hidrogéngázt buborékolatunk keresztül rajta. A **gyakorlatban** azonban **az Ag/AgCl referenciaelektrodot használjuk**, amely egy tömény kloridoldatba merülő ezüst-klorid réteggel bevont ezüstdrótból áll, és kloridszelektív elektródként a klorid koncentrációjának megfelelő potenciált adja. A vonatkoztatási elektrolit egy diafragmán keresztül áll kapcsolatban a mérendő mintával, amely érintkezési ponton megtörténik a méréshez szükséges elektródok közötti töltésátvitel. Az ionszelektív mérésekhez csiszolatos diafragmájú referenciaelektrodokat használnak, amelyeknél ugyan a pH-méréseknél nagyobb diffúziós potenciálok alakulnak ki, de lényegesen jobb a potenciálok reprodukálhatósága.

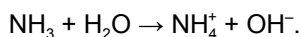
Az ionszelektív elektróddal való méréskor létrehozuk az **elektród kalibrálási görbét**, ami **az elektródpotenciált ábrázolja a koncentráció logaritmusának függvényében**. A kimutatási határ közelében lévő nagyon kis koncentrációnál az elektród potenciálja gyakorlatilag alig változik, a mérendő ion koncentrációjának növekedésével azonban a potenciált egyre inkább a mérendő ion határozza meg. **A lineáris szakaszban** a potenciál egyenletesen változik a koncentráció logaritmusának függvényében, amelynek során **a potenciált kizárólag a mérendő ion koncentrációja határozza meg**. Nagyon magas koncentrációtartományban a lineáris szakasz nem lineáris szakaszba vált át, aminek következtében e koncentrációk az ionszelektív elektróddal nem mérhetők.

A legtöbb ionszelektív elektród szilárdtest-elektrod, amelynek membránját egy nehezen oldódó szervesen oldódó alkotja. Néhány ion esetében a membrán anyagát speciális üveg vagy PVC-vel polimerizált szerves ioncserélők alkotják. Néhány esetben, pl. az ammóniumionok meghatározásánál olyan szenzorokat

alkalmaznak, amelyek a gáznemű állapotba átjutott anyagokkal reagálnak; ezek az úgynevezett gázérzékeny elektródok. A **gázérzékeny elektródok** valójában nem is ionszelektív elektródok, mert ezekkel nem az ionok koncentrációját, hanem **a gázok parciális nyomását mérik**. A gázérzékeny elektróda alkotóeleme egy speciális felépítésű pH-üvegelektrod, amely az Ag/AgCl referenciaelektroddal közösen merül egy speciális elektrolitoldatba, amelyet gázáteresztő membrán választ el a mérendő mintától. A mérés során a meghatározandó iont a pH beállításával gázállapotba vesszük; ammóniumionok esetében a következő módon:



A keletkező gáz nyomása függ a koncentrációtól és a mérés során uralkodó légnyomástól. A parciális nyomástól függően a gáz az elektród elektrolitterébe diffundál, és megváltoztatja a membrán és a pH-elektroda közötti diffúziós réteg pH-értékét, ugyanis itt a következő reakció játszódik le:



A beépített pH-elektroda megváltozott jeléből következtetnek vissza a mintában lévő ammóniumion koncentrációjára. Az ammónium gázérzékelő elektróda esetén az alapelektrod a hidrogénion-szelektív üvegelektrod. A reakcióréteg 10^{-2} mol/dm³ ammónium-klorid-oldat, a detektálás alsó határa 10^{-6} mol/dm³, az optimális pH-érték 12, és a meghatározást zavarják az illó aminok. **A gázérzékeny elektródok szelektivitása nagyobb**, mint bármely más elektródatípusé, ugyanis csak a keletkező gáz diffundál át a membránon az elektróda elektrolitterébe, amelynek koncentrációját a minta pH-értékének megváltozása révén mérik meg, aminek következtében keresztérzékenységből származó mérési hiba nem léphet fel. A gázérzékelő elektródokat is zavarhatja azonban a minta sótartalmától függő ionerősség, ugyanis az ozmózisnyomás miatt vízgőztranszport indul meg a töményebb oldatba, amely azt lassan felhígítja. Az elektrolitoldatok hígulása és töményedése főleg a membrán diffúziós rétegére van hatással. A minta túl alacsony ionerősségét kondicionálóoldat hozzáadásával lehet az elektrolitok ionerősségére emelni, a nagyobb ionerősségű mintákat pedig megfelelő mértékben hígítani kell. Óvatosnak kell lenni a 13-nál nagyobb pH-tartományban végzett mérésnél az ammóniaszelektív elektróddal, mert a membrán egy idő múlva megdagad, és ekkor a pórusméretek csökkennek. Az ammónia mérésekor további **problémát okoznak a nehézfémek**, amelyek egyrészt **aminokomplexekben megkötik az ammóniát**, másrészt pedig a membránon kicsapódva nehézfém-hidroxid lepedéket alkotnak. E jelenség meggátolható, ha a mintához 1,5%-os EDTA-oldatot adagolnak.

A hőmérséklet is jelentős mértékben befolyásolja az elektródpotenciált, ezért nagyon lényeges, hogy a minta és a kalibrálóoldatok hőmérsékletének különbsége ne haladja meg a ± 2 °C-ot. Ebben a hőmérséklet-tartományban a hőmérséklet

okozta hiba kisebb, mint 1,5%. A minta előkészítése során ügyelni kell arra, hogy némely elektróda esetén bizonyos feltételek szükségesek ahhoz, hogy a mérés végbemehessen. Az ammóniumionok méréséhez elengedhetetlen a megfelelő pH-beállítás, és az adott ionerősség beállításával megteremtődik a stabil vonatkoztatási potenciál előfeltétele. A minta-előkészítés célja az is, hogy a mintát a befolyásoló tényezőkre úgy kondicionálják, hogy a mérés ideális körülmények között mehessen végre. Célszerű, ha mind a standardoldatot, mind a minta ionerősségét desztillált vízzel való hígítással vagy ionerősség-beállító oldatok segítségével azonos koncentrációra hozzuk. A pH-értéket tekintve úgy tűnik, hogy minden meghatározáshoz tartozik egy különösen előnyös pH-tartomány, amelynek beállítása pH-pufferek hozzáadásával lehetséges. Az erősen savas vagy lúgos oldatokat a pH-beállítás előtt hígítani kell, nehogy a pufferek hatására keletkező sók miatt túlságosan megemelkedjen az ionerősség. Zavaró ionok az elektróda megmérgeződését vagy keresztérzékenységet okozva zavarják a mérést. A minta megfelelő előkészítése után következhet a mérés, amely háromfajta módszerrel valósítható meg.

4.2.2.4.5.2. A roncsolásban képződött ammónia meghatározása ionszelektív elektróddal

Az ammóniát (ammóniumion) direkt módszerrel, közvetlenül mérjük, vannak azonban indirekt módszerek is, amelyeknél indikátorionra van szükség, mivel az elektród nem reagál a mérendő ionra. Az ammónia meghatározása során felvett **kalibrációs görbe lineáris szakaszán célszerű a mérést elvégezni**. A kalibrációs görbéhez a lineáris szakaszban elegendő kevesebb (kettő-három), a nem lineáris tartományban pedig öt standardoldat használata. A standardoldatok mérését követően **az elektródfeszültséget a koncentráció logaritmusának függvényében ábrázolva kapjuk meg a kalibrációs egyenest**. A kalibrációra használt standardoldatok ionerősségének, hőmérsékletének és pH-jának meg kell felelniük a mérendő minta hasonló paramétereinek. A mintába helyezett elektródák közti feszültséget mérve, majd azt a kalibrálóegyeneshöz hasonlítva, a koncentráció közvetlenül számolható.

A Kjeldahl-roncsolás során keletkezett ammóniumionok meghatározására jól használható például az OP-NH₄-0711P típusú ammóniumion-szelektív elektród, mely 10⁰-10⁻⁶ mol/dm³ tartományban használható, és amelynek reprodukálóképessége a nagyobb koncentrációtól a kisebb felé haladva ±0,02-0,05 pNH₄. Az elektróda szelektivitása a szelektivitási állandóval jellemezhető, ami azt a mérendő ion/zavaró ion koncentrációarányt fejezi ki, amelynél nagyobb koncentrációhányados esetén az elektród szelektív a mérendő, jelen esetben az ammóniumionra nézve. A szelektivitási állandó káliumionok jelenlétében 1,5·10⁻¹, ami azt jelenti, hogy a mérés káliumionok jelenlétében akkor hajtható végre, ha az ammóniumionok koncentrációja eléri vagy meghaladja a káliumion-koncentráció 0,15-szörösét. A szelektivitási állandó nátriumionra 5,5·10⁻³. E két ionon kívül

más ionokkal nem nagyon kell számolni, hisz e két ion forráspontemelőként kerülhet a Kjeldahl-roncsolás során az oldatba.

Az elektród előkészítése során az elektródtestet összekötjük az elektródkábelrel, majd a tömítőgyűrűk segítségével a membránt az elektród alsó részénél rögzítjük. Ezt követően egy 2 cm³-es fecskendő segítségével a membrán feletti részt FIL-NH₄-1 töltőoldattal megtöltjük, majd a kupakot buborékmentesen visszacsavarjuk. Az összeszerelt, buborékmentes elektródot néhány órán át 0,01 mol/dm³ koncentrációjú ammónium-klorid-oldatban áztatjuk, ezután az elektród négy-öt hétig működőképes, majd elveszíti mérőképességét, amit a mérések reprodukálhatatlansága jelez.

A mérések során kialakított mérőcella az előzőek szerint összeszerelt ammónium-ionszelektív elektródból és a vonatkoztatási elektródból áll, amelyek egy pohárban lévő mérőoldatba merülnek. Az ismeretlen minta mérése előtt kalibrációs egyenest kell felvenni, amelynek során ismert ammóniumion-koncentrációjú standardoldatokat használunk. Az azonos típusú elektródok kalibrációs adatai nem azonosak, ezért **minden elektróda esetében egyedi kalibrációs görbét kell felvenni**. Amennyiben a minta várható pNH₄-értékeit ismerjük, elegendő a kalibrációs görbének csak a várt tartományba eső részletét felvenni. A kalibrációs görbét célszerű a mérés során többször ellenőrizni 0,1 mol/dm³-nél hígabb ammónium-klorid-oldat mérésével. Amennyiben a mérendő oldat az ammóniumionokon kívül más ionokat is tartalmaz, akkor a standardoldatok ionerősségét célszerű a mérendő oldat ionerősségéhez közelíteni.

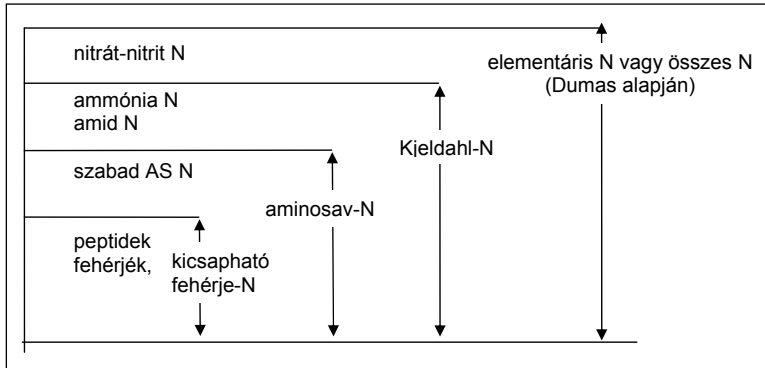
4.3. Szerves alkotórészek meghatározása

Az élelmiszerek az ásványi anyagokon túl főként nyersfehérjéből, nyerszsírból, nyersrostból és nitrogénmentes kivonható anyagokból állnak. Tartalmaznak ezen túl kis koncentrációban olyan vegyületeket is, mint pl. a vitaminok, antioxidánsok, enzimek stb., amelyek ismerete ugyancsak fontos az élelmiszermérnökök számára. E fejezetben a fontosabb szerves komponensek meghatározását tárgyaljuk.

4.3.1. A nitrogén és különféle nitrogéntartalmú anyagok meghatározása

Az élelmiszerek nitrogéntartalmú anyagait kémiai szerkezetük, illetve a meghatározás módja alapján a 4.21. ábra szerint osztályozhatjuk.

Az összeállításból látszik, hogy a fehérjéket és peptideket fehérjekicsapó szerekkel el lehet távolítani, ezek a komponensek alkotják a nitrogéntartalmú anyagok valódifehérje-frakcióját. Az aminosav-analízissel e frakción túl még szabad aminosavakat is meg lehet határozni, míg a Kjeldahl-féle eljárással az amid- és az ammónia-nitrogént az aminosav-analízátorral meghatározható frakción túl



4.21. ábra. Élelmiszerek nitrogéntartalmú anyagainak osztályozása a kémiai szerkezet, valamint a meghatározás módszere alapján

is lehet mérni. A Dumas-féle eljárás minden nitrogéntartalmú vegyületet mér. A nitrogéntartalmú anyagok kémiai szerkezet alapján való elkülönítése nemcsak az alkalmazott analitikai módszer miatt fontos, hanem azért is, mert az ember és a különböző állatfajok eltérő emésztési sajátosságai miatt a különböző frakciókat nem egyformán hasznosítják. A valódi fehérjéket, a peptideket és az aminosavakat az egygyomrúak és a kérődzők is egyaránt hasznosítják, az amidok és az ammónia csak a kérődzők számára hasznosíthatók, a nitrátok és a nitritek pedig sem az emberben, sem az állatban nem értékesülnek, sőt nagyobb mennyiségben károsak is lehetnek.

4.3.1.1. A fehérjék kivonása, kicsapása

A fehérjék állati vagy növényi anyagokból való kinyerése során a hatékonyság döntő tényezője a vizsgált minta maximális mértékű dezintegrálása. A sejtszerkezet megbontására a mechanikai aprításon kívül a szétfagyasztást vagy hipertóniás oldatokkal való kezelést is alkalmazzák. A fehérjék oldhatósága igen különböző, így például a vázfehérjék nem oldódnak vízben és más egyéb oldószerekben sem. A növényi fehérjék egy csoportja például 60-80%-os alkoholban oldódik, a többi fehérje pedig többé-kevésbé oldható vízben, illetve híg vizes oldatokban. Az oldódás függ a vizes oldat ionerősségétől, az ionok minőségétől és koncentrációjától, a pH-tól és a hőmérséklettől.

Magas hőmérsékleten és extrém alacsony vagy magas pH-n az oldódás általában végbemegy, **az izoelektromos pontnak megfelelő pH-n a fehérjék viszont kicsapódnak.** Az egyes oldószerek a különböző fehérjéket eltérő arányban oldják, mert az oldás mértéke az oldószereken kívül függ a fehérje minőségétől, a poláros hidrophil és az apoláros hidrophób csoportok arányától, ezek elrendezésétől és

az így létrejövő dipólusmomentum nagyságától. Az ionok minőségétől függően ugyanabból az anyagból különböző mennyiségű és minőségű fehérje oldható ki. **A neutrális só- és pufferoldatok peptizáló hatása növelhető anionos detergensok adagolásával**, és a peptidlánc összezsavarodottságát okozó diszulfidhidak redukciója vagy oxidációja szintén növeli az oldhatóságot. Nyolcnál nagyobb pH-n a rézionokkal való komplexképzés ugyancsak a fehérje oldhatóságának növelése irányába hat, azonban itt már a fehérje szerkezete is mélyrehatóan átalakul.

A gyakorlatban a fehérjék analízise során az alábbi fehérjekieloldási technológiákat alkalmazzák. Albuminok és globulinok kinyerése állati szövetekből a következő módszerek szerint lehetséges. **Az albuminok, a különféle pszeudoglobulinok és a globulinok csak együtt vonhatók ki**; az egyes frakciók elkülönítését különféle egyéb eljárásokkal lehet elvégezni. Az albuminok például tiszta vízben jól oldhatók, és csak ammónium-szulfáttal telített oldatból csapódnak ki. Gabonafehérje extrakciójára a híg lúgokat, a pH 9-12 közötti puffereket vagy a lúgosan hidrolizáló sók oldatát használják, amelynek során a kísérleti körülményektől függően az összes fehérje 60-95%-a vonható ki. **A kukoricafehérje kivonására** Mertz és Bressan az alábbi eljárást dolgozták ki, ami alkalmazható más növények fehérjéinek extrakciójára is:

10 g zsírtalanított őrleményhez 20 cm³ desztillált vizet, majd annyi 0,2%-os NaOH-oldatot adunk, hogy a szuszpenzió pH-ja 9 legyen. Ezt követően lefagyasztjuk, majd a fagyasztás után felolvasztjuk a szuszpenziót. Ezt a műveletet még kétszer megismételjük. A felolvasztott anyaghoz 250 cm³ desztillált vizet, 150 g CuSO₄ · 5 H₂O-t és 20 g Na₂SO₃-at adunk. A sók feloldódása után az oldat pH-ját 40%-os NaOH-dal pH=10-re állítjuk be, majd 0,5 M NaOH-dal folytatva a lúgosítást, a pH-t állandó keverés közben 12-re növeljük. A szuszpenziót ezt követően 25 °C-on három órán át intenzíven kevertetjük, majd 20 percig 2000 g-n centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük és megőrizzük, az üledéket pedig 100 cm³ 0,01 M NaOH-dal szuszpendáljuk, egy órán át 25 °C-on ismét kevertetjük, majd centrifugáljuk. A mosó felülúszót is az eredeti kivonathoz adjuk, majd az egyesített kivonatot lefagyasztjuk és felolvasztjuk. A kicsapódott keményítőt centrifugálással eltávolítjuk. A tiszta oldatot 0,02 M sósavval szemben három napig 0 °C-on dializáljuk, majd a dialízist három napon keresztül desztillált vízzel szemben folytatjuk. A sómentes fehérjeoldatot rotációs gyorsbepárlón bepároljuk, majd a negyedére csökkent oldatot liofilezzük. A kapott száraz fehérjepor 68-75% nyersfehérjét tartalmaz, 11-es pH-jú karbonát- vagy hidrogén-karbonát-pufferben, valamint 0,01 M NaOH-oldatban jól oldódik. A fehérje 26%-a oldódik vízben, 44%-a 70%-os etanolban, 10%-a pedig nem-fehérje nitrogénként dializálódik.

Az albuminok és a globulinok együttes meghatározása esetén 6 g lisztet 100 cm³ 5%-os K₂SO₄-oldattal 20 °C-on egy órán át rázatjuk, majd centrifugáljuk, és az oldatot finom pórusú analitikai szűrőpapíron szűrjük. Az oldat 50 cm³-ét használjuk fel az albumin- és a globulinfrakció meghatározására. A meghatározást Kjeldahl-módszerrel végezzük. A glutenin meghatározása során 8 g lisztet

50 cm³ vízzel és 5 cm³ 1 M NaOH-dal egy óráig intenzíven kevertetünk, 96-99%-os metanollal 200 cm³-re töltjük fel, majd további 5 cm³ metanollal kompenzáljuk a 8 g liszt térfogatát. A keményítő a metanol hatására kicsapódik, a vattaszűrőn átszűrt szuszpenzióból 50 cm³ 2 g lisztnek felel meg. Brómtimolkék-indikátor jelenlétében az 50 cm³ oldat pH-ját 0,2 M sósavval 6,4-re állítjuk be. A pH-beállítást követően a glutenin kicsapódik, a gliadin pedig oldatban marad. Egy óra állás után a csapadékot lecentrifugáljuk, ezt követően a gliadint tartalmazó felülúszó alkoholos oldat leönthető, a glutenincsapadékot pedig kevés vízzel Kjeldahl-lombikba mossuk át. A gliadint a sósavban oldható fehérje és a glutenin összegéből, valamint az összes fehérje különbségéből számoljuk.

Növényi vagy állati szövetek fehérjetartalmát sajtolással is kinyerhetjük. A laboratóriumi méretű hidraulikus sajtolókkal létrehozott nyomás hatására a nedves minták folyadéktartalma eltávolítható. Az így nyert minta azonban nem képviseli a vizsgálati anyag teljes fehérjetartalmát, hanem csak a strukturális elemekhez nem kötött, vízben oldott fehérjéknek azt a részét, amely az adott nyomáson sajtolással kinyerhető.

A fehérjeoldatokból a fehérjéket esetenként analitikai célra kicsapatjuk. **A fehérjék oldataiból kicsaphatók szerves oldószerekkel**, amelyek közül az acetone, a dioxán és az etil-alkohol használatos leginkább erre a célra, **nehézfém sókkal**, amelyek közül leginkább az ólom-, a réz-, a higany-, az urán-, a vas- és a cinksók jöhetnek számításba. Az ásványi savak közül a fehérjék leválasztására leggyakrabban a sósavat, a salétromsavat és a foszforsavat használjuk, **a szerves savak** közül pedig kiváló fehérjekicsapó hatása van a triklór-ecetsavnak, a szulfo-szalicilsavnak és a pikrinsavnak. Esetenként alkalmazhatjuk a különböző savak keverékét (1 g pikrinsav + 2 g citromsav 100 cm³ vízben), és a savak mellett adhatunk kemikáliát is (10 rész 20%-os ecetsav és 1 rész 10%-os kálium-hexaciano-ferrit elegye). A fehérjék kivonása és kicsapása akár gravimetriás meghatározásra is alkalmas lehet, amennyiben az a mintából kvantitatíve kivonható és vizes oldatba vihető. Az eljárás alkalmas lehet néhány fehérje esetében, a gyakorlatban azonban ez a módszer nem terjedt el, mert az őrlés és a kivonás körülményei nehezen standardizálhatók.

4.3.1.2. A fehérjetartalom mérése a nitrogéntartalom alapján

Az indirekt fehérjemeghatározási módszerek többsége a nitrogéntartalom meghatározásán alapszik, amit az tesz lehetővé, hogy a fehérjék elemi összetétele a fehérje minőségétől és eredetétől függetlenül megközelítőleg azonos. A nitrogéntartalom alapuló meghatározás alapja, hogy **a legtöbb fehérje nitrogéntartalma 16% körül alakul**, ezért ha a nitrogéntartalmat megszorozzuk a $100/16=6,25$ **konverziós faktoral**, akkor megkapjuk a fehérjetartalmat. A nitrogéntartalom alapján csak a tiszta, tisztított fehérjék vagy olyan anyagok fehérjetartalmát lehet meghatározni, amelyek a fehérjén kívül más nitrogéntartalmú anyagot nem tar-

talmaznak. Az élelmiszerek a fehérjén kívül más nitrogéntartalmú anyagot is tartalmazhatnak, ezért az élelmiszer-analitikában a nitrogéntartalom alapján nem a fehérjetartalmat, hanem az úgynevezett **nyersfehérje-tartalmat határozzuk meg**, melynek során az élelmiszer nitrogén%-át 6,25 konverziós faktorial szorozzuk. Ennek megfelelően fehérjeként mérjük az összes nitrogéntartalmú vegyületet, amit az adott módszerrel meg tudunk határozni. A gyakorlatban kielégítő pontosságú az eredmény a 6,25 szorzófaktor számításával. Amennyiben ennél pontosabb eredményt kívánunk elérni, célszerű a vizsgálati anyag fehérjéi tényleges nitrogéntartalmának megfelelő szorzószámával szorozni. Szélsőséges esetként említhető a lazacikrában lévő protamin, amelynek nitrogéntartalma 30,7%, ezért a 6,25-ös konverziós faktor alkalmazásával majdnem kétszer annyi fehérjetartalmat kapnánk, mint a tényleges érték. A protamin tényleges konverziós faktora 3,25. Ellenpéldaként említhető a toll keratintartalma, amely összesen csak 15% nitrogént tartalmaz, ennek megfelelően a konverziós faktor 6,66. A 4.6. táblázat a különféle fehérjék nitrogéntartalmát és a nitrogéntartalomból számított konverziós faktorokat tartalmazza.

4.6. táblázat. Néhány alapanyag fehérjenitrogén-tartalma és a szorzófaktorok

Fehérje	A fehérje nitrogéntartalma (%)	Faktor
Árpa	17,15	5,83
Bab, borsó, lencse	16,00	6,25
Búza	17,15	5,83
Búzacsíra	17,23	5,80
Búza-endospermium	17,54	5,70
Búzakorpa	15,84	6,31
Edesztin (kendermag)	18,55	5,39
Fibrin (humánplazma)	16,90	5,91
Fibroin (hernyóselyem)	18,70	5,35
Földidió dara	18,31	5,46
Gliadin (prolamin búzából)	17,66	5,66
Glicinin (szójabab)	17,30	5,78
Globulin (humánplazma)	15,24	6,56
Globulin	16,03	6,24
Gyapotmag	18,86	5,30
Hemoglobin (lóvér)	16,80	5,95
Hisztin (borjúmáj)	18,00	5,55
Hisztin (borjútimusz)	18,20	5,49
Hordein (prolamin árpából)	17,21	5,81

210 ■ 4. Élelmiszerek összetételének meghatározása

Fehérje	A fehérje nitrogéntartalma (%)	Faktor
Hús	16,00	6,25
Kazein (tehéntej)	15,63	6,39
Keratin (gyapjú)	16,30	6,13
Keratin (sertéssörte)	16,60	6,02
Keratin (toll)	15,00	6,66
Kókuszdió	18,86	5,30
Kollagén (marhabőr)	18,60	5,37
Kukorica	16,00	6,25
Laktoglobulin (tehéntej)	15,60	6,41
Legumin (borsó)	16,04	5,54
Napraforgó és lendara	18,87	5,30
Ovalbumin (tyúktojás)	15,76	6,34
Plazmaalbumin (humán)	15,95	6,27
Plazmaalbumin (marha)	16,07	6,22
Protamin (lazacikra)	30,70	3,25
Protamin (madársperma)	24,40	4,10
Rizs	16,80	5,95
Rozs	17,15	5,83
Szójabab	17,51	5,71
Tej	15,67	6,38
Tojás	16,00	6,25
Zab	17,15	5,83
Zein (prolamin kukoricából)	16,20	6,17
Zselatin (kollagén)	18,00	5,55

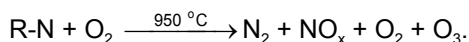
4.3.1.3. A nitrogéntartalom mérése Dumas módszerével

A különböző szervetlen és szerves nitrogéntartalmú anyagok jelentős részének nitrogéntartalmát meg lehet határozni a Dumas által 1826-ban közölt eljárással. Az elmúlt közel két évszázad alatt a módszert folyamatosan fejlesztették, s ma a módosított **Dumas-féle égetéses módszerként** ismerik a világban. Az alapelv **a minta 900-1000 °C-os hőmérsékleten, ellenőrzött oxigénellátás melletti elégetése inert gázáramban**. A Dumas-módszerrel való összesnitrogéntartalom-meghatározás négy fő szakaszból áll:

- égetés,
- redukció,
- gáztisztítás,
- detektálás.

A Dumas-féle égetés mechanizmusa

A nitrogéntartalmú szerves és szervetlen vegyületek 950 °C-on katalizátor (réz-oxid vagy réz-oxid/platina) jelenlétében részben nitrogén-oxidokká, részben pedig molekuláris nitrogénné alakulnak a következők szerint:



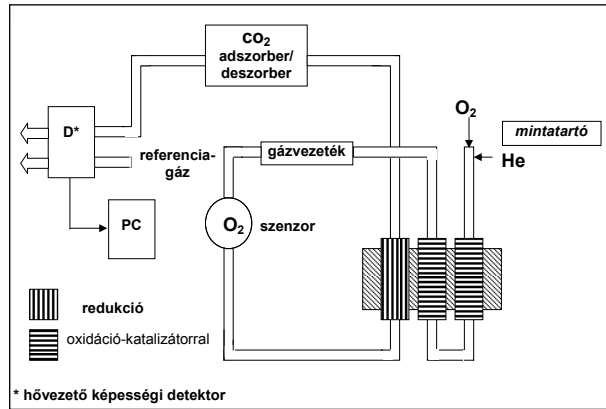
A technikai megvalósítás során mind az oxigén, mind az ún. inert gáz (He, Ar, CO₂) áramlik. Az eljáráshoz nagy tisztaságú (99,99%, ún. négykilences) gázok szükségesek. Az égetés réz-oxid töltetű kvarccsőben történik, majd a gázkeverék az utóégetőbe kerül, amelynek töltete réz-oxid/platina katalizátor keveréke. Ekkor a nehezen oxidálható vegyületek mennyiségi átalakítása is megtörténik. Tekintettel arra, hogy az égetésnél nitrogén-oxidok is képződnek, ezeket a vegyületeket – mivel a detektálás gázfázisban N₂-ként történik – molekuláris nitrogénné kell redukálni. Erre szolgál a wolframkatalizátor, amely egyidejűleg a felesleges oxigént is megköti.

A nitrogéntartalom mérése

Az így kapott áramló gázkeverék több olyan komponenst is tartalmaz, amelyek a mérést többé-kevésbé zavarják (SO₂, H₂O, hidrogén-halogenidok), s így torzítják az eredményt. Ezért adszorbenseket kell ezen összetevők eltávolítására, a gáz szárítására alkalmazni. Ha a hordozógáz CO₂, akkor az elégetéskor keletkező CO₂ elnyeletéséről le lehet mondani. A kapott „tisztá” hordozógázban a nitrogén azon az elven mérhető, hogy a gázok hővezető képessége eltérő. **Hővezetőképesség-mérő cella** (egyenletes hőfokon tartott cella hőmérséklet-változása) **alkalmazásával elérhető, hogy a N₂ mennyiségével arányos jelet kapjunk.** Ennek nagyságát ismert minták nitrogéntartalmának ugyanilyen körülmények közötti meghatározása során kapott eredményekkel hasonlítjuk össze. **Korábban** a detektálás során **térfogatméréssel állapították meg a képződött N₂ gáz mennyiségét,** miután a CO₂ gázt KOH-ban elnyelették. Ebben az esetben figyelembe kell venni a hőmérsékletet és a változó légnomás értékét is.

A fehérjetartalom számítása

A nitrogéntartalomból a nyersfehérje-tartalmat a 4.6. táblázatban bemutatott fehérjekonverziós faktorok segítségével számíthatjuk ki. Összehasonlító kalibrálómintaként leggyakrabban nikotinsavat, lizin-hidrokloridot, EDTA-t és triptofánt használunk. Mivel ezzel **a módszerrel a nitrát-nitrit-tartalmat is** – a Kjeldhal-módszerrel ellentétben – redukció után **a nitrogéntartalomban mérjük,** számos mintatípusnál a ténylegesnél magasabb nyersfehérje-tartalmat kapunk az átszámítás során. Ez különösen a leveles zöldségeknél (spenót, sóska), a zöldliszteknel (lucerna-, fűszénák) fordulhat elő.



4.22. ábra. A Dumas-féle módszerrel működő nitrogénmeghatározó készülék sematikus rajza

Az ismertetett módszer nagy sorozatú mérésekre alkalmas változatainak számos fontos követelményt kell teljesíteniük. Ilyenek többek között:

- egyszerű mintabevitel szilárd és/vagy folyadék mintákból,
- olcsó vagy többször felhasználható mintatartók,
- kis gázfogyasztás,
- könnyű adszorbercsere lehetősége,
- nagyfokú, gázszivárgás elleni tömítettség,
- a gázáram és pontos szabályozhatósága.

Egy Dumas-féle módszerrel működő nitrogénmeghatározó készülék sematikus rajzát a 4.22. ábra mutatja.

A Dumas-módszer előnyei

A ma elterjedőben lévő készülékek a mintatartóba behelyezett mintát (szilárd minta esetén ön- vagy alumíniumkapszulában, illetve porcelántégelyben) adott számítógépes program szerint elemzik, s így adják meg a nitrogéntartalmat. A módszer elterjedését az teszi indokolttá, hogy a gyártók egyre jobban tudják oldani a számítógép vezérelte gépüzemeltetést (a műszakszám növelése), továbbá ezen módszer **kevesebb környezetszennyező terméket bocsát ki**. A mezőgazdasági és élelmiszeripari alkalmazás terjedését elősegítheti, hogy ma már olyan készülékek is kereskedelmi forgalomban vannak, amelyekkel maximum 1 g szerves minta vagy 1 cm³ mintatérfogat is mérhető. Természetesen ekkor figyelembe kell venni a végeredményként várható ún. abszolút nitrogén mennyiségét (maximum 200-300 mg), amit a gépkönyvek tartalmaznak. Ugyanakkor hátrány, hogy **csak jelentős napi mintaszám esetén érdemes a készüléket működtetni**,

a beruházási költségek magasak, és nem elhanyagolható az égető- (kvarc) és adszorpciós csövek, továbbá a katalizátorok költsége sem.

E készülékek további előnye lehet, hogy ezen elv alapján lehetőség van a nitrogén mellett más elemek (kén, szén) mennyiségének meghatározására is. A fehérjék kéntartalmának ismerete számos növénynél (pl. az őszi búza sikérfehérjéinél) nagyon fontos lehet, ezért bizonyos esetekben indokolt a korábbinál jóval bonyolultabb (más égetési hőmérséklet, több adszorpciós cső) és így drágább készülék üzemeltetése is. Ma már az ún. égetéses módszer is bevonult a nagy világszervezetek által elfogadott standard módszerek közé.

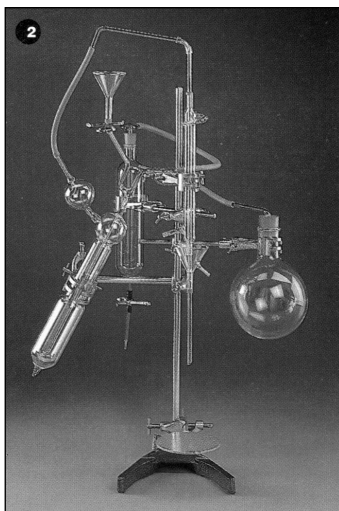
4.3.1.4. A Kjeldahl-féle módszer

Az élelmiszerek nyersfehérje-tartalma Kjeldahl-módszerrel történő meghatározásának lényege, hogy **többórás tömény kénsavval történő forralás során elroncsoljuk az élelmiszerben lévő fehérjéket, melynek során az aminosavak aminocsoportjaiból, valamint az egyéb nitrogéntartalmú anyagok (nitrit és nitrát kivételével) nitrogénjéből ammónia keletkezik, ami a kénsavban NH_4HSO_4 (ammónium-hidrogén-szulfát) formában oldódik.** Kihűlés után **az ammóniát fölös mennyiségben adott 33%-os NaOH-oldattal felszabadítjuk,** majd hígítás után átdesztilláljuk, és kénsav- vagy bórsavoldatban felfogjuk (4.23. ábra). A kénsavoldatban való felfogás esetén a titrálást nátrium-hidroxiddal, bórsavas elnyeletés esetén kénsavval végezzük. A Kjeldahl-féle roncsolás leírását az általános részben már ismertettük, ezért itt csak az idézett fejezetben röviden említett desztillálást, a ledesztillált ammónia meghatározását, valamint a mindennapi gyakorlatban használt Kjel-Foss és Kjeltec automaták működtetését mutatjuk be, felhíva mindenkor a figyelmet a klasszikus módszer és az automatizált műszeres módszer közti különbségekre.

A két, előzőekben ismertetett módszer elvéből következik, hogy a Kjeldahl-féle roncsolást követő nitrogénmeghatározásnál a minta nitrát- és nitrittartalmát nem lehet meghatározni, tehát a Kjeldahl-nitrogén nem az összes nitrogéntartalmat jelenti. A Dumas-féle égetéses módszerrel viszont mind a nitritet, mind a nitrátot meg lehet határozni az összes többi komponenssel együtt, tehát a Dumas-módszerrel az összes nitrogéntartalmat határozzuk meg. A két módszer közti elvi különbség tehát a nitritben és a nitrátban keresendő. Akár Kjeldahl-, akár Dumas-féle módszerrel történik a meghatározás, a nyersfehérje-tartalmat a nitrogéntartalomból általában 6,25-ös konverziós faktorial történő szorzással számítjuk.

A roncsolásban képződött ammónia meghatározása és a fehérjetartalom számolása

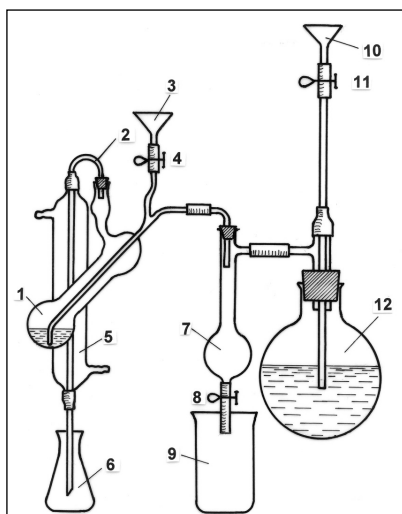
A roncsolásban képződött ammóniát a gyakorlatban az alábbiak szerint desztilláljuk. A kb. 1 g légszáraz anyagból 25 cm³ kénsavval, oxidálószerrel, forráspontemelővel és katalizátorral kapott enyhén opálos, sárgásfehér színű anyagot lehűtjük, 300 cm³ csapvizet adunk hozzá, valamint néhány szem üvegyöngyöt



4.23. ábra. Mikro-Kjeldahl-desztilláló

vagy horzsakövet helyezünk a Kjeldahl-lombikba. A lombikot egy hűtővel és feltéttel ellátott desztillálóállványra helyezzük, a feltét végén eltávozó desztillátumot pedig egy titrálólombikba vezetjük úgy, hogy a hűtőcső vége beleérjen az ammónia megkötésére szolgáló folyadékba. A titrálólombikba helyezhetünk néhány csepp kongóvörös indikátort vagy metilvörös-metilénkék keverékindikátort, 30-40 cm³ desztillált vizet, valamint a várható nitrogéntartalomtól függően 20-100 cm³ 0,1 M-os kénsavat. Egy másik módszer szerint az ammónia megkötésére a kénsav helyett használhatunk 150-250 cm³ 4%-os bórsavat is. A bórsav az ammóniát megköti, de az ammóniatartalom meghatározását 0,1 M-os kénsavval történő titrálás során nem zavarja. A titrálólombik felhelyezése után a roncsolmányt tartalmazó Kjeldahl-lombikba kb. 100 cm³ 33%-os NaOH-ot, vagy ha higany volt a katalizátor (ma már nem használjuk katalizátorként), nátrium-tioszulfátos NaOH-oldatot öntünk, és azonnal összekapcsoljuk a desztillálófeltéttel. A vízgőzzel történő desztillálást addig folytatjuk, amíg a szedőlombikban a desztillátum térfogata annak 75%-át el nem éri.

Ha 1 M-os kénsavat használtunk az ammónia megkötésére, akkor a kénsav feleslegét 0,2 M NaOH-oldattal titráljuk kongóvörös indikátor mellett a vörös színig, keverékindikátor esetében pedig addig, amíg annak vörös színe zöldesszürkére nem változik. Ha a szedőfolyadék bórsav volt, a titrálást 0,1 M kénsavval végezzük metilvörös-metilénkék keverékindikátor jelenlétében, míg annak zöld színe pirosszürkére nem csap át. A Parnas-féle desztillálókészülék összeállítását a 4.24. ábra mutatja.



4.24. ábra. A Parnas-féle ammóniadesztilláló készülék

(1. desztillálólombik, 2. kvarccső csatlakozás, 3. tölcser, 4. szorítócsap, 5. vízhűtő köpeny, 6. gyűjtőpohár, 7. kondenzvízgyűjtő, 8. szorítócsap, 9. gyűjtőpohár, 10. tölcser, 11. csap, 12. gőzfejlesztő lombik)

A vegyszerek tisztaságának, a mérőoldat pontosságának, illetve a roncsolás teljességének ellenőrzését minden esetben elvégezzük. A vegyszerek nitrogéntartalmát 2 g szacharóz szokásos módon történő elroncsolása utáni nitrogéntartalom meghatározásával ellenőrizzük. A vakpróba eredményével a minták tényleges nitrogéntartalmát korrigáljuk. A mérőoldat pontosságát könnyen roncsolódó, analitikai tisztaságú anyagok (acetanilid, karbamid) nitrogéntartalmának meghatározásával végezzük. A Kjeldahl-roncsolás teljességét rendkívül nehezen roncsolható analitikai tisztaságú anyagok (triptofán, nikotinsav) nitrogéntartalmának meghatározásával vizsgáljuk.

Az eredmények kiszámítása és kifejezése

Az ammónia által megkötött 0,1 M kénsav cm^3 -eit megkapjuk, ha a szedőbe helyezett 0,1 M kénsav cm^3 -eiből levonjuk a kénsav visszatitrálására fogyott 0,2 M NaOH cm^3 -eit. A nitrogéntartalmat a következő képlettel számoljuk és tömeg %-ban fejezzük ki:

$$\text{nitrogén \%} = \frac{(S - L) \cdot 0,0028016 \cdot 100}{b},$$

ahol: S – a szedőlombikba tett 0,1 M H_2SO_4 (cm^3),

L – a kénsav visszatitrálására fogyott 0,2 M NaOH (cm^3),

b – a bemért anyag tömege (g),
 0,0028016 – az 1 cm³ 0,1 M-os kénsavnak megfelelő nitrogéntartalom
 mennyisége (g).

Ha bórsav volt a szedőfolyadék, akkor a nitrogéntartalmat a következő képlettel számolhatjuk:

$$\text{nitrogén \%} = \frac{S \cdot 0,0028016 \cdot 100}{b},$$

ahol: S – a titrálásra fogyott 0,1 M-os kénsav (cm³),
 b – a bemért anyag tömege (g).

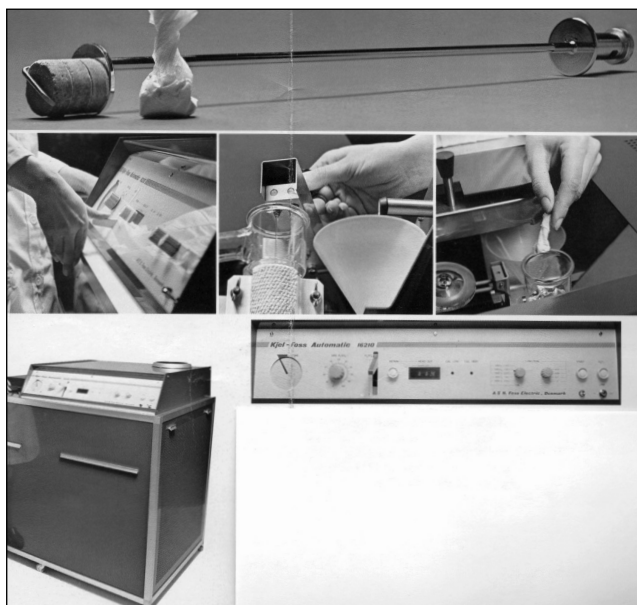
A nyersfehérje-tartalmat a nitrogén% 6,25 konverziós faktoriala történő megszorítása után kapjuk meg.

4.3.1.5. Kjeldahl-automata a nitrogéntartalom meghatározására

A Kjeldahl gyors nitrogénelemző élelmiszerek nyersfehérje-tartalmának gyors meghatározására szolgál a Kjeldahl-módszer alapján. A munkamenet egyezik a hagyományos Kjeldahl-módszerével. A munkafolyamat gyors végrehajtását speciális technikák segítik úgy, hogy az első minta bevitelétől az eredmény kijelzéséig mindösszesen csak 15 perc szükséges, ezt követően pedig minden három percben a készülék újabb és újabb analízis elvégzésére képes. A Kjeldahl-automatának (4.25. ábra) a standard módszerhez hasonlóan a következő munkafolyamatai vannak:

- savas roncsolás,
- hűtés,
- hígítás vízzel,
- vízgőz-desztilláció és ammónia titrálása,
- nyersfehérje-tartalom számítása.

A készülék hat speciális Kjeldahl-lombikkal dolgozik, amelyek hárompercenként az óramutató irányába 60°-kal elfordulnak. Az 1-es helyzetben lévő lombikba helyezük be a kálium-szulfát forráspontemelőt, a higany-oxid katalizátort, a roncsolást végző kénsavat, az oxidációt elősegítő hidrogén-peroxidot, és végül a lombikba helyezük a nitrogénmentes selyempapírba (bemérőpapír) csomagolt 0,5-1 g tömegű mérendő anyagot. A 2-es helyzetben a lombik alatt meggyullad a roncsoló lángja, és a minta három percen keresztül forr. A roncsolás során keletkező gőzök és gázok egy szívócsövön keresztül elnyelődnek és vízszugárvákuum segítségével távoznak. Három perc elteltével a rendszer újabb 60°-os fordulatot tesz meg. A 3-as helyzetben a roncsolás újabb három percen keresztül folytatódik. A rendszer következő fordulatával a 4-es helyzetű hűtőhelyre kerül, ahol egy nagy teljesítményű ventilátor szobalevegővel hűti a lombikot. E pozíció végén a mintát a készülék mintegy 140-150 cm³ vízzel meghígítja, majd az 5-ös helyzetbe kerül a minta, ahol a kénsav közömbösítésére és a higanykatalizátor megkötésére nat-



4.25. ábra. Kjeldahl-Foss gyors nitrogénelemző (a katalizátor behelyezése és a minta nitrogénmentes papírban, a hidrogén-peroxid és a tömény kénsav adagolása, a minta behelyezése a Kjeldahl-lombikba, a készülék és a vezérlőpult)

rium-tioszulfátot tartalmazó NaOH-oldat keveredik a mintával, és megkezdődik az ammónia vízgőz-desztillációja.

Az ammóniatartalmú vizes oldat egy hűtőn keresztül kondenzálódik, majd egy titrálópohárba kerül, ahol az automatikusan adagolt metilvörös-metilénkék indikátoroldattal elegyedik. A lecsepegő ammóniatartalmú oldatot egy automata titrálóberendezés titrálja, mely automata fecskendőjének dugattyúját a titrálópohár alatt lévő fotocella szabályozza. A fotocella észleli az indikátor színváltozását, és annyi savmennyiséget továbbít a titrálópohárba, amely mindig arányos a jelen levő ammónia mennyiségével. A titrálókészülék dugattyúját mozgató tengely egy potenciométerhez csatlakozik, amelynek segítségével az ammóniával arányos elmozdulás háromjegyű digitális kijelzés formájában jelenik meg a készülék oldalán. A kijelzés lehet nitrogén% vagy nyersfehérje%, és a készülék lehetőséget biztosít a különféle konverziós faktor alkalmazására is.

Az ammóniameghatározást követően három perc múlva a lombik a 6-os helyzetbe kerül, ahol sűrített levegő segítségével a rendszer saját magát kiüríti, kitisztítja. A kitisztítás után a lombik az 1-es helyzetbe fordulva kész újabb minta meghatározására. A műszer teljesítménye 15 perces indulószakasz után hárompercenként egy analízis, azaz óránként 20 minta. A mérés pontossága megegyezik a

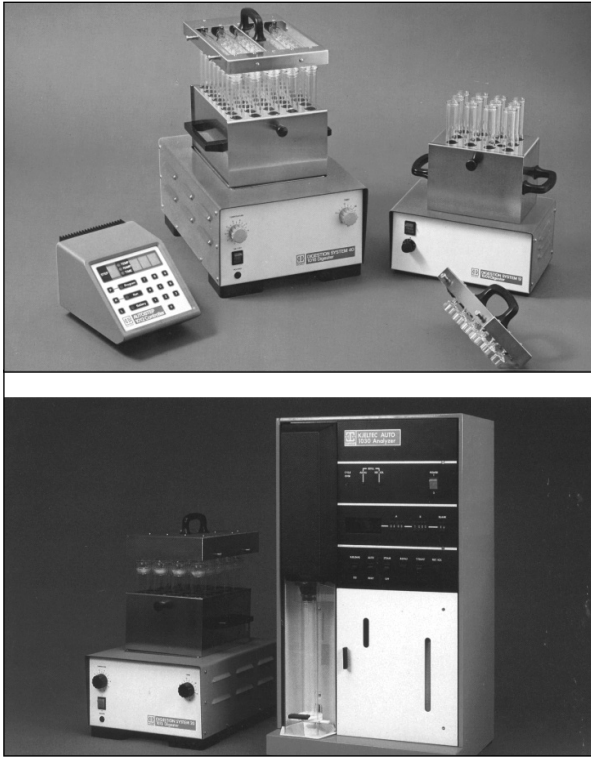
hagyományos Kjeldahl-módszerével. A módszer különösen alkalmas nagyszámú minta gyors sorozatvizsgálatára. Mivel a roncsolás és az ammónia vízgőz-desztilláció ugyanabból a lombikból történik hígítás és egyéb manipuláció nélkül, a készülék különösen alkalmas inhomogén vagy nehezen homogenizálható minták mérésére is. A készülékkel folyadékok (tej, vizelet, testnedvek) nitrogéntartalmát is meg lehet határozni, melynek során a bemérés pipettával történik.

4.3.1.6. Tecator Kjeltec fehérjemeghatározó

A Kjeltec fehérjemeghatározó ugyancsak élelmiszerek nyersfehérje-tartalmának gyors meghatározására szolgál a Kjeldahl-módszer alapján (4.26., 4.27. ábra). Az analitikai laboratóriumokban e készülékkel váltották fel a korábban rendkívüli módon elterjedt és közkedvelt Kjel-Foss gyors nitrogénelemzőt. A készülék kifejlesztését az egészségre és környezetre rendkívül veszélyes higany-oxid katalizátor réz-szulfáttal, illetve szelénrel való kiváltása indokolta. A munkafolyamat lépései teljesen megegyeznek a klasszikus Kjeldahl-módszerével, illetve a Kjel-Foss ismertetésében leírtakkal, azaz: savas roncsolás, hűtés, vízgőz-desztilláció és ammónia titrálása, nyersfehérje-tartalom számítása.

A készülék szakaszos működésű, blokkroncsolóból és desztilláló-titráló részből áll. A roncsoló a fűtőblokkból, a roncsolócsövekből és az ezeket tartó állványból, valamint az elszívófeltétből áll, amely vízsugárszivattyúhoz csatlakozik. A roncsolásnál az őrlött és homogenizált szilárd mintából a nyersfehérje-tartalomtól függően 0,50-1,00 g-ot, nyershúsból 1,00 g-ot, tejből 1 cm³-t, vizeletből 2,0-5 cm³-t mérnek be a 250 cm³-es roncsolócsőbe. Hozzáadnak két darab Kjeltab Se 3,5 tablettát, amely tablettánként 3,5 g K₂SO₄ forráspontemelőt és 3,5 mg szelénkatalizátort tartalmaz, vagy 2 db Kjeltab Cu 3,5 tablettát, amely 3,5 g K₂SO₄-et és 0,4 g CuSO₄ · 5 H₂O-t tartalmaz és 13 cm³ analitikai tisztaságú, koncentrált kén-savat. A minta minőségétől függően különböző mennyiségben az oxidációt elősegítő hidrogén-peroxidot is adnak hozzá, ami szilárd minták esetében 1-5 cm³, tejmintáknál 1 cm³, húsmintáknál 7 cm³. Ezt követően a csöveket behelyezik az előzetesen 420 °C-ra felfűtött roncsolóblokkba, ráhelyezik az elszívófeltétet, és elindítják a vízsugárszivattyút, melynek segítségével távoznak a roncsolás során keletkezett gázok és gőzök a rendszerből. A roncsolás 420 °C-on, egy órán keresztül történik, majd a roncsolóból kivett csöveket lefedve lehűtik. A hűtés után következik a vizsgálat második szakasza, a desztillálás és a titrálás.

A Kjeltec 2400 berendezés alsó szintjén helyezték el a reagenseket tartalmazó tartályokat, a középső részben az automatikus mintaadagoló található, ahol három tartóállvány van 60 db roncsolócső, illetve minta elhelyezésére, a felső részben pedig a desztilláló- és titrálóegység, valamint a folyamatok programozására szolgáló rész helyezkedik el. A mérés a reagensek betöltésével, a mintatartó állványok elhelyezésével és a készülék programozásával indul. A program szabja meg, hogy az egyes reagensekből milyen sorrendben és mennyit adagoljon a



4.26. ábra. A Tecator Kjeltec fehérjeanalizátor roncsolórendszere és a Tecator alapkészüléke



4.27. ábra. Félautomata Tecator fehérjemeghatározó

készülék, valamint azt, hogy mennyi ideig történjen a desztillálás és a titrálás. A programozás során megadják a minta sorszámát, a bemért mennyiséget, a minta helyét a titrálóberendezésben és azt, hogy az eredményt milyen mértékegységben számolja a készülék. Az analízis üzemmódban a készülék az első állványban lévő első csövet emelő segítségével a desztillálóegységbe helyezi, egy pumpa 30 cm^3 1%-os bórsavban oldott brómkrezolzöld–metilvörös indikátort adagol a titrálóedénybe, ezzel egy időben egy másik pumpa 30 cm^3 desztillált vizet juttat a roncsolócsőbe. Ezt követően 60 cm^3 33%-os nátrium-hidroxidot adagolnak a roncsolócsőbe, ami egyrészt megköti a kénsavat, másrészt felszabadítja sójából az ammóniát. A gőzszelep késleltetve nyit, gőz áramlik a roncsolócsőbe, és elindul a desztillálás. Az ammóniatartalmú gőz a kondenzátorban lecsapódik és a titrálóedénybe jut, amely a bórsavban oldott indikátort tartalmazza. A desztilláció alatt az indikátor színének megfelelően (zöldről rózsaszínre vált) egy automata büretta 0,1 M kénsavat adagol a titrálóedénybe mindaddig, amíg a zöld szín rózsaszínre nem vált. A desztilláció addig folyik, amíg az indikátor színe folyamatos rózsaszínné nem alakul. Ezt követően kinyit az ürítőszelep, a titrálóedény kiürül és a gőzszelep lezár. Kinyit a roncsolócső ürítőszelepe is, és a desztillációs maradvány a katalizátorral együtt a gyűjtőtartályba ürül. Az eredmény megjelenik a kijelzőn, a nyomtaton és szükség szerint a memóriában is tárolható, ezt követően a következő roncsolócső felemelésével megkezdődik az újabb minta elemzése.

A nitrogéntartalom számítása a következő:

$$N\% = \frac{(F - B) \cdot 1,401 \cdot M}{\text{bemérés (g)}},$$

ahol: F – 0,1 M kénsavoldat fogyása a mintára (cm^3),

B – 0,1 M kénsavoldat fogyása a vakra (cm^3),

M – a kénsavoldat (mol/dm^3) koncentrációja.

A nyersfehérje-tartalmat a nitrogénszázalék konverziós faktoral való beszorzásával számolják. A készülék ellenőrzését $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ elemzésével végzik, a roncsolás határfokának ellenőrzésére pedig a nikotinsav vagy a triptofán nitrogéntartalmát határozzák meg. Az eredményt a vizsgálatot kérő igényeinek megfelelően nitrogénszázalékban, nyersfehérje-százalékban vagy más mértékegységben adják meg.

4.3.1.7. A valódifehérje meghatározása

Élelmiszerek valódifehérje-tartalmát Barnstein módszere szerint határozzuk meg. A meghatározás során mindazokat a nitrogéntartalmú anyagokat (amidok, aminosavak, ammónia stb.), amelyek nem fehérjéhez kötöttek, úgy távolítjuk el, hogy tiszta- vagy valódifehérjét (a tiszta és a valódi ugyanazt jelenti, egymásnak szinonimái) réz-szulfáttal és nátrium-hidroxiddal kicsapjuk, a keletkezett fehér-

jecsapadékról az egyéb nitrogéntartalmú anyagokat leszűrjük, a csapadékot bő vízzel többször kimossuk, majd a csapadék nitrogéntartalmát Kjeldahl szerint meghatározzuk.

A vizsgálati eljárás során a várható fehérjetartalom függvényében 1-2 g finomra őrölt, légszáraz anyagot 250 cm³-es Griffin-pohárban 100 cm³ desztillált vízzel felforralunk. Keményítődús anyagokat a desztillált víz hozzáadása után, a forralás előtt 30 percig 50 °C-os vízfürdőn melegítjük, mert különben az elegy nem vagy nehezen szűrhető. Felforralás után 250 cm³ 6%-os réz-szulfát-oldatot, majd üvegbottal való keverés közben pár cm³-es adagokban 25 cm³ 1,25%-os nátronlúgot öntünk az elegyhez. A maradék leülepedése után a folyadék tisztáját nitrogénmentes szűrőpapíron átszűrjük, majd a csapadékot háromszori dekantálással, forró desztillált vízzel átmoszuk. Ezután az egész csapadékot kvantitativ a szűrőre visszük, és ott addig mossuk, amíg a szűrlet bárium-kloriddal szulfátreakciót nem ad. A szulfátionok 600 cm³ forró desztillált vízzel való mosás után már biztosan eltávoztak. A szűrést követően a szűrőpapírt a csapadékkal együtt hengerformára csavarva Kjeldahl-lombikba tesszük, és a nitrogéntartalmat meghatározzuk. A valódifehérje-tartalom meghatározását a nyersfehérje-tartalom meghatározásához hasonlóan végezzük. A kénsavas roncsolást követően meghatározott ammóniatartalomból az alábbi képlettel számoljuk a valódifehérje-tartalmat:

$$\text{valódifehérje-tartalom \%} = \frac{(S - L) \cdot 0,0028016 \cdot 6,25 \cdot 100}{b},$$

ahol: S – a szedőlombikba tett 0,1 M H₂SO₄-oldat (cm³),

L – a titráláshoz fogyott 0,2 M NaOH-oldat (cm³),

0,0028016 – az 1 cm³ 0,1 M H₂SO₄-oldatnak megfelelő nitrogén tömege (g),

6,25 – az 1 g nitrogénnek megfelelő fehérje tömege (g),

b – a bemért anyag tömege (g).

4.3.1.8. Az emészthető nyersfehérje-tartalom meghatározása

4.3.1.8.1. Az emészthető nyersfehérje-tartalom meghatározása in vitro pepszines hidrolízissel

A módszer alkalmas állati és növényi eredetű élelmiszerek emészthető nyersfehérje-tartalmának meghatározására. Az eljárás során a vizsgálandó mintát sósavas *pepszinoldatban* szuszpendáljuk, és 39-40 °C-os hőmérsékletű termosztátba teszünk 48 órára. A sósavas *pepszinnel* oldatba vitt fehérje mennyiségét a szuszpenzió szűrletéből Kjeldahl módszerével határozzuk meg.

A vizsgálati eljárás során a 10%-nál nagyobb zsírtartalmú élelmiszert a sósavas *pepszinnel* történő emésztés előtt zsírtalanítani kell. Ezt követően az előké-

szített vizsgálati anyagból 2 g-ot mérünk be egy 500 cm³-es Stohman-lombikba, hozzáadunk 0,83 g *pepszint*, és körkörös mozgattal összekeverjük. Hozzáadunk néhány cm³ 39 °C-os hőmérsékletű 0,075 M-os sósavoldatot, és ismételt körkörös mozdulattal a lombikban lévő anyagokat szuszpendáljuk úgy, hogy a minta teljes mennyisége átnedvesedjen, majd ezt követően a sósav térfogatát 450 cm³-re egészítjük ki. Ezután a lombikot vattával bedugjuk, és 39 °C-os hőmérsékletű termosztátba helyezzük 48 órára, amely időtartam alatt naponta többször, körkörös mozgattal a lombik tartalmát összekeverjük. 48 óra múlva a lombikot a termosztátból kivesszük és 15 cm³ 25%-os HCl-oldatot töltünk rá, 20 °C-ra lehűtjük, majd jelig töltjük desztillált vízzel. A lombik tartalmát alaposan összerázzuk, szűrjük, a szűrlet aliquot részéből a nyersfehérje-tartalmat Kjeldahl módszerével meghatározzuk. A vizsgálat során vakpróbát is végzünk, amikor a mesterséges emésztést a minta nélkül, csupán az eljáráshoz használt vegyszerekkel végezzük el. A vakpróba emészthető nyersfehérje-tartalmára kapott értéket le kell vonni a minta emészthető nyersfehérje-tartalmának értékéből.

Az emészthető nyersfehérje-tartalom kiszámításánál a nyersfehérje-tartalom meghatározásánál ismertetett módszer szerint kell eljárni:

$$\text{emészthető nyersfehérje-tartalom \%} = \frac{(S - L) \cdot 0,0028016 \cdot 6,25 \cdot 100}{b},$$

ahol: S – a szedőlombikba tett 0,1 M H₂SO₄-oldat (cm³),

L – a titráláshoz fogyott 0,2 M NaOH-oldat (cm³),

0,0028016 – az 1 cm³ 0,1 M H₂SO₄-oldatnak megfelelő nitrogén tömege (g),

6,25 – az 1 g nitrogénnek megfelelő fehérje tömege (g),

b – a bemért anyag tömege (g).

A kapott eredményt a hígítással korrigálva kapjuk meg az élelmiszer, illetve a takarmány emészthető nyersfehérje-tartalmát.

4.3.1.8.2. Az emészthető nyersfehérje-tartalom meghatározása in vitro pepszin-tripszin-hidrolízissel

A mintát *pepszinnel*, majd *tripszinnel* hidrolizáljuk, ezt követően az emészthetetlen maradék nitrogéntartalmát Kjeldahl szerint meghatározzuk. A módszer alkalmas állati és növényi eredetű élelmiszerek fehérjeemészthetőségének meghatározására. Az eljárást elsősorban növényi eredetű fehérjék, levélfehérje-koncentrátumok in vitro emészthetőségének meghatározására használják.

A vizsgálati eljárás során 1 g vizsgálandó anyagot centrifugacsőben 20 cm³ 0,1 M sósavban szuszpendálunk, majd 0,1 cm³ 0,01 M sósavban szuszpendált 50 mg *pepszinnel* összekeverjük. A keveréket 37 °C-on 48 órán át enyhén rázatjuk, majd centrifugáljuk. Az üledéket 10 cm³ desztillált vízben szuszpendáljuk

és 0,1 M 8,0 pH-jú nátrium-foszfát puffert és 5 mg *tripszint* adunk hozzá. A keveréket 23 °C-on 16 órán át gyengén rázatjuk, majd centrifugáljuk. Az üledéket $5 \times 30 \text{ cm}^3$ vízzel újra szuszpendáljuk, majd centrifugáljuk, és a felülúszót minden lépés után elöntjük. Az utolsó 20 000 g-n 5 percig végzett centrifugálás után a szilárd maradékot nitrogénmentes szűrőpapíron szűrjük, levegőn megszáritjuk, majd Kjeldahl szerint meghatározzuk a nitrogéntartalmát. A fehérje emészthetőségét %-ban az alábbi képlet alapján számoljuk:

$$\text{a fehérje emészthetősége \%} = \frac{(a - b) \cdot 100}{a},$$

ahol: a – a minta nitrogéntartalma,

b – a minta emészthetetlen részének nitrogéntartalma.

Esetenként a *tripszin* helyett *pankreatint* használnak, és a fehérje *pepszin-pankreatin*-hidrolízist követő emészthetőségét határozzák meg.

4.3.1.8.3. Multienzimes módszer a fehérje in vitro emészthetőségének megállapítására

Az előző két pontban ismertetett módszer szerint a fehérje in vitro emészthetőségét egy, illetve két enzimmel határozzák meg. Újabban három vagy több enzimet használnak a fehérje in vitro emészthetőségének meghatározására, amely eljárásokat multienzimes módszereknek nevezik. A multienzimes módszerekkel a fehérje emészthetősége pontosabban meghatározható, mint az egy vagy két enzim használatát előíró eljárások esetében.

A vizsgálati eljárás során 1 g légszáraz, megfelelő méretűre őrlött takarmányt mérünk be egy 100 cm^3 -es centrifugacsőbe, és 25 cm^3 sósavas *pepszinoldatot* adunk hozzá (3 g *pepszint* oldunk 500 cm^3 0,15 mol/dm³ sósavoldatban), majd 90 percig 40 °C-on gyengén rázatjuk. Ezt követően 220 mg nátrium-hidrogén-karbonáttal a sósavat semlegesítjük, a centrifugacső tartalmához 25 cm^3 *pankreatinoldatot* adunk (3 g *pankreatin*, 30 mg *lipáz*, 57 mg epesavas nátrium, 3 g *amiloglikozidáz* feloldva 750 cm^3 6,8 pH-jú foszfátpufferben), és 60 percig 40 °C-on inkubáljuk. Az inkubálás után 5 cm^3 10%-os nátrium-karbonátot adunk hozzá, és 5000 g-n 15 percig centrifugáljuk. Az üledéket 25 cm^3 desztillált vízzel átmosva szuszpendáljuk, majd a felülúszóval együtt molnár-selyemszítán átszűrjük. Desztillált vízzel történő többszöri átmosás után a szűrőn visszamaradt csapadék nitrogéntartalmát Kjeldahl szerint meghatározzuk. Az emésztési együtthatót az emészthetetlen fehérjetartalom alapján a következő képlettel számoljuk ki:

$$E_m E_{nyfeh} = 100 - \left(\frac{A}{B} \right) \cdot 100,$$

ahol: $E_{m E_{nyfeh}}$ – a vizsgált minta nyersfehérje-tartalmának emésztési együtthatója,
 A – a csapadék nyersfehérje-tartalma (%),
 B – a vizsgált élelmiszer nyersfehérje-tartalma (%).

A módszer elsősorban gabonamagvakból készült élelmiszerek in vitro fehérjeemészthetőségének meghatározására alkalmas. Összetett keverékek esetén az in vitro és az in vivo emésztési együtthatók között rendkívül szoros az összefüggés. Az extrahált mintáknál szorosabb összefüggés és pontosabb eredmények érhetők el, ezért célszerű az élelmiszermintákat a vizsgálatok megkezdése előtt zsírtalanítani.

4.3.1.8.4. A fehérje in vitro emészthetőségének meghatározása pankreatinos hidrolízissel és aminosav-analízissel

A módszer alkalmas állati és növényi eredetű élelmiszerek fehérjei in vitro emészthetőségének meghatározására. Az eljárás során *pankreatinnal* 37 °C-on 15 órán át hidrolizáljuk a fehérjét, ezután a lehasadó aminosavak mennyiségét ioncserés oszlopkromatográfiával mérjük.

A vizsgálati eljárás során a 10%-nál nagyobb zsírtartalmú mintát éterrel vagy petroléterrel extraháljuk, majd meghatározzuk a nitrogéntartalmát. A 200 mg fehérjének megfelelő mintát 15 órán át 37 °C-on 100 mg *pankreatin* és 10 cm³ 8,2 pH-jú foszfátpuffer elegyével inkubáljuk, amelynek során az elegyet 20 cm³-es Erlenmeyer-lombikban mágneses keverőn állandóan keverjük. Ezt követően 10 cm³ hidrolizátumhoz 5 cm³ 20%-os cink-szulfát-oldatot és 5 cm³ 1%-os nátrium-hidroxid-oldatot adunk, amelynek következtében az oldott állapotú hidrolizátlan fehérjék és peptidok a keletkező cink-hidroxiddal kicsapódnak. Az elegyet szűrjük, majd a szűrlethez 1 cm³ 1%-os kénsavat és 4 cm³ 2,2 pH-jú citrátpuffert adunk. Ebből az oldatból az aminosav-analizátor érzékenységtől függően 0,1-1,0 cm³-nyi mennyiséget használunk fel az aminosav-tartalom meghatározására.

A minta eredeti aminosav-összetételét alapul véve kiszámíthatjuk a *pankreatinos* hidrolízis során felszabaduló aminosavak százalékos mennyiségét. Az eredeti aminosav-tartalom %-ában kifejezett felszabaduló aminosav-mennyiséget biológiailag hasznosítható aminosav-tartalomnak tekintjük. A módszer alkalmas a fehérje károsodásának nyomon követésére, a hőkezelések és egyéb technológiai paramétereknek az aminosavak hasznosíthatóságára gyakorolt hatásának mérésére.

4.3.1.9. Fehérjetartalom-meghatározás spektrofotometriás módszerekkel

4.3.1.9.1. Ultraibolya spektrofotometriás módszerek

A legtöbb fehérjének a **280 nm hullámhosszon** az ultraibolya-tartományban fényelnyelési maximuma van, amely a fehérjék tirozin-, fenilalanin- és triptofántartalmára

vezethető vissza. A különböző fehérjék aromásaminosav-tartalma viszonylag szűk határok között változik, ezért ezek fényelnyelése felhasználható a fehérje mennyiségének meghatározására. A módszer előnye a **rendkívüli érzékenység**, továbbá az, hogy **reagens nélkül lehet végezni a meghatározást**. Oszlopkromatográfias elválasztások során az UV-abszorpciót használjuk fel a fehérjekoncentráció folyamatos mérésére. A mérést a nukleinsavak, a purin- és a pirimidinbázisok, valamint a purin- és pirimidinyűrűt tartalmazó vegyületek 260 nm körüli erős UV-abszorpciója zavarja, ezért különböző nukleinsav-fehérje keverékek elemzése során **korrekciókat dolgoztak ki a nukleinsavak okozta fehérjemeghatározási hiba kiküszöbölésére**. Kis nukleinsav-tartalom esetében a 280 nm-en mért fényelnyelés alapján a 10-1000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ méréshatárok között lehet a tiszta, nem zavaros fehérjeoldatok koncentrációját meghatározni. A méréshez olyan UV-detektor szükséges, amely 280 nm vagy ez alatti hullámhosszat tud szelektálni. A fehérje meghatározásánál azt is figyelembe kell venni, hogy a fehérjeanalitikában használt számos oldószernek jelentős UV-abszorpciója van a fehérjék 280 nm-es elnyelési sávjában. Az elektronikus úton való háttérkompenzálás csökkenti a mérés érzékenységét, gradienseltűció esetén való meghatározásnál viszont, mivel az abszorpció folyamatosan változik, a háttérkompenzálás elektronikus úton nem lehetséges. A nukleinsavak zavaró hatása miatt olyan fehérjemérési módszereket is kidolgoztak, amelyeknél a 280 nm-nél rövidebb hullámhossztartományban jelentkező fényelnyelést mérik. **Használhatják a 220-240 nm-en mért fényelnyelést a fehérje meghatározására** annak ellenére, hogy ebben a tartományban a fehérjének nincs abszorpciós maximuma, a nukleinsavaknak viszont abszorpciós minimumuk van. Ebben a hullámhossztartományban nemcsak a tirozin és a triptofán, hanem a fenilalanin, a metionin, a cisztein és cisztin, továbbá a peptidkötés 185 nm-es fényelnyeléséből összegződik a mért extinkció. Az eljárással 5-180 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ fehérjét lehet meghatározni. Ezekben a hullámhosszakon a ribonukleinsavak zavaró hatását még hatékonyabban ki lehet küszöbölni.

A fehérjék és a peptidek UV-abszorpciót mutatnak a **191-194 nm közötti tartományban** is. Ebben a tartományban azért előnyös a fehérje- vagy peptidtartalmat mérni, mert az UV-abszorpció független az aromás aminosavak mennyiségétől, így **a fényelnyelés csaknem független a fehérje vagy peptid minőségétől**. A módszer hátránya, hogy optikailag igen kiváló minőségű, nagy érzékenységű spektrofotométert és jó méréstechnikai feltételeket kíván, mert a rövid ultraibolya-tartományban a szórtfényeffektus nagyon megváltoztathatja a mérések eredményeit. Ebben a mérési tartományban 40-80-szor nagyobb érzékenységet lehet elérni, mint a hagyományos, 280 nm-en mért fényelnyeléssel.

4.3.1.9.2. Spektrofotometriás módszerek a látható fény tartományban

A fehérjék színreakciója valójában az őket felépítő aminosavak színreakcióira vezethető vissza. A fehérjék kimutatására használható színreakciók közül csak

kevés használható mennyiségi analízis céljaira. A legfontosabbak a biuret-reakció és a Folin–Ciocalteu-féle fenolreagenssel való színreakciók.

4.3.1.9.2.1. Biuret-módszer

A biuret-reakció során lúgos közegben a Cu^{2+} -ion négy peptid-nitrogénhez kapcsolódik. A $-\text{CONH}$ -csoporton kívül adják a reakciót a $-\text{CSNH}_2$ -, a $-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ -, a $-\text{CH}_2\text{NH}_2$ -, a $-\text{CRH}\text{NH}_2$ -, a $-\text{CHOHCH}_2\text{NH}_2$ -, a $-\text{CHNH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ -, a $-\text{CHNH}_2\text{CHO}$ -csoportok és természetesen maga a biuret is ($\text{CONH}_2\text{NHCONH}_2$), amelyről a reakció a nevét kapta. Az ibolyaszínű rézkomplexnek a látható fény tartományban, az 540–560 nm között van abszorpciós maximuma, de a rézkomplex a közeli ibolyántúli tartományban, 310 nm-en is mérhető.

Gornall és munkatársai az alábbiak szerint állították elő és használták a biuret-reagenst. 1,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t és 6 g $\text{NaK}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ -t feloldunk 500 cm^3 vízben, 300 cm^3 10%-os karbonátmentes NaOH-oldatot adunk hozzá, majd vízzel 1 dm^3 -re hígítjuk. A reagens polietilén palackban, sötét helyen eltartható. 0,1% kálium-jodid hozzáadása megakadályozza a réz redukcióját, de nem befolyásolja a biuret-színreakciót. A meghatározás során 1 cm^3 1–10 mg/cm^3 -es fehérjeoldathoz 4 cm^3 biuret-reagenst adunk, összerázzuk, szobahőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk, majd **540–550 nm hullámhosszon mérjük a fényelnyelést** 1 cm^3 víz és 4 cm^3 biuret-reagens keverékével szemben. A standard görbét marhaszérumalbumin-oldattal készítjük. Ha nagyobb pontosságra van szükségünk, célszerű a vizsgálati anyagból Kjeldahl-módszerrel fehérjemeghatározást végezni, és erre vonatkoztatni az eredményeket. Mivel a nem fehérje nitrogén is reagál a biuret-reagenssel, ezért a meghatározást triklór-ecetsavas kicsapás után a csapadék lúgos oldatából célszerű elvégezni.

A kisebb molekulatömegű, biuret-reakciót adó, nem fehérjeszerű vegyületektől és egyéb zavaró anyagoktól a biuret-reakcióban keletkező fehérje-réz komplexet Sephadex G-25 oszlopon is el lehet választani. Ezt követően a fehérje-réz komplexet H_2SO_4 – H_2O eleggyel roncsolják, meglúgosítják, majd **a rezet dietil-ditiokarbamáttal kolorimetrikusan meghatározzák**. Ez az eljárás azonos érzékenységgű a Lowry-féle módszerrel (lásd később), és tízszer érzékenyebb a 280 nm-es UV-abszorpción alapuló eljárásnál.

Egy másik módszer szerint a Sephadex gélen szűrővel elkülönített fehérje-réz komplexből roncsolással felszabadítják, majd mérik a **Cu^{2+} -ion-tartalmat**, és **a rézzel katalizált fenol-klóramin-T reakció alapján**, a 410 nm-en mért abszorpcióból számítják a fehérjetartalmat. Ez a réz meghatározási módszer mintegy ezer-szer érzékenyebb, mint a réz atomabszorpciós spektrofotometriás meghatározása, a fehérjemeghatározás érzékenysége pedig ötszázszor nagyobb, mint a Lowry-féle eljárásé (0,01–0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ fehérje).

A biuret-reakció fényelnyelése a közeli ibolyántúli tartományban, 330 nm-en előnyösen mérhető, és itt a meghatározást nem zavarja a nukleinsavak vagy az ammóniumion jelenléte. A rézkomplex fényelnyelését 310 nm-es hullámhossz-

szon is javasolják mérni, melynek során nukleinsavat nem tartalmazó oldatból $0,075 \text{ mg/cm}^3$ -nél kevesebb, nukleinsav jelenlétében pedig $0,15\text{-}3 \text{ mg/cm}^3$ fehérjét tudtak meghatározni. Ellman biuret-módszere 263 nm -nél méri az abszorpciót, az eljárás érzékenysége $0,01 \text{ mg/cm}^3$ fehérje, vagyis egy nagyságrenddel nagyobb, mint a látható tartományban mért abszorpció alapján meghatározható.

Fehérjemeghatározást sok esetben közvetlenül a növényi vagy állati szövetkivonatból kell elvégezni. A kivonásra használt puffer vagy detergens zavarhatja a meghatározást, hisz ezek jelenlétében a biuret-reagens csapadékot ad a fehérjével. A csapadékot oldani lehet például propilén-glikolban, és a fényabszorpció ilyenkor 330 nm hullámhosszon mérhető. A biokémiai reakciók során igen gyakran használt TRIS-puffer (tris[hidroxi-metilamino-metán]) jelenléte nem kívánatos a fehérjemeghatározásnál, mert mind a biuret-, mind a Lowry-féle fehérjemeghatározást zavarja. A puffer nitrogéntartalma miatt a Kjeldahl-féle fehérjemeghatározás is nehézkes, ezért inkább a biuret-kalibráló görbékét különféle TRIS-koncentrációkkal felvéve határozzuk meg, hogy a puffer mennyivel növeli meg az extinkciós értékeket.

A biuret-reakció makro változatai jól használhatók különféle gabonaőrlemények fehérjetartalmának vizsgálatára is. Ennek során az alkalikus réz(II)-szulfát-oldat a fehérjének nemcsak reagense, hanem extrahálószer is. Jennings az alábbi módosított biuret-reagenssel vonta ki, illetve határozta meg a fehérjét.

900 cm^3 vízben feloldott 2 g kálium-nátrium-tartarátot és 15 cm^3 10 M kálium-hidroxidot, folyamatos keverés közben 30 cm^3 4% -os réz-szulfát-oldatot adott hozzá, majd az oldatot desztillált vízzel 1 dm^3 -re egészítette ki. A fehérjemeghatározás során 500 mg lisztet dugóval zárható extrakciós edénybe mért, ezt 2 cm^3 szén-tetrakloriddal megnedvesítette, majd 50 cm^3 módosított biuret-reagenst adott hozzá. Rázógépen hatvan percig rázatta, majd a szuszpenzió egy részét 3000 g-n $10\text{-}15$ percig centrifugálta. A tiszta felülúszó fényelnyelését 550 nm hullámhosszon mérte 1 cm -es küvettában, a kalibráló görbét pedig a Kjeldahl-nitrogénmeghatározás alapján szerkesztette meg. Búza- és árpaőrleményekkel végzett vizsgálatokkal megállapították, hogy a Kjeldahl-nitrogénértékek és az extinkció között igen szoros az összefüggés. Elsősorban a biuret-reagens stabilitását célozva ezt a módszert többen módosították. A kálium-nátrium-tartarát helyett használtak glicerint, mások pedig finoman porított CuCO_3 alkalmazásával küszöbölték ki a reagens bomlékonyságát. Alkalikus vizes oldat helyett kálium-hidroxidra $0,1 \text{ M}$ -os, 60% -os izopropil-alkoholt használva a gabonaőrlemények festékanyagait kevésbé oldódnak ki, így ezek fényelnyelése a biuret-reakciót nem zavarja.

4.3.1.9.2.2. Lowry-módszer

A biokémiai analitikában a legelterjedtebb fehérjemeghatározás a Lowry- (Folin-Lowry-) féle eljárás, amelynek alapja a fehérje biuret-reakciója alkalikus közegben Cu^{2+} -ionnal, és a Folin-Ciocalteu-féle foszformolibdén-foszfor-wolfrámsav redukciója heteropoli-molibdénképpé, a fehérjekötésben lévő aromás aminosavak

rézion katalizálta oxidációja közben. A Folin-féle fenolreagenst az alábbiak szerint készítjük:

100 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -et, 25 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ -et feloldunk 700 cm³ vízben, majd 50 cm³ 85%-os H_3PO_4 -at és 100 cm³ tömény HCl-at adunk hozzá. Az oldatot kétliteres, normálcsiszolatós gömblombikban, hűtővel felszerelve 10 órán át forraljuk, majd 150 g lítium-szulfátot, 50 cm³ desztillált vizet és néhány csepp brómot adunk hozzá. 15 percig visszafolyó nélkül forraljuk, hogy a bróm feleslegét elűzzük, lehűlés után pedig desztillált vízzel egy literre töltjük fel. Barna folyadéküvegbe szűrjük. Használat előtt 1 M-os NaOH-dal fenolftaleinindikátor jelenlétében meghatározzuk az aciditását, a fehérjemeghatározáshoz pedig az előírt koncentrációra hígítjuk. A standard görbék elkészítése során különböző hígításokkal 0, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 és 2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ koncentrációjú fehérjesorozatot állítunk elő szarvasmarha szérumalbumin-frakcióból.

Az így előállított standardsorozat vagy a minta (ami optimális esetben 50-100 mg/100 cm³ fehérjét tartalmaz) 0,1 cm³-éhez 0,1 cm³ 2 mólos NaOH-ot adunk, 100 °C-on 10 percig fűtőblokkba vagy vízfürdőbe helyezük, majd szobahőmérsékletre hűtjük. 1 cm³ frissen készített reagenst adunk hozzá, amely 100:1:1 térfogatszázalékos arányban tartalmazza a 2% nátrium-karbonát, az 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ és a 2% kálium-nátrium-tartarát-oldatot. Az alkalikus réz-tartarát reagenst elkészíthetjük úgy is, hogy 1,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ -t és 3,375 g kálium-nátrium-tartarátot oldunk 100 cm³ desztillált vízben, majd ebből a törzsoldatból 1 cm³-t 2,5%-os Na_2CO_3 -oldattal 100 cm³-re hígítunk. Az oldatot mindig frissen kell készíteni. Az oldatot szobahőmérsékleten 10 percig hagyjuk állni, majd adjunk hozzá 0,1 cm³ Folin-reagenst, intenzíven keverjük össze, ezután hagyjuk állni szobahőmérsékleten 30-60 percig, de az idő a 60 percet soha ne haladja meg. Mérjük az oldat abszorpcióját 750 nm-en akkor, ha a fehérjekoncentráció 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ alatt volt, vagy 550 nm-en akkor, ha a fehérjekoncentráció 100-2000 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ között volt. Szerkesszük meg az abszorbanciák alapján a kalibrációs görbét, amely már alkalmas az ismeretlen fehérjetartalmú minta fehérjetartalmának számítására. Ismeretlen fehérjetartalmú minta esetében 75-200 μg közötti fehérjét tartalmazó mintát 3 cm³ 0,5 M NaOH-ban oldunk, majd az oldatból 1 cm³-t pipetázunk egy körjeles kémcsőbe, 4 cm³ alkalikus réz-tartarát reagenst adunk hozzá, összekeverjük, 10 percig állni hagyjuk, majd 1 cm³ Folin-reagenst adunk hozzá erélyes keverés közben. A standard görbénél leírtaknak megfelelően szobahőmérsékleten állni hagyjuk, ha szükséges, centrifugáljuk, ezt követően pedig mérjük az oldat fényelnyelését a fehérjetartalomtól függően 750 vagy 550 nm-en. Ha a méréseket a hitelesítő görbe lineáris tartományában végezzük, a meghatározás hibája $\pm 2-4\%$.

A Lowry-féle fehérjemeghatározást az oldatban lévő idegen anyagok, puferek, detergenssek, kelátképző anyagok, alkoholok, cukrok, poliszacharidok, pigmentek, nagyobb koncentrációban jelen lévő szulfhidrilék és szulfhidril-reagenssek **erőteljesen zavarják,** és különleges eljárásokat kell alkalmazni a lipoproteinek fehérjetartalmának meghatározása során is. Megállapították, hogy kü-

lönböző pufferek eltérő módon befolyásolják a Lowry-reakció érzékenységét, és csökkentik az érzékenységet a glicin, a glicil-glicin, a citrátok, a szukcinátok, a nátrium-dodecil-szulfát és a cukrok is. Ha ezek az anyagok állandó koncentrációban vannak jelen, akkor **zavaró hatásuk** az azonos körülmények között készített **vakoldattal kompenzálható**. Kimutatták, hogy a glicerín mind a Lowry-féle fehérjemeghatározás esetén, mind a biuret-reakció során lineárisan növeli a fényabszorpciót, amely zavaró hatás megfelelő referensoldattal kompenzálható. Vizsgálatok szerint a redukáló cukrok és a poliszacharidok közül nagyon sok reagál a Folin-reagenssel, és ezek a színreakciók nagymértékben zavarhatják a fehérjemeghatározást. Sokféle cukorral meghatározták az úgynevezett proteinegyenértéket, amelyet a fehérjemeghatározás során figyelembe kell venni. Lipoproteidek és proteolipidek fehérjetartalmának meghatározása során, mivel ezek a vegyületek vizes közegben nehezen oldódnak, a kioldást 37 °C-on, egy éjszakán át tartó lúgos kezeléssel, vagy 100 °C-on 30 percen át végzett lúgos kioldással érik el. Egyes proteolipidek a lipidek eltávolítása után csapadékot is képezhetnek a Lowry-féle fehérjemeghatározás során, a lipoidok oxidációja során képződő bomlástermékek pedig reagálnak a Folin-reagenssel, megnövelve a fehérje mennyiségét.

Amennyiben nem fehérjeoldatból, hanem precipitált fehérjéből kell a meghatározást elvégezni, akkor a precipitátumot 2 mólos NaOH-ban oldjuk, és 100 °C-on 10 percig hidrolizáljuk. Teljes sejtek vagy komplex biológiai anyagok esetében a mintákat megfelelő módon elő kell készíteni a fehérjemeghatározáshoz, ami magában foglalhat például perklórsavas kicsapást, amely után a fehérjecsapadék már alkalmas a Lowry-féle fehérjemeghatározásra.

Egy másik eljárás szerint 1 cm³ fehérjetartalmú mintához 0,1 cm³ 72%-os triklór-ecetsavat adnak, majd 1000-3000 g között 30 percig végzett centrifugálással az oldatból elkülönítik a kicsapott fehérjét, amely most már alkalmas a Lowry-féle meghatározásra. Mivel a detergensek, mint amilyen például a nátrium-dodecil-szulfát, gyakran jelen vannak azokban az oldatokban, amelyből fehérjemeghatározást kell végezni, ilyenkor a fehérje tökéletes kicsapására nemcsak triklór-ecetsavat, hanem foszfor-wolframsavat is alkalmaznak az alábbiak szerint:

1 cm³ fehérjetartalmú mintához hozzáadnak 0,2 cm³ 30 tömeg%-os triklór-ecetsav- és 6 tömeg%-os foszfor-wolframsav-oldatot, összekeverik, majd szobahőmérsékleten 20 percig állni hagyják, centrifugálják 4 °C-on, 2000 g-n, 30 percig, a felülúszót dekantálják, és a kapott csapadékból határozzák meg a fehérjét. A reakció rendkívüli módon függ a pH-tól, ezért ügyelni kell arra, hogy a pH 10,0–10,5 között maradjon a meghatározás során. **A Folin-reagenssel való reakció ideje nem túlzottan kritikus, a reakció gyakorlatilag 10 perc alatt tökéletesen végbemegy, de többórás várakozás sem befolyásolja lényegesen a fényelnyelést.** Nagyon kell ügyelni viszont arra, hogy a Folin-reagens és a minta keveredése gyors és tökéletes legyen, ugyanis a reagens lúgos körülmények között instabil, és bomlása növelheti a meghatározás hibáját. Amint már szó volt róla, a Lowry-módszer hibája, hogy nagyon sok anyag, például pufferek, a drogok, a nuklein-

savak és a cukrok zavarhatják a meghatározást. A zavaró hatások minimálisra csökkenthetők a minta hígításával úgy, hogy a fehérjekoncentráció még elég nagy legyen a hígítás után az optimális meghatározáshoz. A zavaró hatás kiküszöbölésére minden alkalommal zavaró anyagokat tartalmazó vakmintát kell készíteni. A detergensnek, a cukrok és az EDTA zavaró hatása kiküszöbölhető, ha a fehérje kicsapása során nátrium-dodecil-szulfátot is juttatunk a rendszerbe.

Ha a Folin-reagenst nem egyszerre, hanem két adagban adjuk a mintához, az 20%-kal megnövelheti az érzékenységet. Ha három perccel a Folin-reagens adagolása után ditiotreitot adunk a reakcióelegyhez, az érzékenység mintegy 50%-kal nő.

A Lowry-meghatározás során kapott **színes termék színintenzitása függ a fehérje aminosav-összetételétől**, ezért két különböző fehérje, amelyeknek koncentrációja 1 mg/cm^3 , különféle színintenzitást ad a meghatározás során. Figyelembe kell venni, hogy a bovin szérumalbuminnal felvett standard görbe csak közelítő meghatározást ad a fehérje koncentrációjára. Az **abszolút értéket** bármilyen fehérjére ezzel a módszerrel csak **akkor lehet meghatározni, ha a kalibrációs görbe is ugyanabból a fehérjéből készül**, mint amit a mintából meg akarunk határozni. A fehérjetartalom pontosabb meghatározására csak az aminosav-analízis alkalmas.

4.3.1.9.3. Fehérjetartalom-meghatározás festékkötéssel

A fehérjemolekula savanyú és bázisos csoportjai megfelelő kísérleti körülmények között a festék disszociált csoportjaival (legtöbbször szulfonsav csoportokkal) reakcióba lépnek, és velük oldhatatlan, színes csapadékot képeznek. A festékkötés mértékéből a fehérje mennyiségére lehet következtetni, ezért a módszer megfelelő körülmények között mennyiségi meghatározássá fejleszthető.

A szerves festékek közül előszeretettel alkalmazták fehérje meghatározására az **amidofekete 10B festéket** ($\text{C}_{22}\text{H}_{14}\text{N}_6\text{O}_9\text{S}_2\text{Na}_2$), amely savanyú közegben jól kötődik a fehérjéhez, aminek alapján a fehérje mennyisége meghatározható. Folyadékok fehérjetartalmának meghatározása során a fehérjét ecetsavas metil-alkoholban amidofeketével megfestik, majd a centrifugálással eltávolított, megfestett csapadékot nátrium-hidroxidban oldják, és mérik a szín intenzitását. A fehérje festékkötéssel való meghatározása során egyrészt tesztelték azt, hogy a festék hogyan kötődik a különböző fehérjékhez, másrészt különböző fehérjéket próbáltak ki a meghatározások során. Megállapították, hogy **a festékkötés kevésbé specifikus**, mint a Lowry-féle módszer, ugyanis a vizsgált kilenc, különféle fehérje festékkötése nitrogénre számolva közel azonos volt. Az amidofeketét nemcsak folyadékban oldott fehérjék meghatározására, hanem különböző membránokon, illetve géleken elválasztott fehérjék festésére is használták. Megállapították, hogy az amidofekete abszorpciója a poliakrilamid gélben lévő fehérjéhez $1,5 \text{ mg/cm}^3$ -ig lineáris. A megkötött fehérje kvantitatíve festhető amidofeketével, és mennyisége denzitométerrel meghatározható. Az amidofeketén kívül használták még a **xilen-brillant-cianin G**, valamint az **orange G** és a **coomassie kék G 250** festékeket is a fehérje mennyiségi meghatározására.

Gabonaőrlemények fehérjetartalmának és a fehérje minőségének vizsgálatára több gyors módszert is kidolgoztak. A festékkötési módszert a búzalisztfrakciók fehérjei bázisos és savas csoportjainak, illetve ezek arányának meghatározására használták. A bázisos csoportok festékkötését orange G 0,1%-os oldatával, a savas csoportok festékkötését pedig a safranin O 0,2%-os oldatával végezték. A festékkötés mérésére indirekt módszert alkalmaztak, azaz **nem a megkötött festéket, hanem a festék feleslegét mérték** a festékoldat koncentrációjának csökkenéséből. Az orange G színét 472 nm-en, a safranin O színét pedig 452 nm-en mérték, ötvenszeres hígításban. Ebből a módszerből fehérjemeghatározási módszert fejlesztettek ki, amelynek lényege a következő:

600 mg liszthez 50 cm³-es polietilén centrifugacsőben 25 cm³ orange G festékoldatot adnak, amit a következők szerint állítanak elő: 100 mg finoman porított festéket oldanak 100 cm³ vízben, amelynek pH-ját 2,2-re állítják be. A festékkadalás után a dugóval lezárt centrifugacsöveket 15 percig rázzák, miközben a fehérje pozitív töltésű csoportjai és a festék negatív töltésű csoportjai között a reakció teljesen végbemegy. Az oldhatatlan fehérje-festék komplexet és a liszt egyéb, nem oldódott komponenseit ötperces, 4000 fordulaton végzett centrifugálással különítik el a reakcióba nem lépett festékoldattól, majd a felülúszó fényelnyelést 470 nm-en mérik. A festékkötés és a Kjeldahl-nitrogén közötti összefüggés erősen szignifikáns.

4.3.1.9.3.1. Bradford-módszer

Nagyon sok laboratóriumban elterjedt a fehérjék meghatározására a **Bradford-módszer**, amely a **coomassie kék G 250 festék és a fehérje közötti reakción alapul**. Ez a módszer egyszerűbb, gyorsabb és érzékenyebb, mint a Lowry-módszer, ráadásul nem zavarják a minta előállításánál használt reagensek és az NPN anyagok sem. A részletes vizsgálatok megállapították, hogy a festék három, különböző disszociált formában fordulhat elő, a funkciós csoportok pK_s-értékei 1,15; 1,82 és 12,40. A savas oldatban domináns formák vörös és zöld színűek, amelyeknek fényelnyelési maximuma 470 és 650 nm-en van, a negatív töltésű kék forma, amely a fehérjéhez kötődik, 590 nm-en mutat abszorpciós maximumot. **A fehérjék mennyisége a kék színű, negatív töltésű festékekkel határozható meg**, amelynek során a fényelnyelést 590 nm-en mérik. A festék az arginil- és lizil-oldalláncokhoz kötődik, ami a különböző fehérjék esetén az aminosav-tartalom függvényében különböző lehet. A módszer hátránya még az is, hogy érzékeny más vegyületek jelenlétére is. Többszöri módosítás után azonban elmondható, hogy a Bradford-módszer ma is **az egyik legnépszerűbb és legszélesebb körben alkalmazott fehérjeanalitikai módszer**. Az eredeti eljárás alkalmas 10–100 μg közötti fehérje mennyiségének mérésére, a belőle kifejlesztett mikromódszer pedig képes 1–10 μg közötti fehérjét mérni. Ez utóbbi mikromódszer rendkívül érzékeny, de érzékeny az egyéb zavaró hatásokkal szemben is. A meghatározás során az alábbi reagenseket használjuk:

Színreagens: 100 mg coomassie kék G 250-t oldunk 50 cm³ 95%-os etil-alkoholban, az oldatot 100 cm³ 85%-os foszforsavhoz keverjük, majd az egészet desztillált vízzel 1 dm³-re töltjük. A reagenst szűrőpapíron keresztül átszűrjük, és barna üvegben, szobahőmérsékleten tároljuk. Az így kapott oldat néhány héten keresztül stabil, bár némi kicsapódás végbemehet a tárolás során. A csapadékot használat előtt szűréssel el kell távolítani.

A **fehérjestandard előállításakor** szarvasmarha- γ -globulint használunk, 1 mg/cm³ koncentrációban, desztillált vízben oldva. A mikromódszer esetében a proteinstandardot 100 μ g/cm³-es oldatból állítjuk elő. Ezeket a desztillált vízben oldott fehérjéket –20 °C-on tárolhatjuk a felhasználásig. A meghatározás során rendkívüli módon kell ügyelni a tisztaságra és arra, hogy az eszközök detergenst még nyomokban se tartalmazzanak. Kvarcküvetéket nem lehet alkalmazni, mivel a festék kötődik hozzájuk, az üvegeszközökhöz kötődött festéket pedig metanolos oldással vagy detergenssek segítségével el kell távolítani.

A standard módszer szerint 10-100 μ g közötti fehérjének megfelelő szarvasmarha- γ -globulin-oldatot pipettázunk 100 μ l térfogatú kémcsövekbe. Amennyiben az ismeretlen minta fehérjekoncentrációjáról nincsenek információink, a hígításokat 10-szeres, 100-szoros, illetve 1000-szeres mennyiségben végezzük el a törzsoldatból. A kalibrációs görbe készítése során párhuzamosan 10, 20, 40, 60, 80 és 100 μ l-t pipettázunk az 1 mg/cm³ szarvasmarha- γ -globulin standardoldatokból a kémcsövekbe, mindegyiket 100 μ l-re egészítjük ki desztillált vízzel, és 100 μ l desztillált vizet használunk a vakminta előállításához is. Mindegyik kémcsőhöz 5 cm³ fehérjereagenst adunk, kerülve a felhabzást óvatosan összekeverjük, mert az rontja a reprodukálhatóságot. **A reakció nagyon gyorsan lejátsszódik**, ezért a standard, a vak és **a minta fényelnyelését** a reagens hozzáadását követően **két perc múlva már mérhetjük**, de a mérést egy órán belül mindenképpen el kell végezni. A standard görbe nem lineáris, a fényelnyelés függ az alkalmazott reagens fényelnyelésétől. Ebből következik, hogy minden egyes meghatározás alkalmával standard sorozatot és vakmintát is kell készíteni.

A standard módszer alkalmas 10-100 μ g közötti fehérjemennyiségek mérésére. Az ebből kifejlesztett **mikromódszer** ennél **lényegesen érzékenyebb**, és különösen akkor hasznos, ha igen kis mennyiségű fehérje áll rendelkezésre a meghatározáshoz. A mikromódszer alkalmazása során 1-10 μ g közötti fehérjemennyiségeket – maximum 100 μ l össztérfogatban – mérünk be 1,5 cm³ térfogatú polietilén mikrocentrifuga-csővekbe. Amennyiben az analizálandó minta közelítő fehérjetartalmát sem ismerjük, 10-szeres, 100-szoros és 1000-szeres hígítással is elvégezzük a mérést. A kalibrációs görbe készítése során a 100 μ g/cm³ szarvasmarha- γ -globulin standardoldatból mikrocentrifuga-csővekbe mérünk 10, 20, 40, 60, 80 és 100 μ l oldatot, és desztillált vízzel mindegyiket 100 μ l-re egészítjük ki. A vakmintához szintén 100 μ l desztillált vizet mérünk be egy mikrocentrifuga-csőbe. Mindegyik mintához hozzáadunk 1 cm³ fehérjereagenst, és a csöveket óvatosan, de alaposan összekeverjük. A proteinrea-

gens hozzáadását követően 2 és 60 perc között mérjük az oldat fényelnyelését 595 nm-en.

A Bradford-meghatározást nem nagyon zavarják a biokémiai analitikában használt reagensek, ennek ellenére néhány vegyszer jelentős hatással lehet a vakpróba fényelnyelésére, illetve a fehérje és a festék kötődésére. **A legnagyobb problémát a detergensok és a különféle amfolitok okozzák**, amelyeket gélfiltrálással vagy dialízissel el kell távolítani az oldatból, vagy a fehérjéket ki kell csapni, és a csapadékból kell végezni a meghatározást. Megoldás lehet az is, hogyha a vakpróba és a kalibrációs standardok is ugyanazokat a zavaró anyagokat tartalmazzák, mint a minta. Bázikus közegben a festék anion formája dominál, ezért ilyenkor az abszorpció jelentős mértékben megnő.

A fehérjéhez kötött festék abszorpciós maximuma a kék színű ionos formához viszonyítva 590 nm-ről 620 nm-re tolódik el. Célszerű lenne tehát itt mérni a fényelnyelést, ezt azonban már zavarja a zöld színű forma 650 nm-en bekövetkező abszorpciós maximuma. Ezért az érzékenység növelését és a zavaró hatást is figyelembe véve 595 nm a legjobb kompromisszum.

A festék nem kötődik sem a szabad argininhez, sem a lizinhez, sem a 3000 Da-nál kisebb molekulatömegű peptidekhez, ezért a peptidhormonokat és a biológiailag aktív, fontos **peptideket ezzel a módszerrel nem lehet mérni. A Bradford-módszer érzékenysége a különféle fehérjék mérésekor igen eltérő.** Példaként említendő, hogy amennyiben a *tripszin* relatív abszorbanciája 18, akkor a bovin szérumalbuminé 100, a *citokrom c*-é 128, a hisztoné 130, a mielin bázikus fehérjéé pedig 139. A módszert sokféleképpen módosították azért, hogy ez a rendkívül eltérő változatosság mérséklődjék. Változtatták a festékkoldat koncentrációját, a pH-t, de lényeges eredményeket nem értek el e tekintetben. A membránfehérjék mérésekor célszerűnek látszik a detergensok teljes elhagyása és a fehérjék kalcium-foszfáttal való kicsapása. Befolyásolja a módszer érzékenységét a coomassie kék G 250 festék tisztasága, ezért azt csak nagyon jó minőségben, megbízható helyről szabad beszerezni. Jelentős hatással lehet a meghatározás pontosságára a standard kalibrációs görbéhez használt fehérje minősége. Ehhez legtöbbször a szarvasmarha-szérumalbumint használják, mert ez viszonylag olcsó, és tiszta formában könnyen hozzá lehet jutni. A probléma ezzel az, hogy a fehérjének – Bradford-módszerrel vizsgálva – meglehetősen nagy a festékkötő kapacitása, ezért a legtöbb esetben az ismeretlen minta fehérjetartalmát (kalibrációs görbével végezve az értékelést) alulértékeli. A festékkötő kapacitásban mutatkozó különbségek miatt **a meghatározni kívánt fehérje festékkötő kapacitásának hasonlóan kellene lenni ahhoz, mint amiből a standard kalibrációs görbét készítik.**

4.3.1.9.4. Egyéb módszerek a fehérjetartalom meghatározására

Fehérjeoldatok fehérjetartalmának mérésére az előzőekben ismertetett módszereken kívül alkalmasak lehetnek még a **turbidimetriás**, a **fluorometriás**, a

refraktometriás és a **polarimetriás** eljárások is. Ezek a módszerek nem nagyon terjedtek el a gyakorlatban, azonban speciális problémák megoldására alkalmasak lehetnek. A turbidimetriás eljárások azon alapulnak, hogy az igen apró, lebegő részecskéket tartalmazó szuszpenziók, mint amilyenek a nagy hígításban kicsapott fehérjék, a rajtuk áthaladó fény egy részét szétszórják, az oldatot zavarossá teszik. A zavarosság mérése a **nefelometria**. A zavarosság kétféle módon mérhető: a turbidimetriás eljárás során mérhetjük a zavaros oldaton áthaladó fény intenzitását, illetve intenzitásának csökkenését a tiszta oldattal szemben, az abszorpciós fotometria szabálya szerint. A zavarosság mérésének másik módja az, amikor a lebegő részecskék által szétszórta fényt meghatározott szögben mérjük, amely mérési elv hasonló a fluorimetriához. A zavarosság bizonyos határok között arányos a lebegő részecskék számával, illetve adott diszperzitásfok esetén a lebegő anyag koncentrációjával. A koncentráció a turbidimetriás mérés során csak empirikus kalibrációs görbe segítségével mérhető, amennyiben az összes kísérleti körülmény azonos.

Turbidimetriás fehérjemeghatározással jól követhető a fehérjék enzimese lebomlása. Hasonlóan lehet a zavarosságból következtetni a fehérjekicsapás koncentrációfüggésére is. Zein-oldat koncentrációját úgy határozták meg, hogy 70%-os alkoholos fehérjeoldat 2 cm^3 -éhez 6 cm^3 1%-os NaCl-oldatot adtak, és 590 nm-en 60 perc után fotometriásan mérték a zavarosságot. Amennyiben a fehérjéből valamilyen kicsapószerrel zavaros oldatot sikerül létrehozni, akkor elválasztásuk során a turbidimetria akár az egyes fehérjefrakciók detektálására is alkalmas lehet.

A fluorometriás eljárások alkalmazásánál a fehérjemeghatározásra két lehetőség adódik: a fehérjék kapcsolása fluoreszkáló vegyületekhez, illetve a fluoreszkáló vegyületek fluoreszcenciájának kioltása fehérje adagolásával. Az első módszer technikájának lényege, hogy a festékkötéses módszerekhez hasonlóan fluoreszkáló festéket kapcsolnak a fehérjéhez, és mérik az így kapott komplex fluoreszcenciáját 510 nm-en való gerjesztés után 540 nm-en. A többféle fluoreszcenciás festék közül az **eozin** bizonyult a leghasználhatóbbnak. Az eozinon kívül **fluoreszkamint** is használtak fehérjék, peptidok, aminosavak és primer aminok meghatározására, a fluoreszkamin ugyanis szobahőmérsékleten és vizes oldatban is reagál az aminocsoporttal. A gerjesztést 390 nm-en végezték, a kisugárzott fluoreszkáló fény intenzitását pedig 475 nm-en mérték. A reakció $\text{pH} = 4\text{--}10$ közötti tartományban játszódik le, és segítségével $0,5 \mu\text{g}$ fehérje határozható meg. Ugyancsak érzékeny módszert dolgoztak ki a hisztin meghatározására, amelynek segítségével $0,2\text{--}0,4 \mu\text{g}$, lizinben vagy argininben gazdag hisztint lehet meghatározni.

A refraktometriás és a polarográfiás eljárások gyakorlati jelentősége elenyésző. Talán említésre méltó az a tény, hogy egyes aminosavak, polipeptidok és fehérjék meghatározott pH-n, kobalttartalmú pufferben oldva, katalitikus reakcióba lépnek a csepegő Hg-elektóddal, így polarográfiásan mérhetők. A reakciót

a fehérjék –SH csoportja adja. A módszerrel μg nagyságrendben lehet fehérjét meghatározni.

4.3.1.10. *Élelmiszer-fehérjék vizsgálata elektroforézissel és izoelektromos fókuszálással*

4.3.1.10.1. Az elektroforézis és analitikai alkalmazása

Az elektroforézis olyan elválasztási folyamat, amelyben **a szeparálandó komponensek elektromos erőterben különböző sebességgel vándorolnak**. A részecske vándorlási sebességét az elektrolitoldatban főképpen annak töltése és az elektromos térerő szabja meg. Az elválasztandó molekulának magának is lehet töltése, vagy a töltést eredményezheti a molekula felületére adszorbeálódott ion. A töltéssel rendelkező részecskéknek a közegben való mozgását gátolja a súrlódási ellenállás, amely a részecske átmérőjével és az oldat viszkozitásával arányos. A mozgást gátolhatja még az elektrolitoldat, melynek az elválasztandó anyag molekuláival ellentétes előjelű ionjai burokszerűen körülveszik a részecskéket. Ez az ionfelhő hidrátburkot vonz magához, mely gátolja a részecskék mozgását. A fékezőerő annál nagyobb, minél nagyobb a puffer ionerőssége, ezért a vizsgálandó molekula vándorlási sebessége elektromos erőterben az ionerősség növekedésével csökken.

Az elektroforézis valójában anyagkeverékek analitikai vagy preparatív elválasztására szolgáló eljárás, mely **az egyes komponensek elektroforetikus mozgékonyságának különbségén alapszik**. A mintaadagolás módja szerint lehet szakaszos vagy folyamatos üzemű, az elválasztáshoz alkalmazott közeg minősége szerint pedig megkülönböztethetünk szabad és szilárd hordozón végzett elektroforézist (a hordozó lehet papír, keményítő, agar, cellulóz-acetát, porózus üveg vagy poliakrilamid gél). A használt feszültség nagysága alapján ismerünk kis-, közép- és nagyfeszültségű elválasztásokat.

Az analitikai eljárások közül a múlt század nyolcvanas éveig legelterjedtebb volt a papírelektroforézis, manapság azonban a poliakrilamid-gélelektroforézis (PAGE) szinte teljesen háttérbe szorította a többi módszert. A PAGE alkalmazásának legszembetűnőbb oka nagy felbontóképessége, hisz míg a papírelektroforézissel a szérumfehérjéket csak 5-7 frakcióra, addig a PAGE-sel akár 50-60 frakcióra is szét lehet választani.

4.3.1.10.2. A poliakrilamidgél-elektroforézis (PAGE)

A poliakrilamid, az akrilamid és az N,N'-metilén-bisz-akrilamid (BIS) térhálós szerkezetű polimerizációs terméke; a térhálósító BIS a poliakrilamid-láncokba beépülve szabad funkció csoportjaival a szomszédos láncokkal is reagálni képes. A hálószerkezet kialakulásával polimer gélgomolyagok keletkeznek, melyekben a poliakrilamid-láncok a maximális entrópiának megfelelően szabálytalan alakot

vesznek fel. Az akrilamid- és a BIS-koncentráció, valamint a polimerizáció foka megszabja az átlagos pórusnagyságot, a pórusnagyság pedig megszabja az azokon még átszűrődő molekulák maximális tömegét.

A poliakrilamid gél előnye a kémiai stabilitás és indifferencia, a nagyfokú transzparencia, a tág határokon belül megválasztható pórusnagyság, az adszorpció és az elektrooszmózis hiánya, illetve a legtöbb oldószerben való oldhatatlanság. A fentiek miatt **a PAGE szinte valamennyi fehérje elválasztására és analízisére alkalmas**; jól szeparálhatók vele mind a neutrális, mind a bázikus, mind a savanyú karakterű fehérjék, mert a poliakrilamid gél teljes mértékben inert, nem változtatja meg az elválasztandó fehérjemolekulák natív tulajdonságait. Ha a gél és a puffer összetételét jól választjuk meg, bármilyen molekulatömegű, illetve tulajdonságú fehérjét a legjobb felbontóképességgel tudunk elválasztani. (A részletesebb leírás a 2. fejezetben található.)

4.3.1.10.2.1. A fehérjeminták előkészítése, géltre vitele és az elektroforézis folyamata

A mintafelvétel előtt meg **kell határozni a vizsgálandó anyag fehérjetartalmát**, hisz attól függően, hogy a minta hány komponenst tartalmaz, egy mintahelyre 10-100 μg fehérjét kell feljuttatni annak ellenére, hogy egyetlen fehérje 0,1 μg mennyiségben is jól detektálható. 30-50 vagy több komponenst tartalmazó minta esetén 200-400 μg fehérjét kell a géltre felvinni. Biológiai folyadékokat a fehérjekoncentrációtól függő mennyiségben akár közvetlenül is a géltre lehet vinni, élelmiszer- és takarmányfehérjék esetében azonban az analízist meg kell előznie egy jelentős mértékű tisztításnak. Az előkészítés során 10-100 μg fehérjét tartalmazó oldathoz 0,1 cm^3 puffert adunk, amelybe előzőleg 0,1%-os metanol-ecetsav (9:1)-ban oldott bróm-fenolkéket teszünk, ami jelzőfestékként a frontvonal haladását mutatja az elektroforézis folyamán. Ebből a keverékből lehetőleg 10-20 μl anyagot rétegzünk egy-egy mintahelyre. Nagy ionerősségű oldatok esetében a keveréket az elektroforézist megelőzően feltétlenül dializálni kell a hígított gyűjtőgéllal vagy a hígított elektródpufferrel szemben.

A minta felvitele után indíthatjuk az elválasztást. Alkalikus pufferrendszerekben a fehérje, negatív töltésének következtében, az anód felé vándorol. Az egyenáramú áramforrást úgy kell megválasztani, hogy a feszültség és az áramerősség állandó kontroll alatt maradjon. A mintát kisebb áramerősség mellett koncentrálnak (1 mA/gél), majd 2-5 mA/gélre növelve végezzük a fehérjemolekulák szétválasztását. Minden eltérő gélméret és puffer esetében más az optimális feszültség és áramerősség, azt azonban figyelembe kell venni, hogy ha a feszültség és az áramerősség az optimálisnál kisebb, akkor az elválasztott zónák éleetlenek lesznek, ha viszont nagyobb, akkor a keletkezett hő rontja a szeparációt. A futtatást addig folytatjuk, amíg a jelzőfesték a gél szélétől 0,5-1 cm távolságra nem ér, amikor az áramforrást kikapcsoljuk és a géleket kiszedjük. A géllapok eltávolítása a készülék konstrukciójától függ. Egyes esetekben vékony tüvel és vízszugárral le-

het eltávolítani, majd az elvált géllapot ajánlatos azonnal fixálóoldatot tartalmazó edénybe helyezni. A fixálás megakadályozza a fehérje kidiffundálását a gélből, és a festőoldatot is kíméli. Fixálás után a fehérjezónákat festéssel tesszük láthatóvá, majd sor kerülhet a fehérjefrakciók minőségi és mennyiségi kiértékelésére. Festésre leggyakrabban az amidofeketét vagy a Coomassie-kéket használjuk, melyek gélen megkötődő feleslegét mosással kell eltávolítani.

A proteinogram kiértékelése festés nélkül is megvalósítható az UV-fényabszorpció segítségével, de alkalmas erre a fluorimetriás értékelés is fluoreszcens festést követően. A gyakorlatban jobban elterjedt azonban a festett proteinogramok értékelése, amelynek során a festékek a fehérjemolekulák szerkezeti sajátosságai miatt különböző módon kötődnek. A megfestett frakciók kvantitatíve ezért csak ugyanazzal a fehérjével felvett kalibrációs görbe alapján értékelhetők. A mennyiségi értékelés követelménye a jó elválasztás, a denzitométer és az integrátor, illetve a számítógépszoftver. Ilyen esetben is rendkívüli óvatossággal kell eljárni, hisz a mennyiségi értékelést befolyásolhatja a csúcsok nem megfelelő elválása és az, ha a detektor érzékenysége nem lineáris az abszorpcióval.

Az elkészült proteinogramot 7%-os ecetsavban, a festés intenzitásának csökkenése nélkül, hosszú ideig lehet tárolni. A géllapokat dehidratálással is lehet tartósítani.

4.3.1.10.2.2. Speciális alkalmazások az élelmiszerfehérje-kutatásban

Az élelmiszer-fehérjék analízisére sikeresen alkalmazható a PAGE, azonban figyelemmel kell lenni arra, hogy az elválasztással kapott frakciók száma nem mindig adja meg a mintában lévő különböző fehérjekomponensek valóságos számát. Ugyanaz a fehérje vagy enzim több csík formájában is megjelenhet a proteinogramon, mert az esetek egy részében különbség lehet az izomermolekulák méretében, melyet a töltésbeli különbség vagy a kisebb ligandumkötés okozhat, és a frakciók konformációja is különböző lehet. Előfordulhat azonban az is, hogy a frakciók heterogenitását az eljárás során elkövetett hiba okozza a puffer és a fehérjemolekulák közötti, valamint az egyes fehérjefrakciók közötti kölcsönhatások következtében. Így az adott fehérjemolekula részleges disszociációja következhet be, a fehérje aggregációja állhat elő, a konformációs izomerek közötti kapcsolódás jöhet létre, és a fehérjemolekulák közötti komplexképződés sem zárható ki az elválasztás folyamán.

A PAGE alkalmazható élelmiszer-fehérjék molekulatömegének meghatározására is. A fehérjék Na-dodecil-szulfáttal (SDS) való kezelése a molekulákat azonos töltésű random láncokká alakítja, mely az SDS gélelektroforézis molekulatömeg meghatározására történő alkalmazásának az alapja. A különféle módszerek a fehérjéket SDS-sel inkubálják, merkapto-etanolal kezelik, majd detergenst tartalmazó gél- és pufferrendszert használnak, melynek során **az SDS-fehérjekomplex elektroforetikus vándorlása a molekulatömeggel lesz arányos.** A vizsgálandó fehérje mozgékonyágát ismert molekulatömegű fehérje mozgékonyágával

összehasonlítva meghatározható a molekulatömeg. Kalibrációs görbe készítése céljából meghatározzuk különböző ismert molekulatömegű fehérjék mobilitását, majd rendszerint **a molekulatömeg logaritmusát a mobilitás függvényében ábrázolva** olyan **hitelesítő görbét kapunk**, aminek segítségével a vizsgált fehérje molekulatömege a relatív mobilitás alapján meghatározható.

A PAGE jól használható **enzimek specifikus kimutatására, elválasztására és mennyiségi meghatározására** is. Ezen túl a PAGE alkalmazható az élelmiszerfehérje-kutatásban különféle fehérjék szétválasztására. A többkötetnyi alkalmazás közül kiemelkedő, hogy a PAGE-t alkalmazták a bab oldható fehérjéinek izolálására, közeli rokonságban lévő növények rokonsági fokának meghatározására, állati eredetű fehérjék (tej, tojás, hús) fehérjefrakcióinak elemzésére és az izomszövet oldható fehérjéinek jellemzésére. Az utóbbi időben olyan bonyolultnak tűnő feladatokat is sikerült a PAGE-val megvalósítani, mint a különböző fajú állatok tejének megkülönböztetése és a keverési arány meghatározása. Ennek során Vörös és mtsai egyrészt a kancatej fehérjefrakcióit tanulmányozták, másrészt módszert dolgoztak ki a kancatejhez hozzákevert tehéntej mennyiségének meghatározására. Az α_s - és β -kazein vizsgálathoz 8%-os natív PAGE gélt használtak 4 M karbamidtartalommal, a savófehérjék esetében 14%-os PAGE gélt alkalmaztak karbamid nélkül. A gél mérete mindkét esetben 80x100x1 mm volt, az analízis során 15-ös fésűt alkalmaztak, és 10 mg/cm³-es hígítás után a felvitt mintamennyiség 4 μ l/slot volt. A futtatáshoz TRIS-glicin-puffert használtak, a fixálást 12,5%-os triklór-ecetsavval, a festést 0,15%-os Serra-blue-G-vel végezték. A savófehérjék vizsgálatakor a 14%-os karbamidmentes natív PAGE rendszerben nyolc egymástól jól elkülöníthető fehérjefrakciót találtak. Az α_s -kazeinek és a β -kazeinek vizsgálata során 8%-os, 4 M karbamidtartalmú PAGE gélrendszerben 16 fehérjekomponenst sikerült elkülöníteni. A 18 vizsgált kancatejminta közötti különbségek egyértelműen a genetikai polimorfizmus meglétét bizonyítják.

4.3.1.10.3. Különféle fehérjék szétválasztása és meghatározása izoelektromos fókuszálással

Az elektroforézis konstans pH-jú gélek és pufferek segítségével történik, ezzel szemben az izoelektromos fókuszáláshoz (IEF) olyan **pH-gradienst hozunk létre, amely a katódtól az anódig folyamatosan változik**, így tulajdonképpen pH-gradiens segítségével végezzük az elektroforézist. A pH-gradiensben az egyes fehérjék töltésüknek megfelelően vagy a katód, vagy az anód irányába vándorolnak, ott azonban, ahol a pH az egyes molekulák izoelektromos pontjának megfelelő, megállnak, hisz ott töltéssel nem rendelkező, semleges molekulaként viselkednek. Összefoglalva tehát **a fehérjék abban a pontban fókuszálódnak, ahol a közeg pH-ja a fehérje pI-jével azonos**. A módszer kidolgozását az tette lehetővé, hogy előállították a vivőanyag Ampholine-preparátumot – ez különböző poliamino- és polikarboxisavak keveréke, amellyel sikerült megvalósítani a folyamatosan változó pH-t, mely pH-gradiens a meghatározás során stabilis. Az alifás poliamino- és

polikarboxisavak jól oldódnak vízben, pH-értékük különböző, az egyes komponensek pH-ja 3 és 10 között változik, de megfelelő módszerrel a pH-intervallum választható például 4 és 6, 5 és 8, 7 és 9 vagy 8 és 10 között. A vivóamfoliteknek 280 nm-en van abszorpciója, ami kis fehérjekoncentráció esetében nagyobb hibát okozhat. Ha a fehérjetartalmat színreakcióval akarjuk meghatározni, akkor mindenképpen dialízist kell alkalmazni legalább 500-szoros térfogattal szemben, 72 órán át, az oldószert 10-12 óránként cserélve.

Az izoelektromos fókuszálást szacharózgradienssel is kombinálhatjuk, melynek segítségével elsősorban **a fehérje izoelektromos pontját tudjuk megállapítani**. Napjainkban legnagyobb jelentősége a poliakrilamid gélben végzett izoelektromos fókuszálásnak van, amelynek segítségével többek között a tejfehérje genetikai variánsait is szét lehet választani. Az izoelektromos fókuszálás alkalmas lehet arra is, hogy különféle fajok egymáshoz kevert, hasonló karakterű fehérjéit szét lehessen választani és mennyiségüket meg lehessen határozni. Vörös és mtsai arra vállalkoztak, hogy a drága kancatejhez hamisítási célból hozzákevert tehéntejet egyrészt kimutassák, másrészt annak mennyiségére közelítő információt kapjanak. A fehérjefrakciók elválasztását CA-IEF (+ 10 mg glicin)-rendszerben, $124 \times 258 \times 0,2$ mm gélen végezték, 0,5 M H_3PO_4 anódpuffer és 0,5 M NaOH katódpuffer alkalmazásával. A minta hígítása 10 mg/cm^3 , a mintafelvitel módja szűrőpapír, a felvitt mennyiség pedig $11 \mu\text{l/slot}$ volt. A fixálást 12,5%-os triklórecetsavval, a festést pedig 0,15%-os Serra-blue-G-vel végezték.

Az izoelektromos fókuszálással a kanca- és a tehéntejből készült elektroforetogramokat összehasonlítva feltűnő a két állatfaj tejfehérje-szerkezetének különbsége, amely legmarkánsabban a tehéntej α_1 -kazein-komponenseinek helyzetével és azok intenzív tónusával jellemezhető. A kancatej ugyanezen a helyen nem tartalmaz fehérjekomponenseket, ezért ha a hasonló körülmények között végzett IEF során a kancatejmintában ebbe a tartományba eső fehérjék fordulnak elő, akkor biztosan állítható, hogy a kancatejet más, vélhetően tehéntejjel elegyítették. Ha az elektroforetogramról denzitogramot is készítünk, akkor a kontrolltejminták felhasználásával az elegyítés mennyiségi arányára is kaphatunk információt.

4.3.1.11. A fehérjék oszlopkromatográfiája

A kromatográfia szorpción és deszorpción alapuló elválasztástechnikai módszer, melynek során az elválasztandó anyagok egy keskeny kezdeti zónáról különféle szorbenseken, folyadék- vagy gázáramlás hatására, eltérő sebességgel mozdulnak el. A fehérjeanalitikában és a preparatív elválasztástechnikában az oszlopkromatográfia kiemelkedő jelentőségű, amelynek segítségével hasonló szerkezetű frakciók választhatók el egymástól, preparatív oszlopkromatográfiával pedig **egy-egy anyag igen nagy tisztaságban izolálható**. Fehérjék szétválasztására és meghatározására mind a folyadék-szilárd, mind a folyadék-folyadék kromatográfia elterjedt, melyek az elválasztást előidéző hatások alapján adszorpció, megoszlásos és

ioncserés elválasztásokra oszthatók. Mindhárom esetben követelmény, hogy az állófázis oldhatatlan legyen a mozgófázisban, az állófázis irreverzibilisen ne kösse meg az elválasztandó anyagokat, ne bontsa el azokat, és ne lépjen reakcióba a mozgófázis komponenseivel. Az eljárás során az oszlopon az elválasztandó anyagok különböző erővel kötődnek, majd a mozgófázis áramoltatásával a kötődésük erősségétől függően deszorbeálódnak, az oszlop további részében pedig ismét adszorbeálódnak az állófázisra. Ez a folyamat folytatódik az oszlop teljes hosszában, melynek során jelentős eltolódások jönnek létre a szétválasztani kívánt komponensek között, aminek következtében az elválasztandó komponensek különböző időpontban elkülönülve jelennek meg az oszlop végén. Az eluált anyagot a fehérjeanalitikában általában UV-abszorpcióval határozzák meg; az **UV-abszorpció időbeni változását ábrázolva kapjuk a kromatogramot**, melynek segítségével az egyes komponensek azonosíthatók és mennyiségileg meghatározhatók.

4.3.1.11.1. A fehérjék vizsgálata adszorpciós oszlopkromatográfiával

Az adszorpciós kromatográfiában alkalmazott szorbensek közül csak kevés alkalmazható fehérjék elválasztására, mert ezen szorbensek **hidrofil aktív centrumain a kötődés adszorpcióval megy végbe**, kapacitásuk nagy molekulájú anyagokkal szemben viszonylag kicsi, így a fehérjék csak kis határfokkal választhatók el ezzel a módszerrel. Az ilyen típusú kromatográfiás körülmények között a fehérjék denaturálódhatnak, és biológiai aktivitásukat is elveszíthetik, ennek ellenére számos alkalmazást írtak le fehérjék szétválasztására ezzel a módszerrel. Hidroxipapatiton például elemezték az albumin- és a γ -globulin-frakciókat, a tojássárgája lipoprotein- és kromoprotein-frakcióit, meghatározták a lizozim és az ovalbumin mennyiségét, és szétválasztották a szérumprotein-frakciókat.

Ritkán ugyan alkalmazták adszorbensnek a fehérjeanalitikában az alumínium-oxidot, a cellulózt, a kaolint és a szilikagélt, azonban ezek jelentősége a gyakorlatban minimális.

4.3.1.11.2. A fehérjék vizsgálata megoszlásos oszlopkromatográfiával

A megoszlásos oszlopkromatográfia során **az elválasztás alapja az elválasztandó anyag ismételt ellenáramú megoszlása egy álló- és egy mozgófázis között**. Az állófázis egy szemcsés hordozóra felvitt nagy viszkozitású folyadék, a mozgófázis pedig vizes oldatok és szerves oldószerek különböző összetételű elegye. A fázisok közötti egyensúlyi koncentráció-megoszlás elsősorban a mozgófázis polaritásától függ, ezért a megoszlási hányados a mozgófázis összetételének változtatásával módosítható. A megoszlásos oszlopkromatográfia az adszorpciós oszlopkromatográfiához hasonlóan a fehérjekutatásban nem tudott igazán nagy jelentőségre szert tenni, amit azokkal a bonyolult viszonyokkal lehet magyarázni, melyek az álló- és mozgófázis, valamint a fehérjék kölcsönhatása következtében alakulnak ki.

4.3.1.11.3. A fehérjék vizsgálata ioncserés oszlopkromatográfiával

Az ioncserélő oszlopkromatográfia állófázisa egy olyan ioncserélő anyag, amelynek mátrixához elektrolitos disszociációra képes csoportok kötődnek kovalens kötéssel. Azokat az ioncserélőket, amelyek mátrixán **a fix ion negatív töltésű savmaradék, kationcserélőknek, a pozitív töltésű fix iont** tartalmazókat pedig **anioncserélőknek** nevezzük. A fix ionok ellenionjai ugyanolyan töltésű más ionokkal kicserélhetők. Az ioncserés kromatografálás során a szorbens ellenionjait először az oszlopra adagolt minta ionjai váltják fel, majd ezeket, töltéseik nagyságával ellenkező sorrendben, az eluáló pufferoldat ionjai fokozatosan kicserélik. A kicserélés, illetve elválasztás függ a kromatografálás hőmérsékletétől, valamint a mozgófázis ionkoncentrációjától és a pH-tól. Az ioncserélő szorbenseken a fehérjék főként Coulomb-féle erővel kötődnek, az elektrosztatikus kölcsönhatásokon kívül azonban apoláros adszorpcióval és hidrogénhidakkal való kötődéssel is számolhatunk. A nagy molekulatömegű fehérjék esetében a töltést nemcsak az őket alkotó aminosavak aránya határozza meg, hanem jelentősen befolyásolja azt az oldószer pH-ja is. Az izoelektromos pontnál kisebb pH-jú oldatban a fehérjemolekulák pozitív, nagyobb pH-jú oldatban pedig negatív töltésűek lesznek, ezért **a pozitív töltésű anyagok szorpciójához kationcserélő, a negatív töltésűekéhez pedig anioncserélő szorbent kell alkalmazni.** Az izoelektromos pont felett és alatt egy-egy pH-tartományban a fehérjék mind kation-, mind anioncserélő gyanán kromatografálhatók, az izoelektromos pontban viszont az ikeriont nem köti meg sem a kation-, sem az anioncserélő szorbens. Fehérjék oszlopkromatográfias elválasztásához ioncserélő műgyantákat, cellulóz alapú ioncserélőket vagy ioncserélő géleket alkalmaznak.

4.3.1.11.3.1. Elválasztás ioncserélő műgyantákon

A fehérjék ioncserés oszlopkromatográfias vizsgálatakor ügyelni kell arra, hogy a nagy molekulatömegű, erősen differenciált térszerkezetű anyagok a szorpció következtében könnyen denaturálódhatnak, mások pedig az ioncserélő gyanta funkciócs csoportjaira irreverzibilisen kötődhetnek. A feladat megoldásához szükséges optimális ioncserélő kiválasztását elősegíti, ha ismerjük az elválasztandó anyagok izoelektromos pontját, biológiailag aktív anyagok esetében pedig azt a pH-tartományt, amelyben stabilitásukat nem veszítik el. A fehérjeanalitikában leggyakrabban **divinil-benzollal különféle mértékben térhálósított szulfonált polisztirol, valamint polimetakrilsav műgyanták** kerülnek felhasználásra. A kationcserélő műgyantákon kromatografálható fehérjék általában kisebb molekulatömegűek és bázikus jellegűek. Szulfonált polisztirol műgyantán sikerült szétválasztani olyan fehérjéket, mint a *citokrom c*, a *ribonukleáz*, a *dezoxiribonukleáz*, a *lizozim*, az *inzulin*, a *prolaktin*, a *pektináz*, a *celluláz*, a *papain*, a növekedési hormon, a *hisztionok*, a *hemoglobin*, a *tripszinogén*, a *kimotripszinogén* és a *kimotripszin*. Nagyszámú publikáció jelent meg a peptidek ioncserés oszlopkromatográfias

szétválasztásáról és meghatározásáról is. Vizsgálták egyes fehérjék enzimhasítás után kapott fragmenseinek mennyiségét is, és így ez az eljárás is hozzájárult a fehérjék elsődleges szerkezetének meghatározásához.

4.3.1.11.3.2. Elválasztás cellulózalapú ioncserélőkkel

Igen jó hatásfokkal használhatók fehérjék és peptidek elválasztására az erősen hidrofil, cellulózalapú ioncserélők és gél ioncserélők. Az ioncserélő cellulózszármazékok aktív csoportjai a cellulóz felületén helyezkednek el, de ezek mellett a cellulóz hidroxilcsoportjai is megkötik a bonyolult szerkezetű fehérjéket anélkül, hogy azok a szorpció következtében denaturálódnának. A leggyakrabban használt cellulózszármazékok a karboxi-, a metil- és a foszforilált-cellulóz kationcserélők, a dietil-amino-etil-, az amino-etil- és az epiklór-hidrinezett, valamint trietil-aminozott cellulóz anioncserélők.

Az ioncserélő cellulózszármazékok igen hamar elterjedtek, és nagy jelentőségre tettek szert a fehérjeanalitikában. Ezek az anyagok a cellulóz rostos szerkezete és a cellulózmolekula hidroxilcsoportjai miatt nagy mennyiségű vizet tudnak felvenni, ezért a duzzadt cellulóz tömege 7-10-szerese lehet a száraz cellulóz tömegének. A száraz ioncserélő cellulóz előkészítésének első lépése ezért a cellulóz hidratálása, majd az első eluáló pufferrel történő szuszpendálást követően a kromatografáló oszlopba való töltése. A szétválasztani kívánt fehérjeoldatot az oszlop felett lévő puffer alá rétegezzük, vagy pedig az oszlop feletti puffer leengedése után az oszlop felszínére engedhetjük a kromatografálandó oldatot. Ezt követően növekvő pH-jú és ionkoncentrációjú pufferekkel, gradienselúcióval választjuk szét a frakciókat. Miután a fehérjefrakciók elhagyták az ioncserélő oszlopot, az oszlop töltetét 1 M NaOH-dal regeneráljuk, a lúgot az oszlopról desztillált vízzel kimossuk, majd a következő elválasztás előtt az első puffer oldatával addig mossuk, amíg az oszlopról távozó pufferoldat pH-ja azonos nem lesz az eredeti pufferével.

Az ioncserélő cellulózok felhasználása fehérjék kromatografálására szinte áttekinthetetlenül bőséges. Az ioncserélő cellulóz és a pufferek összetételének változtatásával szinte valamennyi jelenleg ismert fehérje izolálása, a többi fehérjefrakciótól történő elválasztása és meghatározása megvalósítható.

4.3.1.11.3.3. Elválasztások ioncserélő gélekkel

A térhálósitott dextransalapú és a poliakrilamid-alapú gélek ioncserélő és géliszűrő tulajdonsággal egyaránt rendelkeznek, a kromatográfias elválasztás során azonban mégis inkább az ioncsere kerül előtérbe. **Az ioncserélő gélek különösen előnyösen alkalmazhatók biológiailag aktív, labilis anyagok elválasztására, illetve tisztítására.** Alkalmazásuk során célszerű figyelembe venni mind az ioncserélőkre, mind a géliszűrőkre vonatkozó elveket és technikai megoldásokat.

4.3.1.11.4. A fehérjék vizsgálata egyéb kromatográfiai módszerekkel

A fehérjék szétválaszthatók és meghatározhatók **affinitás-kromatográfiával**, melynek során az állófázis olyan szorbens, amelynek oldhatatlan mátrixához kovalens kötésre képes gyök segítségével egy biológiailag aktív vegyület van kötve. Ez a mátrixhoz kötött bioszorbens-molekula a mozgófázisból származó, biológiailag aktív vegyülettel reakcióba tud lépni. A bioszorbens által létrehozott reakció lehet egy reverzibilis kötés, vagy lehet egy olyan kémiai folyamat, amelynek során a mozgófázisban lévő molekula kémiailag átalakul. A bioszorbensek kialakítására egyik leggyakrabban használt mátrix brómciános kezeléssel állítható elő agaróz szuszpenzióból, majd az iminocsoporthoz hozzákapcsolják a biológiailag aktív komponenst, ami legtöbbször fehérje. Ily módon **enzimeket lehet a szilárd hordozóhoz kapcsolni**, és az immobilizált enzimeket fel lehet használni fehérjék szétválasztására és meghatározására.

Az affinitás-kromatográfia mellett az elmúlt években rohamos léptekkel fejlődött a **nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia**, amely ugyancsak **kiválóan alkalmas fehérjekomponensek szétválasztására** és meghatározására. A mozgófázis áramoltatása a kromatografálás meggyorsítása érdekében rendkívül nagy nyomáson történik, amelynek során nő a hatékonyság, másrészt pedig felgyorsulnak az elválasztási folyamatok. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia további előnye az automatizálhatóság, melynek következtében a szubjektív hiba gyakorlatilag csak a minta-előkészítésre korlátozódik.

4.3.1.12. A fehérjék géلكromatográfiája

A géلكromatográfia a molekulatömeg-különbségeken alapuló, egyik legelterjedtebb elválasztási módszer. A molekulaméret szerinti elválasztás jól illeszthető az előzőekben ismertetett kromatográfiai módszerekhez. A géلكromatográfiai elválasztás során a mozgófázis valamilyen folyadék, a töltet pedig finom eloszlású gél, megfelelő pórusmérettel, ezért **a gél belsejébe csak azok a molekulák tudnak behatolni, amelyek mérete a gél pórusméreténél kisebb**. Amely molekulák behatolnak a gél szemcsék belsejébe, azok tovább maradnak az oszlopon, nagyobb oldószertérfogattal eluálódnak, mint a gélbe behatolni képtelen, a gél pórusainál nagyobb molekulák. Mivel egy gél pórusai mindig inhomogének, a géلكromatográfia során a gél pórusainál **kisebb és nagyobb molekulatömegű** tartományba tartozó **fehérjemolekulák egymástól elválaszthatók**.

A kromatografálást háromdimenziós rácsot alkotó, térhálós szerkezetű géleken végzik. A térháló mechanikai stabilitást nyújt a gélnek, és a háromdimenziós térháló a gél pórusméretét is meghatározza. A gél mátrixának inertnek kell lennie, azon ioncsoportok nem vagy csak kismértékben lehetnek jelen. A gélnek mechanikailag és kémiailag stabilnak kell lennie, a gél és az elválasztani kívánt anyagok között legfeljebb gyenge, reverzibilis, hidrofób kölcsönhatások alakulhatnak ki.

A gél szemcsemérete lehetőleg homogén legyen, hogy az eltérő méret miatt a részecskék közötti csatornák inhomogenitása ne következzen be. A kromatográfiás műveletekhez használt gélek kereskedelmi forgalomban kaphatók, és szinte minden elválasztáshoz megtalálható az optimális gél típus.

A géلكromatográfia **legfőbb alkalmazási területei a gyors molekulatömegmérés, a preparatív csoportszeparálások a molekulatömeg alapján, az egyes csoportok preparatív frakcionálása, és a peptidek, valamint a fehérjék géلكromatográfiás tisztítása.** Aminosavak is szétválaszthatók géلكromatográfiával, azonban e módszer pontossága, illetve hatékonysága meg sem közelíti az ioncserés oszlopkromatográfiás vagy a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározását.

4.3.1.13. A fehérjék rétegekromatográfiája

A kromatográfiás módszerek közül a rétegekromatográfia a planáris módszerek csoportjába tartozik. Valójában egy „planáris” oszlopról van szó, ezért az oszlopmódszerek és a planáris módszerek között elvi alapokat tekintve gyakorlatilag alig van különbség. Az oszlopkromatográfia felbontóképessége ugyan jelentősen nagyobb, mint a rétegekromatográfiáé, ennek ellenére a rétegekromatográfiának számos előnye van az oszlopkromatográfiával szemben.

- A rétegekromatográfiával elválasztott vegyületek vizuálisan értékelhetők, a szétválasztott vegyületek kimutatására szelektív és specifikus színreakciók alkalmazhatók, így néhány vegyület specifikusan kimutatható a sok komponens mellett.

- Oszlopkromatográfiás elválasztáskor egyes komponensek értékelhetetlenül, irreverzibilisen az oszlophoz kötődnek; rétegekromatográfiás elválasztáskor viszont a minta összes komponenséről áttekintést kapunk.

- A rétegekromatográfiában a kromatográfiás feltételek megváltoztatása rövid időt vesz igénybe, és fő előnye még az is, hogy a legtöbb rétegekromatográfiás módszer egyszerű, olcsó berendezésekkel, rövid idő alatt ad értékes adatokat néha bonyolult anyagkeverékek esetében is.

A rétegekromatográfiás analízis során a hordozók megválasztásával lehetőség van megoszlási, adszorpciós és ioncserés rétegekromatográfiás vizsgálatokra is. A **papírkromatográfia** manapság már háttérbe szorult, ezzel szemben rendkívüli módon elterjedtek a 0,25-0,50 mm vastag **kent rétegek**, melyeket megfelelő aktiválás után lehet analitikai célokra felhasználni. A kent rétegek mellett nagyon sok cég gyárt **kész réteglapokat**, amelyek készítéséhez hordozólapnak üveglemezt és műanyag- vagy alumíniumfóliát használnak. A kész réteglapok könnyen tárolhatók, darabolhatók, egyszerűen dokumentálhatók és egyenletes, homogén réteget adnak.

A vizsgálandó oldott anyagmintákat cseppenthetjük pontban vagy sávban, megfelelő mikropipettával vagy kapillárisal. A cseppentés során meleg levegővel a foltokat vagy sávokat beszárítjuk, így a felcseppentett anyag mennyiségét

széles határok közt változtathatjuk. A felcseppentés után a réteglapokat csiszolt fedelű futtatókádba állítjuk, melynek az aljára töltjük a futtatószer-elegyet. Az oldószeranyag megfelelő távolságra jutása után a réteglapot a kádból kiemeljük, és a megszáradt rétegen a szétválasztott anyagokat saját színük, UV-fluoreszcenciájuk vagy megfelelő reagenssel való bepermetezés után, esetleg melegítéssel kombinálva mutatjuk ki.

A rétegekromatográfiában végezhetünk kétdimenziós futtatást is, sőt az egyik dimenzióban rétegelektroforézist is alkalmazhatunk. A **kétdimenziós futtatással** a komponensek szétválását, beazonosítását és mennyiségi meghatározását javíthatjuk.

4.3.1.13.1. A rétegekromatográfia alkalmazása élelmiszer-fehérjék vizsgálatára

A fehérjéket gélrétegen, szerves- és szervetlen alapú rétegeken, cellulózzrétegen, esetleg ioncserélő rétegeken is elválaszthatjuk. Az ioncserélő vékonyrétegen történő elválasztás inkább az aminosavak és a peptidok szétválasztására használható, míg a fehérjék elválasztására a gélréteg-kromatográfia a legalkalmasabb. A gélréteg készítésére általában a dextranszerű felületaktív és az akrilamid alapú szintetikus géleket használjuk. A gélrétegeket általában üveglapokon 0,5 mm vastagságban rétegenként szerkezettel készítik. A kész rétegek 15-20 perces szabad levegőn történő állás után felhasználhatók kromatográfiai vizsgálatokhoz, illetve nedves kamrában hosszabb ideig tárolhatók, ha a mikroorganizmusoktól a réteget meg tudjuk védeni. A vizsgálandó fehérjemintából 1-5 μl -t viszünk a gélrétegre kapilláris vagy mikropipetta segítségével, és célszerű, ha a vizsgálati minta mellett ismert fehérjepreparátumot is futtatunk. A gélréteg-kromatográfiai futtatókamra egy olyan egyszerű berendezés, amely az üveglap 10-20 fokos dőlésével biztosítja az anyagok optimális vándorlási sebességét, a futtatókeverék pedig megegyezik a gélkromatográfiai elválasztásokhoz használt pufferrendszerekkel. A futtatás után a gélréteglapot a futtatókamrából kiemeljük, majd elvégezzük a lapok értékelését. A színes és fluoreszkáló anyagok esetén az értékelést közvetlenül végezhetjük, a gélrétegen szétválasztott fehérjék detektálására viszont a fehérjéket különböző módszerekkel megfestjük.

A gélréteg-kromatográfia alkalmazható peptidok és fehérjék molekulatömegének meghatározására, ugyanis **a fehérjék molekulatömegének logaritmus** és egy adott rétegen, azonos idő alatt **megtett távolság között szoros az összefüggés**. Ennek alapján ismert molekulatömegű fehérjék futtatását követően megszerkesztett standardgörbe segítségével ismeretlen molekulatömegű fehérjék közelítő molekulatömege meghatározható.

A gélréteg-kromatográfia jelentős felhasználási területe a biológiai folyadékok fehérje-összetételének a meghatározása, továbbá a patológiás fehérjék detektálása. Az ilyen bonyolult keverékek vizsgálata csak kétdimenziós módszerrel lehetséges, amikor is az első dimenzióban géliszűrést, a második dimenzióban pedig elektroforézist, illetve immunodiffúziót célszerű használni. Gélréteg-kro-

matográfiával vizsgálhatók többek közt az enzimek is, melyek közül többet (pl. *tejsav dehidrogenáz*, *ornitin karbamoil transzferáz*, *glioxalát reduktáz*, *savanyú és lúgos foszfatáz*) gélkromatográfiával határoztak meg. A fehérjék elválasztására eredményesen használható a vékony gélrétegben végzett **izoelektromos fókuszálás** is, amire általában poliakrilamid gélt használnak. Ismeretes olyan módszer is, amellyel izoelektromos fókuszálás után az enzimek proteolitikus aktivitása is kimutatható.

A fehérjék elválasztására a folyadék-folyadék, valamint a folyadék-szilárd rétegekromatográfia a nagy molekulatömeg miatt nem igazán alkalmazható. Ugyan többen próbálkoztak cellulóz- és szilikagélrétegen különféle fehérjepreparátumok és enzimek szétválasztásával, a rétegekromatográfia mégis csak a lipoproteinek vizsgálatára használható a nemfehérje rész jó kromatografálhatósága miatt. Így például sikeresen megoldották a hiperlipidémiás betegek lipoproteinjeinek szétválasztását szilikagélen. Hisztonokat, festékkomplexekként, és egyéb bázikus fehérjéket is sikerült szétválasztani cellulózzrétegen.

4.3.1.14. Roncsolás nélküli fehérjemeghatározás

A **roncsolásmentes fehérjemeghatározási eljárások** közül leggyakrabban a közeli infravörös tartományban reflexión (NIR) és transzmisszió (NIT), ezen kívül N-aktiváción, illetve mágneses rezonancián (NMR) alapuló módszerekkel határozzák meg az élelmiszerek fehérjetartalmát.

Az **infravörös spektroszkópiát** kiterjedten használják élelmiszerek fehérjetartalmának meghatározására. A módszer pontossága talán még nem éri el a klasszikus és jól bevált módszerekét, azonban a minta-előkészítés és a mérés kivitelezésének egyszerűsége miatt az ilyen típusú módszerek további elterjedése várható a gyakorlatban. Az **infravörös spektroszkópia a molekulák rezgési és forgási állapotában bekövetkező változásokat méri**, hisz ezeket is a kvantumfeltételek határozzák meg, ezért információt nyújtanak a szerkezetre. A rezgési energia változásait az infravörös fény elnyelése okozza, melynek hullámhossztartománya 2500–15 000 nm között van. A közeli infravörösben (NIR) működő készülékek az 1300–2400 nm, az infravörös (IR) transzmisszióban mérők pedig az 5700–9600 nm közötti tartományban működnek. Az infravörös spektroszkópia azonban praktikus okokból nem a hullámhosszal, hanem a hullámszámmal dolgozik, ami a centiméterben kifejezett hullámhossz reciproka. Ez az infravörös tartományra 600–4000 cm^{-1} .

A rezgési színek a molekulán belüli atomok vagy atomcsoportok egymáshoz viszonyított rezgésének eredménye, melyek normál-, illetve csoportrezgések lehetnek. A **normálrezgés** lehet **vegyértékrezgés**, ami a két atom vegyértékkötése irányában történik, **deformációs rezgés**, mely a vegyértékszög változásaival jár, és **vázrezgés**, amely az egész vázra kiterjed. A **csoportrezgések** meghatározott funkció csoportok rezgései, amelyek alkalmasak lehetnek a mennyiségi meghatáro-

zásra. Az aminos- és az iminocsoport, valamint a savamid-csoport (peptidkötés) infravörös elnyelési tartományai igen széles határt ölelnek fel ($1400\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$), melyek közül kiválasztható az a hullámszám, amely a legpontosabb információt adja a fehérje mennyiségi meghatározása során.

A NIR reflexiós módszert elsősorban gabonaátvételnél, illetve olajos magvak minősítésekor alkalmazzák. A **készüléket ismert fehérje**-összetételű, aprított mintákkal kalibrálják, és meghatározzák a fehérjére jellemző hullámhosszokon az optikai denzitás változása és a koncentráció közötti összefüggést. Ezen regressziós összefüggések lehetővé teszik ismeretlen minták fehérjetartalmának meghatározását akkor, ha a kalibrációt megfelelő anyagokkal végezték, és az ismeretlen minta fehérjetartalma a kalibrációs sor értékén belül esik. **Célszerű a kalibrációt minden élelmiszer-alapanyaggal külön-külön elvégezni**, és az ismeretlen minta analízisét a tulajdonságokban hozzá legközelebb eső kalibrációs összefüggésre vonatkoztatni. Korábban a NIR-technikát elsősorban gabonamagvak és különböző olajos magvak fehérjetartalmának meghatározására használták, ma azonban már bonyolultabb összetételű élelmiszereket, sőt a tejet is lehet minősíteni vele.

A **közeli infravörös tartományban transzmissziót** alkalmazó technikát (NIT) csak a közelmúltban fejlesztették ki, de máris több gyártó alkalmazza ezt az elvet a kifejlesztett készülékekben. A módszer **a mintán átmenő sugárzásból következtet a komponensek minőségére és mennyiségére**, ami korábban nem tapasztalt pontosságot eredményezett. A monokromátor segítségével egy teljes spektrumot vesznek fel, ami szintén növeli a pontosságot az egy-két hullámszámnál felvett adatokhoz képest. A módszer nem érzékeny a környezeti feltételekre, ezért szélsőséges körülmények között (pl. alacsony vagy magas hőmérséklet) is pontos eredményeket ad.

Amennyiben nemcsak mennyiségi analízist, hanem **szerkezetvizsgálatot is akarnak végezni**, akkor az infravörös spektrum felvételéhez a szilárd anyagot alkáli-halogenidekkel (NaCl, KBr) porrá őrölve pasztillákba préselik, folyadékok esetében pedig két nátrium-klorid ablak között vékony filmet képeznek. Az említett alkáli-halogenideknek nincs infravörös abszorpciójuk. Ezt követően felveszik az infravörös spektrumot a $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ hullámszámtartományban, majd azonosítják a mérendő vegyületet a hullámszámokhoz rendelhető funkciós csoportok megállapításával. A funkciós csoportok számának és helyzetének spektrumból történő megállapítása után összeállítható az ismeretlen molekula szerkezeti képlete. Az infravörös spektroszkópia tehát használható ismeretlen szerves anyagok molekulaszervezetének megállapítására, illetve a funkciós csoportok alapján élelmiszerek összetételének meghatározására.

Az **N-aktivációs módszer** lényege, hogy a nitrogéntartalmú anyagokat gyors neutronokkal bombázzák, aminek következtében a neutronok energiájának hatására a kötésben lévő nitrogénatomok gerjesztődnek. Mivel az N-aktiválódási energia a nitrogénatomok mennyiségével arányos, így ennek mérése lehetővé teszi a nitrogéntartalmú anyagok mennyiségének meghatározását. A módszer el-

terjedését gátolja a speciális eszközök és berendezések magas ára, ezért csak ott üzemeltethető gazdaságosan, ahol nagyobb mintamennyiségekkel (1-2 kg) lehet dolgozni és nagy mennyiségű mintát kell minősíteni.

A **mágneses rezonancia** (NMR) mérésen alapuló analizátorokat elsősorban a kisfrekvenciájú (50–60 MHz) tartományban használják fehérjeanalízisre. A berendezés rendkívül gazdaságosan használható, és segítségével nemcsak a mennyiségi meghatározás végezhető el, hanem a kristályosodási tulajdonságokra, valamint a kötési módokra és energiákra is információt kaphatunk.

4.3.1.15. A fehérje aminosav-összetételének meghatározása

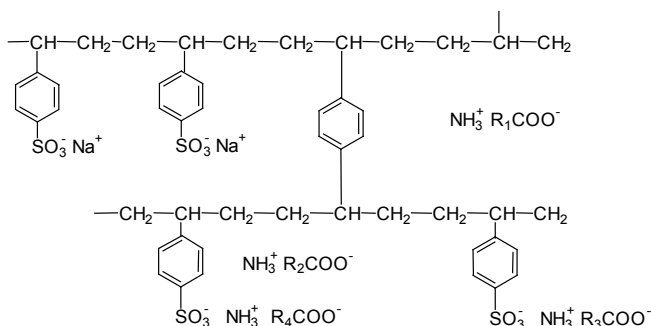
Élelmiszerek aminosav-összetételét a fehérje hidrolízise után, az ioncserés oszlopkromatográfia elvén működő automatikus aminosav-analizátorral, oszlop utáni származékképzéssel, a folyadékkromatográfia elvén működő nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával oszlop előtti származékképzéssel és fotometriásan határozhatjuk meg. A táplálkozással foglalkozó szakemberek számára rendkívül fontos a fehérje aminosav-összetételének ismerete, hisz az ember az esszenciális aminosavakat nem tudja előállítani, a nem fehérje nitrogén hasznosítására pedig gyakorlatilag nem képes. Optimális összetételű élelmiszerek előállítása csak az élelmiszer esszenciális, illetve a limitáló aminosavai ismeretében lehetséges. Az élelmiszerek aminosav-összetétele ismeretében – tudva az ember aminosav-szükségletét – biztosítani lehet az optimális fehérje- és energiaellátást.

Mind az ioncserés oszlopkromatográfia (IEC), mind a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia (továbbiakban HPLC) a kromatográfias elválasztások közé tartozik. E módszerek a szétválasztani kívánt komponensek eltérő szorpciós és deszorpciós tulajdonságain alapulnak. Ismerünk gáz-szilárd, gáz-folyadék, folyadék-szilárd, illetve folyadék-folyadék kromatográfias elválasztási műveleteket. Az IEC a folyékony-szilárd, a HPLC a folyékony-folyékony oszlopkromatográfias módszerek csoportjába tartozik. A kromatográfias módszereknél az adszorpció, a megoszlás, illetve az ioncsere bír legnagyobb jelentőséggel. Mindegyik módszernél követelmény, hogy az állófázis – szorbens oszlop – oldhatatlan legyen a mozgófázisban, a szorbens irreverzibilisen ne kösse meg az elválasztandó anyagokat, ne bontsa el irreverzibilisen azokat, és ne lépjen reakcióba az eluáló oldattal. A kromatográfia mindegyik típusa tulajdonképpen az oldószer (mozgófázis) haladási irányában az oszlopon keresztül egymás után bekövetkező szorpciós és deszorpciós folyamatok sorozata.

4.3.1.15.1. Az aminosav-összetétel meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával

Az IEC állófázisa mindig valamilyen ioncserélő anyag, amelynek vázán (mátrixán) kovalens kötéssel, elektrolitos disszociációra képes savas vagy bázisos jel-

legű **aktív csoportok** vannak. Ha az aktív csoport negatív töltésű savmaradék, **kationcserélő**, ha pozitív töltésű ion, akkor **anioncserélő gyantáról** beszélünk. Az ioncserés elválasztást meghatározza a kromatografálás hőmérséklete, az eluálóoldat ionkoncentrációja és pH-ja. Az ioncserélő oszlophoz Coulomb-féle erővel kötött szerves anyagok az elektrosztatikus kölcsönhatáson kívül apoláros adszorpcióval és hidrogénhidakkal is kötődhetnek. Az aminosavak (amfoter jellegűeknek köszönhetően) savas körülmények között pozitív ionok, amelyek szétválasztását Na-formában lévő, divinil-benzollal 4-8%-ban térhálósított szulfonált polisztirol műgyantán lehet elvégezni. Az ioncsere a következőképpen megy végbe:



Az aminosavak a molekula szerkezetétől és a benne lévő funkcionális csoporttól függően különböző erővel kötődnek az ioncserélő oszlop negatív töltésű szulfonsavcsoportjaihoz. Az ioncserélőn kötődött aminosav-molekulák szorpciója és elúciója folyamán különböző intenzitással jut érvényre az aminosavak sajátos töltése, pK-ja, molekulatömege és oldalláncának poláros vagy apoláros volta. Mindezen tulajdonságok együttes következménye **az aminosavak deszorpciós sorrendje**, amelyet **befolyásol a hőmérséklet, az eluáló pufferek pH-ja, valamint kationkoncentrációja**. A kromatográfia pontosságát meghatározza az ioncserélő műgyanta összetétele is, mely a divinil-benzol-koncentrációval, a gyanta méretével és a gyantából készült oszlop nagyságával szabályozható. Az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiájához **divinil-benzollal különféle mértékben térhálósított szulfonált polisztirol műgyantát használnak, amelynek aktív csoportjai, a szulfonsavak lehetnek hidrogén, nátrium vagy lítium formában**. Az élelmiszerek aminosav-összetételének meghatározása IEC-vel az alábbi folyamatokat foglalja magába:

- a vizsgálati anyag előkészítése,
- a minta hidrolízise, a hidrolizátum feldolgozása,
- az aminosavak szétválasztása IEC-vel,
- az aminosavak mennyiségi meghatározása fotometriásan,
- az eredmény számolása, értékelése.

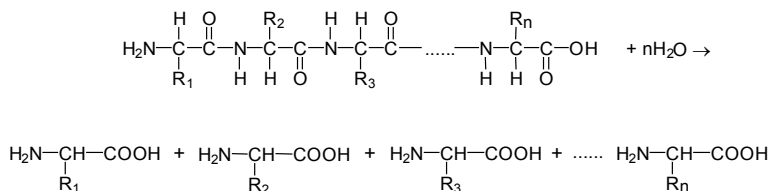
A felsoroltakból adódóan az aminosav-analízis lényege a következő: a megfelelően előkészített (aprított, homogenizált) vizsgálandó anyagban lévő fehérjét sósavval hidrolizáljuk, a hidrolizátum feldolgozása után az aminosavakat egymástól ioncserés oszlopkromatográfiával elválasztjuk, a szétválasztott aminosavat ninhidrinnel reagáltatjuk, a színintenzitás mérésével – ismert koncentrációjú ún. standard aminosavakhoz hasonlítva – az aminosav mennyiségét mérjük (4.28., 4.29., 4.30., 4.31., 4.32. ábra). A folyamatok részletesebben az alábbiak.

A vizsgálati anyag előkészítése

Folyékony minta esetében (tej, vérszérum) turmixgépben, szilárd minta esetében darálással olyan homogenitást, illetve aprítottságot kell elérni, hogy az aminosav-analízishez felhasznált mintamennyiség (10-100 mg) az egész vizsgált anyagot jól reprezentálja. Szilárd minta esetén a szemcseméretnek 0,1 mm-nél kisebbnek kell lennie. Amennyiben nagyobb pontosságra törekszünk, akkor a folyékony mintát kémiletesen szárítjuk, liofilezzük, majd a száraz őrleményből végezzük a bemérést. Ha a minta zsírtartalma meghaladja az 5%-ot, úgy azt Soxhlet-extrakcióval kivonjuk, majd zsírtartalmát az eredmény számolásánál figyelembe vesszük.

A minta hidrolízise, a hidrolizátum előkészítése analízisre

A fehérjék aminosav-összetételének megállapításához a polipeptidláncot alkotó aminosavakat a kötéseikből hidrolízissel fel kell szabadítani. A polipeptidlánc hidrolízisének vázlata a következő:



A fehérje aminosav-összetételének meghatározásakor használt különböző hidrolízismódszerek közül csak olyannak van jelentősége, amely:

- teljes hidrolízist ad, tehát az összes aminosav a legstabilabb kötésekből is felszabadul,

- az egyes aminosavakat nem vagy a lehető legkisebb mértékben károsítja,
- és az alkalmazott reagens nem hoz létre mellékreakciókat.

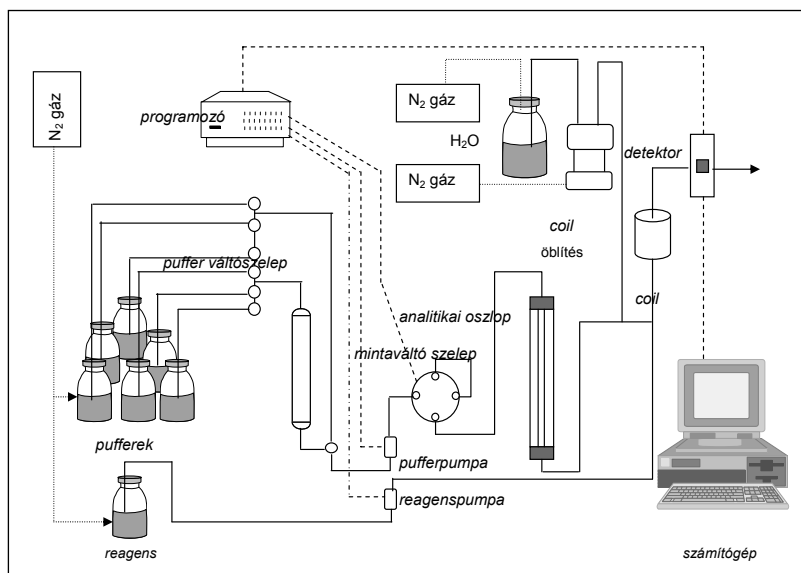
A fehérje teljes hidrolízisére ma leggyakrabban a savas hidrolízises módszereket alkalmazzák, csak a triptofán meghatározása során alkalmaznak lúgos hidrolízismódszert, mert a triptofán indolcsoportja savas körülmények között gyakorlatilag kvantitatíve elbomlik. Enzimes hidrolízist aminosav-meghatározásra

csak ritkán használnak, annak ellenére, hogy ez az eljárás károsítja legkevésbé a meghatározni kívánt aminosavakat.

A gyakorlatban leginkább elterjedt 6 M-os sósavas hidrolízis rövid leírása: 10 cm³-es orvosi ampullába a nyersfehérje-tartalomtól függően bemérünk 10-50 mg megfelelően előkészített mintát, majd 5 cm³ 6 M-os, előzetesen nitrogénnel átbuborékolgatott sósavat adunk hozzá. Leforrasztás után 110 °C-on (± 2 °C) 24 órán át hidrolizáljuk, majd az ampulla tartalmát desztillált vízzel 50 vagy 100 cm³-es gömblombikba mossuk át, és rotációs gyorsbepárlón (nitrogén-atmoszférában) 50 °C-os vízfürdőt alkalmazva, szárazra pároljuk. A sűrűn folyós desztillációs maradékot pH = 2,2-es citrát-pufferben oldjuk fel, majd 25 cm³-es mérőlombikba töltjük, finom pórusú szűrőpapíron, esetleg zsugorított üvegszűrőn szűrjük. A kapott oldat, amely -25 °C alatt mélyhűtő pultban hónapokig tárolható, megfelelő hígítás után kész az aminosavak analízisére. Nagy fehérjetartalmú minták esetén az oszlopra történő felvitel előtt a hidrolizátumot nagymértékben hígítani kell. Desztilláció helyett alkalmazható az ún. közömbösítőes módszer is. Ekkor az ampulla tartalmát pH = 2,2-es citrát-pufferrel 50 cm³-es mérőlombikba mossuk át, és a hidrolizátum pH-ját 4 M NaOH-dal, jeges vízben való hűtés mellett, pH = 2,2-re állítjuk be. A fehérje hidrolízise során a triptofán indolcsoportja gyakorlatilag kvantitatíve elbomlik, a glutamin és az aszparagin savamidcsoportja ammóniára és a kérdéses aminosavra hasad, a szerin 10-15, a treonin 10-20%-ban bomolhat, a cisztein és a cisztein, valamint a metionin oxigén jelenlétében cisztein-szulfinsavvá és -szulfonsavvá, továbbá metionin-szulfoxiddá és -szulfonná alakulhat. A ciszteinből alanin és szerin, szénhidrátok jelenlétében glicin, a metioninból pedig homocisztein, homocisztin és glicin képződhet. Minimális mennyiségű bomlást szenvedhet a tirozin, a glutaminsav, az aszparaginsav, a prolin és az arginin is. Külön figyelmet érdemel a valin, az izoleucin és a leucin, mert ezen aminosavak kötéseik rendkívül nehezen szakadnak fel a hidrolízis során.

Az aminosav szétválasztása ioncserés oszlopkromatográfiával

Az aminosav szétválasztását nátrium formában lévő divinil-benzollal 4%-ban térhálósított szulfonált polisztirol műgyantán végezzük növekvő pH-jú és növekvő nátriumion-koncentrációjú citrát-pufferek segítségével. Ennek során **a savas és hidroxil-aminosavak gyorsabban, a bázikus aminosavak lassabban válnak le az ioncserélő oszlopról, a semleges aminosavak pedig közbülső értéket foglalnak el a két szélső csoport között.** Az aminosavakat pH = 2,2-es pufferben visszük fel az ioncserélő oszlopra, ezután a savanyú és semleges aminosavak szétválasztását 0,2 M pH = 3,25 és pH = 4,25 nátrium-citrát pufferekkel, a bázikus aminosavak szétválasztását pedig – az aminosav-analizátor típusától függően – 0,35-0,85 M nátriumion-koncentrációjú pH = 5,28-6,50 pufferekkel végezzük. Az alkalmazott kromatografálási feltételek mellett (pufferösszetétel, hőmérséklet, áramlási sebesség) az aminosavak mindig ugyanolyan sorrendben eluálódnak az oszlopról; tehát elsőként mindig a legsavasabb aszparaginsav, utolsónak pedig a legbázikusabb



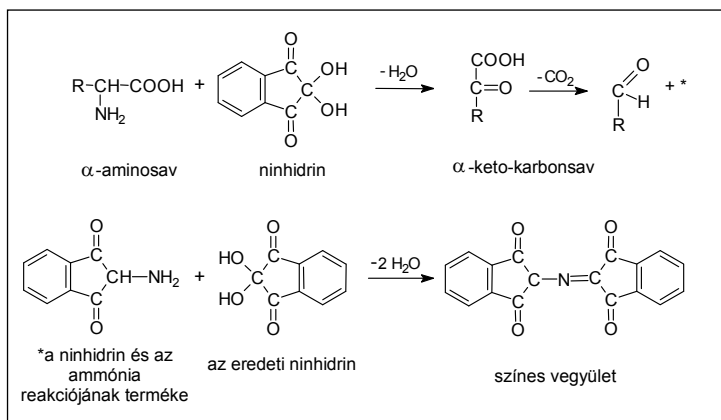
4.28. ábra. Az aminosav-analizátor sematikus rajza

arginin távozik. A pufferek pH-jának és nátriumion-koncentrációjának, valamint a kromatografálás hőmérsékletének változtatásával az aminosavak elúciós sorrendje megváltoztatható, illetve az elúciós idők optimálhatók.

Az aminosav és a ninhidrin reakciója

Az aminosavak oldata színtelen, ezért a meghatározáshoz az aminosavakat színessé kell tenni. **Az ioncserélő oszlopról távozó aminosavakat a keverőblokkban ninhidrinnel reagáltatva kékes, ibolyás-lilás színű vegyületet kapunk.** A ninhidrinoldattal összekevert aminosavakat tartalmazó puffer egy tefloncsőben 15-20 percet tölt el 100 °C-on, amelynek során a pH = 5,5. Az aminosavakkal létrejött szín intenzitását átfolyó küettás fotométerben, 570 nm-en mérjük, kivéve a prolint, amelyet 440 nm-en fotometrálunk, mert a prolin és a ninhidrin közti színreakció sárga színű vegyületet eredményez, amely vegyület fényelnyelési maximuma 440 nm. Az aminosavak és a ninhidrin közti reakció leegyszerűsítve az alábbiak szerint megy végbe.

A vázolt reakció lényege, hogy a ninhidrin az első lépésben az aminosavat α -iminosavvá dehidrogénezi, majd az iminosav ammóniává és α -ketosavvá hidrolizál. A dehidrogénezést kiváltó redukált ninhidrin és egy másik molekula ninhidrin az ammóniával kondenzációs reakcióba lép; az így képződött kondenzációs termék, ill. annak módosulata a színes vegyület (4.29. ábra).



4.29. ábra. Az aminosavak és a ninhidrin reakciója

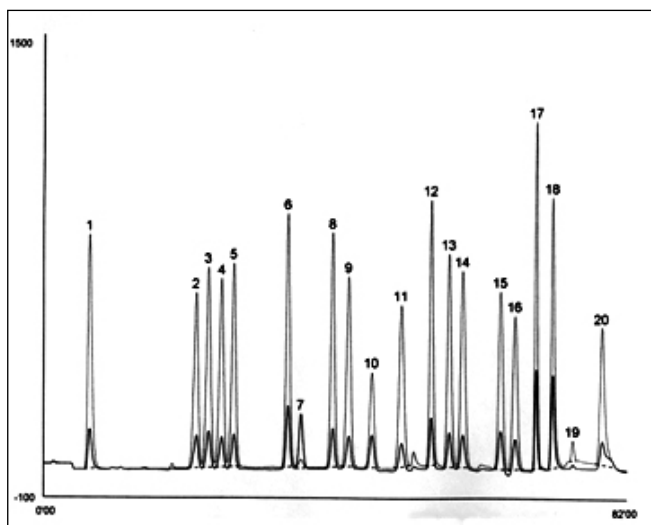
Az aminosav minőségi és mennyiségi meghatározása

Az ioncserélő oszlopról távozó, pufferben lévő aminosavak reakciója a ninhidrinnel a forró vízbe merülő teflonspirálban lejátszódik, majd a színes oldat a fotométer átfolyóküvetáján halad át. A fotométer által érzékelt fényabszorpciót a kompenzográf regisztrálja, amelynek eredménye a kromatogram. A kromatogramon a csúcs helye mindig az aminosavra, a csúcs nagysága, illetve a csúcs alatti terület pedig az aminosav koncentrációjára jellemző, azaz a kromatogramon az első csúcs mindig az aszparaginsavhoz, az utolsó az argininhez tartozik, a csúcs nagysága pedig attól függ, hogy az aszparaginsav, illetve az arginin kis vagy nagy koncentrációban van-e jelen a mintában. Az aminosav-analízissel tehát el tudjuk dönteni, hogy milyen aminosavak vannak jelen a mintában (a csúcs helye alapján), és azt, hogy a jelen lévő aminosavnak milyen a koncentrációja. Az elkészült kromatogram csúcsainak megfelelő aminosav-mennyiségek kiszámítását ma már integrátorral, számítógéppel végezzük. Korábban megállapítottuk:

- az egyes csúcsok tényleges magasságát, a félmagasságnál mért szélességet, és kiszámítottuk a csúcs alatti területet,
- az egy csúcsához kapcsolható aminosav-mennyiségeket a standard kromatogram értékeihez viszonyítva számítjuk ki,
- végül az egyes aminosavat az eredeti mintára vonatkoztatva tömegszázalékban (g aminosav/100 g minta) adjuk meg.

A 4.30. ábra egy perhangyasavas oxidáció utáni fehérjehidrolizátum aminosavait mutatja, a 4.31. ábrán pedig egy fiziológiás oldat szabad aminosavainak meghatározása látható.

Amennyiben nemcsak az élelmiszerekben lévő aminosav mennyiségéről, hanem az élelmiszer-fehérje minőségéről is szeretnénk információt kapni, akkor az aminosav-összetételt g aminosav/100 g fehérje vagy g aminosav/16 g N egységben



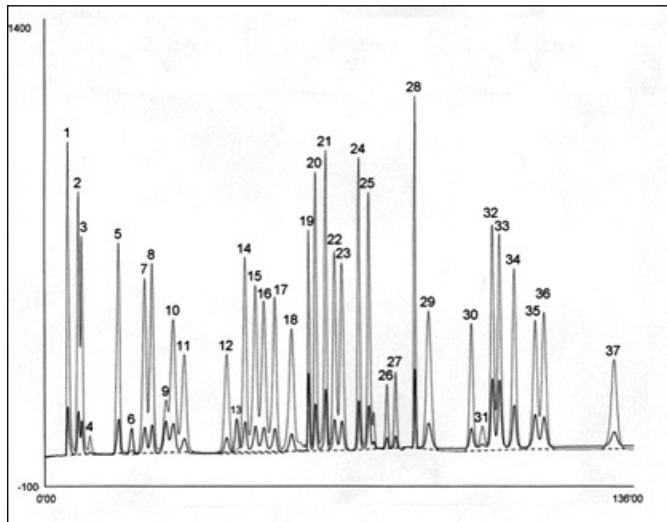
4.30. ábra. A fehérjealkotó aminosavak kromatogramja perhangyasavas oxidáció után. A számokhoz tartozó aminosavak a következők: 1. ciszteinsav, 2. metionin-szulfon, 3. aszparaginsav, 4. treonin, 5. szerin, 6. glutaminsav, 7. prolin, 8. glicin, 9. alanin, 10. cisztin, 11. valin, 12. metionin, 13. izoleucin, 14. leucin, 15. tirozin, 16. fenilalanin, 17. hisztidin, 18. lizin, 19. ammónia, 20. arginin

adjuk meg, amely megmutatja, hogy az élelmiszerekben lévő fehérje 100 grammja hány g aminosavat tartalmaz. Ezen az alapon az összes élelmiszer-fehérje összehasonlítható, hisz a vonatkoztatási alap minden esetben a fehérje.

Az aminosav-analízis érzékenységének növelésére ninhidrin helyett o-ftáldehidet is használhatunk az aminosavak oszlop utáni származékának képzésére, mellyel az aminosav-analízis érzékenységét fokozhatjuk.

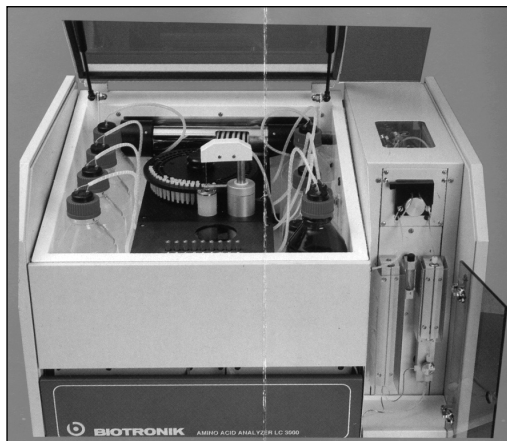
4.3.1.15.2. Az aminosav-összetétel meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiát olyan nagyobb molekulatömegű, hőérzékeny anyagok vizsgálatára dolgozták ki, amelyek egyéb kromatográfias eljárásokkal (gázkromatográf, IEC) nem vagy csak nehezen vizsgálhatók. A nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiánál **az állófázis valamilyen nagy viszkozitású folyadék vagy nagy felületű anyag**, amelyet általában rozsdamentes acélcsőbe préselnek, amelyen keresztül az oldószert pumpa segítségével, nagy nyomáson áramoltatják. **Amennyiben az eluens kevésbé poláros, mint az állófázis, normál fázisú kromatográfiáról, és amennyiben az eluens polárosabb, mint az állófázis, fordított fázisú kromatográfiáról beszélünk.** Az eluens folyamatosan áramlik keresztül az oszlopon, melybe a mintaadagoló se-



4.31. ábra. Egy fiziológias oldat szabad aminosavainak meghatározása lítiumpufferek alkalmazásával

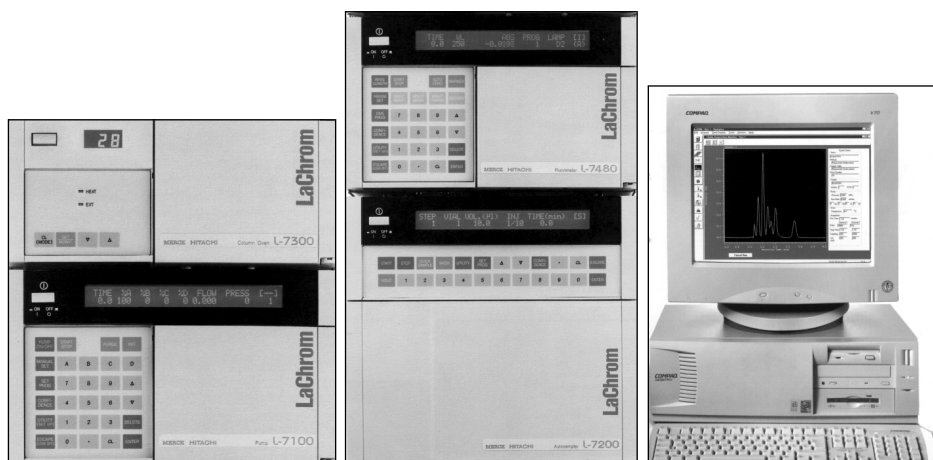
A számokhoz tartozó aminosavak a következők: 1. ciszteinsav, 2. taurin, 3. foszfoszerin, 4. karbamid, 5. aszparaginsav, 6. hidroxiprolin, 7. treonin, 8. szerin, 9. aszparagin, 10. glutaminsav, 11. glutamin, 12. α -amino-adipinsav, 13. prolin, 14. glicin, 15. alanin, 16. citrullin, 17. α -amino-vajsav, 18. valin, 19. cisztin, 20. metionin, 21. cisztation, 22. izoleucin, 23. leucin, 24. tirozin, 25. fenilalanin, 26. β -alanin, 27. β -amino-izovajsav, 28. γ -amino-vajsav, 29. klór-fenilalanin (belső standard), 30. etanolamin, 31. ammónia, 32. ornitin, 33. lizin, 34. hisztidin, 35. 1-metil-hisztidin, 36. 3-metil-hisztidin, 37. arginin.



4.32. ábra. Egy Biotronik aminosav-analizátor



4.33. ábra. Különböző HPLC-oszlopok és a töltet

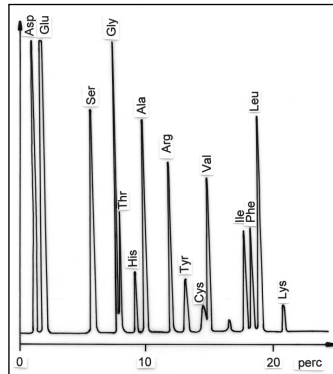


4.34. ábra. LaChrom nagyhatékonyságú folyadékkromatográf

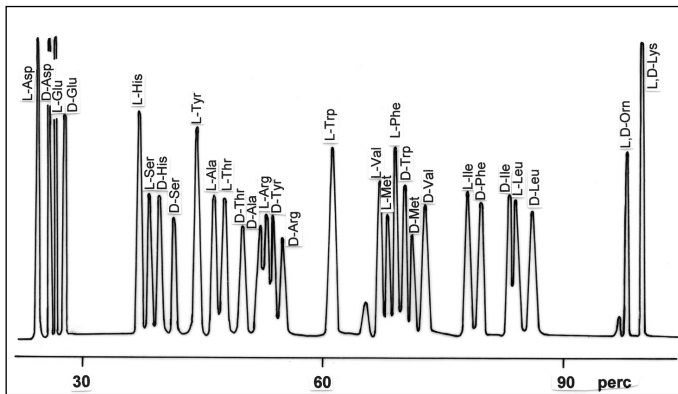
gítségével juttatjuk be a szétválasztani kívánt komponenseket (4.33., 4.34. ábra). Az egyes komponensek eltérő sebességgel haladnak keresztül az oszlopon, és optimális esetben egymástól jól elkülönülve jelennek meg a HPLC-oszlop végén, ahol különböző módszerekkel detektálhatók. **A detektor lehet látható vagy ultraibolya fotométer, de lehet fluoreszcenciás, elektrokémiai, esetleg törésmutató mérőműszer is.** A detektort mindig a szétválasztandó komponensek tulajdonságai alapján választják meg.

Az aminosavak meghatározhatók nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával, oszlop előtti származékképzéssel, amelyre az o-ftálaldehidet, a fluorenilmetil-kloroformátot és a fenil-izotiocianátot használják a legszélesebb körben. Detektálásra leginkább a fluoreszcens detektort használják, amelynek érzékenysége jobb, mint a látható, illetve UV-tartományban mérő detektoroké. Egy tipikus oszlop előtti származékképzéssel és HPLC-n történő szétválasztással kapott kromatogramot mutat a 4.35. ábra.

Amennyiben az oszlop előtti származékképzésre használt reagens egy királis szénatomot is tartalmaz, akkor lehetőség van a D- és az L-aminosav enan-

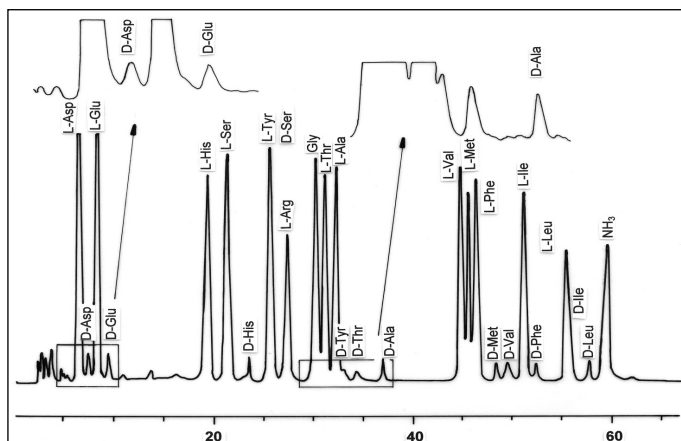


4.35. ábra. Az aminosavak szétválasztása oszlop előtti származékképzés után HPLC-vel



4.36. ábra. Az aminosav-enantiomerek szétválasztása OPA/TATG-származékképzés után

tiomerek szétválasztására és meghatározására nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával. A D- és L-aminosavak származékképzésére leggyakrabban ebben az esetben az 1-(9-fluorenil)-etil-kloroformátot (FLEC) és az orto-ftáaldehidet, valamint a 2,3,4,6-tetra-O-acetil-1-tio- β -D-glükopiranozidot (OPA/TATG) használják (4.36. ábra). Ezekkel a módszerekkel nemcsak azt tudjuk megmondani, hogy mennyi aminosav van jelen a mintában, hanem azt is mérni tudjuk, hogy a mintában milyen az L- és a D-aminosav koncentrációja. Ez különösen azért fontos, mert a különböző technológiai beavatkozások (magas hőmérséklet, lúgos kezelés, detoxikáció) hatására az L-aminosavak egy része átalakulhat D-aminosavvá, amelyeket az ember és a legtöbb állat nem tud hasznosítani, sőt káros hatásait is kimutatták az élő szervezetre. A D- és L-aminosavak szétválasztására és meghatározására végzett analízis eredményeit mutatja a 4.36. ábra.



4.37. ábra. A kis mennyiségű D-aminosavak meghatározása a nagy mennyiségben jelen lévő L-aminosavak mellett

A legtöbb alkalmazás során csak néhány aminosav D- és L-enantiomerére vagyunk kíváncsiak, és nincs szükség az összes fehérjealkotó aminosav D- és L-enantiomerének szétválasztására és meghatározására. Ezért a mozgófázis pH-jának és ionerősségének megváltoztatásával vagy másik szerves oldószer alkalmazásával és esetleg az analitikai oszlop méretének és töltésének változtatásával lehetőség van arra, hogy a kérdéses aminosav-enantiomer(ek)e)t szét tudjuk választani és meg tudjuk határozni. Természetesen ilyenkor minden alkalommal el kell végezni a rendszer optimalizálását a szükséges aminosav(ak)ra.

A 4.37. ábrán egy ilyen optimalizálás látható az aszparaginsav és a glutaminsav, valamint az alanin enantiomerének szétválasztására. A D-aszparaginsav és a D-glutaminsav, illetve a D-alanin a bakteriális fehérjeszintézis markerei, hisz a baktériumok sejt falának peptidoglikánjai jelentős mennyiséget tartalmaznak e három aminosavból. Ebből a kromatogramból azonban az is látszik, hogy hús-szoros mennyiségű L-aminosav mellett nem okoz gondot a D-aminosavak elválasztása és meghatározása a hagyományos fluoreszcens detektor alkalmazásával. A D-aminosavak meghatározásának alsó határa fluoreszcens detektorral ebben a rendszerben 0,2-0,5 nM között van, bár a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav esetén ez a koncentráció kisebb 0,1 nM-nál, a lizinnél pedig 2 nM körül alakul.

4.3.1.15.3. Az aminosav-összetétel meghatározása fotometriásan

4.3.1.15.3.1. A metionintartalom meghatározása

A platincsoport fémei színes komplex jodidokat képeznek, amelyek szerves szulfidokkal vagy merkaptó-vegyületekkel (metionin és cisztein) elszintelenednek, a kéntartalmú vegyületnek mint ligandumnak a platinnal képzett komplexei révén.



A színes reagensoldat a metionintartalommal arányosan színtelenedik el, mivel a cisztein befolyása egyrészt kisebb a platina-jodid komplexre, mint a metioniné, másrészt a cisztein a feleslegben adott formaldehiddel leköthető, így záró hatása kiküszöbölhető.

A meghatározás során az aminosavak ioncserés oszlopkromatográfiájánál leírt hidrolizátum pH-ját 4 M NaOH-dal jeges vízben való hűtés mellett, pH = 8-10 körüli értékre állítjuk be, majd desztillált vízzel 25 cm³-es mérőlombikba mossuk, jelig töltjük, és finom pórusú szűrőpapíron leszűrjük. Ebből az oldatból 1 cm³-t csiszolt dugós kémcsőbe pipettázunk, és 0,33 cm³ maszkírozó oldatot (50 cm³ 40%-os formaldehid-oldatot borát pufferrel 200 cm³-re egészítünk ki) mérünk hozzá. Összerázzuk, 1 cm³ 2 : 1 hígítású HCl-oldatot és 2 cm³ reagenst (15 cm³ 0,1% hexaklór-platinasav oldathoz 15 cm³ 3%-os kálium-jodid-oldatot adunk, és az elegyet desztillált vízzel 200 cm³-re töltjük fel) adunk a mintához (M). A reagensmintával egyidejűleg vakmintát is készítünk, ahol a reagens helyett 2 cm³ desztillált vizet adunk az elegyhez (MV). A „kiindulási” szín meghatározásához a minta helyett borátpuffert (38,14 g Na-tetraborátot és 0,3 g CaCl₂ · 2 H₂O-t feloldunk 500 cm³ desztillált vízben, pH = 8,0, majd 1000 cm³-re töltjük fel) mérünk be (A). 10 perc elteltével mind a három oldat fényelnyelését egy órán belül 490 nm-en mérjük borátpuffer vakkal szemben. A kiértékeléshez az előző leírás szerint olyan kalibrációs görbét készítünk, amelyhez 10, 20, 30, 40 és 50 μg metionin/cm³ töménységű oldatokat használunk fel. A különböző töménységű metioninoldatok színtelenítő hatását a „kiindulási” szín és az egyes standardpontok abszorbancia-különbségeként ábrázoljuk a metioninkoncentráció függvényében.

Az eredmény az ismétellhetőség követelményének megfelelő két párhuzamos mérés számtani átlaga az eredeti mintára vonatkoztatva, tömegszázalékban kifejezve. A „kiindulási” szín és a minta vakértékével csökkentett vizsgált oldat abszorbanciakülönbségéből $[E_A - (E_M - E_{MV})]$ a kalibrációs görbe segítségével határozzuk meg a mintaoldat metioninkoncentrációját az alábbi képlet segítségével:

$$\text{Metionintartalom}\% = \frac{C \cdot H}{m \cdot 10^4},$$

ahol: C – a mintaoldat metioninkoncentrációja (μg/cm³),

H – a vizsgált minta hígítása (cm³),

m – a vizsgált minta tömege (g).

A minta zsírtalanítása, szárítása esetén a megfelelő faktorokat alkalmazva számítjuk ki az eredményt, melynek legnagyobb eltérése két párhuzamos mérés esetén az eredmény 10%-a lehet.

4.3.1.15.3.2. A cisztintartalom meghatározása

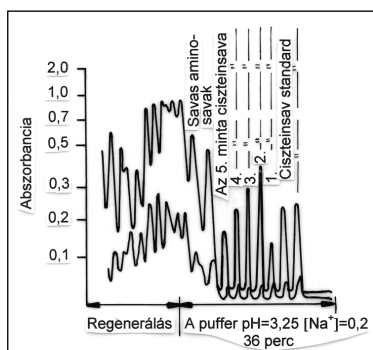
A cisztintartalmat egy gyors ioncserés oszlopkromatográfias módszerrel, illetve fotometriás úton is meg tudjuk határozni.

A cisztintartalom meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával

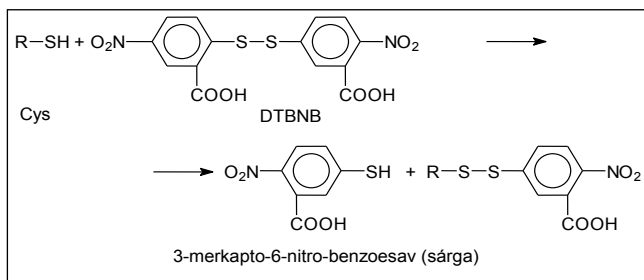
A módszer alkalmas élelmiszerek cisztintartalmának meghatározására. Mivel a kéntartalmú aminosavak, és ezek közül is leginkább a cisztin rendkívül hajlamos az oxidációra, ezért az analízis közben fellépő veszteség elkerülése érdekében célszerű a kéntartalmú aminosavakat oxidált formában, így a cisztint ciszteinsav formában meghatározni. A fentiek miatt a fehérje hidrolízise előtt perhangyasavas oxidációval a cisztint és a ciszteint ciszteinsavvá alakítjuk át, majd a ciszteinsavat ioncserés oszlopkromatográfiával aminosav-analizátorral határozzuk meg.

A vizsgálati eljárás során 10 cm³-es ampullába (melyben a fehérje hidrolízise történik) a megfelelően előkészített mintából a várható cisztintartalomtól függően 30-40 mg-ot mérünk be, 0,4 cm³ perhangyasavat pipettázunk hozzá, és 15 percre 50 °C-os vízfürdőbe merítjük. Ezt követően -25 °C-ra mélyhűtőben lehűtjük, megfagyasztjuk, a perhangyasavat fagyasztva szárítással (liofilezés) eltávolítjuk. (A perhangyasavat a következőképpen állítjuk elő: egy kémcsőbe 9:1 arányban elegyítünk 85%-os hangyasavat és 30%-os hidrogén-peroxidot, 3 percre 50 °C-os vízfürdőbe merítjük, majd szobahőmérsékletűre hűtjük, frissen használjuk.) A perhangyasavval oxidált mintát 5 cm³ 6 M-os sósavval 24 órán át 110 (±2) °C-on hidrolizáljuk, majd a sósavat rotációs gyorsbepárlón ledesztilláljuk, vagy a hidrolizátum pH-ját 4 M NaOH-oldattal pH=2,2-re állítjuk be.

A ciszteinsav meghatározását egy olyan mintaadagolóval ellátott bármely aminosav-analizátorral elvégezhetjük, amelynél lehetséges az áramlási paraméterek lényeges megváltoztatása nélkül egymás után több mintát juttatni az ioncserélő oszlopra (4.38. ábra). Amennyiben csak 1 minta ciszteinsav-tartalmát határozzuk meg, akkor a ciszteinsav és az aszparaginsav között egy olyan üres területet kapunk a kromatogramon, ahova még az áramlási paraméterek figyelembevételével további 3-5 minta ciszteinsavának csúcsa beférne. A fenti lehetőségekkel élve 2-3 percenként öt különböző, perhangyasavval oxidált mintát juttatunk az ioncserélő oszlopra, és az 5. minta ciszteinsav csúcsának megjelenése után – mivel itt már megjelenik az első minta aszparaginsav csúcsa – az analízist megszakítjuk, az ioncserélő oszlopot regeneráljuk, equilibráljuk, és folytatjuk a további minták analízisét. Gyakorlati szempontból célszerű egy ciszteinsav standarddel indítani a meghatározást, amelyet 4-5 minta betáplálása követ az aminosav-analizátor ioncserélő oszlopára. A minták elválasztásához az aminosav-analízisnél leírtaknak megfelelően, csak pH=3,25 nátrium-citrát puffert használunk (esetleg kissé megsavanyítva), a regenerálást 0,2 M NaOH-dal, az equilibrálást pedig ugyanezzel a pufferral végezzük. Fenti módszer alkalmazásával az élelmiszerekben esetenként igen kis koncentrációban előforduló cisztin meghatározását az összes többi aminosavét elérő pontosságú szintre tudjuk emelni. Az eredményt két, párhuzamos mérés átlagában, tömeg%-ban adjuk meg.



4.38. ábra. Cisztintartalom meghatározása perhangyasavas oxidációval és gyorsított betáplálással



4.39. ábra. A cisztein reakciója az 5',5-ditio-bis-(2-nitro-benzoészav)-val

A cisztintartalom meghatározása fotometrián

A módszer alkalmas élelmiszerek és élelmiszer-kiegészítők cisztintartalmának meghatározására. A meghatározás során a megfelelően hidrolizált mintából a cisztint ditioeritrittel (eritro-2',3-dihidroxi-1',4-ditiolbután; DTE) vagy ditiotreittel (treo-2',3-dihidroxi-1',4-ditiolbután; TDD) ciszteinné redukáljuk, majd a felesleges redukálószer nátrium-arsenittel megkötjük. A keletkezett ciszteint 5',5-ditio-bis-(2-nitro-benzoészav)-val (DTBNB) reagáltatjuk, és a keletkezett sárga színű 3-merkaptó-6-nitro-benzoészav mennyiségét 460 nm-en spektrofotometrián határozzuk meg. Mivel mind a redukció, mind a DTBNB-vel történő reakció a tiol-szulfid cserén alapszik, ezért a cisztein-, illetve cisztinmeghatározási módszer specifikus, és más aminosavak nem zavarják. A meghatározás során végbe-menő reakció a következő (4.39. ábra):

A vizsgálati eljárás során a pH=8-ra beállított, desztillált vízzel 25 cm³-re feltöltött és szűrt hidrolizátumból 0,5 cm³-t csiszolt dugós kémcsőbe pipettázunk, 4 cm³ 8,25 pH-jú 0,1 M TRIS-puffert, majd 1,4 cm³ 0,05%-os DTE-oldatot adunk

hozzá. Ezekkel a lépésekkel a cisztint redukáljuk, aminek ideje 10 perc. Ezután 2 cm^3 pH=8-as 0,25 M TRIS-puffert adunk a reakcióelegyhez, majd a redukálószer feleslegét 4 cm^3 0,8%-os Na-azrenittel kötjük meg.

A redukálószer megkötését követően a reakcióelegyhez hozzáadunk $1,5\text{ cm}^3$ reagenst (100 mg DTBNB-t 250 cm^3 acetátpufferben oldunk fel), majd a sárga színű oldat fényelnyelését 460 nm-en mérjük. A mintaoldattal együtt egy vakoldatot is készítünk, ahol a reagens helyett $1,5\text{ cm}^3$ desztillált vizet adunk a reakcióelegyhez. A vakmintára kapott értékkel minden esetben csökkentjük a minta abszorbanciáját. A kiértékelés kalibrációs görbe segítségével történik. Ennek során az előzőekben felsorolt reakciókat ismert koncentrációjú, cisztintartalmú oldatokkal végezzük el. Így $0,024\text{ g}$ cisztint 100 cm^3 8,25-ös pH-jú 0,1 M TRIS-pufferben feloldunk; a kalibrációs görbe felvételéhez ebből az oldatból 0,1; 0,15; 0,20; 0,25; $0,30\text{ cm}^3$ -t pipettázunk csiszoltdugós kémcsőbe, és a reagensek hozzáadása után mérjük az oldat abszorbanciáját. Az értékeket a ciszt(e)inkoncentráció függvényében ábrázoljuk, és a hitelesítőegyenest használjuk fel az ismeretlen minta ciszt(e)inkoncentrációjának meghatározására. Az eredményeket két párhuzamos mérés átlaga alapján az eredeti mintára vonatkoztatva tömeg%-ban fejezzük ki, figyelembe véve a minta zsírtalanítása és szárítása közben beállt tömegváltozásokat, illetve a fotometrlás során végzett hígításokat.

4.3.1.15.3.3. A triptofántartalom meghatározása

A triptofántartalom meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiásan és fotometriásan is történhet élelmiszerekből. A triptofánnal azért kell külön foglalkozni, mert a triptofán indolcsoportja savas hidrolízisnél (különösen nagy szénhidráttartalmú minták esetében) kvantitatíve elbomlik, ezért **a triptofán meghatározása során lúgos hidrolízist kell alkalmazni**. A lúgos hidrolízis történhet bárium- vagy nátrium-hidroxiddal, amelyet követhet mind ioncserés oszlopkromatográfiás, mind a para-dimetil-amino-benzaldehiddel és nátrium-nitrittel képzett kék színű termék koncentrációjának spektrofotometriás meghatározása 590 nm-en.

A fehérje hidrolízisét mind NaOH-dal, mind $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -dal elvégezhetjük. A nátrium-hidroxidos hidrolízis során a 10 cm^3 -es ampullába a megfelelően előkészített mintából a nyersfehérje-tartalomtól függően 50-100 mg-ot mérünk be. 5 cm^3 -es 5 M NaOH-oldatot adunk hozzá, üvegapillárison keresztül 3-5 percen át nitrogéngázt vezetünk az ampullába, leforrasztjuk, szárítószekrényben a mintát $110 (\pm 2)\text{ }^\circ\text{C}$ -on 24 órán át hidrolizáljuk, majd lehűlés után az ampulla tartalmát kevés pH = 4,25 nátrium-citrát-pufferrel 25 cm^3 -es mérőlombikba mossuk. A lombikot jeges vízbe állítva a minta pH-ját tömény sósavval pH = 4-re állítjuk be, majd citrát-pufferrel jelig töltjük. Az oldat centrifugálás, esetleg szűrés után kész a triptofán meghatározására.

A bárium-hidroxidos hidrolízis során a megfelelően előkészített mintából 10-100 mg-ot mérünk be, majd a nyersfehérje-tartalom függvényében 10 mg fehér-

jéhez 1,26 g $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -t és 1,45 cm³ desztillált vizet mérünk hozzá. A bárium-hidroxid szobahőmérsékleten nem megy oldatba, kristályai leülepednek az ampulla aljára. Üvegkapillárison keresztül 2-3 percig nitrogéngázt vezetünk az ampullába, leforrasztjuk, majd szárítószekrényben a mintát 110 (± 2) °C-on 48 órán át hidrolizáljuk. Lehűlés után a hidrolizátumot 50 cm³-es Erlenmeyer-lombikba öntjük át, az ampullát 3 \times 2 cm³ forró desztillált vízzel átöblítjük, 1 csepp fenolftaleinindikátort adunk hozzá, és 6 M sósavval közömbösítjük. A bemért $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -től függően 5-10 g vízmentes nátrium-szulfátot adunk a közömbösített oldathoz, majd a kivált bárium-szulfát csapadékot üvegszűrőn szűrjük vagy centrifugáljuk. A csapadékot 2 \times 3 cm³ desztillált vízzel átmoszuk, az egyesített vizes fázisokat liofilizáljuk. A liofilizálás után kapott bepárlási maradékot pH = 4,25-ös nátrium-citrát pufferben feloldjuk, leszűrjük, és az így kapott hidrolizátum kész a triptofán meghatározására. A triptofánstandardot az előzőekben leírtak szerinti munkafolyamatoknak vetjük alá.

A triptofántartalom mérése ioncserés oszlopkromatográfiával aminosav-analizátoron

Az elválasztás elve és körülményei megegyeznek az aminosav-analízisnél leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy:

- 15 cm³-es rövid ioncserélő oszlopot használunk,
- az oszlop hőmérséklete 55-60 °C,
- eluensként a legmagasabb pH-jú és molaritású nátrium-citrát puffert használjuk.

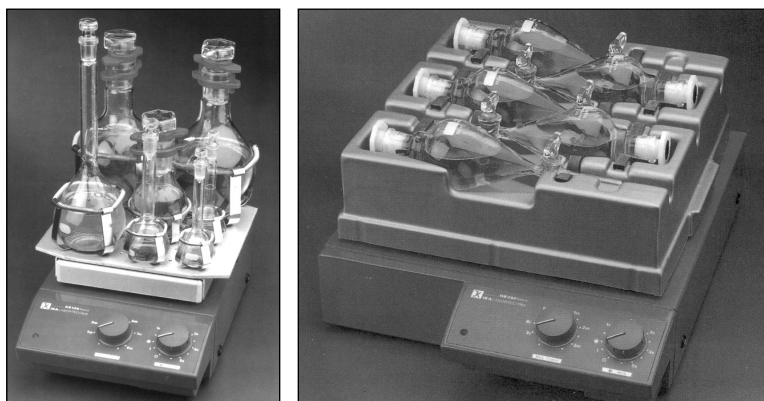
Az eredményt két párhuzamos mérés átlagában, a minta tömeg%-ában adjuk meg.

A triptofántartalom mérése fotometriáson para-dimetil-amino-benzaldehiddel

A minta hidrolízise után a hidrolizátumból 5-10 mg fehérjének megfelelő anyagot mérünk be egy 20 cm³ csiszolt dugós kémcsőbe, majd 10 cm³-re egészítjük ki kénsavas reagenssel, amely 0,3 g para-dimetil-amino-benzaldehidet tartalmaz 100 cm³ tömény kénsavban. A kémcsövet sötét helyen, szobahőmérsékleten, 16 órán át állni hagyjuk, majd 0,1 cm³ 0,045%-os nátrium-nitrit-oldatot adunk hozzá, összerázzuk, és 30 percre sötét helyre tesszük. Ismételt összerázás után a kék színű oldat fényelnyelését 590 nm-en mérjük. A vakpróba a leírtak szerint készül para-dimetil-amino-benzaldehid nélkül. A kiértékelés kalibrációs görbe segítségével történik, amelyet előzetesen 20-150 μg triptofán/10 cm³ reakcióelegy-tartományban veszünk fel. Az ismeretlen minta triptofántartalmát a hitelesítő egyenes segítségével határozzuk meg, és két párhuzamos mérés átlaga alapján a minta tömeg%-ában fejezzük ki. A minta zsírtalanítása és szárítása esetén a tömegváltozásokat figyelembe véve adjuk meg az eredményt az eredeti mintára.

4.3.1.15.4. A hasznosítható lizintartalom meghatározása

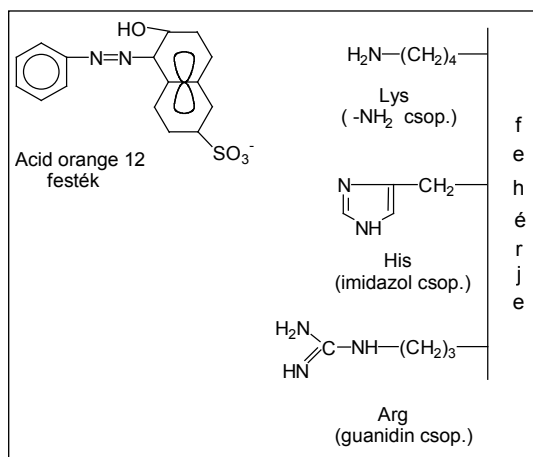
A hasznosítható lizintartalmat ioncserés oszlopkromatográfiás módszerrel, illetve fotometriás módszerrel lehet meghatározni. Az első esetben megfelelő körülmények között 2,4-dinitro-1-fluor-benzollal reagáltatjuk a minta fehérjében lévő lizint, dinitro-fenil- ϵ -amino-lizin származékot létrehozva. Csak szabad ϵ -aminocsoporttal rendelkező lizin reagál a DNFB-vel, ezért a származék koncentrációjának meghatározása megadja a hasznosítható (szabad ϵ -aminocsoporttal rendelkező) lizin mennyiségét. E származék a savas hidrolízis során nem bomlik le, ezért aminosav-analízátorral meghatározható. Amennyiben az eredeti minta sósavas hidrolízise után meghatározzuk az összes lizintartalmat, majd az összes lizinből levonjuk a DNB-lizintartalmat, megkapjuk a hasznosíthatatlan lizin mennyiségét a mintában. Az élelmiszerek összeállításánál mindig a hasznosítható lizintartalommal kell számolni, hisz az ϵ -aminocsoportján blokkolt lizin sem az emberi, sem az állati szervezetben nem hasznosul. A hasznosítható lizintartalomban 10% csökkenés a fehérje jelentős hőkárosodására, valamint biológiai értékének nagymértékű csökkenésére utal.



4.40. ábra. Függőleges és vízszintes rázógépek

A hasznosítható lizintartalom meghatározása festékkötéses módszerrel

A módszer lényege az, hogy meg kell határozni a lizintartalom azon mennyiségét, amely képes szabad aminocsoportja segítségével a festék megkötésére. A megkötött festék mennyisége egyenesen arányos a szabad aminocsoportok számával, ez pedig a hasznosítható lizintartalommal. Az eljárás során a finomra őrölt mintából a vizsgálatnál a mintához Na-acetátot, ecetsavat és festékoldatot adunk, majd egy órán keresztül rázógépekben rázatjuk (4.40. ábra). Ugyanehhez a mintához a B vizsgálatnál Na-acetátot, ecetsavanhidridet adunk, rázatjuk, hozzáadjuk a festékoldatot, majd ismételt ráztatás következik. Az A minta esetében a fehérje hisz-



4.41. ábra. A bázikus aminosavak és az acid orange 12 festék reakciója

tidin, arginin és szabad ϵ -aminocsoportú lizinje, a *B* esetben pedig a lizin szabad ϵ -aminocsoportjának ecetsavanhidriddel történt blokkolása után a hisztidin és az arginin köti meg a festéket. A meg nem kötött festékoldat koncentrációját mindkét esetben 475 nm hullámhossznál spektrofotométeren mérjük, az eredményt kalibrációs görbe segítségével számítjuk. A festékmegkötő lizintartalmat megkapjuk, ha az összes bázikus aminosav festékmegkötő kapacitásából levonjuk a lizin acetilezéssel történő blokkolása után a hisztidin és az arginin festékkötő kapacitását. A festékkötés mechanizmusát az alábbi összeállítás mutatja (4.41. ábra).

A módszer pontos leírása meghaladja a könyv kereteit.

4.3.1.16. Válogatott fejezetek

4.3.1.16.1. Az állati eredetű fehérjék keratintartalmának meghatározása

A módszer alkalmas takarmányok, elsősorban húsliszttek toll-liszt-tartalmának meghatározására. Az eljárás során a toll-liszt és a húsliszt aminosav-összetételében fennálló különbségeket kihasználva, a húsliszthez hozzákevert vagy a technológiai hiányosságok folytán a húslisztbe jutott keratinfehérje mennyiségét határozzuk meg. A tisztintartalom alapján 3-4%, az aminosavakból szerkesztett indexek alapján 2-3% toll-liszt húsliszthez történő hozzákeverése kimutatható. A meghatározás a különböző komponensek eltérő aminosav-összetételén alapszik, ezért a vizsgálati eljárás során az aminosav-analízissel kapcsolatos tudnivalókat ismételtelen már nem közöljük.

A vizsgált minták aminosav-összetételét 6 M-os sósavas hidrolízis után (110 °C, 24 óra) automatikus aminosav-analízátorral határozzuk meg. A tiszta

toll- és a tiszta húsminták aminosav-összetételét vizsgálva megállapítható, hogy a toll cisztintartalma átlagosan 11-12-szer, szerintartalma háromszor nagyobb, mint a húsé, ezzel ellentétben a hús metionintartalma hétszer, lizintartalma 7-8-szor, hisztidintartalma pedig négyszer nagyobb, mint a tollé. A fentiek alapján 3-4% toll-liszttel húslishzthez történő keverése a cisztintartalom alapján kimutatható. Ha az aminosavakból képzünk egy olyan indexet, ahol a tollban lényegesen nagyobb koncentrációban előforduló cisztin és szerin a számlálóban, a húsban lényegesen nagyobb koncentrációban előforduló lizin, hisztidin és metionin pedig a nevezőben található, ennek az indexnek a segítségével 2% toll-liszttel húslishzthez történő keverése kimutatható.

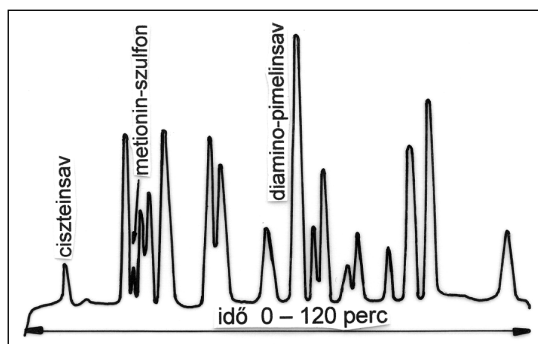
Amennyiben a húslishzthez hozzákevert toll-liszttel százalékanak függvényében ábrázoljuk az indexeket, akkor egy ismeretlen minta toll-liszttartalma mennyiségileg is meghatározható. Az előzőekben említett index ugyanis tiszta marhahúsról 1,2; 2% toll-liszttel tartalmazó marhahúsról 1,5; 5% toll-liszttel tartalmazó marhahúsról 2,0; 10% toll-liszttel tartalmazó marhahúsról 3,2; 20% toll-liszttel tartalmazó marhahúsról 6,6; 50% toll-liszttel tartalmazó marhahúsról 61,1; a 100% tollnál pedig 3100 körül van. A módszer alkalmazásával az 5%-nál nagyobb mennyiségű toll-liszttel húslishzthez történő keverése nagy biztonsággal kimutatható, ami a gyakorlat szempontjából tökéletesen megfelel, hisz 5%-nál kevesebb toll-liszttel hamisítás céljából nincs értelme a húslishzthez hozzákeverni.

4.3.1.16.2. A bakteriális eredetű fehérje meghatározása

A módszer alkalmas élelmiszerek és takarmányok bakteriális eredetű fehérjetartalmának meghatározására. A diamino-pimelinsav, valamint a D-alanin (D-Ala), a D-glutaminsav (D-Glu) és a D-aszparaginsav (D-Asp) kizárólag a baktériumok sejtfalában lévő peptidoglikánokban fordulnak elő. Annak ellenére, hogy a DAPA és a három D-aminosav mennyisége a sejtfalban a baktériumfajtól erőteljesen függ, a DAPA és a D-aminosavak részaránya a baktériumfehérjén belül (állandó takarmányozási feltételek mellett) nem változik, ezért ezek a markerek jól használhatók a bakteriális eredetű fehérje becslésére.

A diamino-pimelinsav (DAPA) tartalom alapján

A diamino-pimelinsav a metionin és az izoleucin között jelenik meg a kromatogramon, ezért a kéntartalmú aminosav oxidációját követően a 6 M-os sósav hidrolízis után határozzuk meg a DAPA-t ioncserés oszlopkromatográfiával aminosav-analizátor segítségével. A metionin oxidációját követően, az igen kis koncentrációban jelen lévő DAPA meghatározására is lehetőség nyílik, hisz a metionin oxidációjával szabaddá válik a valin és az izoleucin közti terület, így a szomszédos aminosavak nem zavarják a kimutathatóság határán lévő DAPA meghatározását (4.42. ábra). A fentiek miatt a DAPA meghatározása előtt a mintát perhangyasavval oxidáljuk az alábbiak szerint: 10 cm³-es ampullába mintegy



4.42. ábra. A diamino-pimelinsav mennyiségének meghatározása ioncserés oszlopkromatográfiával perhangyasavas oxidáció után

10 mg fehérjét tartalmazó légszáraz mintát mérünk be, 0,1 mg-os pontossággal. A perhangyasavas oxidációt és a sósavas hidrolízist az aminosav-analízisnél leírtak szerint végezzük. A DAPA-tartalmat a komplett aminosav-analízisnek megfelelő körülmények között határozzuk meg, aminek során figyelemmel kell lenni a DAPA és az izoleucin tökéletes szétválására.

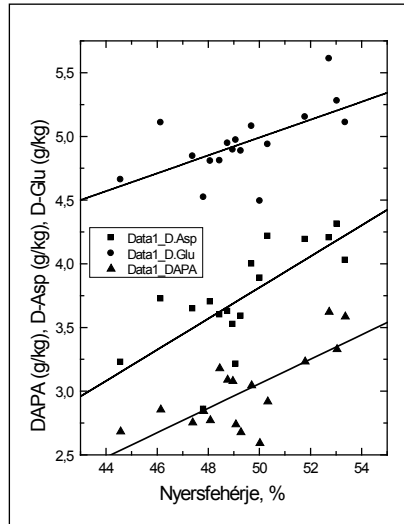
A DAPA-csúcsot az aminosav-analízisnél leírtak szerint értékeljük, az eredményt tömeg%-ban adjuk meg. Mivel a tiszta baktériumfehérje DAPA-tartalma 0,8-1,2% között van, nagyszámú mérés alapján átlagosan 1,0%, a bakteriális eredetű fehérjetartalmat tömeg%-ban az alábbi képlet alapján számíthatjuk:

$$\text{bakteriális eredetű fehérjetartalom \%} = \text{DAPA-tartalom \%} \cdot 100.$$

Tehát ha egy ismeretlen minta tömeg%-ban kifejezett DAPA-tartalmát 100-as „konverziós faktoral” megszorozzuk, akkor a minta összes fehérjetartalmán belül megkapjuk a baktériumok által szintetizált fehérjetartalmat.

A D-aminosav-tartalom alapján

A diamino-pimelinsav-tartalom mellett a D-alanin, a D-glutaminsav és a D-aszparaginsav is csak a baktériumok sejtfalában lévő peptidoglikánokban fordulnak elő, ezért alkalmas módszerrel mérve ezek is jól használhatók markerként a bakteriális eredetű fehérje kimutatására, illetve mennyiségi meghatározására. Az analitikai meghatározás szempontjából tekintve a D-aminosavak közül a D-aszparaginsav és a D-glutaminsav meghatározása lényegesen könnyebb, hisz a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás meghatározás során e két aminosav enantiomerjei közvetlenül a kromatogram elején jelennek meg, ezért ezek elválasztását és meghatározását semmi sem zavarja. (A módszer leírása a 3.3.1.15.2. fejezetben található.) Ezzel szemben az alanin a kromatogram közepén jelenik



4.43. ábra. Összefüggés a baktériumfehérje nyersfehérje-tartalma, valamint a fehérje diamino-pimelinsav-, D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-tartalma között

meg, és enantiomerjeinek szétválasztása és meghatározása lényegesen nehezebb, mint a másik két aminosavé. Az összefüggést a baktériumfehérje nyersfehérje-tartalma, valamint a fehérje diamino-pimelinsav-, D-aszparaginsav- és D-glutaminsav-tartalma között a 4.43. ábra mutatja.

Méréseink szerint a bendőbaktériumok által szintetizált fehérje D-aszparaginsav-tartalma 0,74%, D-glutaminsav-tartalma pedig 0,99%. Ezekből az adatokból olyan szorzófaktorok képezhetők, amelyeknek segítségével a baktériumok által szintetizált fehérje mennyisége meghatározható. Ezek a szorzófaktorok az D-aszparaginsav esetében $100/0,74 = 135$, a D-glutaminsav esetében $100/0,99 = 101$. Ebből következik tehát, hogy ha egy ismeretlen élelmiszerminta D-aszparaginsav-tartalmát 135-tel, D-glutaminsav-tartalmát 101-gyel megszorozzuk, akkor megkapjuk a baktériumok által szintetizált fehérje mennyiségét.

4.3.1.16.3. Speciális kromatográfiai módszerek az egyes aminosavak meghatározására

Rövidített lizin- és metioninmeghatározás

Élelmiszerek két legfontosabb esszenciális aminosava a metionin és a lizin. E két aminosav gyors meghatározására, nagyszámú élelmiszer tesztelésére olyan kromatográfiai módszert dolgoztak ki, melynek segítségével a metionin és a lizin a többi aminosavtól jól elválasztható, pontosan meghatározható. Az aminosavak IEC-s meghatározásánál alkalmazott ioncserélő műgyanta oszlop méretének

csökkentésével, valamint az alkalmazott pufferek pH-jának és nátriumion-koncentrációjának megváltoztatásával elérték, hogy a savas aminosavak a metionin előtti semleges aminosavakkal összemosódva jelennek meg a kromatogramon, melyeket a metionin jól szeparálódott csúcsa követ. Ezt követően a metionin és a lizin közötti aminosavak ismét egymásba mosódnak, majd a lizin jól elváló, éles csúcs formájában jelenik meg. A lizin utáni aminosavakat az oszlopról NaOH-dal lemossák, majd az oszlop equilibrálása után folytatható a metionin és a lizin meghatározása. E módszerrel az aminosav-analízis idejét e két aminosavra mintegy negyedére tudjuk csökkenteni a módszer pontosságának csorbítása nélkül.

Triptofántartalom-meghatározás IEC-vel, rövid oszlopon

Amint korábban említésre került, a triptofán indolcsoportja savas körülmények között gyakorlatilag teljesen elbomlik, ezért a fehérje triptofántartalmát csak bázikus hidrolízist követően lehet meghatározni. A hidrolizátum triptofántartalmának meghatározására kidolgoztak egy gyors módszert, amelynek lényege egy rövid ioncserélő oszlop, valamint relatíve magas pH-jú és nátriumion-koncentrációjú puffer. Ilyen kromatografálási körülmények között az összes fehérjeépítő aminosav összemosódik. Ezeket a többi aminosavtól jól elválóan követi a triptofán, amely így ioncserés oszlopkromatográfiával meghatározható. E módszerrel a vizsgálat idejét töredékére lehet csökkenteni.

Az előző két módszeren túl megoldást dolgoztak ki különböző anyagcserebetegségek gyors diagnosztizálására, amelynek során csak a fenilalanintartalmat vagy a leucin- és valintartalmat határozták meg vérszérumból.

4.3.1.16.4. A tej fehérjefrakcióinak szétválasztása és meghatározása

A módszer alkalmas a tej összesfehérje, valódifehérje, savófehérje, valódi savófehérje, kazein és nem fehérje nitrogén (NPN) szétválasztására és meghatározására. A tej fehérjefrakcióinak szétválasztásánál a kazein és a savófehérjék eltérő viselkedését használjuk ki, amelyet a tej pH-jának csökkenése idéz elő. A kazein pH = 4,6 körül a tejből pelyhes csapadék formájában kicsapódik, míg a savófehérje és az NPN oldatban marad. A kazein centrifugálással történő eltávolítása után kapott savóból triklór-ecetsavval kicsapjuk a savófehérjét, melyet követően már csak a NPN marad oldatban. A kapott frakció fehérjetartalmát Kjeltac gyors nitrogénelemzővel határozzuk meg, majd a fehérjefrakciók egy részét az így kapott adatokból számoljuk.

A tej fehérjefrakcióinak meghatározásánál a teljes tejet ($N\% \cdot 6,38 =$ összesfehérje) 8000 fordulat/percen laboratóriumi centrifugán (4.44. ábra) 10 percig tartó centrifugálással zsírtalanítjuk, majd a tej pH-ját pH-mérő segítségével 4,55-re állítjuk be. A kicsapódott kazeint 8000 g-n centrifugálva választjuk el a tejsavótól. A tejsavóból ($N\% \cdot 6,38 =$ savófehérje) 12% triklór-ecetsavval eltávolítjuk a savófehérjét, meghatározzuk a szűrlet nitrogéntartalmát (NPN). A teljes tej nitrogén-



4.44. ábra. Laboratóriumi centrifuga

tartalmából levonva az NPN-t megkapjuk a tej-valódi fehérje nitrogéntartalmát. A savó nitrogéntartalmából levonva a NPN-t megkapjuk a valódi savófehérje nitrogéntartalmát. A teljes tej nitrogéntartalmából levonva a savó nitrogéntartalmát megkapjuk a kazein nitrogéntartalmát. A frakciók nitrogéntartalmát 6,38-as konverziós faktossal szorozva kapjuk meg azok fehérjetartalmát. A tejminták és a különböző frakciók nitrogéntartalmát Kjeltac gyors nitrogénelemzővel határozzuk meg. Az eredményt párhuzamos vizsgálat után az eredeti mintára vonatkoztatva tömegszázalékban adjuk meg.

4.3.1.16.5. A masztitiszes tőgyből származó tej kimutatása a szabad D-aminosav-tartalom alapján

Az egészséges tej nem tartalmaz szabad D-aminosavakat, míg tőgygyulladás hatására megnő a tej szabad D-aszparaginsav-, D-glutaminsav- és D-alanin-koncentrációja, és ezen D-aminosavak mellett nyomokban még D-allo-izoleucint, D-prolint, D-valint, D-leucint és D-lizint is ki lehet mutatni a gyulladással tőgyből származó tejből. A szabad D-aminosavak mennyiségének meghatározásával az egészséges tőgyből származó tejhez hozzáfejt kóros tőgyből származó tej kimutatható, részaránya becsülhető. A D-aminosavakon túl a tej összes szabadaminosav-tartalma is lényegesen megnő tőgygyulladás hatására.

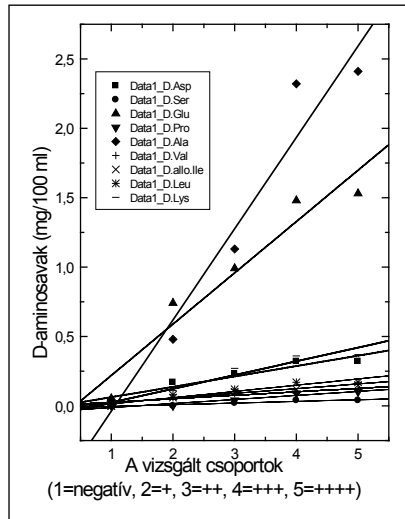
A módszer a tej szabadaminosav- és szabad D-aminosav-tartalmának meghatározásán alapul. A szabad aminosavakat IEC-vel, a szabad D-aminosavat pedig HPLC-vel határozzuk meg. Az eljárás során a tejmintákat a mintavétel után jeges vízben hűtjük, majd 2 órán belül mélyhűtőbe ($-25\text{ }^{\circ}\text{C}$) rakjuk, s ott tároljuk az analízisre történő előkészítésig. A tejmintákat felolvasztás és $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra történő felmelegítés után 5000 g-n 30 percig centrifugáljuk, amelynek során egyrészt eltá-

volítjuk a tej alakos elemeit, amelyek leülepednek a centrifugacső aljára, másrészt elvégezzük a tej zsírtalanítását is. Ezt követően 50 cm³ mintához 50 cm³ 25%-os triklór-ecetsavat adunk, majd 20 perc állás után a kivált csapadékot 10 000 g-n 30 percgig centrifugáljuk. A kapott felülúszó pH-ját az összes szabad aminosav meghatározása esetén 4 M NaOH-dal pH = 2,2-re, a D-aminosavak meghatározásakor pedig pH = 7-re állítjuk be. Az így kapott oldatokat liofilezővel 10 °C-os tálcáfűtést alkalmazva beszárítjuk, majd az összes szabad aminosav-meghatározásakor a beszárított anyagot 10 cm³ pH = 2,2-es citrátpufferben, a szabad D-aminosav-meghatározásakor pedig 1 cm³ bidesztillált vízben oldjuk fel. Az így előkészített mintákat -25 °C-on tároljuk az analízisek megkezdéséig.

A mastitest próba magasabb fokozataiban a szabad aminosav mennyisége jelentős mértékben megnő. A +-es minősítésű tej 2-szer, a ++-es 3,5-szer, a +++ és ++++-es minősítésű pedig 5-5,5-szer több szabad aminosavat tartalmaz, mint a normális, mastitest próba alapján negatívnak mért tej. A mastitest próba alapján negatívnak tekintett minták nem tartalmaznak szabad D-aminosavat. A pozitív minősítésű tejmintákban a D-aszparaginsav, D-glutaminsav és a D-alanin mellett megjelenik a D-valin, a D-allo-izo-leucin, a D-leucin és a D-lizin is. A ++, +++ és ++++ mintákból még további két aminosavat, a D-szerint és a D-prolint is ki lehet mutatni. A szabad aminosav és a szabad D-aminosavak mennyisége az egészséges és a mastitest próba alapján kórosnak minősített tejkben a következő (4.45. ábra, 4.7. táblázat):

4.7. táblázat. A szabad aminosavak és a szabad D-aminosavak mennyisége az egészséges és a mastitest próba alapján kórosnak minősített tejkben

Szabad aminosavak összege (mg/100 cm ³)	Vizsgált csoportok a mastitest próba alapján				
	negatív	+	++	+++	++++
	3,387	8,744	12,614	17,569	18,300
Szabad D-aminosavak mennyisége (mg/100 cm ³)	Vizsgált csoportok a mastitest próba alapján				
	negatív	+	++	+++	++++
D-Asp		0,17	0,23	0,32	0,32
D-Ser	-	-	0,02	0,04	0,04
D-Glu	-	0,74	0,99	1,48	1,53
D-Pro	-	-	0,04	0,09	0,10
D-Ala	-	0,48	1,13	2,32	2,41
D-Val	-	0,08	0,09	0,09	0,12
D-allo-Ile	-	0,08	0,10	0,12	0,15
D-Leu	-	0,06	0,12	0,17	0,17
D-Lys	-	0,11	0,27	0,36	0,37
Szabad D-aminosavak összege	-	1,72	2,99	4,99	5,21



4.45. ábra. Az egészséges és a mastitest próba alapján gyulladással járó tejből származó tej D-aminosav-tartalma

A szabad D-aminosav-tartalom alapján el lehet dönteni, hogy a vizsgált elegej tartalmaz-e kóros tejből származó tejet, ha ugyanis az elegejéből ki lehet mutatni D-aminosavat, akkor az elegej biztosan tartalmaz kóros tejből származó tejet is. Amennyiben a vizsgált tejminta szabad D-aminosav-összegét (vagy külön-külön az egyes aminosavat) összehasonlítjuk a mastitest próba különböző fokozatainál kapott értékekkel, akkor az eltérő összetételű tej mennyiségének becslésére is lehetőség nyílik.

4.3.1.16.6. A karbamidtartalom meghatározása

Élelmiszereink közül a tejpor tartalmaz jelentős mennyiségű karbamidot. A karbamidtartalom meghatározása során a minta vizes kivonatához 4-dimetil-aminobenzaldehyd oldatot adunk, s a kialakuló sárga szín intenzitását spektrofotométeren 440 nm hullámhosszon mérjük. A vizsgált eljárás során elsőként egy karbamidkalibrációs-sort készítünk. Ennek során lemérünk 1 g karbamidot 0,2 mg pontossággal, kb. 200 cm³ vízben feloldjuk, egy 500 cm³-es normál lombikba töltjük, összerázzuk és desztillált vízzel jelre állítjuk. A karbamid törzsoldatból 2, 4, 6, 8, 10, 12 cm³-t mérünk 100 cm³-es normál lombikokba, desztillált vízzel jelre töltjük, elegyítjük. E kalibrálóoldatok 5 cm³-re 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 és 1,2 mg karbamidot tartalmaz. A minta vizes kivonatának elkészítése során lemérünk 2 g vizsgált anyagot 0,1 mg pontossággal, ha a várható karbamidtartalom 3% alatti, valamint 1 g vizsgált anyagot, ha a várható karbamidtartalom 3% felett van.

500 cm³-es Stohmann-lombikba helyezzük, hozzáadunk 1 g aktív szenet, 250 cm³ desztillált vizet, 5 cm³ cink-acetát és 5 cm³ kálium-[hexaciano-ferrát(II)] oldatot. Rázógépen 30 percig rázatjuk, majd desztillált vízzel jelig töltjük, elegyítjük, ülepedés után szűrjük, a várható karbamidtartalom függvényében a szűrletet hígítjuk úgy, hogy a vizes kivonat 100 cm³-re 10-20 mg karbamidot tartalmazzon.

A karbamidtartalom mérése során 5-5 cm³-t pipetázunk a karbamid kalibrációs sorból, a minta vizes kivonatának szűrletéből, valamint a vakmintából csi-szolt dugós kémcsövekbe, hozzáadunk 5 cm³ 4-dimetil-amino-benzaldehid oldatot. Alaposan összerázzuk, 10 percig állni hagyjuk, utána 440 nm hullámhosszon mérjük az abszorbanciát. Vakmintaként olyan oldatot használunk, amely a minta kivételével valamennyi felhasznált vegyszert tartalmazza. A karbamidtartalmat (K) a következő képlettel számoljuk és tömegszázalékban fejezzük ki:

$$K = \frac{E_M}{E_K \cdot m},$$

ahol: E_M – a minta vizes kivonatának abszorbanciája,

E_K – a 0,1 mg karbamidra számított átlagos abszorbanciaérték, amely a kalibrációs sor abszorbanciájának 2, 4, 6, 8, 10 és 12-vel történő osztásával kapott hányadosok számtani középértéke,

m – a vizsgált bemért minta tömege (g).

A karbamidtartalmat két párhuzamos meghatározás középértékeként, egytizedes pontosságra adjuk meg; a meghatározás során a megengedett legnagyobb eltérés az eredmény 5%-a.

4.3.2. Zsírtartalom és zsírsavösszetétel-meghatározás

4.3.2.1. A nyerszsírtartalom meghatározása

Élelmiszerek nyerszsírtartalmát **Soxhlet-féle visszafolyó készülékben, éteres vagy petroléteres kivonás után határozzuk meg.** Az extrahálószer elpárologtatása után visszamaradó anyag tartalmazza a valódi zsírokat, a foszfatidokat, a viaszokat, a szterinszármazékokat, a színanyagokat és az illózsírsavak nagyobbik részét. A nyerszsírtartalom meghatározása során 1 mg pontossággal lemérünk 5 g vizsgálandó anyagot (m_0), zsírmentes extrahálóhüvelybe helyezzük, és a hüvelyt zsírmentes vattával lezárjuk. A vizsgálandó mintát tartalmazó hüvelyt az extrahálókészülék (4.46. ábra) közép részébe helyezzük, majd összekapcsoljuk a 4-5 szem horzsakövet tartalmazó, előre lemért (m_2) és n-hexánnal vagy petroléterrel 3/4 részig megtöltött lombikkal. A hűtő felhelyezése után a mintát 6 órán keresztül olyan fűtéssel extraháljuk, hogy a szivornya óránként legalább tízszer cserélje az oldószert. Az extrahálás során a minta mindig friss extrahálószerrel érintke-



4.46. ábra. Egy Soxhlet-készülék és egy Tecator Soxhlet zsírmeghatározó berendezés

zik, hisz a zsíros oldószer lombikba történő visszaszívása után onnan csak az extrahálószer tud elpárologni, mert az extrahált zsírok forráspontja többszöröse az oldószerének. Ezzel az eljárással rendkívül hatékony kioldást lehet elérni viszonylag csekély oldószer alkalmazásával. Hatórás extrahálást követően a mintát tartalmazó hüvely eltávolítása után az oldószert a lombikból a középrészbe desztilláljuk, és onnan folyamatosan eltávolítjuk. A zsírt és az oldószer maradványait tartalmazó lombikot egy órára 98 °C-os (± 2 °C) hőmérsékletű szárítószekrénybe helyezük, majd exsikkátorban hűtjük, mérjük. Lemérés után további fél órán át szárítjuk. Kihűlés után mérjük, majd ezeket a műveleteket mindaddig ismételjük, míg a két utolsó mérés közötti eltérés kevesebb lesz 1 mg-nál. Az utolsó mérés eredménye (m_1). A nyerszsírtartalmat a következő képlet szerint számítjuk és tömegszázalékban fejezzük ki:

$$\text{nyerszír \%} = \frac{m_1 - m_2}{m_0} \cdot 100,$$

ahol: m_0 – a vizsgálatra bemért minta tömege (g),

m_1 – a lombik, a horzsakő és a száraz kivonat tömege (g),

m_2 – a lombik és a horzsakő tömege (g).

A nyerszsírtartalmat két párhuzamos meghatározás eredményének középértékeként egytizedes pontossággal adjuk meg. A párhuzamos vizsgálat között megengedett legnagyobb eltérés 0,3% nyerszír.

Állati eredetű takarmányok és élelmiszerek esetében a zsírtartalmat ezzel a módszerrel rendkívül nehéz a minta egyéb komponenseitől elválasztani, ezért ilyen esetekben a Soxhlet-extrakciót megelőzően a mintát sósavas kezelésnek kell alávetni. A sósavas kezelés során a zsír elválik a minta egyéb alkotórészeitől, szűrőpapí-

ron a szabaddá vált zsír és a minta egyéb részecskéi könnyen felfoghatók, ezt követően az előzőekben ismertetett módszer szerinti Soxhlet-extrakció elvégezhető.

4.3.2.2. A peroxidszám és a savszám meghatározása

A zsírok tárolása során bekövetkező minőségi romlást okozó elváltozásokat gyűjtő néven avasodásnak hívjuk. Ez lehet egyszerű hidrolízis vagy oxidatív avasodás, melynek során víz és katalizáló anyagok (fémionok) jelenlétében, valamint a mikroorganizmusok *lipáz* enzimjeinek hatására a zsírok szabad zsírsavakra és glicerinre bomlanak. A szabad zsírsavak lúgot kötnek meg, így a lúgfogyasztás meghatározásával a **savszám** megállapítható.

A telítetlen zsírsavak kettős kötése igen reakcióképesek, különösen a többszörösen telítetlen olajok hajlamosak oxidatív avasodásra, peroxidok képzésére. A peroxidok arányát jellemző ún. peroxidszám a peroxidfázisban hirtelen megemelkedik, majd egy csúcs után csökken, mert a peroxid helyén aldehid vagy keton képződik. Az erélyes oxidáló hatású peroxid a kálium-jodid-oldatból jódot szabadít fel, és ennek jodometriás titrálásával a **peroxidszám** meghatározható.

A peroxidszám, illetve a savszám meghatározásához a zsírkinyerést a következők szerint végezzük. A vizsgált anyag zsírtartalmának függvényében 200-300 g mintát teszünk egy kb. 5 cm belső átmérőjű és 1 m hosszú üvegcsőbe, folyamatosan annyi petrolétert öntünk rá, hogy a lecsepegő zsíroldat térfogata 150-200 cm³ legyen. A hidegen végzett extrakcióval megakadályozzuk a zsír minőségének változását a zsírkinyerés során. A másfél óra alatt általában letisztult oldatot zsírlombikba öntjük át, majd a petrolétert a zsírról az oldat felhabzásáig ledesztilláljuk. A petroléteres zsíroldat felhabzása után a desztillálást befejezzük. A továbbiakban a lehűlt petroléteres zsíroldatot használjuk a további vizsgálat-hoz, amelynek zsírtartalmát a következők szerint határozzuk meg.

A száraz, 1 mg pontossággal lemért (A) csiszolt fedelű bemérőedénybe 1 cm³-t pipettázunk a vizsgált petroléteres oldatból, és 1 órára 100 °C-os szárítószekrénybe tesszük. Lehűlés után mérjük az együttes tömeget (B), amelynek segítségével az 1 cm³-es petroléteres zsíroldat zsírtartalma (Zs) g-ban a következő szerint számítható:

$$Zs = B - A$$

Az így kapott hideg zsíroldatból végezzük el a peroxidszám és a savszám meghatározását.

Peroxidszám meghatározása

A petroléteres zsíroldatból osztott pipettával 2 cm³-t pipettázunk egy 250-300 cm³-es jódszámlobkiba, hozzáadunk 20 cm³ ecetsav-kloroform 2:1 arányú elegyét és 2 g porított kálium-jodidot, majd ötpercnyi állás után vízfürdőn forrásig

melegítjük (amíg a légbuborékok a felszín 2/3-át be nem borítják). Ezután hideg vízben gyorsan hűtjük, és már hűtés közben 25 cm³ 1%-os kálium-jodid-oldatot adagolunk hozzá. Egy cm³ keményítõindikátor-oldat jelenlétében a kivált jódot 0,01 M Na₂S₂O₃-mérõoldattal erõs rázogatózás közben megtitráljuk. A peroxidszámot az alábbi képlettel számítjuk és cm³/100 g egységben adjuk meg.

$$P = \frac{A \cdot 10}{Z_s \cdot 2},$$

ahol: P – peroxidszám, amely megadja az 1000 g zsír által leválasztott jóddal egyenértékû 1 M Na₂S₂O₃ cm³-einek számát,
A – a fogyott 0,01 M-os pontos koncentrációjú Na₂S₂O₃ (cm³),
Z_s – az 1 cm³ petroléteres zsíroldatban lévõ zsír mennyisége (g).

A savszám meghatározása

Az elõzõekben ismertetett módon kapott petroléteres zsíroldatból beosztásos pipettával 1 cm³-t mérünk be egy 250-300 cm³-es Erlenmeyer-lombikba, majd hozzáadunk 10 cm³ dietilétert. Az oldathoz 2-3 csepp 1%-os fenolftaleinindikátor-oldatot adunk, és 0,1 M-os etil-alkoholos KOH mérõoldattal megtitráljuk. A savszámot az alábbi képlettel számítjuk, és mg/g-(mg KOH/1g zsír) egységben adjuk meg:

$$S = \frac{a \cdot 5,611}{Z_s},$$

ahol: S – savszám, az 1 g zsír közömbösítéséhez szükséges KOH mennyisége (mg),
a – a fogyott etil-alkoholos 0,1 M KOH mérõoldat (cm³),
Z_s – az 1 cm³ petroléteres zsíroldatban lévõ zsír mennyisége (g),
5,611 – az 1 cm³ 0,1 M-os alkoholos KOH mérõoldatban lévõ KOH tömege (mg).

A peroxidszámot és a savszámot két párhuzamos mérés középértékeként, egész számban adjuk meg.

4.3.2.3. A zsír zsírsavösszetételének meghatározása gázkromatográfiásan

A gázkromatográfia részletesebb leírása a 3.2.1.6. fejezetben található. Ebben a fejezetben csak azokat az alapvetõ ismereteket foglaltuk össze, amelyek a zsír-savak gázkromatográfiás analízisének megértéséhez szükségesek.

4.3.2.3.1. A gázkromatográfia elmélete

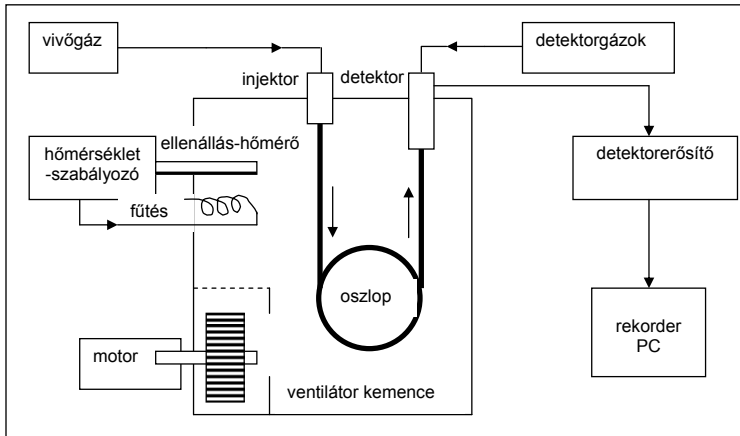
A gázkromatográfia a kromatográfiás módszerek közül egy olyan analitikai eljárás, mely összetett elegyek komponensekre történõ szétválasztását teszi lehetővé. A gázkromatográfia esetében a mozgófázis gáz vagy gõz állapotban van jelen, az

állófázis pedig folyadék (kémiaailag inaktív hordozóra felvitt polimerek, zsírok, szilikonolajok) vagy szilárd anyag (aktív szén granulátum, szilikagél, alumínium-oxid). A gáz-folyadék kromatográfia esetén a folyadékban való oldékonyság különbsége választja el az elegy alkotórészeit. A gáz-szilárd kromatográfia esetén az elválasztás alapja az állófázis felületén történő adszorpció különbsége. A gáz-kromatográfia rendkívül jól használható illó vagy illékonyra tehető vegyületek analizésére, valamint alkalmas az optikai izomerek szétválasztására is.

Összefoglalva tehát, a gázkromatográfia lényegében azon alapul, hogy **a különféle illékony anyagok molekulái adott hőmérsékleten, adott gáznomás esetén különböző ideig tartózkodnak a szilárd vagy folyékony adszorbens felületén, azaz a molekulák szerkezetüktől függően különböző időtartam után deszorbeálódnak.** Ha egy adszorbenssel töltött kromatográfias oszlopon gáz-elegyet áramoltatunk, akkor **az oszlopról először a leggyengébben adszorbeáló komponens lép ki, majd ezt követi a növekvő erősségű adszorpció sorrendjében a többi komponens. Az egyes alkotórészek különböző ideig tartózkodnak a kromatográfias oszlopon. A gázelegy áramlásának kezdetétől számított idő, amely alatt az egyes komponensek az oszlopot elhagyják, a retenciós idő,** amely adott kromatográfias rendszerben jellemző az egyes komponensekre.

A gázkromatográfiához (4.47., 4.48. ábra) szükséges eszközök mind a gáz-szilárd, mind a gáz-folyékony rendszerű eljárásokban azonosak: vivőgáz-rendszer, mintaadagoló berendezés, kromatografáló oszlop vagy kolonna, termosztát, érzékelőberendezés vagy detektor, illetve regisztrálóberendezés, amelyet újabban a komputer és a szoftverek helyettesítenek.

A gázkromatográfiában csak olyan vivőgáz használható, amely sem a vizsgálandó anyaggal, sem az oszlop töltetével nem lép kémiai kölcsönhatásba. Leggyakrabban vivőgázként nitrogént, hidrogént, héliumot, argont, szén-dioxidot, ritkán levegőt vagy oxigént használnak. A kromatográfias készülékeket gázpalackból látják el vivőgázzal, amelyet még tisztítani vagy szárítani szükséges. A gázkromatográfias készülékbe a vivőgáz belépése után a mintaadagoló berendezés segítségével juttatjuk be a mintát. A vizsgálandó anyagot általában folyadék halmazállapotban tápláljuk a készülékbe, de lehetséges a gáz, sőt a szilárd halmazállapotba történő bejuttatás is. A kolonnában a mintának már légneműnek kell lennie, ezért folyékony vagy szilárd anyag vizsgálatakor az adagoló és az oszlop közé előmelegítőt kell beiktatni, amellyel a minta elpárologtatható. Folyékony minták adagolására különleges fecskendőket szerkesztettek, amelyek hozzájuk tartozó tüvel egy szilikongumi réteget szűrnak át, így a vizsgált anyagot a gázkromatográfia kellően felmelegített adagolóterébe lehet fecskendezni. A készülékhez töltött és kapilláris vagy más néven üres kolonnák csatlakoztathatók. **A töltött kolonnák** készülhetnek üvegből, alumíniumból, rézből, valamint saválló acélból. Átmérőjük 2-4 mm, hosszuk 1-6 m között változik. A hosszabb oszlopokat csak spirál alakban helyezhetjük el, mert másképp nem férnének el a termosztátban. **A kapilláris kolonnák** anyaga az előzőekben ismertetettekén túl lehet még műanyag is. A kapilláris csövek



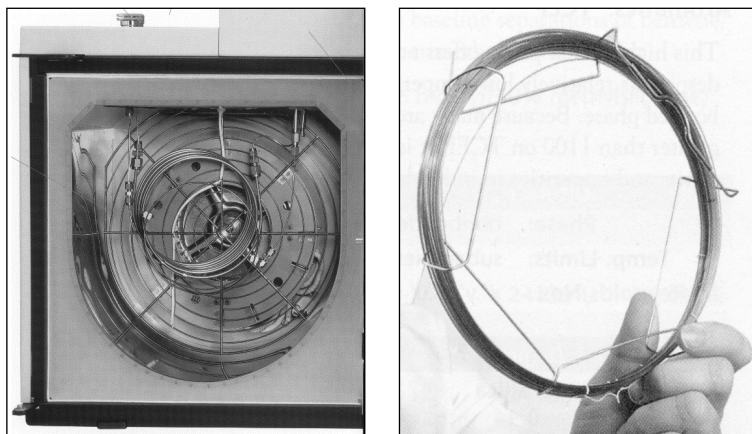
4.47. ábra. A gázkromatográf elvi felépítése

belső felületét különböző módszerekkel növelik, azért, hogy minél több folyadékot lehessen arra felvinni. Belső átmérőjük 0,1-1 mm, hosszuk 10 és 100 m között változik, de speciális analitikai célokra használhatnak több száz méteres kapilláris kolonnákat is. A kapilláris kolonnát orsóra vagy egyéb tartóra tekerik fel, ami lehetőséget ad a ki- és bevezetés kialakítására is. A kromatografáló oszlop töltete attól függően, hogy adszorpciós vagy megoszlási kromatografálást végzünk, más és más lehet. Adszorpciós gázkromatográfiában a töltet felületaktív, kémiaiilag indifferent, nagy fajlagos felületű, poláros vagy apoláros szemcsés anyag. A megoszlási gázkromatográfiánál a folyadék töltetet a hordozóanyag felületére vagy a kapilláris cső falára viszik fel.

A nedvesítő anyaggal szemben követelmény, hogy a kromatografálás hőmérsékletén folyékony, kémiaiilag közömbös legyen, és tartósan maradjon meg a hordozó felületén, illékonyága lehetőleg minél kisebb, oldékonysága minél nagyobb legyen. Nagyon jól megfelelnek erre a célra a különböző szilikonolajok.

A szétválasztani kívánt komponensek tulajdonságaitól és a kolonna töltetétől függően a rendszert szobahőmérséklettől 400 °C-ig temperálhatjuk. Mivel a kromatográfiás elválasztást a hőmérséklet jelentős mértékben befolyásolja, a kolonna hőmérséklete csak szűk határok között ingadozhat. A mai modern készülékeknél a termosztát fűtése is megoldható, melynek során a termosztát hőmérséklete 0,1-50 °C/perc értékkel is változtatható.

A kolonnáról távozó komponensek folytonos, gyors és érzékeny észlelésére szolgálnak a különböző **detektorok**. A detektor a kilépő gázáram valamilyen fizikai vagy kémiai tulajdonságának megváltozását érzékeli a komponens megjelenésekor. E változás erősítőn keresztül észlelhető, regisztrálható és értékelhető. A regisztrált jelek összességét hívjuk **kromatogramnak**. A sok kifejlesztett gázkromatográfiás detektor közül legfontosabbak a **hővezetőképesség-mérő detektor**, a **lángionizációs**

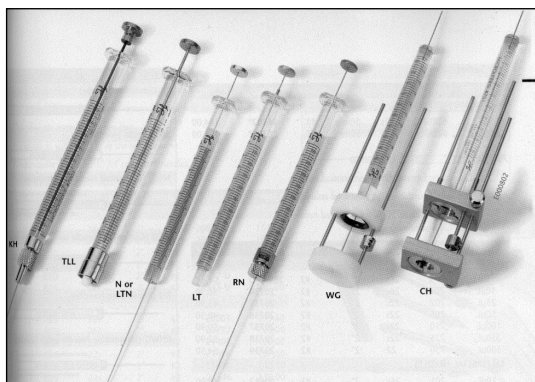


4.48. ábra. Egy gázkromatográf oszloptere és egy kapilláris oszlop

detektor, az elektronbefogásos detektor és a lángfotometriás detektor. A lángionizációs detektor tulajdonképpen egy hidrogénégő, amelyben a láng két elektród között alakul ki, amelyekre 100-300 V feszültséget adunk. A hidrogénláng 2000-2200 °C hőmérsékletén a hidrogén is kismértékben ionizálódik, ami állandó alapáramot biztosít az elektródák között. Ha a kolonnáról szerves anyag jut a detektorba, abból a hidrogénlángban elégve ionok keletkeznek. Ennek következtében a gáz vezetőképessége, s ennek megfelelően az ionáram jelentősen megnő. A lángot határoló két elektróda között keletkező ionáram a megfelelő erősítés után regisztrálható.

A detektor jelét egy műszer rögzíti, amelynek során megkapjuk az elemzés eredményét, a kromatogramot. Regisztráló műszerként általában vonalíró elektronikus potenciométert használunk. Integrátorok segítségével mérni lehet a csúcsok alatti területet, a csúcsok retenciós idejét, segítségükkel teljesen automatizált elemzés valósítható meg. Újabb készülékeknél a gázkromatográf működését komputerbe táplált szoftverek segítségével teljes körűen ellenőrizhetjük. A kromatogramok regisztrálására és értékelésére ma már kizárólag elektronikus integrátorokat vagy számítógépet használunk, amelyek segítségével teljes mértékben kiküszöbölhető a fázisító és időigényes kézi értékelés.

A gázkromatográfiás módszereket ma már az élelmiszer-analízis sok területén alkalmazzák. Így többek között gázkromatográfiával határozzák meg az anti-oxidánsokat, a tartósítószerket, a szermaradványokat, az íz- és aromaanyagokat, valamint az illó vagy illóvá tehető komponenseket (alkoholok, aldehidek, zsírsavak, észterek), és újabban aminosav-meghatározásra is használható az aminosavak észterszármazékainak analízise során. A gázkromatográf nehezen illó, illó származékká nem alakítható és hőlabilis anyagok (szénhidrátok, egyes vitaminok) vizsgálatára nem alkalmas. Ezen utóbbi komponensek analízisét nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával lehet elvégezni.

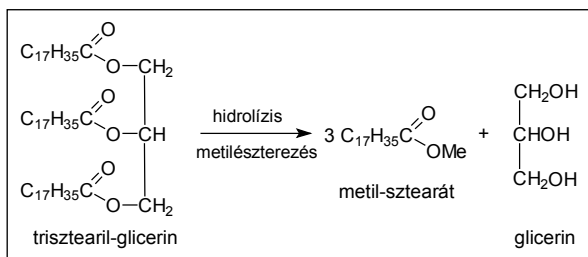


4.49. ábra. Mikropipetták a gázkromatográfba történő injektáláshoz

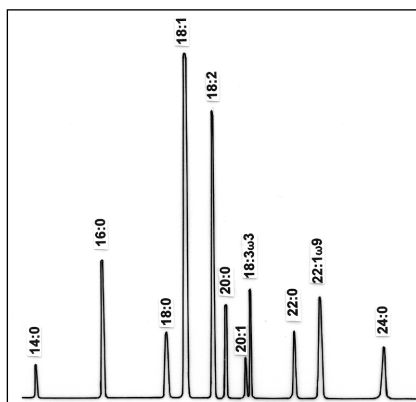
Összefoglalásul a gázkromatográfiai analízis menete a következőképpen írható le. Az analizálni kívánt illó komponenseket megfelelő előkészítés, ill. származékképzés után a mintaadagoló mikrofecskendő (4.49. ábra) segítségével a kolonnatér elejére juttatjuk be, 0,5-2 μ l térfogatban. A magas hőmérséklet hatására a komponensek pillanatszerűen elillannak, és a gőzöket a vivőgáz (nitrogén, hidrogén, hélium vagy argon) viszi magával. A gőz komponensei az állófázisban oldódnak, de az érkező gárrészecskék hatására egy részük kilép a gázfázisba, előrehalad és ismét oldódik a folyadékban. Ez folyamatosan zajlik a kolonna egész hosszában, aminek eredményeként a vizsgált komponensek lemaradnak a gázfázishoz képest. Ez a lemaradás vagy retenció a különböző anyagoknál az eltérő oldhatóság miatt más és más, emiatt a különböző komponensek a kolonnán eltérő sebességgel haladnak végig, és annak végén külön-külön jelennek meg. **A minta injektálásától a komponensek a kolonnából való kilépéséig eltelt idő a retenciós idő**, amely adott kolonnánál, hőmérsékleten és vivőgázsebességnél nem változik, így a komponens azonosítására felhasználható. A kolonnából kilépő komponenseket a detektor érzékeli, amely az illósavak és a zsírsavak meghatározásakor lángionizációs elven működik. A szerves anyagok elégeése során keletkező szén- és hidrogéntartalmú ionok hirtelen nagy áramnövekedést okoznak, amit regisztrálókészülékkel vagy komputerrel folyamatosan mérünk, így áramintenzitás-idő görbét kapunk, amelyet kromatogramnak nevezünk. A kromatogramok értékelése történhet kézzel, de ma már integrátorral, ill. komputerrel végzett értékelést alkalmazunk. A kromatogramon a csúcs helye az illető anyag minőségére, a csúcs nagysága (csúcs alatti terület) pedig az illető anyag mennyiségére jellemző tulajdonság.

4.3.2.3.2. A napraforgóolaj és a disznózsír zsírsavösszetételének meghatározása

Az ismertetésre kerülő módszer alkalmas a napraforgóolaj, valamint a disznózsír és az egyéb növényi és állati zsiradékok zsírsavösszetételének meghatározására.



4.50. ábra. A triglicerid hidrolízisének, illetve átészterezésének folyamata



4.51. ábra. A telített és telítetlen zsírsavak standard kromatogramja (a csúcsok mellett a szénatomszám, valamint a telítetlen kötések száma és helye látható)

Gázkromatográfias módszerrel elsősorban azok a komponensek vizsgálhatók, amelyek illékonyak vagy 300 °C-ig illékonyra tehetőek. A triacil-glicerinek a nagy molekulatömegük miatt nem felelnek meg ennek a követelménynek, és a hidrogénhíd-kötések, illetve az ennek következtében létrejött molekulaasszociátumok miatt a szabad, hosszú láncú zsírsavak is alkalmatlanok erre. Ezekből, valamint a triacil-glicerinek észterkötésének hidrolízise után szabadabbá váló zsírsavakból zsírsav-metilésztereket szintetizálunk, majd a kapott vegyületet vizsgáljuk gázkromatográfiasan. A hidrolízis, ill. az átészterezés folyamatait a 4.50. ábra mutatja.

A meghatározás során 0,2 g napraforgóolajat vagy disznózsírt feloldunk 2 cm³ n-heptánban, és víztelenítés céljából kevés kiizzított nátrium-szulfátot adunk hozzá. A víztelenített heptános oldatból 0,5 cm³-t egy fiolába pipettázunk, és hozzáadunk 0,5 cm³ nátrium-metilát reagenst, majd 60 °C-on 1 órán át melegítjük, 10 percenként összerázzuk. Ezt követően hozzáadunk 1 cm³ n-heptánt és 1 cm³ desztillált vizet, majd 1-2 percig rázzuk. A reagens feleslegének eltávolítása után a felső szerves fázisból injektálunk a gázkromatográfba. A zsírsav-metilészterek cianopropil

állófázisú kapilláris oszloppal elválaszthatók, meghatározásukra lángionizációs detektor használható (4.51. ábra). A kapott kromatográfias csúcsok alatti területek a zsírsav-metilészterek mennyiségével arányosak. Az eredményeket ennek megfelelően a zsírsav-metilészterek relatív tömegszázalékában adjuk meg.

$$\text{Rel\%} = (T_{\text{zsírsav}} / \Sigma T_{\text{zsírsav}}) \cdot 100$$

ahol: Rel% – a zsírsav-metilészter relatív mennyisége,

$T_{\text{zsírsav}}$ – a zsírsav-metilészter kromatográfias csúcsa alatti terület,

$\Sigma T_{\text{zsírsav}}$ – a zsírsav-metilészterek kromatográfias csúcsai alatti területek összege.

Azonos mintából két párhuzamos mérés közötti eltérés az eredmény 5%-a.

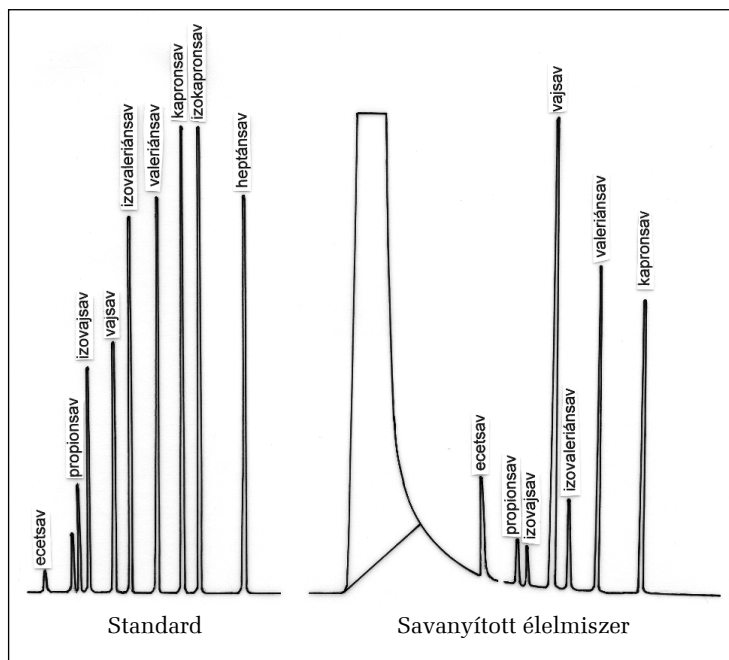
4.3.2.4. Válogatott fejezetek

4.3.2.4.1. Az illósavak meghatározása gázkromatográfián

Illósavaknak nevezzük a 2-6 szénatomszámú monokarbonsavakat (ecetsav, propionsav, vajsav, izo-vajsav, valeriánsav, izo-valeriánsav, kapronsav és izo-kapronsav). Ezek az „illósavak” vizes oldatukból melegítéssel könnyen elillannak, tehát kidesztillálhatók. Illékonyságuknak köszönhetően szaguk is intenzív; az ecetsavé kis koncentrációban kellemes, de a többié kellemetlen. Gyakorlati szempontból az erjesztett élelmiszerek illósvartartalmának a meghatározása a legjelentősebb. Az erjesztéssel történő tartósítás során a cukortartalom anaerob bomlás következtében tejsavvá alakul. A folyamattal párhuzamosan végbemenő erjedések során ecetsav, propionsav, vajsav, valamint a fehérjebomlás következtében nagyobb molekulájú illózsírsavak is előfordulhatnak az élelmiszerekben. Az erjesztéssel készített táplálékokban 1,0-1,5% körüli tejsav-koncentráció kívánatos; a propionsav jelenléte nem káros, sőt hozzájárul az élelmiszer tartósításához. A vajsav jelenléte önmagában nem káros, de ártalmas folyamatokra, illetve rosszul végrehajtott erjesztésre, silózásra utal, és rontja az organoleptikus tulajdonságokat. Izovajsav, illetve a nagyobb molekulájú illózsírsavak az aminosavbomlás eredményeként jelennek meg.

Az illózsírsavak meghatározását korábban frakcionált desztillálással, újabban viszont gázkromatográfias eljárással határozzák meg. Az első eljárás szerint a különféle savakat a vizes oldatból kidesztillálták, szedőkben forráspont alapján elkülönítve felfogták, és mennyiségüket lúgos titrálással határozták meg. A desztillálás során a különböző savak nem váltak el tökéletesen egymástól, ezért ezzel a módszerrel csak az ecetsav-, a propionsav- és a vajsavtartalmat vizsgálták, a többi illósvat pedig figyelmen kívül hagyták.

Napjainkban az illózsírsavak meghatározása gázkromatográfias módszerrel történik. Ennek első lépésében 100 g erjesztéssel tartósított élelmiszert vagy ta-



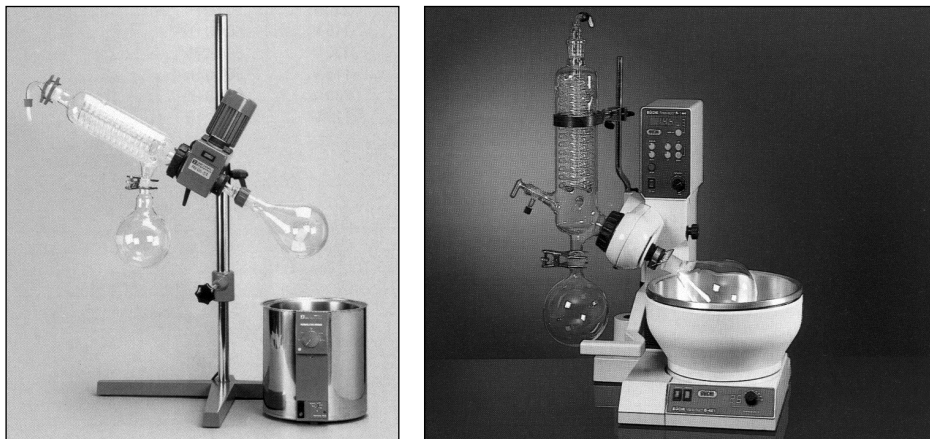
4.52. ábra. Az illózsírsavak meghatározása gázkromatográfiával

karmányt mérünk egy 1000 cm³-es mérőlombikba, ráöntünk 900 cm³ desztillált vizet, 1 napot állni hagyjuk, időnként összerázzuk. A szűrletből 4 cm³-t centrifugacsőbe mérünk, hozzáadunk 0,2 cm³ foszforsavat és 8000 g-n 10 percig centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, és ebből injektálunk 1 μl-t a gázkromatográfba. Az illózsírsavak analízise polietilén-glikol állófázisú kapilláris oszloppal történik lángionizációs detektálással.

Minden elemzés előtt általában naponta injektálunk standardoldatot, amely az összes meghatározni kívánt komponenst ismert koncentrációban tartalmazza. Megállapítjuk a retenciós időket, meghatározzuk a koncentráció számításához szükséges faktorokat. A hitelesítő kromatogram elkészülte után injektálunk a vizet kivonatból, az integrátor vagy a komputer segítségével megállapítjuk, hogy mely savak találhatók benne, és a hitelesítő kromatogramhoz történő hasonlításal kiszámítjuk azok koncentrációját (4.52. ábra).

4.3.2.4.2. F₂-toxin meghatározása gázkromatográfiával

A vizsgálati mintát etil-acetáttal Soxhlet-készülékkel extraháljuk, a kapott extraktumot hexán-acetonitril, majd kloroform-lúg, folyadék-folyadék extrakcióval tisztítjuk. A tisztított kivonatból szilil-származékképzés után töltetes gázkroma-



4.53. ábra. Rotációs gyorsbepárlók a különböző frakciók kíméletes koncentrálására

tográfias elválasztással (hőmérséklet-programozás mellett) lángionizációs detektorral határozzuk meg az F_2 -toxin tartalmat.

A mérés kivitelezése során a lisztfinomságúra őrlött mintából 20 g-ot Soxhlet-készülékben 8 órán át extrahálunk. Az extraktumot rotációs gyorsbepárlóval (4.53. ábra) szárazra pároljuk, a maradékot 50 cm³ hexánban feloldjuk, majd 25-50 cm³ acetonitrillel kétszer kirázzuk. Az acetonitriles fázisokat bepároljuk, majd a maradékot 25 cm³ kloroformban vesszük fel. Ezt 2 × 10 cm³ 1 térfogatnyi 0,1 mol/dm³ sósavoldattal tompított 10 térfogatnyi 1 mol/dm³ NaOH-oldattal óvatosan kirázzuk. Az egyesített lúgos fázisokat 0,67 mol/dm³ foszforsav-oldat és 0,1 mol/dm³ NaOH-oldat felhasználásával pH = 9,5-re állítjuk be, majd 3 × 15 cm³ kloroformmal kirázzuk, az egyesített kloroformos fázisokat vízmentesítés után bepároljuk. A maradékot acetonban feloldjuk és a mintát nitrogénáramban, szobahőmérsékleten bepároljuk, ezt követően a maradékot 200 μl acetonban vesszük fel. Ebből 100 μl-t használunk a gázkromatográfias analízishez. Ezt a mennyiséget nitrogénáramban ismételtén bepároljuk, majd 30 percen keresztül 50 μl szililező reagenssel szililezzük. Az így kapott mintából 1-3 μl-t injektálunk a gázkromatográfba. Az analízishez 0,25-0,50 μg/μl koncentrációjú standardoldatot használunk fel szintén szililezett formában. A gázkromatográfias elemzés körülményei az alábbiak:

- kolonna: 2 mm belső átmérő, 1 m hosszú üveg 3% OV-17 töltettel,
- hőmérséklet $T_1 = 275$ °C, $T_D = 305$ °C, $T_K =$ hőmérsékletprogram 150 °C/perc, 8 °C/perc emeléssel 260 °C-ig, 3 perc hőmérséklettartás,
- nitrogénáramlási sebesség: 17,5 cm³/perc, hidrogénáramlási sebesség: 30,5 cm³/perc, levegőáramlási sebesség = 300 cm³/perc.

Ilyen kromatográfias körülmények között a zearalenon szililezett származéka 16 perces retenciós idővel detektálható.

4.3.2.4.3. Antioxidánsok (BHT) meghatározása

A butil-hidroxi-toluol (BHT) alacsony forráspontja miatt könnyen gázállapotúvá alakítható, ezért gázkromatográfias módszerrel meghatározható. Az eljárás során az antioxidáns tartalmú vizsgálandó anyagból, elsősorban zsírból, margarinból, olajból oldatot készítünk, amelyet közvetlenül injektálunk a gázkromatográfba. A gázkromatográfias elválasztás relatíve magas hőmérsékletén (200-300 °C) mind az oldat, mind az oldott anyagok gázállapotúvá válnak, és megfelelően megválasztott gázkromatográfias oszlopon szétválaszthatók.

A vizsgálati eljárás során a disznózsírból, margarinból vagy étolajból 100 mg vizsgálati anyagot oldunk 10 cm³ hexánban, és az így elkészített oldatból 1 µl-t injektálunk a gázkromatográfba. A gázkromatográf injektorának hőmérséklete 250 °C, a vivőgáz hélium, az injektorban a nyomás 180 kPa, a kolonna 10 m hosszú és 0,25 mm átmérőjű kvarckapilláris szilikonolaj töltettel, a kolonnatér hőmérséklete 220 °C, detektorként pedig ITD-800 tömegspektrométert használunk 220-as tömegszámú üzemmódra beállítva 220 °C-on. A BHT csúcsának beazonosítása után az eredményt a következők szerint számítjuk ki, felhasználva azt, hogy a mérések során a BHT mennyiségével arányos területű kromatográfias csúcsot kapunk. A BHT-tartalmat mg/kg-ban adjuk meg a következő képlet szerint:

$$C_{\text{BHT}} = \frac{T_{\text{minta}} \cdot C_{\text{St}} \cdot 10}{T_{\text{standard}} \cdot m},$$

ahol: C_{BHT} – a minta BHT-tartalma (mg/kg),

C_{St} – a standardoldat BHT-tartalma (mg/cm³),

T_{minta} – a mintából származó BHT-csúcs területe,

T_{standard} – a standardból származó BHT-csúcs területe,

m – a bemért minta mennyisége (kg).

Két párhuzamos mérés között a megengedett legnagyobb eltérés az eredmény 5%-a lehet.

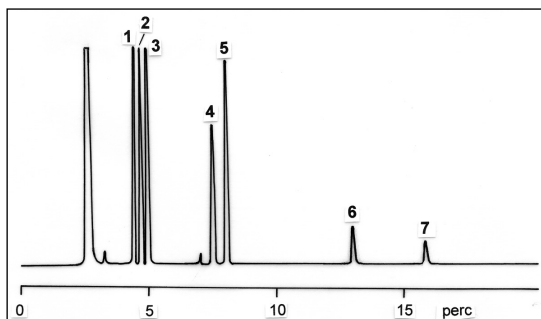
A különféle antioxidánsokat a megfelelő kromatográfias körülmények betartásával egy lépésben is szét lehet választani és meg lehet határozni. A 4.54. ábrán látható szétválasztás különféle antioxidánsok meghatározására irányult. A kromatogramon az első csúcs a butil-hidroxi-anizol, a második csúcs a butil-hidroxi-toluol, az utolsó csúcs pedig a propil-gallát mennyiségét mutatja. A 3-6 csúcsok különféle antioxidánsokhoz tartoznak. A gázkromatográfias elválasztás körülményei a következők voltak (mindegyik antioxidáns 200 µg/cm³ koncentrációjú oldatából 2 µl-t tápláltunk be a gázkromatográfba):

30 m × 0,25 mm SAC-5 oszlop,

200 °C-os hőmérséklet,

30 cm/sec áramlási sebességű héliumgáz,

lángionizációs detektor 200 °C-on.

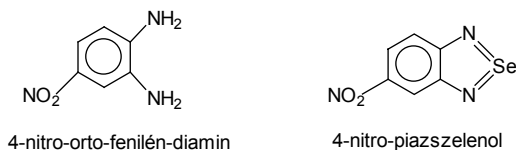


4.54. ábra. A különféle típusú antioxidánsok szétválasztása és meghatározása gázkromatográfiával

1. BHA, 2. BHT, 3. TBHQ, 4. Etoxiquin, 5. Ionox 100, 6. THBP, 7. Propil-gallát

3.3.2.4.4. Szeléntartalom meghatározása biológiai mintákból gázkromatográfiás eljárással

A módszer alkalmas vér, vérszérum, hús, tej, tejtermékek szeléntartalmának meghatározására. A szelén önmagában nem alkalmas a gázkromatográfiás meghatározásra, mert 300 °C-ig nem párologtatható el, ezért olyan szelénszármazékot kell képezni, amely megfelelően illékony, így alkalmas a gázkromatográfiás vizsgálatra. Ilyen alkalmas anyag lehet a piazszenol, amely a vizsgálati minta roncsolása után szabaddá vált négy vegyértékű szelén és egy alkalmas származékképző reagens reakciójával állítható elő. Ez az illékony vegyület az aromás 4-nitro-orto-fenilén-diamin és a szelén reakciója során keletkezik. A származékképző reagens és a szelénnel kapott származék képlete a következő:



A 4-nitro-piazszenol megfelelő körülmények között a szennyező anyagoktól jól elkülöníthető és mennyiségileg jól meghatározható.

A vizsgálati eljárás során a mintát először roncsolni kell, amelyet a származékképzés követ, majd a gázkromatográfiás meghatározással folytatódik. A roncsolás során 1 g alacsony nedvességtartalmú élelmiszerhez vagy 10 g tejhez, vérhez 4 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ -t és 10 cm³ tömény salétromsavat adunk, és egy

éjszakán át állni hagyjuk. Ezt követően a roncsolást melegítéssel fejezzük be, majd a szárazra párolt anyagot egy éjszakára 500 °C-os izzítókemencébe tesszük. Az izzítás utáni maradékhoz 10 cm³ 6 mólos sósavoldatot adunk, majd szárítószekrényben 30 percig 95-100 °C-on melegítjük. Lehűlés után 25 cm³-es mérőlombikba töltjük, hozzáadunk 4 cm³ 7,5 mólos nátrium-hidroxid-oldatot, majd 25 cm³-re töltjük fel desztillált vízzel. Ebből a törzsoldatból 2,5 cm³-t egy fiolába mérünk, hozzáadunk 0,25 cm³ 4-nitro-orto-fenilén-diamin (NPD) reagensoldatot és 0,5 cm³ toluolt. Egy percig intenzíven rázzuk, majd a toluolos fázisból 2 μl-t injektálunk a gázkromatográfba. Az elválasztást 30 m hosszú, 0,75 mm belső átmérőjű üvegapilláris kolonnán SPB-35 megosztó fázissal végezzük elektronbefogásos (ECD) detektorral. Direkt injektálást végzünk 230 °C-os hőmérsékleten. A kolonnatér hőmérséklete 170 °C, a detektor hőmérséklete pedig 300 °C. A mennyiségi meghatározáshoz ismert koncentrációjú szelénoldattal elvégezzük az előzőekben ismertetett vizsgálati eljárást. Az ismert koncentrációjú szelénoldattal kalibráljuk a készüléket, és a szelén mennyiségének meghatározása során a minta és a standard anyag kromatográfiás csúcsának területét viszonyítjuk egymáshoz. A számolást a következő képlet alapján végezzük:

$$\text{Szelén} = \frac{T_{\text{minta}}}{T_{\text{standard}}},$$

ahol: Szelén – a minta szeléntartalma μg/dm³ egységben,

T_{minta} – a minta szeléntartalmából adódó kromatográfiás csúcs területe,

T_{standard} – a standardból származó szelén kromatográfiás csúcsának területe.

Két párhuzamos mérés között a megengedett legnagyobb eltérés az eredmény 5%-a.

4.3.3. A nyersrost és a rostfrakciók meghatározása

4.3.3.1. A nyersrosttartalom meghatározása klasszikus módszerrel

A nyersrost fogalmkörébe eltérő kémiai összetételű és különböző kémiai viselkedésű, kizárólag növényekben található anyagok tartoznak. Az eltérő kémiai jellegből adódóan nehéz olyan vizsgálati módszert találni, amely megfelelné rutinvizsgálatok céljaira is. A ma használatos módszer szerint a mintát 30 percig 1,25%-os kénsavban, majd a kénsav eltávolítása és desztillált vizes mosás után 1,25%-os kálium-hidroxid-oldatban fél óráig főzzük, amelynek során a fehérjék, az oldható szénhidrátok, a zsírok, a szerves savak és az ásványi anyagok egy része oldatba megy, a szűrőn pedig visszamarad a nyersrost, amelynek szárazanyag-tartalmából még le kell vonni a nyersrost hamutartalmát. A módszer hibái közé tartozik, hogy a főzés során a hemicellulóz 50-80%-a, a cellulóznak és a ligninnek pedig 10-40%-a oldatba megy.

A nyersrosttartalom meghatározása során 2 g megfelelően előkészített takarmányt 1 mg-os pontossággal bemérünk egy 400 cm³-es főzőpohárba, hozzáadunk 150 cm³ desztillált vizet és 50 cm³ 0,510 mólos kénsavat (a kettő együtt 1,25%-os kénsavoldatot eredményez), szükség szerint néhány csepp habzástgátló anyagot, majd 30 percen keresztül forraljuk, az elpárolgó vizet pedig forró desztillált vízzel a 200 cm³-es jelig pótoljuk. Ezt követően a forrás leállítására 50 cm³ hideg desztillált vizet adunk hozzá, hagyjuk lehűlni szobahőmérsékletűre, majd a kapott folyadékot tulipántölcséren keresztül molnár selyemszita segítségével leszívátjuk. A maradékot meleg vízzel savmentessé mossuk, majd a szűrőn maradt részeket veszteség nélkül, fecskendőpalack (spriccflakon) segítségével mindig visszajuttatjuk a pohárba. Ezután hozzáadunk 50 cm³ 0,891 mólos kálium-hidroxid-oldatot és desztillált vízzel 200 cm³-re egészítjük ki (az így kapott oldat 1,25%-os), 30 percig forraljuk, miközben az elpárolgó vizet forró desztillált vízzel pótoljuk a 200 cm³-es jelig. A 30 perc letelte után a forrás megállítására hozzáadunk 50 cm³ hideg vizet, hagyjuk lehűlni szobahőmérsékletűre, és a folyadékot tulipántölcséren keresztül molnár selyemszita segítségével leszívátjuk. A maradékot 150 cm³ meleg vízzel többszöri ismételtetéssel tisztára mossuk, miközben a szűrőn maradt részeket minden esetben veszteség nélkül visszajuttatjuk a pohárba.

A savas, illetve a lúgos forralás után kapott maradékot egy átnedvesített szűrőpapíron keresztül leszűrjük (4.55. ábra). A hamumentes analitikai szűrőpapírt előzőleg 105 °C-on 1 órán át szárítjuk, majd a bemérodénnyel együtt 0,2 mg pontossággal lemérjük (B). A pohárból a savas-lúgos mosással kapott anyagot egy gumírozott végű üvegbot segítségével maradék nélkül a szűrőre mossuk. A víz lecsurgása után a kapott anyagot a rosttartalomtól függően kétszer-háromszor 25 cm³ acetonnal átmoszuk. Az aceton lecsurgása után a szűrőpapírt a bemérodénybe visszatesztjük, 5-8 órán keresztül 105 °C-on, fedél nélkül tömegállandóságig szárítjuk. Szárítás után a szárítóedényre a fedelet rárajuk, exsikkátorban hagyjuk lehűlni, majd 0,2 mg pontossággal lemérjük (A). Az A–B különbség a rosthامت még tartalmazó rost, azaz „a”.

A rosthامت-meghatározáshoz 0,2 mg pontossággal lemérünk egy kiizzított kvarc- vagy porcelántégelyt (D), és belehelyezzük a rostot tartalmazó szűrőpapírt. 550 °C-on három órán keresztül izzítókemencében hamvasztjuk, majd exsikkátorban hagyjuk kihűlni, és 0,2 mg pontossággal lemérjük (C). A C–D különbség a rosthامت, azaz a „b”.

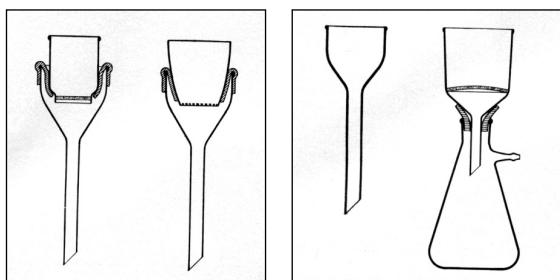
A nyersrosttartalmat az alábbi képlet szerint számítjuk és tömegszázalékban fejezzük ki:

$$\text{Nyersrost\%} = \frac{a - b}{m} \cdot 100,$$

ahol: a – rosthامت-tartalmú nyersrost tömege, azaz A–B, (g),

b – rosthامت tömege, azaz C–D, (g),

m – meghatározáshoz bemért minta tömege (g).



4.55. ábra. Különböző típusú porcelánszűrők a rost szűrésére

A nyersrosttartalom a két párhuzamos meghatározás eredményéből számított középérték. Azonos mintából két párhuzamos mérés eredménye közötti legnagyobb megengedett eltérés: 10%-nál kisebb nyersrosttartalom esetén 0,3% nyersrost, 10%-nál nagyobb nyersrosttartalom esetén az eredmény 3%-a.

Amennyiben a takarmány 10%-nál több zsírt tartalmaz, akkor azt a rostmeghatározás előtt zsírtalanítani kell, és a zsírtalanított anyagból kell rostmeghatározást végezni. Zsírtalanított minta esetében az eredmény kiszámítása és kifejezése a következők szerint történik:

$$\text{Nyersrost\%} = \frac{(a - b) \cdot (100 - z_s)}{m_{z_s}}$$

ahol: a – a rosthamu-tartalmú nyersrost tömege, azaz A–B, (g),

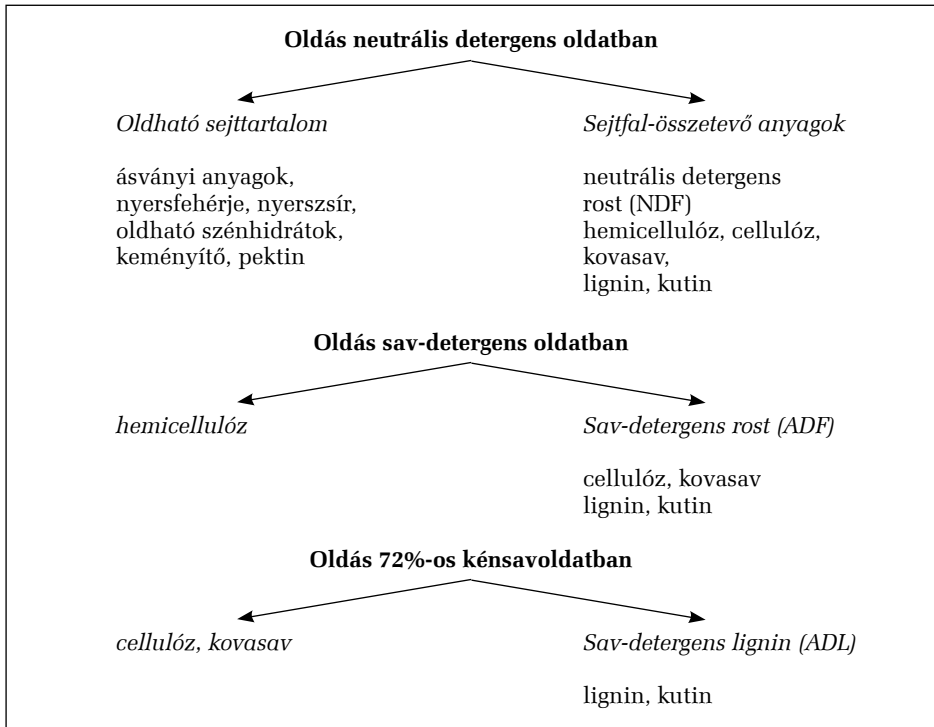
b – a rosthamu tömege, azaz C–D, (g),

z_s – a vizsgált takarmányminta zsírtartalma %-ban,

m_{z_s} – a nyersrost-meghatározáshoz bemért zsírtalanított minta tömege (g).

4.3.3.2. A rostfrakciók meghatározása Van Soest szerint

A klasszikus rostmeghatározás hibáinak kiküszöbölésére Van Soest egy új módszert dolgozott ki a növények sejtfalát alkotó anyagok és az oldható sejttartalom különválasztására. Eszerint egy 7,0 pH-ra beállított ún. neutrális detergens oldattal (Na-lauril-szulfátot, etilén-diamin-tetraecetsavat, dinátrium-hidrogénfoszfátot és nátrium-borátot tartalmazó oldat) egy órán át történő főzéssel kioldjuk, a növényi sejtek oldható sejttartalmát, azaz az ásványi anyagokat, a nyersfehérjét, a nyerszsírt, a cukrokat, a keményítőt és a pektint. A vízzel, majd acetonnal történő többszöri mosás után visszamaradó rész az ún. **neutrális detergens rost** (Neutral Detergent Fiber, **NDF**) tartalmazza a sejtfal-összetevőket, azaz a hemicellulózt, a cellulózt, a kovasavat, a lignint és a kutint. Ezt követően a neutrális detergens



4.56. ábra. A rostfrakciók meghatározása Van Soest szerint

rost alkotóinak szétválasztása következik, amelynek során először 0,5 M kénsavat és 2% cetil-trimetil-ammonium-bromidot tartalmazó oldattal főzzük a NDF-et, amelynek hatására oldatba megy a hemicellulóz, és a maradék, az ún. **sav-detergens rost** (**Acid Detergent Fiber, ADF**) már csak a cellulózt, a lignint és az inkrusztáló anyagokat (kovasav, kutin) tartalmazza.

A sav-detergens rost két legfontosabb alkotórészét, a cellulózt és a lignint 72%-os kénsavoldatban történő kezeléssel lehet szétválasztani, amelynek során a cellulóz és a kovasav oldatba megy, a kutin és a lignin pedig visszamarad a **sav-detergens lignin** (**Acid Detergent Lignin, ADL**) frakcióban. A leírt rostfrakció-meghatározási módszert a 4.56. ábra szemlélteti.

Ez a módszer az utóbbi időben rendkívül elterjedt, mert leegyszerűsítette az élelmiszerek analízisét. Az oldható sejtartalom jól tájékoztat az élelmiszer tápláléértékéről, a sav-detergens rostra kapott eredmények pedig jól egyeznek a hasznosulási kísérletek eredményeivel. A rutinvizsgálatoknál általában megelégszünk az NDF meghatározásával, és csak ritkábban kerül sor az ADF és az ADL analízisére. A rostfrakció-analízist végezhetjük nagy odafigyeléssel manuálisan



4.57. ábra. Tecator Fibertec rostmeghatározó

is, az ismertetett detergens oldatok alkalmazásával, de célszerű az analíziseket valamilyen automatikusan működő műszer (pl. Tecator Fibertec, 4.57. ábra) segítségével végezni. Ebben az esetben a vizsgálandó mintát egy zsugorított üvegszűrőbe mérjük be, amelyben a neutrális detergens oldattal, a sav-detergens oldattal és a sav-detergens-lignin oldattal is kezelhetjük a mintát. Mindegyik kezelés után az oldatokat a zsugorított üvegrétegen keresztül vízsugárszivattyúval leszívjuk, aminek során a minta a zsugorított üvegszűrőn marad. A szűrő és a minta szárítása és mérése után alkalmazzuk a következő detergens oldatot, tehát a minta a szűrőt sohasem hagyja el, így a manipulációs veszteség is sokkal kisebb, mint a kézi eljárásnál. Egy készülékkel naponta 18-24 minta rostfrakcióit lehet meghatározni.

4.3.4. A nitrogénmentes kivonható anyagok meghatározása

Élelmiszerek analízisének a nitrogénmentes kivonható anyagokat, amelyek tartalmazzák a cukrokat, a keményítőt, az inulint, a pektint, valamint a hemicellulózt és a cellulóz oldható részét, számítással határozzuk meg. Amennyiben az élelmiszer szárazanyag-tartalmából kivonjuk a hamu-, a nyersfehérje-, a nyerszsír- és a nyersrosttartalmat, akkor megkapjuk a nitrogénmentes kivonható anyagok mennyiségét. Ha pontosabb analízisre van szükségünk, akkor a következő vizsgálatokat alkalmazhatjuk a nitrogénmentes kivonható anyagok egyes komponenseinek kimutatására és meghatározására.

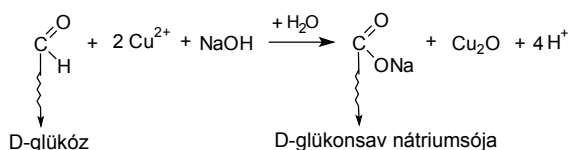
4.3.4.1. A cukrok kimutatása és meghatározása

A szénhidrátok és ezen belül a cukrok (mono-, di-, illetve triszacharidok, polihidroxi-aldehidek vagy polihidroxi-ke-tonok, illetve ezek származékai) kémiai

sajátságait az alkoholos hidroxil-, valamint az aldehid-, illetve a ketocsoportok szabják meg. Kimutatásuk és meghatározásuk is a funkciós csoportok kémiai reakciói alapján történik. Ezek közül legjelentősebbek a szabad aldehidcsoport kémiai reakciói, amelyek segítségével a redukálócukrok könnyen kimutathatók és meghatározhatóak.

4.3.4.1.1. Aldózok kimutatása Fehling-reakcióval és ezüsttükör-próbával

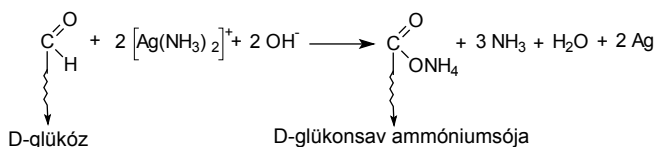
A Fehling-reakció során a réz(II)-szulfát oldatból (Fehling I-oldat) és a lúgos kálium-nátrium-tartarát oldatból (Fehling II-oldat) keletkező kék színű komplexből a cukrok vörös színű réz(I)-oxid csapadékot választanak le a következő reakció szerint:



A reakció során a két vegyértékű rézionokat a D-glükóz aldehidcsoportja egy vegyértékű rézionokká redukálja, miközben a glükóz aldehidcsoportja karboxilcsoporttá alakul (oxidálódik), a D-glükózból pedig nátrium-hidroxidos közegben a D-glükonsav nátriumsója keletkezik. A réz(I)-oxid mennyiségének mérésével a glükóz koncentrációja is meghatározható.

A Fehling-reakció kivitelezése során néhány cm^3 1%-os D-glükóz-oldathoz 2 cm^3 Fehling I- és 2 cm^3 Fehling II-oldatot adunk, majd a kémcső tartalmát forrásig melegítjük. A forralás megkezdésétől számított pár másodpercen belül a vörösbarna rézoxid-csapadék kiválása észlelhető, amely a forralás befejezése után leülepszik a kémcső aljára.

Az ezüsttükör-próba során ammóniás ezüst-nitrát-oldatból a D-glükóz a tökéletesen tiszta zsírintes kémcső falára fémezüstöt választ ki, amelynek során az ezüst tükröző bevonatot képez. Amennyiben a kémcső nem tökéletesen tiszta, vagy a reakció közben a kémcsövet megrázzuk, az ezüst fekete csapadék formájában válik le, ami a forralás után kiülepszik az oldatból. A reakció során a D-glükóz aldehidcsoportja reagál egy ezüst-amin komplexszel, amelyet ezüst-nitrát-oldatból ammónium-hidroxiddal állítunk elő, és az ennek során keletkezett csapadékot ammónium-hidroxid feleslegében oldjuk. A reakció során a D-glükózból D-glükonsav, illetve annak ammóniumsója, az ezüstionból pedig fémezüst keletkezik. A kísérlet kivitelezése során 2-3 cm^3 D-glükóz-oldathoz 5 cm^3 5%-os ammóniás ezüst-nitrát-oldatot adunk, és az elegyet vízfürdőn óvatosan melegítjük. Szerencsés esetben a kémcső falára ezüsttükör formájában fémezüst válik le, ellenkező esetben fekete csapadékot kapunk. A reakció a következő egyenlet szerint megy végbe:



4.3.4.1.2. Az összes cukortartalom meghatározása

Élelmiszereinkben általában a szacharóz vagy más néven répacukor, ha tejet tartalmazó élelmiszerről van szó, a tejcukor fordul elő nagyobb koncentrációban. E két cukor a diszacharidok csoportjába tartozik, mindkettő képlete $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. A laktóz a redukálócukrok, a szacharóz pedig a nem redukálócukrok közé tartozik, azaz a laktóz adja, a szacharóz nem adja a Fehling-reakciót és az ezüsttükörpróbát. Mindkét diszacharid híg sósavas oldatban melegítve két monoszachariddá, a szacharóz glükózzá és fruktózzá, a laktóz pedig glükózzá és galaktózzá hidrolizálható.

A mennyiségi meghatározás elve tulajdonképpen az előző fejezetben ismertetett Fehling-reakció, amelynek során a Cu^{2+} -ionokból Cu^+ -ionok keletkeznek, a cukor aldehidcsoportjának hatására. A Cu^+ -ionok mennyiségét meghatározva a cukor mennyisége pontosan meghatározható. A vizsgálati eljárás során 20 g mintát mérünk be egy 1000 cm^3 -es mérőlombikba, hozzáadunk 500 cm^3 vizet, és 1 órán át rázógépből rázatjuk. A cukor meghatározását zavaró anyagok eltávolítására $20\text{-}20 \text{ cm}^3$ Carrez I- és II-oldatot adunk hozzá. A Carrez I-oldat készítése során 100 cm^3 -es mérőlombikban desztillált vízben feloldunk $21,9 \text{ g}$ cink-acetátot, hozzáadunk 3 cm^3 ecetsavat, jelig töltjük és jól összerázzuk. A Carrez II-oldat készítése során egy 100 cm^3 -es mérőlombikban desztillált vízben feloldunk $10,6 \text{ g}$ kálium-hexaciano-ferrát(II)-ot, elegyítjük, jelig töltjük. A Carrez I- és a Carrez II-oldat hozzáadása után 80% -os etanollal jelre töltjük, összerázzuk és leszűrjük. A szűrletből kiveszünk 200 cm^3 -t, elpárologtatjuk az etanol fő tömegét, a bepárlási maradékot pedig meleg desztillált vízzel átmossuk egy 200 cm^3 -es mérőlombikba, majd lehűlés után jelre töltjük. Ezt az oldatot használjuk a későbbiekben a redukálás, valamint az inverzió után az összes cukortartalom meghatározásához.

A redukálócukor-tartalom meghatározása során az előzőek szerint előkészített oldatból kipipetázzunk kb. 25 cm^3 oldatot egy 300 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikba. A kivett oldat 60 mg -nál több redukálócukrot ne tartalmazzon. Pipetázzunk 25 cm^3 Luff-Schoorl-reagenst az Erlenmeyer-lombikban lévő 25 cm^3 vizsgálandó oldathoz. (A Luff-Schoorl-reagenst az alábbi módon készítjük el: óvatosan keverve 100 g , 50 tömegszázalékos citromsavoldatot $300\text{-}350 \text{ cm}^3$ nátrium-karbonát-oldathoz töltünk egy 1000 cm^3 -es mérőlombikba, mely már $143,8 \text{ g}$ vízmentes nátrium-karbonátot tartalmaz feloldva. Hozzáadjuk a 100 cm^3 desztillált vízben feloldott 25 g réz-szulfátot, összerázzuk, majd desztillált vízzel jelre töltjük, elegyítjük. Egy éjszakán át ülepedni hagyjuk, majd leszűrjük, és

294 ■ 4. Élelmiszerek összetételének meghatározása

4.8. táblázat. A Luff-Schoorl-reagenshez tartozó 0,1 mólos nátrium-tioszulfát mérőoldat fogyásának megfelelő glükóz, fruktóz, invertcukor tömege mg-ban (kétpérfes melegítés és tízpérfes forralás esetén)

0,1 mólos Na ₂ S ₂ O ₃ mérőoldat térfogata (V-F)f cm ³	A glükóz, fruktóz, invertcukor tömege (K)	
	mg	tömeg különbség
1	2,4	
2	4,8	2,4
3	7,2	2,4
4	9,7	2,5
5	12,2	2,5
6	14,7	2,5
7	17,2	2,5
8	19,8	2,6
9	22,4	2,6
10	25,0	2,6
11	27,6	2,6
12	30,3	2,7
13	33,0	2,7
14	35,7	2,7
15	38,5	2,8
16	41,3	2,8
17	44,2	2,9
18	47,1	2,9
19	50,0	2,9
20	53,0	3,0
21	56,0	3,0
22	59,1	3,1
23	62,2	3,1

ellenőrfzzük a pH-ját, amelynek optimális esetben 9,1-nek kell lennie.) A minta és a Luff-Schoorl-reagens elegyéhez adjunk 2 db horzsakövet, és szabad láng felett, rázogatva hozzuk forrásba 2 percen belül. Ezt követően azonnal tegyük az Erlenmeyer-lombikot azbesztes hálóra, helyezzünk a lombikra léghűtőt, és pontosan 10 percfig forraljuk, majd azonnal hűtsük le hideg vízzel. A kivált réz(I)-oxidot a következők szerint titráljuk meg: a kihűlt lombikba adagoljunk 10 cm³ 3%-os kálium-jodid-oldatot, és rázogatás közben óvatosan 25 cm³ 3 mólos kén-savoldatot. Ezután titráljuk 0,1 mólos nátrium-tioszulfát oldattal szalmasárga színig, majd adjunk hozzá 1 cm³ keményítőindikátor-oldatot és fejezzük be a titrálást. A fenti eljárással párhuzamosan készítsünk egy vakpróbát, ami csak

abban különbözik az ismertetett eljárástól, hogy a mintaoldat helyett 25 cm³ desztillált vizet használunk.

Az összes cukortartalom meghatározása során pipetázunk a 200 cm³-es mérőlombikban lévő cukoroldatból 50 cm³-t egy 100 cm³-es mérőlombikba, adjunk hozzá néhány csepp metilnarancs-indikátoroldatot és annyi 4 mólos sósavoldatot, amíg az indikátor színe piros lesz. Ezután adjunk hozzá 15 cm³ 0,1 mólos sósavoldatot, majd tegyük a lombikot intenzív forrásban lévő vízfürdőbe, és tartsuk ott 30 percig. Ezután gyorsan hűtsük le 20 °C-ra, adjunk hozzá 15 cm³ 0,1 mólos nátrium-hidroxid-oldatot, töltsük fel desztillált vízzel és rázzuk össze. Vegyünk ki belőle 25 cm³-t és végezzük el a cukormeghatározást az előzőekben ismertetett Luff-Schoorl szerint. A redukáló-, illetve az összes cukortartalmat a 4.8. táblázatban lévő adatok alapján számoljuk a következő képlet segítségével. Az eredményt tömegszázalékban fejezzük ki.

$$C = \frac{K_{(V-F)} \cdot f}{m \cdot 10},$$

ahol: K – a 4.8. táblázatból kikeresett cukortartalom (mg),

V – a vakpróbára fogyott 0,1 mólos nátrium-tioszulfát térfogata (cm³),

F – az aliquot mintaoldatra fogyott 0,1 M nátrium-tioszulfát mérőoldat térfogata (cm³),

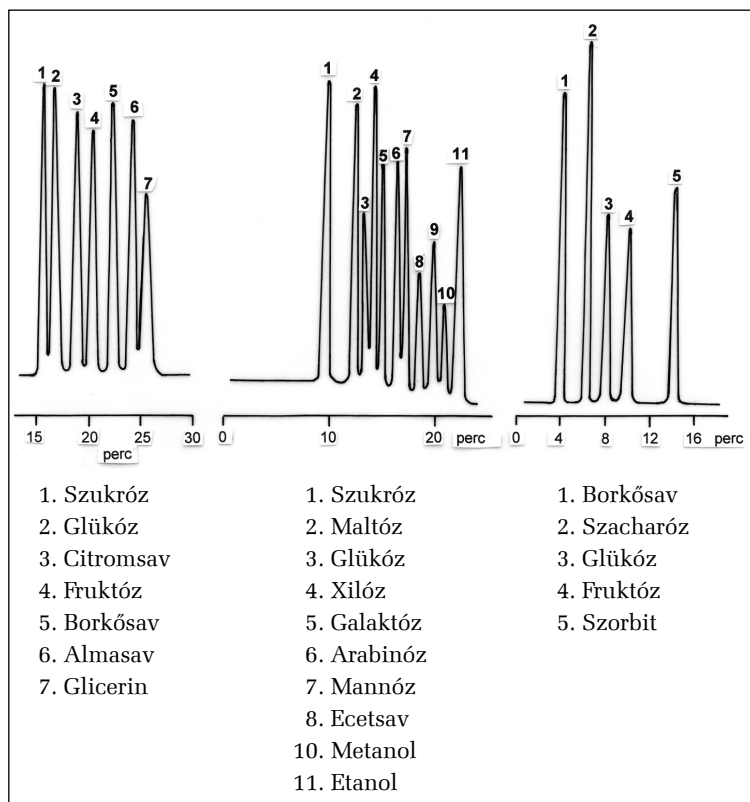
f – 0,1 mólos nátrium-tioszulfát mérőoldat faktora,

m – a titráláskor kipipetázott mintaoldatban lévő minta tömege (g).

A cukortartalom két párhuzamos vizsgálat eredményéből számított számtani középérték, amelyet egytizedesre kerekítve adunk meg. A két párhuzamos mérés között megengedett legnagyobb eltérés a számtani középérték 8%-a.

4.3.4.1.3. Monoszacharidok szétválasztása és meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A monoszacharidokat és a diszacharidokat különböző folyadékkromatográfias technikával, elsősorban nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával szét lehet választani, illetve meg lehet határozni. A 4.58. ábra első kromatogramján látható, hogy az alkalmazott kromatográfias technikával hét szénhidrát egymástól tökéletesen szétválasztható, és a csúcsok elválása kielégíti a meghatározás követelményeit. Még jobb az elválás a harmadik kromatogramon, ahol csak négy cukor, valamint borkósav szétválasztása látható. A középső kromatogram egy bonyolultabb feladat megoldására mutat be példát, ahol a különféle cukrok mellett szerves savakat és alkoholokat is elválasztunk egymástól.



4.58. ábra. Cukrok, savak, alkohokok és cukoralkohokok szétválasztása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A cukrok szétválasztására és meghatározására mindaz érvényes, ami már a korábbi nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiás elválasztás során tárgyalásra került. A különbség csupán annyi, hogy eluensként vizet vagy rendkívül híg savanyú oldatot használunk; az átfolyási sebesség 0,4 és 0,6 cm³/perc, a kromatografálási hőmérséklet pedig 30 és 80 °C között változik. A speciális, cukrok szétválasztására és meghatározására kifejlesztett oszlopok mellett szinte minden elválasztásnál és meghatározásnál törésmutató-mérő detektort használunk.

4.3.4.2. A keményítő és meghatározása

4.3.4.2.1. Különböző kísérletek keményítővel

A keményítő a poliszacharidok csoportjába tartozik; glükóz monomerekből $\alpha(1\rightarrow4)$ kötésekkel kapcsolódó poliszacharid. A keményítő tulajdonságainak tárgyalása-

kor a keményítő oldhatóságával és hidrolízisével, valamint a keményítő és a jód közötti színreakcióval foglalkozunk.

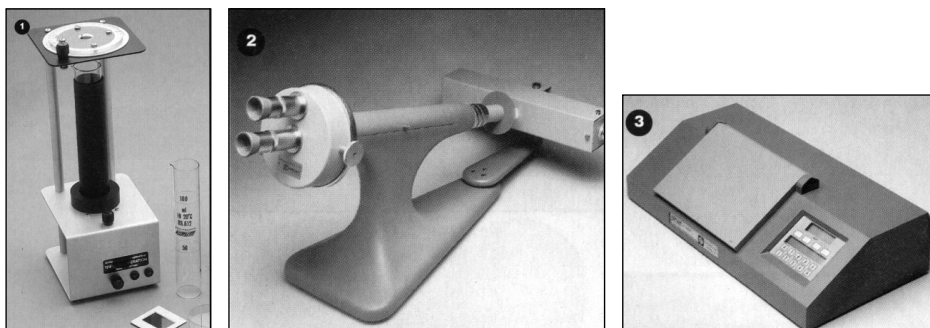
A keményítővel kapcsolatos kísérleteket a keményítőcsiriz készítésével kezdjük. Ennek során 5 g búzakeményítőt 50 cm³ vízben hidegen jól elkeverünk, majd 50 cm³ forró desztillált vizet adunk hozzá, intenzíven összekeverjük, amelynek során pudingszerűen megszilárduló keményítőcsirizt kapunk. A keményítő hideg vízben nem oldódik – ha egy késhegynyi keményítőt 1 cm³-nyi hideg vízzel összeszerázunk, akkor az egy átlátszatlan szuszpenziót képez, ezért, ha ezt az oldatot gázlágon óvatosan melegítjük, akkor 5 percen belül gyengén opalizáló kolloid oldatot kapunk. Az oldat 1 cm³-ét tízszeresére hígítjuk desztillált vízzel, majd az így kapott oldathoz 1-2 csepp kálium-jodidos jódoldatot csepegtetünk. Intenzív sötétkék színeződést tapasztalhatunk, mert a jód és a keményítő kék színű vegyületet alkot egymással. Ezt az ún. jód-keményítő reakciót rendkívüli érzékenysége miatt mind a jód, mind a keményítő kimutatására használják.

A keményítő sem az ezüsttükör-, sem a Fehling-reakciót nem adja, mivel szabad aldehidcsoportot nem tartalmaz. A keményítő tömény kénsavval reagáltatva vagy híg savakkal hosszabb ideig forralva hidrolízis közben monoszacharidokká alakul, amely már adja a Fehling-reakciót. Állításunk igazolására két kísérletet is végezhetünk. Az első kísérletben egy 100 cm³-es főzőpohárban pár gramm keményítőt mérünk, majd 5-10 csepp koncentrált kénsavat adunk hozzá. Üvegbottal a kénsavat és a keményítőt egymással elkeverjük, a kapott péphez óvatosan 1-2 cm³ desztillált vizet adunk, majd gázlágon óvatosan 2 percig forraljuk az oldatot. Lehűlés után 1 cm³-t kiveszünk az oldatból, nátrium-hidroxid-oldattal meglúgosítjuk, majd elvégezzük a Fehling-próbát, melynek eredménye pozitív lesz.

A második kísérletben 10 db kémcsövet helyezünk egy kémcsőtartóba, és mindegyikbe töltünk 10 cm³ 0,1 mólos sósavoldatot. Mindegyik kémcsőhöz hozzáadunk olyan keményítőtartalmú oldatot, amelyet 10 g keményítőcsiriz és 50 cm³ desztillált víz elkeverésével állítottunk elő. A keményítőoldatból töltünk 1 cm³-t mindegyik kémcsőbe, tartalmukat rázzuk jól össze, és helyezük őket egy forró vizes edénybe. A forrás kezdetétől számított kétpercenként vegyünk ki egy-egy kémcsövet a forró vízből, és jeles vízben azonnal hűtsük le. A tizedik kémcső kivétele után (20 perc) várjuk meg, míg mindegyik kémcső tökéletesen kihűl, tartalmukat felezzük meg, és végezzük el egyik felével a jód-keményítő, a másik felével pedig a Fehling-reakciót. A két percig forró vízben állt kémcső a jód-keményítő reakciót még kiválóan adja, a Fehling-reakció pedig kevés redukálócukor jelenlétére utal. A 20 percig forró vízben tartott kémcső már nem adja a jód-keményítő reakciót, viszont intenzív sötétbarna elszíneződést kapunk a Fehling-reakció elvégzése után, ami nagy mennyiségű redukálócukor jelenlétére utal. Amennyiben az összes kémcsővel elvégezzük a jód-keményítő reakciót, akkor egy olyan színskálát kapunk, amelynek az első tagjai (2, 4 perces melegítés) intenzív kék színt produkálnak, amely színintenzitás az idő függvényében csökken, és a 16-20 percig forró vízben lévő kémcsövek már csak rendkívül halvány színt produkálnak, illetve a színreakciót egyáltalán nem is adják.

4.3.4.2.2. A keményítőtartalom meghatározása

A gyakorlatban leginkább alkalmazott módszer szerint a takarmánymintát meghatározott ideig híg sósavoldatban főzzük, a fehérjék kicsapása után a tükrös szűrlet optikai forgatóképességét pedig polariméteren mérjük. A kapott forgatási értéket korrigáljuk a 40 térfogat%-os etanolban oldható híg sósavoldattal kezelt komponensek optikai forgatóképességének értékével, majd e korrigált forgatási érték alapján számítjuk ki a keményítőtartalmat. Tájékoztató mérésre elegendő a fehérjék kicsapása után kapott szűrlet optikai forgatóképességének polariméteres mérése is (4.59. ábra), ez azonban tartalmazza az élelmiszerben jelen lévő egyéb, optikailag aktív vegyületek (cukrok, aminosavak) forgatóképességét is.



4.59. ábra. Különböző típusú polariméterek a forgatóképesség meghatározására

A tájékoztató vizsgálat szerint a megfelelően előkészített és homogenizált mintából 1 mg-os pontossággal lemérünk 2,5 g-ot, és 100 cm³-es polarizálólombikba helyezük. Hozzáadunk 25 cm³ 0,31 mólos sósavoldatot úgy, hogy a minta teljes mennyisége átnedvesedjen, és a lombik nyakára tapadt mintarészecskék is a lombikba mosódjanak. Ezt követően még hozzáadunk 25 cm³ 0,31 mólos sósavoldatot, majd a lombikokat forrásban lévő vízfürdőbe helyezük, és pontosan 15 percig forraljuk.

A vízfürdőből kivéve azonnal 25 cm³ hideg desztillált vizet adunk hozzá, és a lombikot hideg vízzel szobahőmérsékletűre hűtjük. Kis fehérjetartalom esetén hozzáadunk 5 cm³ Carrez I-, majd 5 cm³ Carrez II-oldatot, és ismételen alaposan összerázzuk. Nagy fehérjetartalom esetén a Carrez-oldatokat megduplázzuk. Desztillált vízzel jelig töltjük, és összerázás után szűrjük. Ezt követően mérjük a szűrlet optikai forgatóképességét polariméterrel (α). Ha a leszűrt oldat nem tükrös, ismételjük meg a műveleteket nagyobb mennyiségű Carrez-oldatok használatával. A keményítőtartalmat (K) a következő képlettel számítjuk ki és tömegszázalékban adjuk meg:

$$K = \frac{100 \cdot 100 \cdot \alpha}{[\alpha]_{20}^D \cdot l \cdot m} \cdot f,$$

ahol: α – a minta forgatóképessége (fok),

$[\alpha]_{20}^D$ – a fajlagos forgatóképesség (fok),

l – a polarimétercső hossza (dm),

m – a vizsgálathoz bemért minta tömege (g),

f – átszámítási faktor, a mérés hullámhosszáról (546 nm) a nátrium

D-vonalára (589 nm).

Azonos mintából két párhuzamos meghatározás eredménye között megengedett legnagyobb eltérés 0,5% keményítőtartalom.

4.3.4.3. Válogatott fejezetek

4.3.4.3.1. Cukoripari késztermékek hamutartalmának meghatározása az elektromos vezetőképesség alapján

A kereskedelmi forgalomba kerülő cukrok nagy tisztaságú élelmiszerek, amelyek a cukron kívül minimális mennyiségben csak ásványi anyagokat tartalmaznak. Hazánkban a kristálycukor megengedett maximális hamutartalma 0,044%, a finomított kristálycukoré és a kockacukoré pedig 0,025%. Ilyen kis mennyiségű hamutartalmat a hagyományos módon (izzítás utáni mérlegelés) rendkívül körülményes meghatározni, ezért inkább a desztillált vízben oldott cukor elektromos vezetőképességét mérik, hisz a nagyobb hamutartalom több fémionnal jár együtt, amelynek következtében a nagyobb hamutartalmú cukoroldat elektromos vezetőképessége is nagyobb. A répacukor maga nem vezet az elektromos áramot, sőt az ionok mozgékonyságának akadályozásával az oldat vezetőképességét még csökkenti is.

A vezetőképesség-mérésnél problémát okoz a hőmérséklet is, ezért a mérőműszer kalibrálását és a minta vezetőképességének mérését mindig azonos hőmérsékleten kell elvégezni, vagy hőmérséklet-korrekciót kell alkalmazni. A hitelesítő- és a mintaoldatok készítésénél bidesztillált vizet kell használni, hogy a vízben lévő ionok a mintaoldat vezetőképességét csak csekély mértékben befolyásolják. A jó minőségű bidesztillált víz fajlagos vezetőképessége szobahőmérsékleten $5 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. A vezetőképességet konduktométerrel mérjük, amelynek lényege, hogy egy harangelektrodból kialakított mérőcellát merítünk a mérendő közegbe, és az ezen létrejövő feszültségesést mérjük. A fajlagos vezetőképességet a $\kappa = C \cdot K$ összefüggés definiálja, ahol C a harangelektrod cellaállandója, amelyet ismert koncentrációjú kálium-klorid-oldat vezetőképességét mérve határozzunk meg, K a műszerskálán leolvasott érték $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ -ben.

300 ■ 4. Élelmiszerek összetételének meghatározása

A kristálycukor hamutartalma meghatározása során 26 g/100 cm³ koncentrációjú vizes oldatot készítünk, majd megmérjük ennek fajlagos vezetőképességét 20 °C-on, valamint ezzel párhuzamosan mérjük az oldatkészítéshez használt víz vezetőképességét is 20 °C-on. A %-ban kifejezett hamutartalmat a következő képlet szerint számítjuk ki és tömegszázalékban adjuk meg:

$$H = 6 \cdot 10^{-4} \cdot C (K - 0,35 \cdot K_V),$$

ahol: K_V – a műszerskáláról leolvasott víz vezetőképessége ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$),

C – a harangelektrod cellaállandója,

K – a mérőműszeren leolvasott érték ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$).

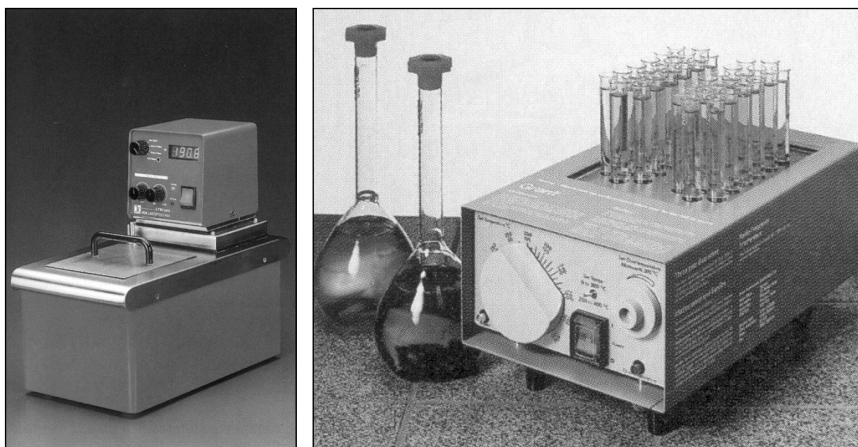
4.3.4.3.2. A melasszal kapcsolatos vizsgálatok

A melasz olyan sötétbarna, jellegzetes szagú, sűrűn folyó folyadék, amely átlagosan 50% cukrot, 12% hamut és mintegy 20% nem cukorszerű szerves anyagot tartalmaz. Szárazanyag-tartalma a technológiától függően 80-84% között van. Takarmányként történő hasznosítását rendkívül nagy energiatartalma és ízletessége indokolja, és a nagy cukortartalom mellett jelentős szereppel bírhat a kérődzők takarmányozásában 1,3-1,8% nemfehérjenitrogén-tartalma is. Ásványianyag-tartalmára jellemző az alacsony nátrium-, kalcium- és foszfortartalom, illetve a rendkívül magas káliumtartalom, ami nagyobb mennyiségű melasz etetése esetén zavart okozhat az állat ásványianyag-háztartásában is. Ragacsos, viszkózus volta miatt viszonylag nehéz a takarmányozási technológiába beilleszteni; ez a tulajdonsága azonban előnyösen kihasználható granulátumok, pelletek készítésénél, hisz a takarmányszemcséket nagyon könnyen összeragasztja. Az említettekén túl jelentős lehet szabadaminosav-tartalma, és nagyon sok, a mikroorganizmusok életműködéséhez szükséges biológiailag aktív anyagot (B_1 -, B_6 -vitamin, nikotinsav, folsav, biotin, pantoténsav, inozit) is tartalmaz.

4.3.4.3.2.1. A melasz szárazanyag-tartalmának meghatározása kézi refraktométerrel

A melasz szárazanyag-tartalmának meghatározása a szabványos szárítószekrényben történő szárítással rendkívül nehéz a nagy cukortartalom miatt, ezért ennek mérésére különböző indirekt módszereket dolgoztak ki. A refraktometriás módszer azon alapszik, hogy adott hőmérsékleten egy oldat sűrűsége, illetve törésmutatója szoros kapcsolatban van annak koncentrációjával, amennyiben tehát refraktométerrel meghatározzuk a vizsgálandó anyag (jelen esetben a melasz) törésmutatóját, annak alapján következtethetünk annak látszólagos szárazanyag-tartalmára.

A refraktometriás mérés elvét az alábbiak szerint lehet megfogalmazni. **A fény sebessége megváltozik, ha egy fázishatáron átlépve optikailag eltérő**



4.60. ábra. Keringető- és kémcsőtermosztát a pontos hőmérséklet beállítására



4.61. ábra. Különböző típusú refraktométerek

tulajdonságú közegbe kerül. A sebesség megváltozása az új közegben irányváltást idéz elő, amely jelenséget fénytörésnek nevezzük. A fénytörés a törésmutatóval jellemezhető, ami egyenlő a két egymással érintkező közegben a fénysebesség hányadosával, illetve a fázishatáron áthaladó fény beesési szöge szinuszának és a törési szöge szinuszának hányadosával. Két közeget összehasonlítva azt a közeget tekintjük optikailag sűrűbbnek, ahol a fény sebessége kisebb. A fény sebessége vákuumban a legnagyobb; a vákuumra vonatkoztatott törésmutatót abszolút törésmutatónak nevezzük. A levegőre vonatkoztatott törésmutató csak alig különbözik az abszolút törésmutatótól, ezért a gyakorlatban ezt használjuk.

A melasz szárazanyag-tartalmának meghatározása refraktométerrel az alábbiak szerint történik: A refraktométert úgy helyezük el, hogy a tárgylemez előtt lévő tükör segítségével maximális fény jusson a tárgylemezre. A jól homogenizált mintát vékony rétegben egy kis spatula segítségével egyenletesen elkenjük a refraktométer tárgylemezén, majd tetejét lezárjuk, ügyelve arra, hogy a védőablak

fedelét felnyissuk. A refraktométert a pontos leolvasás érdekében szükség esetén termosztáljuk (4.60. ábra). A készülék megfigyelő távcsövén keresztül két átlósan egymást keresztező vonalat látunk, melynek felső mezője sötét, az alsó pedig világos. A refraktométer (4.61. ábra) jobb és bal oldalán elhelyezett állítógombokat addig forgatjuk, amíg a sötét-világos rész a legélesebb kontúrral pontosan a két vonal metszéspontjában helyezkedik el. Ebben a helyzetben leolvassuk a megfigyelő távcső alsó részénél elhelyezkedő törésmutató- és szárazanyag-skálán a megfelelő értékeket.

4.3.4.3.2.2. A melasz pH-jának elektrometriás meghatározása

A melasz pH-ja a benne oldott anyagok következtében, az alkalmazott technológia függvényében 6,4–8,4 között változik. A melasz pH-jának mérése során bármilyen precíziós pH-mérőt, üveg- és referenciaelektrodát vagy kombinált üvegelektrodát használhatunk. Ez utóbbi együttesen tartalmazza az üvegelektrodát és a másodfajú referenciaelektrodát. Mivel a melasz pH-ja semleges, illetve a gyengén lúgos tartományban várható, ezért az elektrometriás rendszert 7-es pH-jú pufferoldat segítségével hitelesítjük. A pH mérésével egy korábbi fejezetben már foglalkoztunk, ezért ebben a fejezetben csak a melaszra vonatkozó speciális előkészítő eljárást ismertetjük. A 4.62. ábrán egy pH-mérő és néhány elektróda látható.

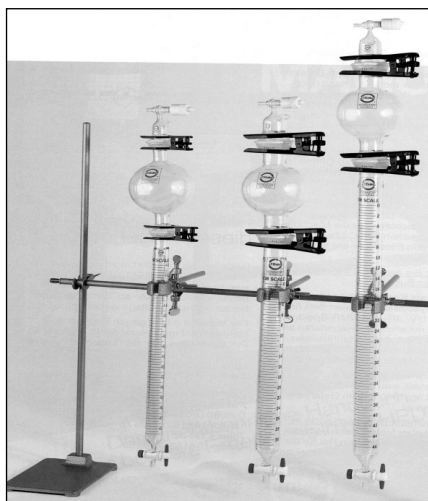


4.62. ábra. Egy pH-mérő és a kapcsolódó mérőelektródák

Mivel a melasz sűrűn folyó viszkózus folyadék, ezért pH-ját közvetlenül mérni nem lehet. Ezért a minta-előkészítés során 50 g melaszt kb. 40 cm³ desztillált vízzel elegyítünk, az elegyet 100 cm³-es mérőlombikba visszük és jelre töltjük. Többszöri összerázás után ezt az 50 vegyes százalékos oldatot használjuk a pH-mérésre. A hígítás a melasz nagy pufferkapacitása miatt nem jelent jelentős változást az eredeti pH-hoz viszonyítva.

4.3.4.3.2.3. A melasz összes aniontartalmának meghatározása ioncserével

Az összes aniontartalom meghatározásakor a vizes melaszoldatot hidrogénion formában lévő, erősen savas kationcserélő oszlopon bocsátjuk át, majd az oszlopon áthaladó oldatban lévő savak mennyiségét acidimetriásan meghatározzuk, és az eredményt 100 g látszólagos szárazanyag-tartalomra adjuk meg. A kationcsere folyamán a kationokkal ekvivalens hidrogénion megy az oldatba, amelynek mennyiségéből következtethetünk a kationok, illetve az ezekkel ekvivalens anionok mennyiségére.



4.63. ábra. Különböző kromatográfiás oszlopok

A vizsgálat során az 50 vegyes százalékos melaszoldatból 20 cm^3 -t egy 100 cm^3 -es Kohlrausch-lombikba mérünk, hozzáadunk egy késhegynyi aktív szennet, a lombikot desztillált vízzel jelre töltjük, majd összerázás után redős szűrőpapíron leszűrjük. A szűrletből 25 cm^3 -t $1,5$ - $2,0 \text{ cm}^3$ /perc sebességgel át bocsátunk a kationcserélő oszlopon; az oszlopról távozó folyadékot pedig egy titrálólombikban fogjuk fel. (A kationcserélő oszlop 12 cm hosszú és $1,2 \text{ cm}$ átmérőjű, a töltet Varion KS kationcserélő műgyanta. A kationcserélő műgyanta oszlopba töltése előtt egy 5 mm vastagságú üvegyapotrétteget helyezünk el a kromatografáló oszlop alján, és erre töltjük rá a 12 cm gyantát. A gyanta hidrogénformába hozása során 2 - 4 cm^3 /perc átfolyási sebességgel kb. 100 cm^3 2 mólos sósavoldatot bocsátunk át az oszlopon, majd annyi desztillált vizet engedünk rá, hogy a lecsepegő folyadék az ezüst-nitráttal már ne adja a kloridok jellemző fehér csapadékos reakcióját. Néhány kromatográfiás oszlop a 4.63. ábrán látható.)

A mintaoldat oszlopon történő átbocsátása után még kb. 60-70 cm³ térfogatú desztillált vizet bocsátunk át az oszlopon 2-4 cm³/perc átfolyási sebességgel, aminek segítségével az ioncserét tökéletesessé tesszük, illetve a kationokkal ekvivalens hidrogénionokat a titrálólombikba tökéletesen átmoszuk. Az ioncserélő oszlopon lecsepegő oldatot 0,1 mólos nátrium-hidroxid-oldattal fenolftaleinindikátor mellett megtitráljuk. A melasz összes aniontartalmát 100 g látszólagos szárazanyag-tartalomra vonatkoztatva az alábbi képlet segítségével számoljuk:

$$A = \frac{40 \cdot a}{b \cdot d} f \text{ mekv}/100Bx^{\circ},$$

ahol: a – a 0,1 mólos nátrium-hidroxid mérőoldat fogyása (cm³),
 f – a mérőoldat faktora,
 b – az aktív szénrel kezelt oldat látszólagos szárazanyag-tartalma,
 d – az előkészített oldat sűrűsége 20 °C-on (átlagosan 1,024 g/cm³),
 Bx[°] – Brix-fok a látszólagos szárazanyag-tartalom mértékegysége.

4.3.4.3.2.4. A melasz kálium- és nátriumtartalmának meghatározása lángfotometriásan

Az előző fejezetben leírt összesaniontartalom-meghatározás során a melaszban lévő kationok a kationcserélő műgyantán megkötődtek, amelyek onnan híg sósav-oldattal lemoshatók, majd ezt követően az eluátumban lévő kálium- és nátriumionok koncentrációja lángfotometriásan mérhetővé válik. E módszer alkalmazásával feleslegessé válik a nagy cukortartalmú melasz rendkívül körülményes szárítása, illetve izzítása. A vizsgálati eljárás során az előző fejezetben leírt ioncserét követően a gyantaoszlopon 100 cm³ 2 mólos sósavoldatot engedünk át 2-4 cm³/perc sebességgel, amelynek során az oszlopról lecsurgó folyadékot egy 100 cm³-es mérőlombikban fogjuk fel. Desztillált vízzel a lombikot jelre töltjük, összerázzuk, és az így kapott oldat kálium- és nátriumion-koncentrációját atomabszorpciós fotométerrel, lángemissziós üzemmódba kapcsolva, levegő-acetilén gázzal működtetve meghatározzuk. A melasz kálium-, illetve nátriumtartalmát mg/kg mértékegységben adjuk meg a lángfotometriásan mért koncentráció (mg/dm³) és a hígítási tényező (40) figyelembevételével.

4.3.4.3.3. A háztartási keményítő tisztaságának vizsgálata polarimetriás módszerrel

A vizsgálat során a mintát forró, hígított kénsavval hidrolizáljuk, majd mérjük az oldat optikai forgatóképességét. Ha a minta oldható szénhidrátokat vagy egyéb, optikailag aktív anyagokat is tartalmaz, megváltozik a forgatóképessége. A forgatóképesség megváltozását okozó anyagok átalakításához a vizsgálandó anyagból

külön bemérést végzünk, abból vizes kivonatot készítünk, majd a szilárd mintához hasonlóan meghatározzuk annak forgatóképességét.

A meghatározás során egy 100 cm³-es Kohlrausch-lombikba bemérünk 2,5 g vizsgálandó anyagot, és körkörös mozzgatással történő keverés közben részletekben hozzáadunk 50 cm³ 1,124%-os sósavoldatot. Ezt követően a lombikot 15 percen át forrásban lévő vízfürdőbe tartjuk, és hárompercenként körkörösén megrázzuk. A negyedóra letelte után a lombikot csapvízzel szobahőmérsékletűre hűtjük, majd hozzáadunk 3-3 cm³ Carrez I- és Carrez II-oldatot. A lombikot desztillált vízzel jelig töltjük, tartalmát összerázzuk, 20 perc után redős szűrőpapíron leszűrjük, és megmérjük a kristálytisztá szűrlet forgatóképességét.

A keményítő mellett lévő egyéb optikai forgatóképességet mutató vegyületek mérésére egy 100 cm³-es Kohlrausch-lombikba bemérünk 2,5 g vizsgálandó anyagot, hozzáadunk 50 cm³ desztillált vizet, majd 30 percig állni hagyjuk, miközben többször körkörösén megmozgatjuk, a vízzel oldható, optikailag aktív anyagok kioldódásának elősegítésére. Ezt követően Carrez I- és Carrez II-oldattal derítést végzünk, majd a szűrletből 50 cm³-t egy 100 cm³-es Kohlrausch-lombikba pipetázunk. Ehhez hozzáadunk 2,25 cm³ 25%-os sósavoldatot, és a hidrolízis-műveletet az előzőekhez hasonlóan elvégezzük. Ezután a lombikot desztillált vízzel jelre töltjük, majd összerázás után mérjük az oldat forgatóképességét. A vizsgálati anyag keményítőtartalmát az alábbiak szerint számoljuk:

$$K = 10,88 \cdot (A - 2k),$$

ahol: A – a keményítő hidrolízise után mért forgatóképesség (körfok),

k – a korrekciós érték meghatározása esetén mért forgatóképesség (körfok).

4.3.4.3.4. A rezisztenskeményítő-tartalom meghatározása

A rezisztens keményítő hatásai a szervezetben

A keményítő a szénhidrátok közül a fő táplálékforrás, a növényekben a legelterjedtebb raktározó poliszacharid, granulátumként jelenik meg a zöld levelek kloroplasztjában és a magok, gumók amiloplasztjában. Nemrég felismerték, hogy **a keményítő részleges emésztése** és a vékonybélben való felszívódása normális jelenség, amely kapcsolatban áll az emészthetetlen keményítőkkal, amelyeket rezisztens keményítőnek (RS) hívnak. Az RS az étrendi rostfajta egyik típusa, amely magába foglalja az összes olyan keményítőt és keményítő-bomlásterméket, amelyek nem szívódnak fel az egészséges ember vékonybélében, és amelyek élettani funkciói hasonlóak az étkezési rostokéhoz. A rezisztens keményítőt a vastagbélben élő mikroorganizmusok rövid láncú zsírsavakká fermentálják, melyek ott csökkentik a pH-t, megakadályozva így a patogén baktériumok túlzott elszaporodását. Az illózsírsavak, az ecetsav, a propionsav és a vajsav közül a

vajsav egészségvédő hatásai a karcinogenezis megelőzése és gátlása a vastagbélben, a nyálkahártya oxidatív stressz elleni védelme, a vastagbél védelmi gátjának megerősítése, és gyulladásgátló tulajdonsággal is rendelkezik. A propionsav képes csökkenteni a koleszterin koncentrációját a vérben, és szerepe van a jóllakottságérzés kialakulásában is.

A rezisztens keményítő definíciója, szerkezete, tulajdonságai

A rezisztens keményítőt négy általános típusba sorolják. Az RS1 keményítő fizikailag nem hozzáférhető az emésztés számára, mert az intakt sejtfalak a gabonákban, a magokban vagy a gumókban megakadályozzák az emésztést. Az RS2 keményítők olyan natív granulátumok, amelyek szemcsés keményítőt tartalmaznak, melyek a konformáció vagy a szerkezet miatt állnak ellen az emésztésnek. Az RS3 a nem szemcsés keményítő eredetű anyagokat jelenti, amelyek ellenállnak az emésztésnek. Ezek általában retrogradált keményítők, amelyek főzési és/vagy hűtési lépések hatására alakulnak ki a natív keményítőkből. Az RS4 kémiai módosított keményítők, amelyek étezzett, észtezzett vagy más vegyszerekkel kialakított keresztkötéseket tartalmaznak oly módon, hogy a keményítő emészthetősége csökken.

A dietetikus (étkezési) rostok sokféle definíciója a meghatározásuk módszeréből adódik, azaz hogy az étkezési rostot növényi részként, kémiai anyagként vagy a vékonybélben történő emésztésfiziológiai anyagcsere részeként határozzuk meg. Az Amerikai Gabona Kémikusok Egyesülete 2000-ben az étrendi rostot olyan ehető részeként határozta meg, amelyek ellenállnak az emberi vékonybélben történő emésztésnek, valamint felszívódásnak, a vastagbélben pedig teljes vagy részleges erjedésen mennek keresztül. Legújabban néhány országban az étrendi rost fogalmába beleértik a rezisztens keményítőt is, azonban ez a felfogás nem terjedt el a világ több országában. **A rezisztens keményítő többszörösen bizonyított kiváló élettani hatásai** miatt célszerű tudni annak élelmiszerekből történő meghatározását.

Analitikai módszerek a rezisztens keményítő mérésére

Az élelmiszerekben található rezisztenskeményítő-tartalom mérésére szolgáló bármely módszer fő lépése először az összes emészthető keményítő eltávolítása a termékből termotabil α -amilázok alkalmazásával. Ezt követően meghatározzák az enzimés emésztés után visszamaradó anyag keményítőtartalmát, ami azonos a rezisztens keményítővel. A módszerek tehát az enzimés emésztés elvén alapulnak, és megadják a 37 °C-on az enzimés emésztésnek ellenálló keményítő mennyiségét.

Az első lépés tehát az emészthető keményítő eltávolítása az élelmiszermintából hasnyálmirigy α -amiláz alkalmazásával. Azokban az esetekben, amikor feltételezhető, hogy termékgátlás léphet fel a hasnyálmirigy α -amilázzal szemben, a további keményítőtöbbszörösen érdeklődés érdekében amiloglükozidázt adnak a mintához. Hogy utánozzák a gyomorban és a bélben lezajló élettani és biokémiai folyamatokat,

esetenként az amilolízis mellett pepszinnel és tripszinnel kiváltott proteolízist is alkalmaznak a meghatározás során. Az enzimes lépések után visszamaradó anyag a rezisztens keményítő. A rezisztens keményítő mennyiségét úgy is lehet számolni, ha a savas hidrolízis utáni összes keményítő mennyiségéből levonják az enzimes hidrolízissel meghatározott emészthető keményítő mennyiségét.

Egy módosított eljárás szerint a két enzimmal elvégzett hidrolízist követően a hidrolízis termékeit 80% etanollal extrahálják, a maradékot 2 mólos kálium-hidroxidban feloldják és amiloglükózidázzal tovább hidrolizálják, majd a második hidrolízis végtermékeinek analízise után számolják a rezisztenskeményítő-tartalmat. Az eljárás során 100 mg mintához 500 U hasnyálmirigy α -amilázt adnak 10 ml 0,1 mólos, 6,9-es pH-jú tris-maleinsav pufferben, ami ezentúl még 4 mM kalcium-kloridot is tartalmaz, majd 16 órán át, 37 °C-on kevertetik. Ezt követően 40 ml etil-alkoholt adnak hozzá, egy óráig állni hagyják, majd centrifugálják. A maradékot kétszer mossák 80%-os etilalkohollal, a maradékot 60 °C-on megszáritják, hozzáadnak 1,5 ml vizet, majd 1,5 ml 4M nátrium-hidroxid-oldatot, fél óráig szobahőmérsékleten kevertetik, majd hozzáadnak még 12 ml vizet. Az így kapott diszperzió 1,5 ml-éhez hozzáadnak 0,65 ml 2M ecetsavoldatot, melynek következtében a pH 4,5-re áll be. Ezt követően hozzáadják a pH = 4,5-es nátrium-acetát pufferben oldott amiloglükózidáz-oldatot, 90 percig 65 °C-on kevertetik, majd a glükóz-oxidáz kittel vagy valamilyen másik analitikai módszerrel meghatározzuk a glükóztartalmat, melyből számolni tudják a rezisztens keményítő mennyiségét.

4.3.5. A provitaminok és a vitaminok meghatározása

Élelmiszerek provitaminjainak és vitaminjainak meghatározása a többi komponenshez viszonyítva relatíve összetett analitikai feladat, mert egyrészt kicsi a koncentrációjuk a többi komponenshez képest, másrészt a legtöbb vitamin érzékeny az oxidációra és néhány még a fényre is. Ezért csak kíméletes analitikai műveletekkel, szükség esetén semleges atmoszférában vagy a direkt fény kiküszöbölésével lehet analizálni. A vitaminok kémiai összetételüket tekintve olyan sokfélék, hogy meghatározásukra általános eljárást nem lehet kidolgozni, csak egyedi analitikai műveletekkel lehet őket elemezni, és meghatározásuk legtöbbször még különböző előkészítési műveleteket is igényel. A legtöbb esetben a meghatározás előtt a zavaró anyagokat el kell távolítani, a vitaminokat extrakcióval ki kell vonni, a kötött formában lévőket kötéseikből fel kell szabadítani, majd ezután következhet az azonosítás és a mennyiségi meghatározás. Általánosságban elmondható, hogy a zsírolható vitaminok kivonását szerves oldószeres extrakcióval végezzük, a vízoldható vitaminokat pedig vízzel vagy pufferoldattal nyerjük ki a vizsgálandó anyagból. A kivonás után az extraktumot általában kromatográfiai módszerrel tisztítjuk, majd tisztítás után alkalmazhatjuk a klasszikus analitikai módszereket, fotometriás és kolorimetriás, spektrofotometriás, fluorimetriás és főként kromatográfiai eljárásokat.

4.3.5.1. A karotin- és a xantofilltartalom meghatározása

A módszer alkalmas légszáraz zöld vagy légszárazra szárított friss zöldnövények karotin- és xantofilltartalmának meghatározására. E módszer szerint a légszáraz zöld vagy szárított mintákat hexán és acetone vagy petroléter és acetone elegyével szobahőmérsékleten nitrogénáram alatt extraháljuk, majd az extraktumot metanolos kálium-hidroxidos oldattal kezeljük. A bepárolt extraktum maradékát petroléterben feloldjuk, és alumínium-oxid oszlopon kromatografáljuk. **Az eluátum karotin-, illetve xantofilltartalmát spektrofotometriásan mérjük.** A meghatározás során extrahálási, kromatografálási és spektrofotometriás méréseket végzünk. Az extrahálás során a mintából, annak várható karotintartalmától függően 1-3 grammot mérünk le 1 mg pontossággal, és csiszolt dugós mérőhengerben vagy mérőlombikban 30 cm^3 n-hexán és acetone 7:3 térfogatarányú elegyét adjuk hozzá. Nitrogéngáz befúvásával a levegőt az üvegedényből elűzzük, az üvegedényt a csiszolt dugóval bedugjuk és 1 éjszakán át sötétben állni hagyjuk. Kromatografálás előtt 1 órával hozzáadunk 2 cm^3 40%-os metanolos kálium-hidroxid-oldatot, összerázzuk, és 30 percig sötétben állni hagyjuk. Ezt követően hozzáadunk 2 cm^3 vizet, összerázzuk, és hagyjuk, hogy a csapadék leülepedjen, majd 70 cm^3 hexánt vagy petrolétert adunk hozzá, elegyítjük és megvárjuk, míg a csapadék ismét leülepszik. A felső tiszta fázisból a várható karotintartalomtól függő mennyiséget egy csiszolatos gömblombikba kimérünk, majd rotációs gyorsbepárlón $50\text{ }^\circ\text{C}$ -on bepároljuk. A bepárlási maradékot 20 cm^3 petroléterben feloldjuk.

Kromatografálásakor a petroléterben szuszpendált alumínium-oxidból egy 15 cm magas oszlopot készítünk, ügyelve arra, hogy az oszlop elkészülte után mindig legyen oldószer az adszorbens felett. Az alumínium-oxid tetejére 2 cm vastagon vízmentes nátrium-szulfátot rétegzünk, és ennek a tetejére visszük fel az előzőek szerint elkészített minta petroléteres oldatát. A kromatografálóoszlopot vízsugár-vákuummal úgy szívjuk meg, hogy az eluátum mennyisége másodpercenként 2-3 csepp legyen. Az eluálást addig folytatjuk, míg a lecsepegő eluátum már szintelen nem lesz. A mérőlombikba gyűjtött eluátumot petroléterrel jelig töltjük és összerázzuk. A karotinfrakció eltávolítása után egy másik mérőlombikba gyűjtjük a xantofillt tartalmazó eluátumot, melyet az oszlopra vitt etanollal oldunk le. A xantofill-frakció távozása után a lombikot etanollal jelig töltjük és összerázzuk.

A spektrofotometriás mérés során a petroléteres eluátum karotintartalmának mérésekor az abszorbanciaértéket 450 nm-es hullámhosszon, 1 cm-es küvettában, petroléterhez hasonlítva mérjük le. A xantofilltartalom meghatározását is ugyanilyen körülmények között végezzük etanolhoz viszonyítva. A karotin- és a xantofilltartalom számításánál figyelembe kell venni az eluátum abszorbanciáját, az eluátum térfogatát, a meghatározáshoz bemért minta tömegét, valamint a karotintartalom-meghatározásnál a β -karotin, a xantofilltartalom-meghatározásnál pedig a xantofill 1%-os petroléteres, illetve etanolos oldatának 1 cm-es küvettában, 450 nm-en mért elméleti abszorbanciaértékét. Az eredmény két párhuzamos

mérés számtani középértéke. A párhuzamos mérések közt megengedhető eltérés a középérték 8%-a. Az eredményt egész számra kerekítve mg/kg-ban adjuk meg.

4.3.5.2. Zsíroltható vitaminok meghatározása

4.3.5.2.1. Az A-vitamin-tartalom meghatározása HPLC-módszerrel

A módszer alkalmas élelmiszerek A-vitamin-tartalmának meghatározására. Az eljárás során a megfelelően előkészített mintát lúgos közegben hidrolizáljuk, a felszabadult retinolt pedig petroléterrel extraháljuk. Az extraktumot bepároljuk, metanolban feloldjuk, a **retinoltartalmat pedig nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával fordított fázisú oszlopon UV-detektálással 325 nm hullámhosszon határozzuk meg.** A retinol felszabadítására lúgos közegben végzett hidrolízis körülményei függenek a várható A-vitamin-tartalomtól. Általánosságban a hidrolízist az alábbi körülmények között végezzük. Az A-vitamin-tartalomtól függően 5-15 g mintát 0,02 g pontossággal egy Erlenmeyer-lombikba mérünk, hozzáadunk 50 cm³ etil-alkoholt, 2 cm³ 3%-os nátrium-szulfid-oldatot, 2 cm³ 10%-os aszkorbinsav-oldatot és 1 cm³ 0,1%-os metanolban oldott BHT-t, végül 10 cm³ 60%-os kálium-hidroxid-oldatot. A lombik tartalmát óvatosan körkörösén összerázzuk, és 30 percre nitrogénáram mellett 70 °C-os hőmérsékletű vízfürdőbe merítjük. Ez idő alatt 5 percenként intenzíven körkörösén összerázzuk, majd a hűtőt 10 cm³ etil-alkohollal leöblítjük, és a lombikot vízcsap alatt szobahőmérsékletűre lehűtjük. A hidrolizátumot 50 cm³ vízzel, majd etil-alkohollal az oldhatatlan részekkel együtt 200 cm³-es mérőlombikba mossuk, a mérőlombik tartalmát körkörös mozgattal összerázzuk, szobahőmérsékletűre hűtjük, majd etil-alkohollal jelig töltjük. A bedugaszolt mérőlombikot többszöri átfogatással elegyítjük, ezután sötétben 15 percig ülepedni hagyjuk. Közben egy rázótolcsérbe bemérünk 50 cm³ 10%-os nátrium-klorid-oldatot és 50 cm³ petrolétert, és a mérőlombikban lévő felülúszóból ehhez pipettázunk hozzá a várható A-vitamin-tartalom függvényében 10-100 cm³-t. A rázótolcsért bedugaszoljuk, 1 percig intenzíven rázzuk, majd a fázisok szétválása után az alsó fázist egy 400 cm³-es főzőpohárba engedjük le, a felső fázist pedig Erlenmeyer-lombikba töltjük és sötét helyre tesszük. Az alsó fázis kirázását még kétszer 50-50 cm³ petroléterrel megismételjük, az egyesített petroléteres fázisokat 10 g vízmentes nátrium-szulfáttal víztelenítjük, majd a petrolétert maximum 40 °C-os hőmérsékleten, nitrogénáramban bepároljuk úgy, hogy az extraktum térfogata kb. 5 cm³-re csökkenjen.

A petroléteres extraktumhoz 5 cm³ metanolt adunk, és a rotációs bepárlón térfogatát 2 cm³-re csökkentjük. Ezt követően a maradékot 2 cm átmérőjű G4-es üvegszűrőn keresztül egy vákuumszűrő segítségével 10 cm³-es kalibrált kémcsőbe szűrjük. A gömblombikot a szűrőn át metanollal a kémcsőbe mossuk, és a kémcső térfogatát 10 cm³-re állítjuk be. Az így nyert oldat 1 hétig alkalmas az A-vitamin-tartalom meghatározására.

Az így előkészített oldat 20 μl -ét injektáljuk a nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfbba. Az elválasztást 25 cm hosszú, 7-10 μm szemcsenagyságú, C18 típusú oszloppal, fordított fázisú kromatográfiával végezzük, metanol-víz 95:5 arányú elegyét 1,5 cm^3 /perc áramlási sebességgel áramoltatva. A retinolsúcspot annak retenciós ideje alapján azonosítjuk. A mennyiségi meghatározáshoz egy retinil-acetát alapoldatot használunk, amely izopropil-alkoholban mintegy 200 ezer NE egység (1 NE = 0,3 μg A-vitamin) A-vitamint tartalmaz 100 cm^3 -enként. Ebből tízszeres hígítást képezünk, és ezt a tízszeresen hígított retinil-acetát mérőoldatot a mintával teljesen megegyező módon készítjük elő az A-vitamin meghatározásához. Az így előkészített standardoldatból a mintához hasonlóan 20 μl -t injektálunk a HPLC analitikai oszlopára, és ezt követően a standard és a minta csúcs alatti területének összehasonlítása után a minta A-vitamin-tartalma számolható. A vizsgálat ismételhetősége a vitamintartalom függvényében a középérték 10-20%-a.

4.3.5.2.2. A D₃-vitamin meghatározása nagyhatékonyságú folyadék-kromatográfiával

A módszer alkalmas vitamin-alapanyagok, panelek és premixek D₃-vitamin-tartalmának meghatározására. **A módszer szerint a mintát metanollal extraháljuk, és az így kapott metanolos oldatból szűrés vagy centrifugálás után 50 μl -t injektálunk a HPLC készülékbe, az abszorbanciát pedig 265 nm-nél mérjük.**

Az eljárás során a vizsgálandó mintából a vitamintartalom függvényében 1-10 grammot mérünk be egy 100 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikba, hozzáteszünk 50 cm^3 metanolt, és a gondosan lezárt lombikot ultrahangfürdőbe (4.64. ábra) helyezzük 2 \times 10 percre, ennek hiányában a lombikot 30 percig rázógéppel rázatjuk. A rázatás vagy ultrahangozás után az oldatot vákuumban szűrjük vagy centrifugáljuk, a tiszta oldatot vákuumban 3-4 cm^3 -re bepároljuk, majd eluenssel 6 cm^3 -re egészítjük ki. A meghatározást 250 \times 4,6 mm-es ODS HIP-5 kromatográ-



4.64. ábra. Ultrahangfürdők

fiás oszlopon végezzük. 200 cm³ metanol és 800 cm³ acetonitril elegyével 1,5 cm³/perc eluens áramlási sebesség mellett kromatografálunk, és a D₃-vitamin csúcsát 10-11 perc retenciós idő után 265 nm-en detektáljuk. Ezt követően 1,25 μg/cm³, 2,5 μg/cm³ és 5,00 μg/cm³ koncentrációjú D-vitamin-tartalmú standardoldatokat készítünk metanollal, és segítségével hitelesítőgörbét veszünk fel. A hitelesítőgörbe segítségével a minta ismeretlen D₃-vitamin-tartalma meghatározható. Az eredményt μg/g értékben adjuk meg. Az azonos mintákból végzett két párhuzamos érték között megengedett legnagyobb eltérés az eredmény 15%-a. A zsírolható vitaminok gyakorlatban használatos egységeit és azok egymásba történő átszámolását, valamint a mérési hullámhosszakat a 4.9. táblázat tartalmazza.

4.9. táblázat. A zsírolható vitaminok gyakorlatban használatos egységei és azok egymásba történő átszámolása, valamint a mérési hullámhosszok

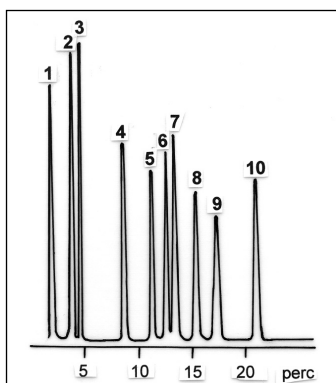
Vitamin	Egység	Mérési hullámhossz (nm)
A-vitamin	1 NE = 0,3 μg	325
E-vitamin	1 NE = 1 mg	292
D-vitamin	1 NE = 0,025 μg	265
K-vitamin	mg/kg; μg/kg	255
Karotin	mg/kg	451

4.3.5.2.3. E-vitamin (α-tokoferol) meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A módszer alkalmas vitamin-alapanyagok, panelek és premixek E-vitamin-tartalmának meghatározására. Élelmiszerek E-vitamin-tartalma a természetes tokoferoltartalom, valamint a természetes és hozzáadott tokoferol-acetát hidrolíziséből származó **α-tokoferol összege**, amelyet mg/kg egységekben fejezünk ki. A módszer szerint a megfelelően előkészített mintát lúgos közegben hidrolizáljuk, a hidrolízis végén az elegyet sósavval megsavanyítjuk. A felszabadult α-tokoferolt petroléterrel extraháljuk, az extraktumot bepároljuk és metanolban feloldjuk. **Az α-tokoferol-tartalmat nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával fordított fázisú oszlopon UV-detektálással 292 nm hullámhosszon határozzuk meg.** A módszer részletes leírása meghaladja a könyv kereteit.

4.3.5.2.4. A zsírolható vitaminok szimultán meghatározása nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával

A zsírolható vitaminok a megfelelően megválasztott kromatográfiai körülmények között egy lépésben is szétválaszthatók, illetve meghatározhatók. A 4.65. ábra 10 különböző vitamin, illetve vitaminszármazék szétválasztását mutatja.



4.65. ábra. A zsírolható vitaminok szétválasztása és meghatározása folyadékkromatográfiával.

A szétválasztott vitaminok a következők: 1 – menadion (K_3 -vitamin), 2 – retinol (A-vitamin), 3 – retinol-acetát, 4 – menaquinon (K_2 -vitamin), 5 – δ -tokoferol, 6 – ergo-kalciferol (D_2 -vitamin), 7 – kole-kalciferol (D_3 -vitamin), 8 – α -tokoferol (E-vitamin), 9 – tokoferol-acetát, 10 – fillo-quinon (K_1 -vitamin).

A szétválasztás körülményei az alábbiak:

Oszlop: 150×4 mm GRA-SIL 120 ODS-5 ST $5 \mu\text{m}$,
 acetonitril mozgófázis $0,8 \text{ cm}^3/\text{perc}$ áramlási sebességgel,
 7 MPa nyomás, 30°C hőmérséklet,
 UV-detektálás 280 nm-en.

4.3.5.3. A vízoldható vitaminok meghatározása

4.3.5.3.1. A B₁-vitamin- (tiamin-)tartalom meghatározása HPLC-vel fluorimetriás detektálással

A módszer alkalmas dúsított élelmiszerekben a hozzáadott B₁-vitamin meghatározására. A módszer szerint **a mintát hidegen zsírtalanítjuk**, Selecton B₂ jelenlétében **híg sósavval**, majd **koncentrált sósavval kezeljük**. Nitrogénatmoszférában $80\text{-}90^\circ\text{C}$ -os vízfürdőn fény kizárása mellett oldjuk, majd hígítás és szűrés után **lúgos közegben tiokrommá oxidáljuk**. A meghatározást **HPLC-vel, spektrofluorimetriás detektálással, a mintával azonos módon elkészített tiamin-klorid-hidroklorid standardoldathoz viszonyítva végezzük**.

A vizsgálati eljárás során a minta várható B₁-vitamin-tartalmától függően $2,5\text{-}10$ grammot mérünk be egy 250 cm^3 -es Erlenmeyer-lombikba, és 100 cm^3 $0,1$ mólos sósavval szuszpendáljuk, majd még 1 cm^3 tömény sósavat adunk hozzá. (Amennyiben a minta zsírtartalma magas, úgy a mintát egy tölcseren lévő szűrőpapírra tesszük, és több részletben 100 cm^3 körüli mennyiségű n-hexánnal

vagy petroléterrel átmoszuk, majd száradni hagyjuk.) Ezt követően 80-90 °C-os vízfürdőn visszafolyós hűtéssel, fénytől védve 30 percig oldjuk, majd csapvízzel lehűtjük, szűrés nélkül 200 cm³-es mérőlombikba visszük, desztillált vízzel jelig töltjük, alaposan összerázzuk, majd ülepedni hagyjuk. Az oldat tisztáját a várható B₁-vitamin-tartalomtól függően desztillált vízzel 250 cm³-re hígítjuk, összerázzuk és szűrjük. A szűrlet 10 cm³-éhez oxidációs edényben automata pipettával hozzáadunk 5 cm³ oxidálóoldatot, amely 2%-os kálium-ferricianid és 30%-os nátrium-hidroxid 1:1 arányú elegye, és az egész oldatot alaposan átkeverjük. Ezt követően hozzáadunk 0,5 cm³ tömény foszforsavat és csapvíz alatt lehűtjük. A mintaoldatból 20 cm³-t C18-as tisztítóoszlopon préselünk keresztül, és az így megtisztított oldatból injektálunk 20 μl-t a C18-as töltetű analitikai oszlopra. A B₁-vitamin oxidált származékát metanol : foszfát puffer elegyével eluáljuk 1,2-1,5 cm³/perc áramlási sebesség mellett, majd fluoreszcenciás detektálással 320 nm-es extinkciós és 424 nm-es emissziós hullámhossznál határozzuk meg a B₁-vitamin mennyiségét. A kalibráció során az oxidációs edénybe 10 cm³ vízbe bemérünk 100, illetve 200 μl standardoldatot, amely 250-500 ng tiamin-klorid-hidrokloridot tartalmaz, majd a mintához hasonlóan oxidáljuk, tisztítjuk és kromatografáljuk őket. A minta B₁-vitamin-tartalmát a mintánál kapott csúcsmagasságból vagy területből, a vizsgálatához bemért minta tömegéből, illetve a standard egységnyi koncentrációjára jutó csúcsmagasságból vagy területből számoljuk. Az azonos mintából végzett két, párhuzamos mérés értéke között megengedett legnagyobb eltérés 20 μg/kg B₁-vitamin-tartalom felett az eredmény 15%-a.

4.3.5.3.2. A nikotinsavamid meghatározása HPLC-módszerrel

A módszer alkalmas az élelmiszerekhez hozzáadott nikotinsavamid-tartalom meghatározására. **Az eljárás során a mintát metanol : foszfát puffer eleggyel extraháljuk, majd az extraktum szűrése és centrifugálása után a nikotinsavamid-tartalmat folyadékkromatográfiásan határozzuk meg 254 nm-en UV-detektálással, ionpárpépzéssel.**

Az eljárás során a minta nikotinsavamid-tartalmától függően 1-5 grammot mérünk be egy alufóliával bevont Erlenmeyer-lombikba, és hozzáadunk 100 cm³ extrahálószerrel, ami 15 cm³ metil-alkohol és 85 cm³ 1%-os foszfátpuffer elegye. Az extrakciót 3 × 5 perces ultrahangozással végezzük, amelynek során a túlzott felmelegedés elkerülése végett az ultrahangozások között kétperces szünetet tartunk. Az extrahálás után a mintát leszűrjük, térfogatát mérjük, majd egy centrifugacsőbe 10 cm³-t pipetázunk belőle. 10 percig 10 ezer g-n centrifugáljuk, majd amennyiben szükséges, a folyadékkromatográfiás mozgófázissal szükség szerint hígítjuk. A megfelelően hígított és előkészített anyagból 50 μl-t injektálunk a folyadékkromatográf 25 cm hosszú fordított fázisú C18 típusú oszlopára. A mozgófázis 1 literre 1 g n-heptánszulfonsav-nátriumot, 125 cm³ metil-alkoholt és 875 cm³ 1%-os foszfátpuffert tartalmaz. A nikotinsavamid-csúcsot 254 nm-en detektáljuk.

A mennyiségi meghatározáshoz ismert mennyiségű nikotinsavamid-standardot mérünk be 0,1 mg pontossággal, amelyhez hozzáadunk 100 cm³ folyadékkromatográfiás mozgófázist. Az oldódást ultrahangozással segítjük elő, majd az oldatot szükség szerint folyadékkromatográfiás mozgófázissal hígítjuk úgy, hogy annak koncentrációja 4-20 ng/cm³ között legyen. Az eredményt a standard csúcs alatti területe, a minta csúcs alatti területe, a hígítások és a bemérés figyelembevételével számoljuk és mg/kg-ban adjuk meg az eredeti mintára vonatkoztatva. Párhuzamos mérés esetén a mérés pontossága az átlag 8%-a.

4.3.5.3.3. A C-vitamin-tartalom meghatározása

4.3.5.3.3.1. A C-vitamin-tartalom meghatározása 2,6-diklór-fenol-indofenolos titrimetriával

A módszer szerint **az aszkorbinsavat a mintából oxálsavoldattal vagy metafoszforsav-ecetsav elegyével extraháljuk, ezt követően pedig 2,6-diklór-fenol-indofenol színezékoldattal lazacrózsaszínig titráljuk.**

A minta-előkészítést követően a C-vitamin-tartalom függvényében 10-100 grammot mérünk be 0,1 mg pontossággal, majd a bemért minta grammokban kifejezett tömegéhez képest 1-5-szörös mennyiségű 2%-os oxálsav-oldattal vagy ecetsavas metafoszforsav-oldattal extraháljuk. Az oldatot leszűrjük előntve a szűrlet első néhány cm³-ét, és ha szükséges, megfelelő hígítással érjük el, hogy a szűrlet aszkorbinsav-tartalma 0,1-1 mg/cm³ között legyen. Az így kapott oldatból kiveszünk három aliquot részt úgy, hogy abban az aszkorbinsav-tartalom 2 mg körül legyen, és titráljuk meg a 2,6-diklór-fenol-indofenol-színezékoldattal úgy, hogy a lazacrózsaszín legalább öt másodpercig megmaradjon. A titrálást megelőzően meghatározzuk a színezékoldat hatóértékét aszkorbinsav standardoldatok segítségével, és a hatóértéket az 1 cm³ színezékoldattal ekvivalens aszkorbinsav mg-ban megadott mennyiségére fejezzük ki. A titrálást követően egy vakpróbát is készítünk, amelynek során a titrálást úgy végezzük el, hogy az eljárás során a minta helyett azonos térfogatú extrahálóoldatot használunk. Az eredmény számolásánál a vakpróbánál fogyott színezékoldat térfogatát a minta titrálásához fogyott színezékoldat térfogatából le kell vonni. Az eredményt a következő képlet szerint számoljuk, és mg/100 g termék mértékegységben adjuk meg:

$$\text{Aszkorbinsav-tartalom (mg/100 g)} = \frac{(V_0 - V_1) \cdot m_1}{m_0} \cdot 100,$$

ahol: m_0 – a titráláshoz felhasznált aliquot rész tömege (g),

m_1 – az 1 cm³ színezékoldattal ekvivalens aszkorbinsav tömege (mg),

V_0 – a titráláshoz fogyott színezékoldat térfogata (cm³),

V_1 – a vakpróba fogyott színezékoldat térfogata (cm³).

Az eredmény a három meghatározás számtani középértéke. A vizsgálatot zavarják a vas-, a réz- és az ónionok, a redukálóanyagok, a hidrogén-szulfidok, a szulfidok és a kén-dioxid.

4.3.5.3.3.2. Az aszkorbinsav-tartalom meghatározása spektrofotometriás módszerrel

A módszer szerint a mintából **az aszkorbinsavat oxálsavoldattal vagy metafoszforsav : ecetsav elegyével extraháljuk. Az aszkorbinsav a 2,6-diklór-fenol-indofenol színezéket kvantitatíve redukálja; a feleslegben lévő színezékanyagot xilollal extraháljuk, és az oldat abszorbanciáját 500 nm-en, spektrofotometriásan meghatározzuk.** Az eljárás során az előző fejezetben leírt extrakció szerint úgy kell eljárni, hogy az oldat 0,05-0,5 mg aszkorbinsavat tartalmazzon cm^3 -enként. Ebből az oldatból 1-5 cm^3 mennyiséget pipettázzunk centrifugacsőbe, és adjunk hozzá a mintával megegyező térfogatú 4-es pH-jú nátrium-acetát-ecetsav pufferoldatot. Késedelem nélkül adjunk hozzá feleslegben 2-6-diklór-fenol-indofenol-színezékoldatot, keverjük össze, és adjunk hozzá 10 cm^3 xilolt, zárjuk le a centrifugacsövet, és rázzuk erőteljesen 6-10 másodpercig. A rétegek szétválásáig centrifugálunk, majd óvatosan eltávolítjuk a felső xilolos réteget, beletöltjük a spektrofotométer küvetájába, és lemérjük a xilolos fázis abszorbanciáját 500 nm-en. Vakpróbaként a xilol abszorbanciáját határozzuk meg ugyancsak 500 nm-en. A mennyiségi meghatározáshoz helyezünk 4 db centrifugacső mindegyikébe ugyanannyi extrahálóoldatot, mint amennyit a mintaanalízisek során használtunk, adjunk mindegyikhez ugyanannyi mennyiségű pufferoldatot és ezt követően az egymás utáni csövekbe 0,2; 0,4; 0,6 és 0,8 cm^3 színezékoldatot. Végezzük el a xilolos kirázást, határozzuk meg az abszorbanciákat, rajzoljuk meg a kalibrációs görbét, azaz ábrázoljuk az abszorbanciaértékeket a hozzáadott színezékoldat térfogatának függvényében. Az aszkorbinsav-tartalmat $\text{mg}/100$ g termékben kifejezve a következő képlettel számítjuk ki:

$$\text{Aszkorbinsav-tartalom (mg/100 g)} = \frac{(V_0 - V_1) \cdot m_1}{m_0} \cdot 100,$$

ahol: m_0 – a meghatározáshoz felhasznált aliquot részben lévő minta tömege (g),
 m_1 – az 1 cm^3 színezékoldattal ekvivalens aszkorbinsav tömege (mg),
 V_0 – a színezékoldat térfogata (cm^3),
 V_1 – a színezékoldat-felesleg térfogata a mért abszorbancia alapján a kalibrációs görbéről leolvasva (cm^3).

Két azonos mintából végzett meghatározás eredménye között az eltérés a számtani középérték 3%-a. Ha a termék xilolban oldható színanyagot tartalmaz, akkor a xilolos fázis abszorbanciájának mérése után adjunk hozzá két csepp félig

telített hidrokinnoldatot, keverjük össze, hagyjuk állni 30 másodpercig, majd mérjük le ismét az abszorbanciáját. Az így mért abszorbanciát vonjuk le a xilolos fázis kezdeti abszorbanciaértékéből.

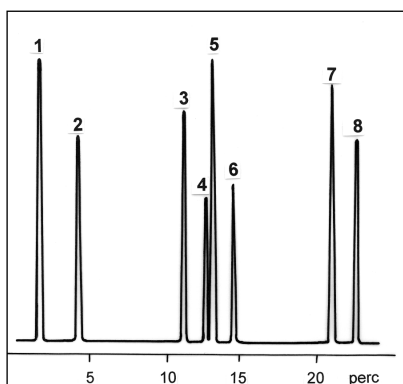
4.3.5.3.3.3. Az aszkorbinsav meghatározása HPLC-módszerrel

A módszer alkalmas élelmiszerek C-vitamin-tartalmának meghatározására. **A homogén laboratóriumi mintát metanol-foszfát puffereleggyel extraháljuk, majd a leszűrt oldatot nagyhatékonyságú folyadékkromatográffal analizáljuk, elektrokémiai detektálást alkalmazva.**

A minta vitamintartalmának függvényében 1-10 g anyagot mérünk be egy 250 cm³-es Erlenmeyer-lombikba, és 50-100 cm³ extrahálószerrel extraháljuk. Az extrahálószer 350 cm³ metanoból és 650 cm³ 0,01 mólos kálium-dihidrogén-foszfát-oldatból áll, amelynek összekeverés után a pH-ját 1 mólos foszforsavval 3,0 értékre állítjuk be. A lombikot alufóliával bevonjuk; 30 perces rázatás vagy 3 × 5 perces ultrahangos kezelés után a lombik tartalmát vákuumban leszűrjük, esetleg öt percig 3500 g-n centrifugáljuk. A szilárd maradékot 5 cm³ extrahálószerrel mossuk, a szűrlet térfogatát feljegyezzük, és a tiszta oldatból 20-50 μl-t injektálunk a HPLC készülékbe. A kromatografálásra Spherisorb 5 ODS 250 × 4,6 mm-es oszlopot használunk. Az eluens 350 cm³ metanolt, 650 cm³ 0,01 mólos kálium-dihidrogén-foszfát-oldatot és 2 cm³ decilamint tartalmaz. Az eluens pH-ját 3,0-ra állítjuk be 1 mólos foszforsav-oldattal. Az eluens áramlási sebessége 0,5 cm³/perc, a detektor ED 101 E elektrokémiai detektor. A méréshez szükséges kalibrációs egyenest a következőképpen készítjük a mélyhűtőben tárolt kristályos C-vitamin standardból: 0,05; 0,1 és 0,2 mg/cm³ koncentrációjú oldatokat készítünk az extrahálószerrel, majd az oldatokat tízszeresére hígítva vesszük fel a kalibrációs egyenest. A C-vitamin rendkívüli bomlékonysága miatt a standardoldatokat nem célszerű egy héten túl használni. Ha az előzőeknek megfelelő koncentrációnál a kalibrációs egyenes lineáris, akkor további hígításokat nem kell készíteni.

Az eredményeket mg/kg-ban adjuk meg, figyelembe véve a minta C-vitamin-csúcsának magasságát, a szűrlet térfogatát, a minta extrakcióhoz felhasznált mennyiségét, valamint a hitelesítőgörbéhez bemért aszkorbinsav koncentrációját. A mérés hibája két párhuzamos mérést követően az átlag 10%-a.

A vízoldható vitaminok a megfelelően megválasztott folyadékkromatográfiai körülmények között nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával egymástól szétválaszthatók, illetve meghatározhatók. A 4.66. ábrán a következő vitaminok szétválasztása látható: 1 – L-aszkorbinsav (C-vitamin), 2 – nikotinsav, 3 – piridoxin-hidroklorid (B₆-vitamin), 4 – nikotinsavamid, 5 – tiamin-hidroklorid (B₁-vitamin), 6 – folsav, 7 – ciano-kobalamin (B₁₂-vitamin), 8 – riboflavin (B₂-vitamin). A meghatározás során CROM-SIL 120 ODS 5-ST, 5 μm töltetű, 150 × 4 mm-es oszlopot használtak. Az eluens 6,6-os pH-jú, 20 μM koncentrációjú kálium-foszfát-oldat volt, az áramlási sebesség 8 cm³/perc, a nyomás 9 MPa, a hőmérséklet 30 °C volt, a detektálást pedig 254 nm-en végezték.



4.65. ábra. A zsíroltható vitaminok szétválasztása és meghatározása folyadékkromatográfiával.

A szétválasztott vitaminok a következők: 1 – L-askorbinsav (C-vitamin), 2 – nikotinsav, 3 – piridoxin-hidroklorid (B₆-vitamin), 4 – nikotinsavamid, 5 – tiamin-hidroklorid (B₁-vitamin), 6 – folsav, 7 – ciano-kobalamin (B₁₂-vitamin), 8 – riboflavin (B₂-vitamin).

4.3.5.3.3.4. A tej aszkorbinsav-tartalmának meghatározása

A módszer az aszkorbinsav oxidációján alapszik a 2,6-diklór-fenol-indofenollal 2,5–3,5 pH-tartományban. Ebben a pH-tartományban a C-vitamin tartóssága a tejszérumban jobb, mint kevésbé savas pH-nál. A titrálás során a reagens kék színe pirosba csap át.

A meghatározás során 25 cm³ tejet pipetázunk egy 250 cm³-es Erlenmeyer-lombikba, majd 20 cm³ vizet adunk hozzá. Intenzív összekeverés után hozzámérünk 5 cm³ 20%-os szulfo-szalicilsav oldatot, intenzíven összerázzuk, öt perc állás után redős szűrőpapíron szűrjük, amelynek során az első zavaros cseppeket a szűrőre visszavisszük. A tiszta szűrletből kiveszünk 20 cm³-t (amely megfelel 10 cm³ tejnek), egy fehér porcelántálba visszük, hozzáadunk 0,4 cm³ pH = 2,8-ra beállított 50%-os Na-acetát-oldatot, majd állandó keverés mellett megtitráljuk a mikrobürettából folyó színezékekkel addig, míg az oldat enyhén piros színt vesz fel és színét legalább 30 másodpercig megtartja. A szűrlet kimérése után a titrálást két perc időtartamon belül el kell végezni. Az oldatok beállítását az előző fejezetekben leírtak szerint végezzük. A tej C-vitamin-tartalmának kiszámítására a következő képletet használjuk, figyelembe véve, hogy a titráláshoz felhasznált tejszérum 10 cm³ tejnek felel meg.

$$\text{Tej aszkorbinsav-tartalom mg/kg} = \frac{g \cdot e \cdot 1000}{10},$$

ahol: g – a színezékoldat-felhasználás (cm³), 20 cm³ tejszérumra,
e – 1 cm³ színezékoldatnak megfelelő aszkorbinsav mennyisége (mg).

4.3.5.3.4. Az U-vitamin-tartalom meghatározása automatikus aminosav-analizátorral

A módszer alkalmas élelmiszerek, elsősorban növényi anyagok sejtnedvei U-vitamin-tartalmának meghatározására. **Az U-vitamint tartalmazó anyagot 2,2 pH-jú citrát-pufferben végzett homogénezés után 12 órán át 4-5 °C-on hűtőszekrényben tároljuk.** Ezt követően a homogenizátumot szűrjük, és **a szűrletből meghatározzuk az U-vitamint** (S-metil-metionin-szulfonium-klorid, a továbbiakban SMM). A módszerrel az SMM elválasztható a többi szabad aminosavtól, és mennyisége az ioncserés oszlopkromatográfia adta pontossággal meghatározható.

Az eljárás során a friss növényi mintából 30 grammot mérünk be egy gyorsfordulatú homogenizálóberendezés edényébe, hozzáadunk 30 cm³ 2,2 pH-jú Na-citrát puffert, öt percig intenzíven homogenizáljuk, majd további 12 óráig hűtőszekrényben tároljuk. A rostos részeket szűrővel eltávolítjuk, a szűrőn maradt anyagot 2 × 2 cm³ pufferrel átmoszuk. A szűrletet lapos fenekű kristályosítócsészékbe öntjük, és hideg ventillációval 10 cm³-re besűrítjük. Az így kapott sűrítmenyből az automatikus aminosav-analizátor érzékenységének megfelelő mennyiséget viszünk fel a megfelelő hígítás után az ioncserélő oszlopra. **Az U-vitamin a bázikus aminosavak között, az alkalmazott pufferrendszer függvényében a lizin előtt vagy után jelenik meg a kromatogramon.** Az alkalmazott pufferrendszerek, hőmérséklet- és időprogramok, valamint a készülék kalibrálása teljes mértékben megegyezik a fehérjék aminosav-összetételének meghatározását tárgyaló fejezetben leírtakkal. Az U-vitamin-meghatározás pontossága a szabad aminosavak nagy koncentrációja és zavaró hatása miatt az átlag 5%-a.

4.3.5.3.5. A karnitin meghatározása fotometriával

Az emlősök szervezetében folyó zsírsavak β -oxidációjában jelentős szerepet játszik a karnitin. A zsírsavak β -oxidációja acetyl-CoA egységekre a mitokondriumok belsejében történik, azonban a mitokondrium belső membránja nem átjárható a zsírsavak és a CoA-észterek számára, ezért a zsírsavak bejuttatása a karnitin segítségével történik. A karnitin a belső membránon történő transzportban vesz részt oly módon, hogy átveszi a zsírsav CoA-észtereinek savkomponensét saját hidroxil-csoportjára a megfelelő *transzferáz* enzimek segítségével. A zsírsav CoA-észter acil-csoportja a *karnitin-palmitoil transzferáz I* enzim segítségével átkerül a karnitinre, amely a belső mitokondriummembrán külső felén helyezkedik el. Az így létrejött acil-karnitin a *karnitin transzlokáz* közvetítésével bejut a mitokondriumba, miközben egy szabad karnitinmolekula kikerül a citoplazmába. A belső mitokondriummembrán belső feléhez kötött *karnitin-palmitoil transzferáz II* enzim egy szabad CoA-SH felhasználásával újra létrehozza az acil-CoA észtert, amely így be tud lépni a β -oxidációs ciklusba. Az acetyl-CoA és a karnitin reakciót az Edman-féle 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoészter)-val (DTBNB) követhetjük,

amelynek lényege a következő. A felszabaduló CoA-SH szabad tiolcsoportja révén a DTBNB-vel sárga színű termék keletkezése közben reagál, melynek abszorpciós maximuma 412 nm-nél van. A termék koncentrációjának mérésével a karnitin mennyisége meghatározható. Az SH-csoport és a DTBNB közötti reakció leírása a *Cisztintartalom meghatározása* című fejezetben található. A módszer pontos leírása meghaladja a jegyzet kereteit.

4.3.6. A mikotoxinok és meghatározásuk

4.3.6.1. A mikotoxinok általános jellemzése

A mikotoxinok a mérgező anyagok körébe tartozó toxikus vegyületek. Nevük magyarra lefordítva **gombamérgeket** jelent, ami arra utal, hogy **a mikotoxinokat az élelmiszerekben előforduló káros mikroorganizmusok, a penészgombák termelik**. Rendkívüli jelentőséggel bírnak a mezőgazdasági és élelmiszeripari termelés, a feldolgozás és tárolás, a takarmányozás és állattenyésztés, valamint a humán- és az állategészségügy területén is. Európában a mikotoxin mérgezések és penészgombás fertőzések legjelentősebb kártétele az 1970-es években következett be a fusariumos gombafertőzések és az F₂-fuzárium-toxin mérgezések következtében. A mikotoxinokkal mint potenciális rizikófaktorokkal a jövőben is számolni kell, ezért rendkívül fontos a humánmegbetegedések, az állatmérgezések és az elhullások megelőzése és elhárítása, illetve csökkentése.

Mikotoxinoknak nevezzük a penészgombák olyan viszonylag kis molekulatömegű másodlagos anyagcseretermékeit, amelyek **a magasabb rendű élőlényekre mérgező hatásúak. Mikotoxikózisok a magasabb rendű élőlényeknek a mikotoxinok által okozott megbetegedései**, tehát valójában kémiai anyagok által kiváltott mérgezések. A mikotoxinok LD₅₀ értéke (mely érték a heveny toxikus hatás kifejezésére szolgál, azaz a mikotoxin azon testtömeg kilogrammra kifejezett mennyiségét jelenti, amely egyetlen kezelés esetén 21 napon belül a kísérleti állatok felét elpusztítja) rendkívül alacsony, ezért a mikotoxinok a mérgek legmérgezőbb csoportjába tartoznak. A mikotoxikózis nem tévesztendő össze a **mikózissal, amely a magasabb rendű élőlények mikroszkopikus gombák által okozott megbetegedése, fertőzése**.

4.3.6.2. A mikotoxinok képződésének feltételei

A gombafajok toxintermelő képessége genetikailag determinált tulajdonság; csak az ún. toxikogén gombák termelnek mikotoxint. A gombák toxintermelése függ a szubsztrátum sajátosságaitól, a közeg nedvességtartalmától, a pH-tól, a hőmérséklettől, a környezet páratartalmától, és a társmikroflórának is szerepe lehet a toxintermelésben. Általánosságban elmondható, hogy a szubsztrátum egyrészt biztosítja a tápanyagot a gomba elszaporodásához, másrészt speciális anyagai

révén közvetlenül is hathat a gombák mikotoxin-szintézisére. Bizonyos gombák csak a nekik optimális szubsztráton képesek elszaporodni és ezt követően toxint termelni. A gombák szaporodásához és növekedéséhez szükség van a 13% feletti nedvességtartalomra, a toxintermeléshez az optimális nedvességtartalom azonban ennél lényegesen nagyobb. A toxintermelés pH-optimuma az enyhén savas közegben van (pH = 6 körül), míg a gombanövekedés egy tágabb pH-tartományban is lehetséges. A toxintermeléshez általában a 20 °C körüli hőmérséklet az optimális, míg a gombák szaporodása ennél lényegesen alacsonyabb, és magasabb hőmérsékleten is végbemehet. Mind a gombanövekedéshez, mind a toxinképződéshez szükséges a 80% feletti páratartalom. A gomba elszaporodását és a toxinképződést befolyásolhatja a társmikroflóra is, hisz ennek jelenléte elnyomhatja az adott gomba szaporodását és toxintermelését.

4.3.6.3. A mikotoxinok fizikai, kémiai és biológiai sajátosságai

A szerkezeti különbségek következtében jelentős mértékű eltérések lehetnek a különböző vegyületcsoportba tartozó mikotoxinok között. Az F₂-toxin pl. relatíve stabil a hővel szemben, a levegőben, a látható és az UV fényben és a különböző oldószerekben. Az aflatoxinok viszont ezekkel a hatásokkal szemben érzékenyek, bomlékonyak. A mikotoxinok igen változatos kémiai reakciókba vihetők; stabilabban gyengén savas közegben, míg lúgos közegben viszonylag könnyen bomlanak, és érzékenyek az oxidáló- és redukálószerekkel szemben is. Biológiai sajátosságait, főbb károsító hatásait tekintve a mikotoxinok igen sokfélék lehetnek. Két példát kiemelve: az aflatoxinok májkárosító, daganatképző és teratogén hatásúak, a zearalenon pedig ösztrogén hatású, ezért szaporodásbiológiai károkat is okozhat. Ismerünk ezen túl fetotoxikus és mutagén hatású, ideg- és vesekárosító, vér- és bőrkárosító, valamint vérzéseket és szövetelhalást okozó mikotoxinokat is. Hazánkban heveny mikotoxikózissal nem, inkább csak azok krónikus hatásával számolhatunk. A mikotoxinok felvétele történhet a szájon és a bőrön át, valamint a levegőből. A szervezet próbálja lebontani, átalakítani őket, de az átalakulás nem jár minden esetben detoxikációval. Kiürülésük a szervezetből eredeti, illetve átalakult formában döntően a bélsárral és a vizelettel történik, de megjelenhetnek a verejtékben, a tojásban és a tejben is.

Magyarországon és Erdélyben az F₂- és T₂-toxin, a dezoxivalenol, az ochratoxin A, az alternariol és az alternariol-monometiléter előfordulásával számolhatunk. Az alapanyagok közül főként a kukorica, valamint a búza és a zab a fő szubsztrátjai a mikotoxin-termelő gombáknak, de megemlíthető ezen kívül még az alma is, amely gyakran patulinnal szennyezett. Mikotoxinok képződhetnek a termelés vagy még inkább a tárolás során, és a mikotoxinok képződésében fontos szerepet játszanak az égővi sajátosságok és az időjárás viszonyok is. A fenti indokok alapján feltétlenül szükséges élelmiszerek mikotoxin-tartalmának meghatározása, hisz emberi ételmezésre mikotoxin-tartalmú élelmiszer nem használható fel, va-

lamint a mikotoxin-tartalmú takarmány felhasználása is csak igen korlátozottan lehetséges az állatok takarmányozása során.

4.3.6.4. A mikotoxinok meghatározása kémiai módszerekkel

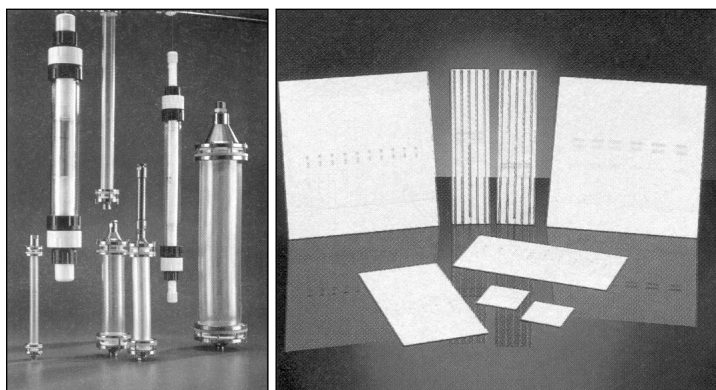
A mikotoxikológiai vizsgálat magában foglalja egyrészt a mikológiai és a mikrobiológiai vizsgálatokat, másrészt a kémiai analíziseket, továbbá a biológiai és immunkémiai tesztek is. A vizsgálatok közül jelen fejezetben csak a kémiai analízisekre szorítkozunk.

A mintavételi szabványok előírásai szerint vett átlagmintát szükség szerint maximum 50 °C-on kíméletesen szárítjuk, majd szilárd minták esetén őrléssel, szerv- és szövetminták esetén kvarchomokkal vagy vízmentes nátrium-szulfáttal történő eldörzsöléssel biztosítjuk a kellő homogenitást, míg a folyékony mintákat általában közvetlenül használjuk fel az analízisekhez. Ezt követően a vizsgálandó mikotoxinokat szerves oldószerek (etil-acetát, acetonitril, metanol, aceton) vagy szerves oldószer-víz elegyek használatával kivonjuk, amely kivonás történhet Soxhlet-extrakcióval, rázatással, gyors fordulatú homogenizátorral és ultrahang-fürdővel. A nyers toxintartalmú extraktumot szerves folyadék-folyadék extrakcióval, speciális szerves oldószer-lúgoldat extrakcióval, oszlop- és rétegekromatográfiával, illetve ezen eljárások kombinációjával tisztítani kell. A kimutatások és meghatározások standard mikotoxinok felhasználásával, rétegekromatográfiával vizuálisan (a mikotoxinok fluoreszcenciája, valamint vegyszerekkel láthatóvá tétele után), illetve denzitometriás értékelés alkalmazásával, gáz- és folyadékkromatográfiás módszerekkel, továbbá ultraibolya- és infravörös spektrofotometriás, magmágneses rezonancia spektroszkópiás és tömegspektrometriás technikákkal, valamint ezek kombinációjával végezhető.

4.3.6.4.1. Az F₂-toxin-tartalom vizsgálata vékonyréteg-kromatográfiával

A vizsgálati mintát etil-acetáttal Soxhlet-készülékben extraháljuk, a nyers kivonatot hexán-acetonitril, majd speciális kloroform-lúg folyadék-folyadék extrakcióval tisztítjuk. A tisztított kivonatot kétdimenziós rétegekromatográfiás kifejlesztés után UV, illetve látható fényben vizsgáljuk, az F₂-toxin fluoreszcenciája, illetve színreakcióval láthatóvá tétele révén.

A mérés során a megfelelő szemcseméretűre megőrölt mintából 20 gramot Soxhlet-készülékben etil-acetáttal nyolc órán át extrahálunk, majd az extraktumot rotációs gyorsbepárlóval bepároljuk. A maradékot 50 cm³ hexánban feloldjuk, majd 50 cm³ és azután még 25 cm³ acetonitrillel kirázzuk. Az acetonitriles fázisokat bepároljuk, majd a maradékot 25 cm³ kloroformmal vesszük fel. Ezt kétszer 10 cm³, 1 térfogatnyi 0,2 mol/dm³ sósavoldattal tompított 10 térfogat 1 mol/dm³ nátrium-hidroxid-oldattal óvatosan kirázzuk. Az egyesített lúgos fázisok pH-ját 0,67 mol/dm³ koncentrációjú foszforsavoldat és 0,1 mol/dm³ nátri-



4.67. ábra. Vékonyréteg-kromatográfiai lemezek és különböző méretű kromatográfiai oszlopok

um-hidroxid-oldat felhasználásával 9,5-re állítjuk be. Ezt követően $3 \times 15 \text{ cm}^3$ kloroformmal kirázzuk, majd az egyesített kloroformos fázisokat vízmentesítés után bepároljuk. A maradékot acetonnal kvantitatíve speciális fiolákba visszük át, a mintákat nitrogénáramban bepároljuk, és a maradékot $200 \mu\text{l}$ acetonban vesszük fel. Ezt megfelelően $100\text{-}100 \mu\text{l}$ -t használunk fel a réteg- és a gázkromatográfiai elemzésekhez. A 4.67. ábrán vékonyréteg-kromatográfiai lemezek és különböző méretű kromatográfiai oszlopok láthatók.

A rétegekromatográfiai elválasztást Kieselgel G készrétegre minta, standardok (a felhasználandó standard koncentrációja $0,1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) és minta + hozzáadott standard felvitele mellett kétdimenziós kifejlesztéssel végezzük. Az első irányban toluol-etilacetát-hangyasav = 6:3:1, a második irányban kloroform-aceton = 9:1 arányú elegyekkel végezzük a futtatást. Az értékelés UV fényben 254 és 365 nm-en közvetlenül, majd az 1%-os 4-metoxi-benzol-diazonium-fluoroborát-oldattal, valamint $0,1 \text{ mol}/\text{dm}^3$ nátrium-hidroxid-oldattal, továbbá $0,05 \text{ mol}/\text{dm}^3$ kénsavoldattal történő bepermetezés után látható fényben történik.

4.3.6.4.2. Az F_2 -toxin meghatározása gázkromatográfiával

Az előző fejezetben leírtak szerint kivont és tisztított F_2 -toxin-tartalmú anyagot szilil származékképzés után, töltetes gázkromatográfiai elválasztással, hőmérséklet-programozás mellett, lángionizációs detektálással analizáljuk. A módszer leírása egy korábbi fejezetben található.

4.3.7. Válogatott fejezetek

4.3.7.1. A szója és a szójatermékek tripszininhibitor-aktivitásának meghatározása

A módszer alkalmas a szója és a szójatermékek tripszininhibitor-aktivitásának meghatározására. A *tripszin* enzim a N- α -benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid-hidroklorid (DL-BAPA) mesterséges szubsztrátból sárga színű p-nitro-anilin terméket hasít le. Tripszininhibitor jelenlétében kevesebb sárga színű vegyület keletkezik, így az enzimgátlás mértéke fotometriásan nyomon követhető. A tripszininhibitor az antinutritív növekedésgátló vagy lassító, a táplálék értékesülését rontó anyagok közé tartozik. A proteázgátlás és ezen belül a **tripszingátlás** igen elterjedt a növényvilágban. A mintegy tízféle ismert proteázgátlás közül a tripszingátlás a leglényegesebb. Ennek lényege, hogy **a tripszin nem tudja a bázikus aminosavaknál a fehérjét támadni, mivel az inhibitor a tripszinhez sztöchiometrikusan kötődik**. Hatására a hasnyálmirigy hiperszekréciója indul meg, reverzibilis pankréasz-hipertrófia alakul ki, a kéntartalmú aminosavak hozzáférhetőségének romlása miatt fokozódik az endogén-nitrogén-vesztés, látens metionin- és cisztinhiány lép fel. A fentiek miatt rendkívül fontos ismerni a szója és szójatermékek tripszininhibitor-aktivitását.

A vizsgálati eljárás során a zsíros mintát hideg eljárással zsírtalanítjuk, miközben zsírtartalmát is meghatározzuk. A lisztfinomságúra őrölt zsírtalanított mintából 2 g-ot analitikai mérlegben főzőpohárba mérünk, majd 70-80 cm³ desztillált vízben szuszpendálunk. A szuszpenzió pH-ját 1 mólos nátrium-hidroxiddal 9,5-9,8 közé állítjuk be, ezután 100 cm³-re kiegészítjük desztillált vízzel, majd az így kapott oldatot három órán keresztül mágneses keverőn kevertetjük. Az előkészített szuszpenzióból, attól függően, hogy kezeletlen vagy kezelt szójáról van-e szó, különböző térfogatú bemérésekkel hígítási sorozatot készítünk. A hígítási sorozat tagjaiból azt az oldatot választjuk a tripszininhibitor aktivitásának meghatározására, amelynek abszorbanciaértéke a szójamintát nem tartalmazó oldat abszorbanciaértékének 40-60%-át adja. Az optimális hígítású oldatból száraz kémcsövekbe hígítási sorozatot készítünk 0,6; 1,0; 1,4 és 1,8 cm³-es bemérésekkel, majd a sorozat minden tagját desztillált vízzel 2 cm³-re egészítjük ki. Mindegyikhez hozzáadunk 2-2 cm³ tripszinoldatot és 5 percig 37 °C-on termosztáljuk. Ezt követően 5 cm³ DL-BAPA oldatot adunk hozzá, összerázzuk, 10 percig 37 °C-on termosztáljuk, majd 1 cm³ 30%-os ecetsavat hozzáadva a reakciókat leállítjuk. A mintákat ezután száraz kémcsövekbe szűrjük, majd 30 perc múlva 410 nm-en mérjük az abszorbanciaértékeket a reagens vakoldattal szemben. A vizsgálathoz szükséges reagens vakoldat csak a felhasznált vegyszereket tartalmazza minta nélkül, amelyre a spektrofotométert nullázzuk, szójaminta-vakpróba, amely csak a szójamintát és a DL-BAPA reagenst tartalmazza, amelyre kapott abszorbanciaértékre a korrekciókat el kell végezni.

Az adott térfogatú szójaszuszpenziókat tartalmazó elegyek tripszininhibitor (a továbbiakban: TIU) értékeit az inhibitort nem tartalmazó ún. nullás oldat és az inhibitort tartalmazó szójaszuszpenzió elegyek értékeinek a különbségéből számítjuk ki. Az adott térfogathoz kiszámított TIU-értékeket 1 cm^3 szuszpenziónak megfelelő értékre számítjuk át, az így kapott értékeket (TIU/cm^3) az eredetileg bemért szuszpenzió cm^3 -einek függvényében ábrázoljuk (0,6; 1,0; 1,4; 1,8), és a TIU-értékeket összekötő egyenes és az Y tengely metszéspontja adja az 1 cm^3 szójaszuszpenzió által előidézett gátló hatást TIU-egységben kifejezve. Az eredmény pontosabban számítható a lineáris regresszióval kapott egyenes egyenletéből ($y = a + b \cdot x$), amelyből $x = 0$ esetén az „a” érték adja az 1 cm^3 szójaszuszpenzió által előidézett gátló hatást. Az eredetileg bemért szójaminta mennyisége, a szójaszuszpenzió hígításának, valamint a vizsgált anyag olaj- és víztartalmának ismeretében a vizsgált anyag TIU-értékét 1 mg zsíros, légszáraz anyagra vonatkoztatva adjuk meg. A párhuzamos meghatározások eredményei között megengedett legnagyobb eltérés az eredmény 10%-a.

4.3.7.2. A szója ureázaktivitásának meghatározása

A módszer alkalmas szója és szójatermékek hőkezeltségi fokának megállapítására, mivel az ureáz enzim rendkívül érzékeny a hőkezelés hőfokára és időtartamára. A módszer szerint a meghatározandó szójadaramintákat karbamidot tartalmazó, valamint karbamidot nem tartalmazó $7,5 \text{ pH}$ -jú pufferoldatban szuszpendáljuk és 30 percig $35 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tartjuk. A szójaszuszpenzióban lévő ureáz enzim a karbamidból ammóniát tesz szabaddá, ami megnöveli ennek az oldatnak a pH-ját. Meghatározva a karbamidot tartalmazó és a karbamidot nem tartalmazó szójaszuszpenzió pH-ját, a pH-különbség arányos lesz a szójában található ureáz enzim aktivitásával.

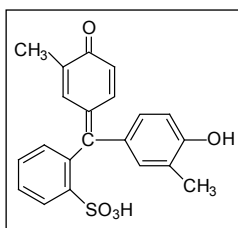
A vizsgálati eljárás során a lisztfinomságúra őrölt szójadarából 2×1 grammot mérünk be egy 100 cm^3 -es főzőpohárba. Az egyik mintához 50 cm^3 $7,5 \text{ pH}$ -jú foszfátpufferben oldott karbamidoldatot, a másikhoz csak foszfátpuffert adunk. A mintákat üvegbottal többször fölkeverjük, és az üvegbotot a főzőpohárban hagyva, azokat 30 percre $35 \text{ }^\circ\text{C}$ -os termosztátba helyezzük, majd a mintákat ötpercenként felkeverjük. 30 perc után a mintákat szűrőpapíron szűrjük, és mindkét minta pH-értékét pH-mérőn, szobahőmérsékleten lemérjük. A szójadarára jellemző ureázaktivitás értéke a hőkezelés függvényében a következő:

kezeletlen, nyers szója (toaszterezetlen)	pH-érték-különbség 1,7-2,5
részlegesen hőkezelt szója (részlegesen toaszterezett)	0,2-1,7
jól hőkezelt szója (jól toaszterezett)	0,0-0,2

4.3.7.3. A szója hőkezelttségének megállapítása krezolvörös festékkötési próbával

A módszer alkalmas a szója hőkezelttségi fokának megállapítására, mert a szójaminták és a krezolvörös közötti reakció intenzitása szoros kapcsolatban van a Maillard-reakcióban részt vevő vegyületekkel, a fehérjék szabad ϵ -aminocsoportot tartalmazó lizinjével és a redukálócukrokkal. A nem redukálócukrok glikozidos hidroxil-csoportjának amilolízise révén redukálócsoport alakulhat ki, és a Maillard-reakció termékei megkötik a krezolvörös festékeket. A festékmegkötés mértékéből a szója hőkezelttségi fokára lehet következtetni. A krezolvörös (4.68. ábra) kémiai szerkezetét tekintve o-krezol-szulfotoalein, egy olyan festék, amely:

- pH = 1,2-ig **vörös**,
- pH = 2,8-7,4 között **sárga**,
- pH = 9,0 vagy fölötté **bíbor** színű.



4.68. ábra. Krezolvörös indikátor ($C_{22}H_{18}O_5S$), (o-krezol-szulfotoalein)

A vizsgálati eljárás során 400 mg mintát mérünk a 100 cm³-es Erlenmeyer-lombikba, és 50 cm³ n-hexanollal hidegen extraháljuk. Rázás, dekantálás, majd a hexanosos fázis elöntése után 200 mg zsírtalanított mintát mérünk be a meghatározáshoz egy 100 cm³-es csiszoldugós Erlenmeyer-lombikba. Hozzáadunk 10 cm³ frissen előállított krezolvörös reagenst, mely 1 rész alkoholos krezolvörös oldatból, valamint 9 rész 0,1 mólos sósavból áll. Egy órán át rázógépen rázatjuk, majd centrifugáljuk. Egy cm³ felülúszóhoz 10 cm³ 0,02 mólos nátrium-hidroxid-oldatot adunk, és 570 nm-en fotométráljuk. Mintavakot készítünk, mely a festék nélkül az összes többi reagenst tartalmazza, majd a fotométert a festék nélküli reagensre állítjuk be. Standardsorozatot készítünk, amely 0,25; 0,50 és 1,0 cm³ krezolvörös reagensből és 0,2 mólos nátrium-hidroxid-oldatból áll. Meghatározzuk a standardsorozat fényelnyelését 570 nm-en, az abszorbanciát ábrázoljuk a koncentráció függvényében, és a kapott hitelesítő egyenest használjuk fel az ismeretlen minta krezolvörös-tartalmának meghatározására.

326 ■ 4. Élelmiszerek összetételének meghatározása

Az eredményeket az 1 g szójaliszt által megkötött festék mg-jainak mennyiségében adjuk meg. Az 1 g liszt által megkötött krezolvörös mennyiségét a következő képlet alapján kapjuk meg:

$$x = (2,0 - 10 \cdot A) \cdot 2,5,$$

ahol: x – az 1 g szójaliszt által megkötött festék (mg),

A – az oldatban mért krezolvörös mennyisége.

A különböző módon hőkezelt szójaminták krezolvörös megkötése a következő:

	mg krezolvörös/g liszt
jól hőkezelt szója	3,8-4,3
nyers szója	2,0-3,0
alulkezelt szója	3,3-3,7
túlkezelt szója	4,3 felett

A zsírtalanított minta esetén az eredményt a zsírtartalommal korrigálni kell. Azonos mintából a két, párhuzamos mérés között a megengedett eltérés az eredmény 10%-a.

4.3.7.4. Immunológiai módszerek a fehérjék szétválasztására és meghatározására

Az immunológiai módszerek közül azok a legalkalmasabbak, amelyek speciális antiszérumot reagáltatnak azzal az extraktummal, amelyből a fehérjét ki akarják mutatni. Az eljárás során a fehérje csak a megfelelő antitesttel lép reakcióba, és a pozitív reakció a fehérje jelenlétét deklarálja.

Az **egyszerű immunodiffúziós módszernél** a gélben az antitestek egyenletes koncentrációban vannak elosztatva, az antigéneket (a kivont fehérjéket) pedig a gélbe vájt lyukakba juttatva hagyják, hogy a gélbe diffundáljanak. Amint az antigén a gélben kapcsolatba kerül az antitesttel, egy precipitációs sáv, gyűrű keletkezik, melynek átmérőjét mérve nemcsak minőségi, hanem a gyűrű nagysága alapján mennyiségi meghatározásra is van lehetőség.

A **dupla immunodiffúziós módszer** esetében az antigént és az antitestet a gél két szélén, egymástól határozottan elkülönítve helyezik el, majd hagyják, hogy azok egymás felé diffundáljanak. A két anyag találkozásakor precipitáció történik, mely az antigén-antitest komplexnek felel meg. Mivel az antigén és az antitest diffúziója is függ a diffúziós koefficienstől és az anyag koncentrációjától, a kicsapódások a gél különböző részein történnek meg és könnyen értékelhetők. Mind az egyszerű, mind a dupla immunodiffúziós módszernél a kapott jelek (precipi-

tációk) átfedhetik egymást, ezért van egy bizonyos korlát, amelynél több frakció ezzel a módszerrel nem mutatható ki a vizsgált mintából.

A precipitációs reakciónál általában a precipitációs köröket értékelik, melyek segítségével egy hitelesítő egyenest tudnak létrehozni a mennyiségi kiértékelésre. Ennek során a konstans koncentrációjú antiszérumhoz eltérő, ismert koncentrációjú antigéneket adnak, melyek különböző nagyságú precipitációs gyűrűket hoznak létre, melyek segítségével a kalibrációs egyenes szerkeszthető.

Az olcsó és hatékony módszerek közül kiemelkedik az **ELISA** (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), mely **immunanalitikai módszer az antigén és antitest (ellenanyag) reakcióján alapul**, amelyek másodlagos kötőerőkkel összekapcsolódva komplexet hoznak létre. Az ELISA továbbfejlesztett változata, a szendvics immunoassay lényege az, hogy az antigén fehérje felületén több olyan hely található, melyhez ellenanyag kapcsolható.

A hagyományos eljárás szerint a mikrotiter lemez felületéhez antigéneket kötnek, melyhez hozzáadják a vizsgálni kívánt mintát. A felülethez kötött antigének és a minta-**antigének versengenek az ellenanyaghoz való kötődésben**. A kötődés után mosás következik, melynek során mindent eltávolítanak, ami nem kötődött az antigénhez, a felületen megkötődött ellenanyaghoz pedig hozzáadnak egy specifikus enzimmel konjugált ellenanyagot, melyhez az enzim szubsztrátját adva **egy színes termék keletkezik, melynek intenzitása fotométerrel mérhető**. A mért abszorbancia a vizsgálandó antigén (minta) koncentrációjával fordítottan arányos, mert minél több az antigén a mintában, annál több ellenanyagot köt meg, így annál kevesebb ellenanyag kötődik a felületen immobilizált antigénekhez.

A megkötődést követően a meg nem kötődött anyagokat a mikrolemezekről mosással eltávolítják, majd a kromogén HRP-szubsztrátot adják a lemezhez. Ebben a lépésben a HRP-enzim aktivitása egyenesen arányos a HRP-hez kötött fehérje mennyiségével, és arányos a mintában lévő szabad fehérje mennyiségével is. Az utolsó lépésben **a HRP-enzim működését bizonyos inkubációs idő után leállítják, és a HRP enzimreakcióban keletkezett színes vegyület koncentrációját 450 nm-en végzett fotometrálassal mérik**.

A kalibrációs egyenes segítségével az ismeretlen fehérjetartalmú minta abszorbanciáját felhasználva a fehérjetartalom számítható. Ez a módszer jól használható különböző élelmiszerek fehérjetartalmának mérésére, mert nem kíván jól felszerelt, drága laboratóriumokat és analitikai eszközöket, hanem a feladatot egy szerényen felszerelt laboratóriumban is, az ELISA kit-ek megvásárlása után, meg lehet oldani. Amennyiben az ELISA-mérési eredmények pozitívak, mindenképpen javasolt a pozitív mintákat egy HPLC/MS/MS vagy egy GC/MS/MS laboratóriumban ellenőriztetni.

Az ELISA-módszer alkalmazása

Nagyon sok ELISA-módszert kifejlesztettek a különféle fehérjék kimutatására. A módszernek van egy direkt és egy indirekt változata. A direkt változat esetében

a vizsgálni kívánt antigénnel hoznak létre antitestet a nyúlban, és ezzel végzik a vizsgálatokat, az indirekt módszer esetén pedig egy második antitestcsoportot hoznak létre kecskében, ami a nyúl IgG-re specifikus. Az **ELISA az egyik legjobb módszer a fehérjék kimutatására**, mert a tesztet három óra alatt végre lehet hajtani, és 0,1%-nál nagyobb mennyiségű fehérjét ki lehet mutatni. Extraérzékeny esetben 1 mg minta elég az azonosításra, kevesebb specifikus antiszérum szükséges a meghatározáshoz, és nem szükségesek extratiszta készítmények, ami jelentősen csökkenti a költségeket.

Az indirekt ELISA-módszer azért is nagyon közkedvelt, mert vele bizonyos fehérjéket közvetlenül lehet meghatározni. Az ELISA-val és a peroxidáz-antiperoxidáz teszttel (PAP), speciális antiszérumok alkalmazásával, az eredeti, a részlegesen hőkezelt vagy a hőkezelt mintákat is el lehet különíteni egymástól. A dupla antitest szendvics technika ugyancsak alkalmas különböző fehérjék elkülönítésére még akkor is, ha azok hőkezelésen mentek keresztül.

4.3.7.5. A glutén kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas analitikai módszerek

Egy kívülálló számára egy-egy élelmiszer-komponens kimutatása és mennyiségi meghatározása könnyűnek tűnhet, hisz vannak szabványos vagy ajánlott analitikai módszerek, leírások, és úgy gondolhatnák, hogy azok alkalmazása nem jelent nehéz feladatot. A könyvünkben korábban leírtak is ezt sugallhatják, esetenként minden egyszerűnek tűnhet. Aki azonban az élelmiszer-analitika területén dolgozik, az tudja, hogy a legtöbb esetben nehéz dolga van az analitikusnak, ha egy olyan bonyolult mátrixból, mint az élelmiszer, akar valamilyen komponenst meghatározni. Arról nem is beszélve, hogy egy összetevő meghatározására is több módszer ismert, és az analitikusnak kell a módszert a megbízó kívánásaihoz, illetve a laboratórium felszereltségéhez igazítani. A gluténmeghatározás kapcsán ezekre a problémákra szeretnénk a figyelmet felhívni.

A glutén nem egy egységes anyag, hanem több, különböző molekulatömegű és oldhatóságú fehérje alkotja, és már rögtön az elején abba a problémába ütközünk, hogy a különböző oldhatóság miatt hogyan vonjuk a ki a fehérjét egy olyan bonyolult mátrixból, mint az élelmiszer. Bonyolítja a helyzetet, hogy nagyon heterogének a felületi tulajdonságok, molekulán belül és molekulák között is előfordulnak kovalens kötések (diszulfid hidak), és a kérdéses molekulák érzékenyek lehetnek akár a hőre, akár a különféle vegyszerekre.

Különböző módszereket dolgoztak ki a gabonafehérjék és az őket kódoló gének jellemzésére és meghatározására. Ezek: izoelektromos fókuszálás (IEF), A-PAGE, SDS-PAGE, fordított fázisú folyadékkromatográfia (RP-HPLC), méretkizárásos HPLC (SE-HPLC), nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis (HPCE), mátrixtámogatott lézer deszorpciós ionizáció – repülési idő tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS), immunoblotting és polimeráz láncreakció (PCR). A legtöbb

szerző más és más módszert használ, de végeztek a módszerek között összehasonlító vizsgálatokat is, azonban nincs határozott állásfoglalás arról, hogy melyik a legcélravezetőbb módszer, azt ugyanis mindig a feladat szabja meg. A módszer kiválasztására legnagyobb hatással a megkívánt specificitás és érzékenység bír.

A standard módszerek kidolgozása nagyon nehéz, különösen, ha a gluténmentességet kell deklarálni, mert a glutén olyan fehérjék komplex keveréke, amelyek különböző gabonafélékben találhatóak, a fehérjeprofíljuk természetes változatosságával, amely genetikailag meghatározott, és még a környezeti tényezők is befolyásolják. Mielőtt kiválasztanánk a legérzékenyebb és legspecifikusabb módszert a glutén meghatározására, egy nemzetközileg elismert glutén referencianyagra lenne szükség, amely alkalmas lehet a laboratóriumok eredményeinek nemzetközi összehasonlítására.

A glutén kimutatására leggyakrabban az immunológiai tesztek, főként az ELISA-t, a proteomikát tömegspektrométerrel kapcsolva, és a genetikai megközelítést is alkalmazták PCR-ral. Annak ellenére, hogy általánosan elfogadott módszerekről van szó, egyiket sem lehetett teljes biztonsággal alkalmazni a glutén nagy érzékenységgű kimutatására élelmiszerekből. Mindegyik módszernek vannak előnyei és hátrányai, és mindegyik kiválóan alkalmas speciális problémák megoldására. Az ELISA műszerei viszonylag olcsók, a módszer egyszerű, nem kíván szakképzett személyzetet, könnyen betanítható, sok analitikus szereti ezt a módszert, ezért széles körben elterjedt. Ezzel szemben a tömegspektrométer rendkívül drága, képzett személyzetet és infrastruktúrát igényel, de az utóbbi időben jelentős haladást értek el vele az igen kis (mg/kg) koncentrációban előforduló allergén fehérjék kimutatására és meghatározására. Mivel sok esetben a mintabeazonosítás nehézséget jelent, a tömegspektrometriás analízis rendkívül előnyös lehet a többi módszerhez viszonyítva.

4.3.7.5.1. A gluténmeghatározás jelentősége

Manapság a cöliákia gyógyítására az egyetlen megbízható terápia a szigorú gluténmentes táplálkozás. A természetes formájukban is gluténmentesnek tekinthető alapanyagok mellett ismeretesek nagyon alacsony gluténtartalmú vagy gluténmentes sütőipari termékek is. A búzaallergia egyfajta ételallergia, mely az immunoglobulin E-n (IgE) keresztül nyilvánul meg, és a búzamazgban tárolt fehérjék okozzák. Néhány reakció a búzafehérjékre korlátozódik, míg másokat nagyon sokfajta növényi szövetben előforduló fehérje okozhat. Az olyan egyéb gabonafélék fehérjéi, mint a kukorica, a cirok és a köles, csak nagyon ritkán okoznak allergiás reakciót, és nem hasonlatosak azokhoz a reakciókhoz, melyeket a búza, az árpa, a rozs és a zab kiváltak. Azok az aminosav-szekvenciák, melyek az allergiás reakciók kiváltásáért felelősek, nagyon hasonlóak ezekben a növényekben.

A lisztérzékenység (cöliákia, CD) a glutén által kiváltott, az immunrendszer által közvetített glutén-szenzitív enteropátia, amely leginkább az európai lakosság

körében nyilvánul meg. A CD-t és az IgE-dependens búzaallergiát a búza glutén vagy a gluténhez nagyon hasonló összetételű gabonafehérjék váltják ki, amelyek a rozsban, az árpában, a tönkölybúzában és néhány esetben a zabban fordulnak elő. A zab által kiváltott cöliákia ritka, de néhány esetben a bélhámsejtek finomszerkezetének megváltozását és gyulladását okozhatják. A cöliotoxikus fehérjék hatásukat a glutén speciális aminosav-összetételének köszönhetik, melyben a magas prolintartalom megakadályozza a fehérje enzimes bontását, így nagyon sok immunogén glutén polipeptid éri el a vékonybelet.

4.3.7.5.2. Analitikai módszerek a glutén kivonására és meghatározására élelmiszerekből

Minta-előkészítési és fehérjeextrakciós technikák

A minta-előkészítés három egymást követő lépése a fehérje analízise előtt a sejtek szétroncsolása, a zavaró anyagok eltávolítása vagy inaktiválása, majd a fehérje oldhatóvá tétele és feloldása. A gabonafehérjék kioldása közben különböző tényezőket kell figyelembe venni, hogy a lehető legjobb kioldást, majd ezt követően bármilyen reprodukálható meghatározást tudjunk elérni. Először is minden zavaró interakciót figyelembe kell venni, mely a meghatározni kívánt fehérje és a minta egyéb alkotórészei között kialakulhat. Mivel a fehérjék közti diszulfidhidak megnehezítik a fehérjék analízisét, **elsődleges fontosságú a redukálószer alkalmazása**, melyek segítségével a diszulfidhidakat szét lehet szakítani és át lehet alakítani szabad szulfhidril csoportokká. Ezt követheti akár az elektroforetikus, akár a kromatográfias analízis. A blokkoló reakció a legtöbb esetben valamilyen alkilálás, mely növelheti a fehérje elektroforetikus mozgékonyágát, az ionerősség, mely növelheti az elektroforézis vagy a kromatográfia hatékonyságát. A sókoncentráció szintén hatással lehet a fehérjékre; a meghatározás során alaponal-zavarokat és rosszabb elválasztást okozhat.

A szerves oldószereket, elsősorban az acetonnitrilt is alkalmazzák a minta kivonása során. Az oldékonyságot növelheti a karbamid vagy a nátrium-dodecilszulfát (SDS), melyeket előszeretettel alkalmaznak gabonafehérjék kivonására. Figyelemmel kell lenni azonban arra, hogy ezek a kemikáliák a további analitikai lépések során zavarhatják a meghatározást. Az SDS főleglegét például acetonnal kell eltávolítani, hogy a minta alkalmas legyen további elektroforetikus vagy kromatográfias analízisekre. A fehérjék újbóli feloldására alkalmas lehet olyan fizikai módszer is, mint az ultrahanggal történő kezelés, bár ennek energiája és a kezelés ideje hatással lehet a fehérje integritására.

Az analitikai cél figyelembevételével különböző egy- és többlépéses extrakciós technikákat dolgoztak ki a fehérje kivonására. A gabonafehérjék **egylépéses extrakciójának** célja az összes fehérje kivonása, mely a vízdoldható és a vízben oldhatatlan fehérjéket is reprezentálja. A gluténmentes gabonafélék egylépéses extrakciójára olyan puffereket alkalmaztak, melyek karbamidot és ditio-treitolt (DTT) tartalmaz-

tak. Esetenként alkalmazták még e két ágens mellett az SDS-t vagy a tiokarbamidot is. Az egy lépéses fehérjeextrakciós módszer egyszerűsége, reprodukálhatósága és gyorsasága miatt rendkívül népszerű, ennek ellenére nincs olyan módszer, melyet általánosan lehetne mindenfajta analitikai célra alkalmazni.

A **szekvenciális extrakciós módszerek** a fehérjefrakciókat különböző oldhatóságuk és méretük alapján választják szét, mely frakciók ezt követően alkalmasak lesznek további analitikai felhasználásra. A jó minta-előkészítés egyszerű, reprodukálható, és a fehérje megváltozása, átalakulása, károsodása a lehető legkisebb a lépések során. Általánosságban elmondható, hogy a minta proteolitikus enzimeit inaktíválni kell, a karbamidot tartalmazó mintákat pedig tilos hőkezelésnek alávetni.

A gabonafehérjék extrakciója során a gluteninfehérjék HMW és LMW glutenin alegységeinek szétválasztására alkalmazzák a szekvenciális, különböző szerves oldószerekkel végzett extrakciót, és az RP-HPLC-t. Az LMW-GS szelektív kicsapására alkalmazták a 80%-os acetonnal való kezelést, melyet követően a gliadin extrakciója következett, majd alkohollal extrahálták a glutenineket, miután a diszulfidhidakat redukcióval szétbontották. A módszer finomításával nagy tisztaságú fehérjefrakciókat tudtak előállítani, melyek alkalmasak voltak a további analízisre.

A búzalisztet különböző detergenssekkel is kezelték, mielőtt a preparatív célra szánt fehérjét 70%-os etanollal extrahálták volna. Az etanollal mosott, liofilezett gluténfrakciót használták a glutenin előállítására, melynek során a pelletet 50%-os propanolban szuszpendálták, centrifugálták, majd 0,04 mólos ecetsavval szemben dializálták. A felülúszó tartalmazta a gliadinokat. A gluteninfrakciót 50%-os propanollal és 1% DTT-vel kezelve, melyet 65%-os propanol követte 1% DTT-vel, a pellet és a felülúszó elválasztásával a HMW- és a LMW-frakciókat tudták egymástól különválasztani.

A nagy kihívást az jelenti egy analitikus számára, amikor a gliadint kell meghatározni olyan mátrixból, amely a gliadin mellett még az egyéb prolaminokat, mint amilyenek a hordein, a rizs prolaminjai és a zeinek, is tartalmazza. A problémát az jelenti, hogy a kis mennyiségű gliadin mellett a nagy mennyiségben jelen lévő prolaminok is kioldódnak az analizálni kívánt anyagba. Amennyiben a hagyományosan alkalmazott alkoholos extrakció után egy ecetsavas kezelést is közbeiktatunk, akkor a gliadinokat az egyéb prolaminoktól el lehet választani és tovább lehet analizálni.

Az élelmiszer mátrixból extrahált fehérjéket további tisztításnak kell alávetni olyan szempontból, hogy milyen speciális szétválasztási vagy detektálási műveleteket kell a továbbiakban végrehajtani. Néhány esetben a mintának speciális kémiai kezelésen kell átesnie a további analitikai vizsgálatok előtt. Amennyiben tömegspektrométerrel akarjuk az extrahált fehérjemintát tovább elemezni, akkor a **fehérjéket peptidekké kell hidrolizálni**, amennyiben elektroforézis vagy

HPLC-analízis a cél, akkor **elengő a diszulfidhidak szétbontása** valamilyen redukálószer (DT, 2-merkaptó-etanol, (2-ME)) segítségével. Az érzékeny és pontos analitikai mérést még olyan tényezők is befolyásolhatják, mint a minták kezelése, tárolása, a tárolás hőmérséklete vagy a mintában lévő szennyeződések.

HPLC alkalmazásakor, hogy a minta néhány napig stabil legyen, 80 °C-on, két percre tartó **hőkezelést kell alkalmazni**. A liofilezés, melyet az oszlopkromatográfiával szétválasztott minták esetében alkalmaznak, a fehérje oldhatóságának irreverzibilis megváltozását okozhatja, mert ennek folyamán fehérjeaggregátumok jöhetnek létre, különösen, ha az oldószer acetonitril is tartalmaz. Ezért a liofilezés helyett inkább a membránokkal történő koncentrációt javasolják kromatográfiás preparátumok esetében.

Az intakt gluténfehérjék esetében a kromatográfiás módszerek nem voltak alkalmasak az egyes fehérjék azonosítására, ezért helyettük inkább az enzimes bontás során keletkező peptidek MS/MS analízisét javasolják. Az általánosan használt **tripszin a glutén esetében nem volt célravezető**, mert a glutén kevés arginint és lizint tartalmaz, ezért inkább a **kimotripszint alkalmazták**, melynek segítségével kapott peptidek már alkalmasak voltak a további analízisre.

Egy fehérjeextrakciót nem igénylő enzimes módszert is kidolgoztak a glutén és egyéb fehérjék analízisére. A módszer lényege **az élelmiszerminta direkt enzimes emésztése**, melyet LC/MS/MS-analízis követ. A gyomor és a duodénum körülményeit modellezve a **pepszint, a tripszint és a kimotripszint alkalmazták** a fehérje emésztésére a kromatográfiás analízis előtt. Korábban az említett enzimek mellett még a karboxipeptidázt és az elasztázt is alkalmazták erre a célra. Az enzimes kezelést 100:1 arányú fehérje:enzim keverékkel, két órán át tripszinnel és kimotripszinnel végezve, az emésztés során, amennyiben a glutén jelen van a mintában, **olyan alkalmas marker peptidek szabadulnak fel, melyek jelzik a glutén jelenlétét**.

Módszerek a glutén meghatározására

Immunológiai módszerek

A glutén fehérje alapon történő meghatározására előszeretettel alkalmazzák az immunológiai módszereket, melyek olyan antitesteket használnak, mint az allergiás emberek vérérszérumában megtalálható IgE, vagy melyet az allergén élelmiszer extraktummal kezelt kísérleti állatok vérérszérumából állítanak elő. A gluténmeghatározás területén messze az immunológiai módszerek a legérzékenyebbek, ezért a legszélesebb körben alkalmazott módszerek is, de az eredmények reprodukálhatósága gyenge, mert különböző referenciastandardokat, extrakciós eljárásokat és antitesteket alkalmaznak a meghatározás során.

A kereskedelmi forgalomban több olyan ELISA-kit található, mely alkalmas az élelmiszerek gluténtartalmának meghatározására. A legtöbb esetben az extrakciós oldatok összetételét, az antitestek tulajdonságait és a kalibrációs anyagokat nem hozzák nyilvánosságra. Néhány módszer specifikus a búzára, mások viszont

csak a rozs vagy az egyéb toxikus fehérjék detektálására alkalmasak. Olyan antitesteket is fejlesztettek, melyek képesek felismerni a toxikus gabonafehérjét, és amelyeket már széles körben alkalmaznak a gyakorlatban.

Az ELISA-módszerek a legtöbb esetben gliadin vagy hordein referenciafehérjét használnak, az antitestek pedig gliadinra vagy néhány gliadin epitópra specifikusak. Ebből következően az ilyen módszer nem veszi tekintetbe az egyéb toxikus fehérjét, mint pl. a gluteninokat, hanem csak az élelmiszerben lévő összes glutén mennyiségére ad egyfajta becslést. Az eredményt kétszeres szorzóra, mert a gliadinok az összes gluténfehérje kb. felét teszik ki. Amellett, hogy különböző referenciastandardokat használnak, a molekulák oldékonyságában előforduló egyedi különbségek, a nem megfelelő kioldási módszer miatt is, hibát okozhatnak az ELISA-val történő gluténmeghatározás során.

Az immunológiai módszerekben használt antitestek

A használt antitesttől, a kalibrációs eljárástól és az alkalmazott referenciaanyagtól függően az ELISA-tesztek különböző eredményeket adhatnak ugyanazon mintára. Néhány kereskedelmi forgalomban kapható teszt a monoklonális egér antitesteken (mAb) alapszik, mely egy Ausztráliában termesztett búzafajta ω -gliadinjaival reagál. Ennek az antitestnek az előnye, hogy a gliadinfrakció nem csapódik ki a hőkezelés során.

Egy α -gliadinra kifejlesztett antitest a gliadinokon kívül hasonló módon reagál az LMW-GS-sel, a hordeinokkal, az aveninokkal és a szekalinokkal, de nem reagál a HMW-GS-sel. Az LMW-GS típusú fehérjékkel kapcsolatos antitesteket is kifejlesztettek kifejezetten ennek a frakciónak a mérésére. Egy újabban kifejlesztett antitest elsősorban az ω -szekalin extraktumával reagál, de felismeri a gliadinokat, a hordeinokat és a szekalinokat, azonban nem ismeri fel az aveninokat. A kulcsszekvencia ezekben az esetekben a hőrezisztens GlnGlnProPhePro, a GlnGlnGlnProPhePro és a LeuGlnProPhePro epitópok (antigén-molekulának az a része, amelyhez az antitest kötődik). A GlnGlnProPhePro szekvencia az α -gliadinokban tizenegyszer nagyobb arányban fordul elő, mint a γ -gliadinokban, és jelen van még az árpa hordeinjeiben és a rozs szekalinjaiban is. Ez az antitest nem ad keresztreakciót az eleve gluténmentes magok fehérjéivel. A különböző antitestek egyedi specificitása felhívja figyelmet a glutén meghatározására alkalmazott immunokémiai módszerek validálására.

A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA-tesztek alkalmazása a glutén meghatározására

Az immunológiai reakció lebonyolítására használt teszt-összeállítások tartalmaznak egy referenciaanyagot, egy vagy több specifikusan kifejlesztett antitestoldatot és más kémiai anyagokat, mint amilyenek a pufferek és az extrahálószerke. Van néhány kereskedelmi forgalomban kapható összeállítás elsősorban a gliadin és/vagy a glutén meghatározására.

A gliadinokat eddig úgy tekintették, hogy ezek a legalkalmasabbak a glutén meghatározására. A mennyiségi meghatározáshoz szükség van egy standardra, mellyel kalibrálni lehet a módszert. Az európai gliadin referenciaanyag kifejlesztésekor arra a következtetésre jutottak, hogy a gliadinok és a glutelinek mennyisége a búza fajtájától függően jelentős mértékben változik, ezért szükség van arra is, hogy **a helyi fajtákból állítsanak elő standardokat**, azokkal **antitesteket**, melyek segítségével vizsgálni lehet a helyi adottságoknak megfelelően a gliadinok mennyiségét. Mivel a glutelinek szintén okozhatják a CD-t, megállapították, hogy olyan módszereket kell kifejleszteni, melyek mind a glutenint, mind a gliadint képesek mérni. Csak az olyan antitestek alkalmazása tekinthető megbízható megoldásnak, melyeknek segítségével mind a gliadinok, mind a gluteninek mérhetőek.

Még a múlt század kilencvenes éveinek elején teszteket fejlesztettek ki az árpára, de csak a 160 mg/kg feletti gluténmennyiségeket tudták vele kimutatni, és a módszer képtelen volt a hordein analízisére. Az alkalmazott antitest főként a HMW-GS alegységeket ismerte fel, de valószínűleg alkalmas volt az LMW-GS, az ω -gliadinok és kismértékben az α - és β -gliadinok felismerésére is. Ez a gliadin-tartalom téves megállapításához vezetett, és ez okozta az eredmények nagy szórását is, mivel az ω -gliadinok mennyisége a különböző búzaváltozatok esetében nagy eltérést (6-20%) mutat. Ugyanezekből az okokból az ω -gliadinokat is mérő ELISA nem tudja mennyiségileg pontosan meghatározni az árpa prolaminjait, alábecsli a durumbúza gliadinjait, és a valóságosnál magasabb eredményt ad a tritikálé és a rozs prolaminjaira. A fentiekén túl hibát jelenthet még a keresztreakció is a különböző gluténtartalmú gabonáknál.

Egy speciális antitesten alapuló ELISA-tesztet fejlesztettek ki a gluténmentes élelmiszerek gluténtartalmának mérésére, mellyel 2-5 mg/kg gliadin mutatható ki az élelmiszerekből. A módszerrel 1,5 mg/kg gliadin és 3 mg/kg glutén még kimutatható, és 5 mg/kg feletti értékek mennyiségileg meghatározhatók. A módszer érzékenysége 0,78 ng/ml gliadinokra és 0,39 ng/ml hordeinekre és szekalinokra. A módszerrel a gliadinok és a hordeinek meghatározhatók mind az eredeti, mind a hőkezelt mintákból, mind a búzából, mind az árpából készült termékeknél, és alkalmas a gluténtartalom kimutatására hidrolizált termékekből is.

A feldolgozott élelmiszerek prolamin-tartalma részben vagy egészben (pl. az árpamalátában) hidrolizált formában van jelen az élelmiszerben. Ez az ELISA-t alkalmatlanná teszi a vizsgálatra, mert az antitest nem ismeri fel a hidrolizált gluténfehérjét. Ezt követően kidolgoztak olyan speciális antitesten alapuló kompetitív ELISA-módszert is, melyeket hidrolizált minták esetében is tudtak alkalmazni.

A dezamidálás, mely gyakran előfordul a hőkezelés során, befolyásolhatja az élelmiszer-biztonságot, mert az ELISA nem képes mérni a dezamidált glutént, ami kockázatot jelent a CD-betegek számára. Ebből következően az ELISA-teszt önmagában nem nyújt teljes biztonságot a gluténintoleranciában szenvedők számára.

Összefoglalva az előzőeket, egy élelmiszerről azt deklarálni, hogy gluténmentes, nagyon nehéz, mert a vizsgálatot lényegesen befolyásolja az, hogy milyen módszert használtak a gluténtartalom mérésére, és hogy milyen élelmiszermátrixból történt a meghatározás.

A gluténallergének azonosítása proteomikai módszerekkel

Bármilyen analitikai módszer lényege a meghatározni kívánt anyag, vegyület azonosítása és koncentrációjának mérése. Az élelmiszer-allergének esetében ez nehéz feladat, mert az élelmiszerek nagyszámban tartalmazhatnak olyan fehérjéket, melyek allergiát okozhatnak. A proteomikai (a fehérjék kétdimenziós gél-elektroforézissel történő szétválasztása) vizsgálatok során szétválasztják a fehérjéket, ezt követi az egyes fehérjék azonosítása.

A gabonák analízise során elsődleges eszköz a szétválasztás, az azonosítás és az egyes fehérjék hatásának felderítése a gabona minőségére, valamint hogy vannak-e egészségre ható speciális tulajdonságai. A proteomikai munkafolyamat során a nagyhatékonyságú szétválasztási módszereket, mint amilyen a **kétdimenziós elektroforézis** vagy a különféle **kromatográfias módszerek**, előszeretettel alkalmazzák, a **mikroanalitikai módszereket** pedig az egyes fehérjék azonosítására használják (N-terminális szekvenálás vagy MS), olyan **adatbázisok alkalmazásával**, melyek segítségével az azonosítás biztonsága megfelelő.

A **proteomika** rendkívül hatásosnak bizonyult a gyakorlatban a fehérjék azonosítására, ezért **egyre nő a szerepe a toxikus komponensek analízisében** is. A fehérjék azonosítása azért nehéz, mert a közöttük lévő különbségek olyan csekélyek lehetnek, mint a pontmutáció egy búzafajta HMW-GS fehérjéjében, vagy néhány bázispár beszúrása a fehérjét kódoló DNS-szakaszba. A fehérjék szintjén ezek a **különbségek az SDS-PAGE technikával kimutathatók**, de ugyanerre a célra **nem alkalmas az RP-HPLC**. Az eredmények ellentmondásosságát jelzi az a tény is, hogy ezeket a **változásokat géntechnikával vagy MALDI-TOF-módszerrel nem sikerült megerősíteni**. Ebből egyértelműen az következik, hogy a glutén toxikus szekvenciájának azonosítására csak magas feloldóképességű és nagyon érzékeny módszerek alkalmasak.

Elektroforézis a gabonafehérjék szétválasztására

A gabonafehérjék szétválasztásáról és meghatározásáról korábban már volt szó. Kezdődött a papír-elektroforézissel, majd a disc-elektroforézissel folytatódott, melyet a nagyhatékonyságú felbontási (HR) technikák követtek, mint amilyenek a PAGE, az SDS-PAGE, az A-PAGE és az IEF, ezt követte a kapilláris elektroforézis (CE), a 2D-s elektroforézises technikák, illetve a felsorolt módszereket többféle kombinációban is alkalmazták a hatékonyság növelésére, mint amilyen pl. a HR-2D-HPLC-HPCE (kétdimenziós, nagy felbontású, nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia, nagyhatékonyságú kapilláris elektroforézis). A proteomikában legszélesebb körben a 2D IEF-SDS-PAGE-t használják a fehérjék azonosítására,

melyet a tripszines emésztés során kapott fragmentek MS-analízise követ a sorban. A fehérjék azonosítása kapcsán beszámoltak az A-PAGE – SDS-PAGE kombinációjáról is.

A specifikus és hatékony elektroforézis mindig attól függ, hogy a vizsgálandó fehérjéket hogyan sikerült a mintából kivonni, ami magyarázatot ad a fehérjecsíkok átlapolódására az elektroforézises analízis során. Szekvenciális extrakciós módszerek alkalmazása segít megelőzni ezt a problémát, melyek segítségével javul a fehérjék szétválása, ennek következtében a fehérjeprofil is. A mennyiségi meghatározás során nagyon fontos a célnak megfelelően megválasztott módszer, mert pl. a 2D gélben történő analízis esetében az ω -gliadinok a festékmentesítés és a gél tárolása során kidiffundálhatnak a helyükről. Olyan különböző anyagok, melyeket a fehérjék kivonásánál alkalmaznak (sók, fehérjebontó enzimek vagy a mintában lévő szénhidrátok, nukleinsavak, fenolos vegyületek, zsírok és kémiai maradvány anyagok) hátrányosan befolyásolhatják az elektroforézis hatékonyságát.

Az SDS-PAGE-t, mely méret szerint választja szét a különböző fehérjefrakciókat, széles körben alkalmazzák a gabonafehérjék minőségi jellemzésére és mennyiségi meghatározására. Az olyan nagy molekulákra, mint amilyenek pl. a búza gluteinjei, többdimenziós SDS-PAGE-technikát dolgoztak ki, mellyel kiváló elválasztást tudtak elérni. Az A-PAGE esetében az elválasztás alapja a fehérjetöltés sűrűsége, amit jó hatásfokkal tudnak használni a különböző változatok beazonosításánál, a fehérjelenyomat alapján. A búzafajták azonosítására a gliadin-összetételben fennálló különbségeket használják fel, amelyeket A-PAGE-vel határoznak meg. Az A-PAGE-t használták az α -, a β -, a γ - és az ω -gliadinok, az árpahordeinek, a rozsaveninek, a rizsprolaminok és a gluteninek analitikai és preparatív analízisére, az oldékonyságot növelő karbamid jelenlétében.

Az IEF a különböző izoelektromos pont alapján választja szét a fehérjéket a gélben kialakított pH-gradiens segítségével. Ezt a módszert a tartalékfehérjék szétválasztására használják széles körben. E módszer alkalmazása során karbamidot és tiokarbamidot használnak a fehérje oldékonyságának növelésére, ugyanis a különböző pH-kon nehéz a fehérjéket oldatban tartani.

A CE (kapilláris elektroforézis) módszer alapja ugyanaz, mint az A-PAGE-é: a fehérjék töltéssűrűségében fennálló különbség. Több módszert is kidolgoztak a gabonafehérjék CE-vel történő szétválasztására, de néhány speciális alkalmazás kivételével a módszerek nem terjedtek el a gyakorlatban.

A gabonafehérjék analízise kromatográfiával

Leginkább az egydimenziós HPLC-módszereket használják a gabonafehérjék szétválasztására, az SEC-t és az RP-HPLC-t pedig, mely módszerek alapja a gabonafehérjék eltérő molekulaméret-eloszlása és hidrofobitása, a fehérjék méreteloszlásának mérésére, a fehérje-polimorfizmus kimutatására és a biokémiai tulajdonságok jellemzésére használják. A látszólagosan nem extrahálható polimer fehérjék (UPP) mennyisége jó indikátornak bizonyult a gabona polimer fehérjék moleku-

laméret-változásának jellemzésére, és nagyon sok fehérjeminősítő rendszerben használják ezt a módszert. Az RP-HPLC a gélelektroforézissel együtt alkalmas az élelmiszer-fehérjék tulajdonságainak, különösen hidrofobicitásának meghatározása egy olyan bonyolult mátrixból, mint amilyenek az élelmiszerek.

Jelenleg nagyon sok kromatográfias eljárást alkalmaznak a gyakorlatban fehérjék azonosítására és mennyiségi meghatározására, és igen elterjedt a HPLC-MS kapcsolt technika is, mellyel a fehérjék vagy fehérjefrakciók azonosításának biztonsága jelentős mértékben megnő. Az ultra-nagyhatékonyságú kromatográfiát (UHPLC) gyakran közepes feloldóképességű kvadrupol MS-sel vagy nagy feloldóképességű TOF-MS-sel kombinálják. Az UHPLC-MS a HPLC-MS-hez képest lényegesen megnöveli a csúcok feloldását és a spektrális tisztaságot. A kiváló feloldóképesség új információkat adhat a mintáról, és nem lényegtelen az sem, hogy az UHPLC-rendszer lényegesen lecsökkenti az analízis idejét.

Tömegspektrométer és kapcsolt technikák a gabonafehérjék analízisében

A proteomikában széles körben elterjedt a **nagy sebességű fehérjeazonosítási módszer MS-sel kombinálva**, ami olyan eljárásokat helyettesített, mint az N-terminális szekvenálás. Ennek során lágy ionizációs technikákat alkalmaznak a fehérjék tömegspektrometriájában, mint amilyen pl. a MALDI vagy az elektro-spray-ionizáció. Még érzékenyebb az a módszer a fehérjék azonosítására, amikor a **MALDI-MS-sel az analizálandó fehérjéből származó peptideket analizálnak**. Ezt megelőzően a fehérjét enzimekkel hidrolizálják, melynek során olyan fragmentek keletkeznek, amelyek ujjlenyomatszerűen karakterisztikusak a kérdéses fehérjére. A fehérje peptid térképe elkészítésének pontosságát erősen befolyásolja a mátrix.

A gabonafehérjék esetében sikerült a közvetlen azonosítás és molekula-tömeg-meghatározás mindenfajta előzetes kezelés nélkül MALDI-TOF-MS-sel. A gliadin mennyiségi meghatározására kezeletlen és kezelt mintákból ugyancsak végeztek kísérleteket ezzel a módszerrel, melynek során vizsgálták az egyéb toxikus prolamínokat is. Ugyancsak ezzel a módszerrel vizsgálták a gluténfehérje szerkezetét és a fehérje poszttranszlációs módosulásait. Különböző növényi eredetű prolamínokat (gliadin, hordein, szekalin, avenin) szelektíven szét tudtak választani és azonosítani MALDI-TOF-MS-sel még akkor is, ha ezek a molekulák egy komplex mátrixban együtt voltak jelen.

Amikor a gluténfehérjéket tripszinnel kezelik, viszonylag kevés olyan peptid keletkezik, melyek méretüknél fogva alkalmasak az MS/MS-analízisre. Az MS-technikát gélelektroforézissel és/vagy a fehérje előemésztésével kombinálva, esetenként több mint egy enzimmel végezve az emésztést vagy speciális mintaelőkészítő műveleteket alkalmazva javítani lehet a proteomika hatékonyságát és specifikusságát, lehetővé téve a fehérje szerkezetének átfogóbb elemzését.

A gliadin azonosítására olyan hatékony kapcsolt technikákat alkalmaztak, mint a 2D gélelektroforézis RP-HPLC MS/MS-sel kapcsolva, és ehhez hasonló

technikát alkalmaztak az árpa gluténpeptidjeinek az azonosítására is. A különböző búzafajták (téli búza, tavaszi búza, búza-rozs hibrid, durumbúza, tönkölybúza) ω -gliadinjainak aktuális molekulatömegét MALDI-TOF-MS-sel és SDS-PAGE-vel határozták meg. Ennek során a molekulatömeg MS-módszerrel mérve sokkal alacsonyabb volt, mint az SDS-PAGE-mobilitás alapján mérve. Különböző búzafajták HMW-GS-frakcióit is sikerrel analizálták MALDI-TOF-MS-sel.

Az enzimes emésztés és az LC/MS/MS-technikák kombinálásával, hat gluténmarker peptid felhasználásával sikerült mennyiségileg is meghatározni a glutén nyomait eredeti formájú vagy kezelt élelmiszerekből. Az MS/MS-sel történő fehérjeazonosítás lényege, hogy **az adatbázisban olyan fehérjeszekvenciákat kell keresni, melyek megegyeznek a proteolízissel hasított minta spektrumával.** Az allergén fehérjék adatbázisát a múlt század kilencvenes évei elején hozták létre, és ez az interaktív bioinformatikai eszköz azóta is a proteomika lényeges részét képezi. **A gluténmarker peptidok alkalmasak a cöliákiát okozó toxikus glutén kimutatására, mivel ezek a búzában, a rozsban és az árpában is jelen vannak, de teljes mértékben hiányoznak a többi, immunválaszt ki nem váltó fehérjékből.** A továbbiakban még nagyon sok cöliákiát okozó peptidet azonosítottak, és most már ott tartunk, hogy kb. 16 000 fehérje és peptid azonosítására van lehetőség, amelyek közül természetesen sok nem toxikus.

Genomikai módszerek

A DNS-alapú módszerek lényege **a specifikus DNS-fragmentum PCR-módszerrel történő megsokszorozása**, melynek specificitását primerek alkalmazásával érik el, melyek megkönnyítik az élelmiszerben lévő, keresett DNS megsokszorozását. A cél DNS rendszerint fajspecifikus, és markerül szolgál a különleges élelmiszer-komponens jelenlétének kimutatására. A módszer alapja egy polinukleotid vagy primer készlet, amelyet a meghatározni kívánt gén vagy génszakasz alapján terveznek.

A polimeráz-lánreakció (PCR) egy molekuláris biológiai technológia a DNS enzimes amplifikálására (a kópiák megsokszorozására). A technológia lehetővé teszi a DNS egy kis darabjának megsokszorozását analízis céljából. A PCR-t az élet szinte minden területén használják, így élelmiszerek analízisére is, amikor egy oda nem illő gént vagy génszakaszt kell kimutatni, mellyel megerősíthető vagy cáfolható bizonyos komponensek jelenléte.

A PCR-t a DNS-szál egy rövid, jól definiált szakaszának amplifikálására használják, ami lehet egyetlen gén vagy csak egy génrészlet. **A PCR csak kis DNS-szakaszok másolására képes, melyek hossza legfeljebb 1000 bázispár.** A PCR-hez az alábbi komponensek, ill. segédanyagok szükségesek: DNS-templát, mely tartalmazza a DNS-szakasz amplifikálandó régióját, két primer, amelyek meghatározzák az amplifikálandó szakasz elejét és végét, DNS-polimeráz enzim, amely lemásolja az amplifikálandó szakaszt, nukleotidok, amelyekből a DNS-polimeráz felépíti az új DNS-t, és puffer az enzim számára megfelelő kémiai környezet biztosítására.

A PCR-készülékben a reakciócsöveket a reakció egyes lépéseihez szükséges hőmérsékletekre ciklikusan felhevítik és lehűtik. A reakció során az amplifikálandó DNS-szakaszt a primerek kiválasztásával határozzák meg. **A primerek rövid, mintegy 50 nukleotidból álló mesterséges DNS-szálak**, amelyek komplementerek az amplifikálandó DNS-szakasz elejével és végével. Ezek a kezdő- és végpontokon hozzákapcsolódnak a DNS-templáthoz, ahová a DNS-polimeráz kötődik, és megkezdik egy új DNS-szál szintézisét.

A primerek olvadási hőmérséklete az a hőmérséklet, amelynél a primer kötőhelyeinek fele foglalt, mely így nő a primer hosszával. A túl rövid primerek több helyre is kapcsolódhatnak egy hosszú DNS-templáton, amely nem specifikus kópiákat eredményezne. Másfelől a primer hossza az olvadási hőmérséklet által limitált. Ha az olvadási hőmérséklet 80 °C felett van, akkor a DNS-polimeráz kevésbé aktív, ezért a primer optimális hossza általában 20-40 nukleotid, az olvadási hőmérséklet pedig 60 és 70 °C között van.

Néha degenerált primereket használnak, melyek hasonló primerek keverékei, ezek alkalmazása akkor lehet előnyös, ha a gént különböző anyagokból kell amplifikálni, ahol a gének hasonlóak, de nem azonosak. A degenerált primerek esetenként nagyon hasznosak lehetnek, de jelentősen csökkentik a PCR-amplifikálás specificitását.

A PCR-eljárás húsz-harminc ciklusból áll, mely ciklusok az alábbi lépéseket tartalmazzák: Az első lépésben a kettős szálú DNS-t 94-96 °C-ra hevítik, hogy a szálak szétváljanak. A denaturálásnak nevezett lépés során a két DNS-szálat összekötő hidrogénkötések felbomlanak. A második lépésben a DNS-szálak felbontása után a hőmérsékletet annyira csökkentik, hogy a primerek hozzá tudnak kapcsolódni a DNS-szálakhoz (annealing vagy kapcsolódás). A hőmérséklet ebben a fázisban a primerek olvadási hőmérséklete alatt van, általában 45-60 °C. A harmadik lépésben az enzim a kapcsolódott primernél kezdve végigmegy a DNS-szálon, és létrehozza a megfelelő DNS-szakaszt (meghosszabbítás). Ennek során a szülő-nukleinsavszál szolgál templátként a leánylánc szintéziséhez.

A PCR-ral kapott termék agargél-elektroforézissel azonosítható. Ennek során DNS-t tartalmazó mintát injektálnak agargélbe, és a rákapcsolt elektromos áram hatására a kisebb DNS-szálak gyorsabban mozognak a gélben a pozitív pólus felé. A PCR-termék mérete egy a gélbe injektált standard, egy ismert hosszúságú DNS-szakaszokat tartalmazó DNS-létrával összehasonlítva határozható meg. Ennek során meghatározható az amplifikált DNS-szakasz tömege, de biztonsággal nem azonosítható be, hogy valójában milyen szakaszcsoportról is van szó. Erre sokkal alkalmasabb a Southern blot technika. (A **blottolás** során a gélben megfuttatott minta komponenseit a gél síkjára merőleges folyadékáramlással vagy merőleges elektromos erőterrel átvándoroltatják egy vékony polimer filmre.)

A **Southern blot technika** segítségével az adott DNS-mintából **specifikus DNS-szakaszok kimutatása válik lehetővé.** Ennek során az agaróz gél-elektroforézissel elválasztott szakaszok nitrocellulóz filterre kerülnek, ahol az adott

DNS-szakaszra specifikus próbákkal jelölik meg azokat, majd restriktív endonukleázokkal a nagyobb DNS-t kisebb szakaszokra hasítják. A DNS-t ezután nátrium-hidroxiddal denaturálják, melynek következtében a DNS két szála elválik egymástól. A DNS denaturálása fontos a későbbi membránhoz való kötődés és a próbákhoz való kapcsolódás miatt. Nitrocellulóz vagy nylon membránt helyezve a gél tetejére, a kapilláris hatás miatt a minták felfelé mozdulnak el, a membránhoz kötődnek, megőrizve a gélbeli helyzetüket. A nitrocellulóz membrán esetében 60-100 °C közötti száraz hőkezelés történik, nylonmembrán esetében UV-kezelés következik, amikor is kovalens keresztkötéssel megtörténik a DNS membránhoz kötődése.

Ezt követően **a membránt hibridizációs próbával kezelik.** Ez egy olyan specifikus szekvenciával rendelkező DNS-molekula, mely a vizsgálni kívánt szakasszal komplementer. **A próbát radioaktívan vagy fluoreszcensen, esetleg festékkel jelölik, hogy a kötési hely láthatóvá váljon.** A hibridizációt követően a nem hibridizált próbákat lemossák a felületről, és a hibridizációs mintázatot Röntgen-filmén autoradiográfiával, fluoreszcens jelölés esetén fluorométerrel vagy kromogén szubsztrát alkalmazásával enzimes színreakcióval teszik láthatóvá.

A valós idejű (real-time) PCR-módszer alkalmazása során a DNS-sokszorosítást kvantitatívan tudjuk nyomon követni. Ezzel a technikával nagy pontossággal meg tudjuk határozni a DNS-templát kiindulási mennyiségét, ami lehetővé teszi pl. **egy élelmiszerben az oda nem illő komponens kimutatását és mennyiségi meghatározását.** A valós idejű PCR során a célszekvenciához olyan **primer próbát** (szondát) készítenek, amely nem a *forward* vagy *reverse* primer letapadási helyére kötődik, hanem valahova közéjük. Korábban olyan szintetikus oligonukleotidot alkalmaztak, amely 5'-végén radioaktív izotóp foszfátot tartalmazott, a 3'-véget viszont úgy módosították, hogy arról ne tudjon a polimeráz szálhosszabítást indítani. A polimerizáció során, amikor az enzim a szondát eléri, annak 5'→3' exonukleáz aktivitása elbontotta azt, és később az oldatban megjelenő izotópjelet mérni lehetett. **A kvantitatív Real-Time PCR (Q-PCR) tehát olyan PCR-alapú módszer, mely lehetővé teszi a PCR-ciklusok során keletkező termék valós idejű detektálását és mennyiségi mérését.** A módszer széles körben alkalmazható pl. idegen élelmiszer-komponensek vagy genetikailag módosított organizmusok (GMO) kimutatására és mennyiségi meghatározására.

A gabonagének esetében sok esetben tapasztalható poliploiditás és helyi gén duplikáció. A gén elemzésének első lépése, hogy milyen szerepe van a génnek a szervezetben, pl. milyen polipeptid szintézisét irányítja. A génexpresszió (kifejeződés) elemzése történhet a messenger ribonukleinsav (mRNS) vagy a fehérje analízisével. A mRNS-sel történő jellemzés esetenként a fehérjeexpresszióra nem reprezentatív, és gyakran nem mutat összefüggést az expresszált fehérje szöveti jelenlétével.

Valós idejű PCR-t használtak a búza, a rozs, az árpa és a zab megkülönböztetésére különböző élelmiszermintákból, melynek során a gabona prolamin

gént célzó specifikus primert használtak. A módszert zab esetében alkalmazták a specifikus toxikus fehérjék kimutatására is. Az analíziseredményeket az ELISA-módszerrel gluténre kapott eredményekkel hasonlítva megállapították, hogy **a PCR-módszer alkalmas a gluténmentes élelmiszerek és gluténmentes alapanyagok analizésére.**

A PCR-módszert optimálták a glutént tartalmazó gabonafélék kimutatására lisztből, ill. a gluténmentes termékek kimutatására sütőipari termékekből. Modellként szójalisztet használva, a 0,1%-ban hozzáadott búzalisztet ki tudták mutatni. A módszert **sikerrel alkalmazták gluténmentesnek mondott lisztek és kétszersültek esetében**, ahol több esetben gluténtartalmú gabona DNS-t tudtak kimutatni. Egy másik esetben a valós idejű PCR-t a gluténtartalmú gabonanövények analizésére alkalmazva meghatározási célként a búza, a kamut búza, a tönkölybúza és a rozs HMW gluteninfrakcióját jelölték meg. A módszer érzékenységét különböző keverékek tesztelésével határozták meg. Zöldségmátrixból 2,5 mg/kg, húsból pedig 5 mg/kg búza volt kimutatható. A rozs és búza specifikus rendszerérzékenysége 10 mg/kg volt. A búza DNS-kimutatása tehát jó lehetőség a glutén élelmiszerekből való kimutatására.

4.3.8. Stabil izotópok alkalmazása az élelmiszer-analitikában

C₃ típusú fotoszintézisnél (fák, gabona, hüvelyesek, répa), amely leginkább a mérsékelt és a hideg égövön elterjedt növényekre jellemző, a szén-dioxidot először **három szénatomos szerves savakban** a (dihidroxi-aceton-foszfát és glicerinsav-3-foszfát) köti meg a folyamat kulcsenzime, a ribulóz-1,5-bisfoszfát-karboxiláz-oxigenáz (Rubisco). A **C₄-es típusú fotoszintézis során** (cukornád, kukorica) a szén-dioxidot először **négy szénatomos szerves savakban** kötik meg, majd a C₄ termékből a CO₂ felszabadul, és újra fixálódik a Rubisco segítségével. Ez a módszer meleg, jól megvilágított környezetben hatékonyabb a C₃ típusú fotoszintézisnél. A CAM típusú fotoszintetizálók szintén négy szénatomos karbonsavakban kötik meg először a szén-dioxidot, de itt a refixálás időben elválasztott, leginkább a meleg, száraz élőhelyek szukkulens növényeire jellemző folyamat (nappal C₃, éjjel C₄ típusú fotoszintézis).

Az élelmiszerek víztartalmának, ill. szervesanyag-tartalmának **stabilizotópos összetétele kapcsolatban áll a fotoszintézis típusával** (¹²C, ¹³C, ¹³C/¹²C arány), ill. a földrajzi elhelyezkedéssel. Az izotópok aránya csak akkor bizonyító erejű, ha a levont következtetést más vizsgálatokkal is meg lehet erősíteni. Az **oxigén és a hidrogén izotópok arányát** fel lehet használni arra, hogy eldöntsük, eredeti gyümölcsleőről van-e szó, vagy pedig a gyümölcslevet sűrítményből, a helyi ivóvízzel történő hígítással állították elő. Ilyenkor vizsgáljuk a deutériumot (D) és a 18-as oxigén izotópot (¹⁸O), mert **az eredeti gyümölcsle a nehezebb izotópokban dúsabb**, mint a helyi, hígításra használt víz. A megkülönböztetés alapja az a tény, hogy a **gyümölcs leve a nehezebb izotópokban feldúsul**, mert a növény a páro-

logtatás során a könnyebb izotóp-összetételű vizet nagyobb mértékben távolítja el a szervezetéből, mint a nehezebbet. Ezt a jelenséget párolgási hatásnak hívják. Ha cukrot tesznek a narancslébe, megváltozik annak $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ aránya, amelynek alapján a hozzáadott cukor mennyisége meghatározható.

A mesterséges, hozzáadott L-aszkorbinsav kimutatására is lehetőség van a stabil izotópok alapján. Az aszkorbinsavat (amely mesterségesen előállítva ugyanolyan jó, ugyanúgy hasznosul a szervezetben, mintha a növény maga állította volna elő) a C4-es asszimilációt folytató kukorica által létrehozott keményítőtől állítják elő, melyben a $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ arány 10-14‰ körül van, míg ez az érték a természetes, gyümölcs eredetű aszkorbinsav esetében 19-23‰ között mozog. Ha tehát az aszkorbinsavat pl. kromatográfiai eljárással el tudjuk választani az élelmiszer többi komponensétől, és meg tudjuk határozni a jelzett izotóparányokat, a C-vitaminnal történő kiegészítés és annak mennyisége deklarálható.

A stabil izotópos módszer **a bor vizezésének kimutatására is alkalmazható**, ugyanis a mustban lényegesen nagyobb a ^{18}O koncentrációja, mint a talajvízben, és értéke nem változik az erjedés során. A módszer alkalmazása során minden borvidéken, földrajzi helyen meghatározzák minden évjárat ^{18}O -tartalmát, a talajvíz ^{18}O -tartalmát, mely adatok segítségével, számítógépes adatbázis alkalmazásával, a bor vizezettsége kimutatható, a vizezés mennyisége meghatározható. A helyzetet bonyolítja, hogy **a bor ^{18}O -tartalma a szüret időtartamától is függhet**, mert a később szüretelt szőlőből készült bor ^{18}O -koncentrációja nagyobb a korán szüreteltétől (de itt is vannak kivételek), ezért ezt a módszert nagy körültekintéssel kell alkalmazni.

Mivel az alkohol a borban lévő cukorból keletkezik, ezért a must cukrából keletkező alkohol és a maradék cukor $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ arányának meg kell egyeznie. Ha cukrot vagy más területről származó mustot tesznek a borba, akkor a **keletkező alkohol izotóparánya eltérhet az eredeti alkohol izotóparányától**. Ha a borban lévő alkohol ^{13}C -értéke eléri vagy meghaladja a 23‰-et, akkor a bort nem must eredetű cukorral hamisították. Az elmúlt években pl. jó minőségű, olcsó, Dél-Európából származó borokkal hamisították a német borokat, melynek tényét a stabilizotópos módszerekkel fel lehetett tártani.

Az almaecetet is hamisítják mesterségesen előállított, **olcsó ecetsav hozzáadásával**. Ha az ecetsavat a kukoricakeményítő fermentációjával állítják elő (C4 típusú fotoszintézist folytat), akkor a ^{13}C értékéből a hamisítást ki lehet mutatni. Ha C3-as növény a hamisítás alapja (gabonakeményítő, répa, burgonya), akkor ezen az alapon a hamisítás ténye nem állapítható meg, ekkor viszont elő lehet venni **a deutérium** mennyiségét, mely **a tömény ecetsav hígító vizében kisebb**, mint az eredeti almaecetében, és ennek alapján a hamisítás ténye kimutatható. A pontos eredmények kialakításához számítógépes adatbázisra van szükség.

A tej és a tojás származási helyét is meg lehet határozni a stabil ^{18}O izotópok alkalmazásával, ugyanis ezekben a termékekben az izotópok mennyisége és aránya a helyi talajvíz mintázatát követi, tehát **a talajvíz és a termék ^{18}O izotóp**

arányának segítségével a származási helyről kaphatók információk. A stabil nitrogén (^{15}N) és szénizotópok (^{13}C) segítségével a kokain és a heroin származási helye is beazonosítható, mely módszerekkel sikerült bizonyítani, hogy a kokain Bolíviából vagy Kolumbiából származik. Ugyancsak jól alkalmazható módszert dolgoztak ki az **ementáli sajt származási helyének meghatározására** a ^{13}C , a ^2H , a ^{15}N és a ^{87}Sr stabil izotópok alapján. E módszerrel nagy biztonsággal el tudták különíteni egymástól az allgauti, a bretagne-i, a szavolyai, a finn és a svájci ementáli sajtokat.

FELHASZNÁLT ÉS AJÁNLOTT IRODALOM

- ANDERSON, J. L.–BERTHOD, A.–ESTÉVEZ, V. P.–STALCUP, A. M. (eds.)
2015 *Analytical separation science*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- BALTES, W. (ed.)
1990 *Rapid methods for analysis of food and food raw material*. Hamburg, Behr's Verlag.
- BARCELÓ, D. (ed.)
2013 *Advanced techniques in gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS-MS and GC-TOF-MS) for environmental chemistry*. Comprehensive Analytical Chemistry 61. Elsevier B. V.
- CSAPÓ J.–ALBERT Cs.–CSAPÓNÉ KISS Zs.
2008 *Élelmiszeranalitika*. Válogatott fejezetek. Kolozsvár, Scientia Kiadó, 1–314.
- CSAPÓ J.–CSAPÓNÉ KISS Zs.–ALBERT Cs.–SALAMON Sz.
2007 *Élelmiszerfehérjék minősítése*. Kolozsvár, Scientia Kiadó, 1–506.
- CSAPÓ J.–CSAPÓNÉ KISS Zs. (szerk.)
2006 *Élelmiszer- és takarmányfehérjék minősítése*. (Társszerzők: Babinszky L.–Győri Z.–Simoné Sarkadi L.–Schmidt J.). Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- CSAPÓ J.–CSAPÓNÉ KISS Zs.
2007 *Biokémia – állattenyésztőknek*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- CSAPÓ J.–CSAPÓNÉ KISS Zs.
2004 *Élelmiszerkémia*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- CSAPÓ J.
2001 *Élelmiszer- és takarmányanalitikai gyakorlatok*. Kaposvár, Kaposvári Egyetem, Állattudományi Kar.
- ERDEY L.
1966 *Bevezetés a kémiai analízisbe. Mennyiségi kémiai analízis*. Budapest, Tankönyvkiadó.
- ERDEY L.
1966 *Bevezetés a kémiai analízisbe. Minőségi kémiai analízis*. Budapest, Tankönyvkiadó.
- FANALI, S.–HADDAD, P. R.–POOLE, C. F.–SCHOENMAKERS, P.–LLOYD, D. (eds.)
2013 *Liquid chromatography. Fundamentals and instrumentation*. Elsevier. B. V.
- FRANCA, A. S.–NOLLET, L. M. L. (eds.)
2018 *Spectroscopic methods in food analysis*. Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group. Boca Raton.
- GASZTONYI K.–LÁSZTITY R. (szerk.)
1992 *Élelmiszer-kémia 1*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.

346 ■ Felhasznált és ajánlott irodalom

- GASZTONYI K.–LÁSZTITY R. (szerk.)
1992 *Élelmiszer-kémia 2*. Budapest, Mezőgazda Kiadó.
- HEGEDŰS M.–KRALOVÁNSZKY U. P.–MÁTRAI T.
1981 *A takarmányfehérjék minősítése*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.
- KERESE I. (szerk.)
1975 *Fehérjevizsgálati módszerek*. Budapest, Műszaki Könyvkiadó.
- KOVÁCS B.–CSAPÓ J.
2015 *Az élelmiszermeghatározás analitikai módszerei*. Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar. Készült a TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014. projekt keretében.
- KOVÁCS B.–CSAPÓ J.
2015 *Modern methods of food analysis*. University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Science and Environmental Management. Készült a TÁMOP-4.1.1.C-12/1/KONV-2012-0014. projekt keretében.
- LÁSZTITY R.–TÖRLEY D. (szerk.)
1987 *Élelmiszeranalitika I*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.
- LÁSZTITY R.–TÖRLEY D. (szerk.)
1987 *Élelmiszeranalitika II*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.
- LÁSZTITY R.–TÖRLEY D.
1987 *Alkalmazott élelmiszer-analitika*. Budapest, Mezőgazdasági Kiadó.
- MAGYAR ÉLELMÉZÉSIPARI TUDOMÁNYOS EGYESÜLET VITAMIN MUNKA-BIZOTTSÁGA.
1977 *Vitamin-meghatározási eljárások természetes anyagokban*. Budapest.
- MATTER, L. (ed.)
2002 *Food and environmental analysis by capillary gas chromatography*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- MONTET, D.–RAY, R. C. (eds.)
2018 *Food traceability and authenticity. Analytical techniques*. Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group.
- NOLLET, L. M. L.–TOLDRÁ, F. (eds.)
2013 *Food analysis by HPLC*. Third edition. Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group.
- PICÓ, Y. (ed.)
2012 *Chemical analysis of food: Techniques and applications*. First edition. Elsevier. B. V.
- STEWART, K. K.–WHITAKER, J. R. (eds.)
1984 *Modern methods of food analysis*. Westport, AVI Publishing Inc.
- WEAVER, C.
1996 *Food chemistry laboratory*. New York, CRC Press.
- WOLFE, D. H.
1984 *Introduction to college chemistry*. USA, McGraw-Hill Book Co.

Abstract

This *Analytical Chemistry for Food Engineers* book was written for the students of the Faculty of Miercurea Ciuc of Sapientia Hungarian University of Transylvania (Cluj-Napoca). We hope that this book will be used also by the students of the prospective branch for foodstuff and environmental engineering, and even maybe this will provide help also for the students of the new branches during their studies. In writing of this book, we had to have regard to the traditions of the faculty, that is, the analytical methods contained in this book are associated with the materials taught in the framework of other subjects. Thus, our intention was to write a book that students could use during the practical teaching of several subjects.

The book starts with a brief qualitative chemical analysis followed by classical quantitative chemical analysis, discussed in more length. In these chapters, students can gain knowledge on the course of the qualitative and quantitative analysis, acid-alkalimetry, the oxidation reduction as well as the precipitation titration methods, and, finally, on determinations based on the formation of complex compounds. The authors then describe the theoretical foundations of ultraviolet-visible absorption spectrophotometry and the separation methods, the theoretical basis of chromatography, electrophoresis and isoelectric focusing, which are extremely important in the analysis of foodstuffs.

Following these chapters, the methods developed for the determination of the main foodstuff components are dealt with. At the beginning of this part, after determination of the moisture contents, determination of mineral components and different spectroscopic methods are discussed. Afterwards, determination of the nitrogen-containing substances, more closely, determination of the protein contents, protein fractions, and amino acid composition of proteins are treated. We place emphasis on the most expensive foodstuff component, the proteins, and we try to discuss every method that is suitable for protein quality evaluation. Subsequent to the determination of fat contents and fatty acid composition, examination of crude fibre and fibre fractions is treated. Among the nitrogen-free extractable substances, we determine the sugars and starch and examine the properties of various sugar-containing preparations as well. We devote special attention to the determination of provitamins and vitamins as well as to mycotoxins. As a closing compilation, at the end of most chapters, there are sections of *Selected Chapters*, in which specific foodstuff analytical methods are discussed.

During the course of writing the book, we tried to compile the chapters in such a way that the students have the possibility also to carry out the discussed examinations based on the instruments of the Department of Foodstuff Science.

We tried to build the individual chapters upon each other so that the students can get advance from the simpler examinations to the more complicated ones, obtaining knowledge on the most important steps of the foodstuff analysis.

Finally, we wish to gratefully thank our reviewer, Professor **Béla Kovács**, PhD, and chemical technician **Judit Stanics** for the conscientious typing and constructing of the chemical formulae. Any errors that still may be found in this book are exclusively due to the authors. Readers of this book are kindly requested to draw attention to these errors.

Rezumat

Cartea „Chimia analitică pentru ingineri de produse alimentare” a fost concepută pentru studenții Facultății de Științe Economice, Socio-Umane și Inginerești din Campusul din Miercurea Ciuc al Universității Sapienția din Cluj-Napoca. Sperăm că această carte va fi utilă viitorilor studenți ai specializărilor Ingineria produselor alimentare, Ingineria genetică, Inginerie și management în alimentație publică și agroturism, Biotehnologii sustenabile, cât și pentru noile specializări ce vor funcționa în viitor. În redactarea acestei cărți am luat în considerare tradițiile acestei facultăți, curricula specializărilor menționate, urmărind ca metodele analitice tratate să fie asociate cu subiectele predate la disciplinele cu caracter teoretic și tehnologic. La structurarea materialului am avut în vedere furnizarea informațiilor practice folositoare studenților în activitatea lor curentă și în cea de cercetare studentescă, dar și intenția de a ajuta absolvenții în viitoarea profesie de inginer în domeniul alimentar.

După o scurtă prezentare a chimiei analitice calitative, materialul redactat conține aspectele teoretice și practice ale chimie analitice cantitative clasice. În aceste capitole studenții pot căpăta cunoștințe despre analize calitative și cantitative, bazate pe reacții de neutralizare, oxida-reducere, cât și despre titrare cu formare de precipitat, în final fiind prezentate determinări pe baza formării complexilor. În continuare sunt prezentate metodele spectrofotometriei de absorbție în UV-VIS și cele bazate pe separare. Dintre acestea din urmă autorii prezintă bazele teoretice și tehnicile cromatografiei, electroforezei și focusarea izoelectrică considerate ca fiind cele mai importante în analiza alimentelor.

După acestea urmează prezentarea metodelor elaborate pentru determinarea principalelor componente din alimente. În prima parte, după determinarea conținutului de umiditate, studenții se pot familiariza cu metodele de analiză a componentelor minerali și cu diferitele metode spectrofotometrice. În continuare sunt prezentate metodele de determinare a componentelor cu conținut de azot, mai precis analiza proteinelor, a fracțiilor de proteine și a compoziția de aminoacizi a proteinelor. Ne ocupăm mai amănunțit cu componentele cele mai valoroase ale alimentelor respectiv cu proteinele și încercăm să descriem toate metodele posibile pentru evaluarea calității acestora. După metodele de determinare a conținutului de grăsimi și de acizi grași a acestora, sunt discutate modalitățile de investigare a conținutului de fibre crude și ale fracțiunilor acestora. Dintre substanțele extractibile fără conținut de azot sunt prezentate determinările zaharurilor și ale amidonului și sunt descrise metodele de investigate ale proprietăților câtorva preparate zaharoase. Determinarea provitaminelor, vitaminelor și a micotoxinelor ocupă un loc special în această carte. La finalul celor mai multe

capitole se găsesc așa numite capitole selectate, în care sunt prezentate metodele analitice specifice alimentelor.

În redactarea cărții ne-am străduit să structurăm astfel materialul informatic încât pe lângă cunoașterea metodelor analitice studenții să aibă posibilitatea, ca folosind aparatura din laboratoarele departamentului de Știința alimentară, să parcurgă și analizele concrete. Capitolele cărții sunt structurate astfel încât ele să ofere studentului un parcurs lin, de la simplu la complex, al învățării principalelor metode de analiză a alimentelor.

În cele din urmă, am dori să ne exprimăm mulțumirile noastre lectorului cărții, profesorului Béla KOVÁCS, și tehnoredactorului, tehnician Judit STANICS, pentru munca sa minuțioasă și editarea formulelor din carte. Erorile rămase sunt doar „meritele” autorilor. Rugăm studenții să binevoiască a ne atrage atenția asupra acestor greșeli.

A KÖTET SZERZŐI

Dr. Albert Csilla gyógyszerész, 2001-ben végzett a Marosvásárhelyi Orvosi és Gyógyszerészeti Egyetemen. Kétéves gyógyszerészi munka után, 2003 végén kezdett el dolgozni a Sapientia Erdélyi Magyar Tudományegyetem Csíkszeredai Campusán gyakornokként. A Kaposvári Egyetem Doktori Iskolájában szerzett PhD-fokozatot. Jelenleg adjunktus, más egyéb oktatómunkája mellett műszeres analitikából előadást és gyakorlatokat tart környezet- és élelmiszer-mérnök hallgatóknak. Kutatómunkáját a fehérje- és aminosav-analitika területén fejti ki; az utóbbi időben pedig a D- és L-aminosavak szétválasztásával és meghatározásával foglalkozik.

Dr. Csapó János az MTA doktora, egyetemi tanár, okleveles vegyész, több mint 45 éve foglalkozik élelmiszerek fehérjetartalmának, aminosav-összetételének, újabban D-aminosav-összetételének meghatározásával, a fehérje biológiai értékének mérésével. A vezetésével kidolgozott új analitikai-kémiai módszereket több élelmiszer- és takarmányanalitikai laboratóriumban alkalmazzák. Tudományos munkáját is nagyrészt ezen a területen fejtette ki. Több mint 50 tankönyv és egyetemi jegyzet, mintegy 400 magyar és idegen nyelvű szakcikk szerzője, és közel 500 előadást tartott hazai és nemzetközi tudományos konferenciákon. A graduális és posztgraduális, valamint a doktori képzésben magyarul és angolul oktatja a biokémia, az élelmiszer-kémia, a mezőgazdasági kémia, a tej és tejtermékek a táplálkozásban, az élelmiszer- és takarmányfehérjék minősítése, a funkcionális élelmiszerek és az élelmiszer-hamisítás, PhD-hallgatóknak pedig az állatiternék-előállítás biokémiája, az élelmiszerkémia, a modern módszerek az élelmiszeranalitikában és az élelmiszer- és takarmányanalitika tárgyakat.

Kiss Dóra PhD-hallgató, 2015-ben végzett a Debreceni Egyetem Természettudományi Karán mint vegyészmérnök. Ezt követően, 2017-ben a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karán diplomát szerzett mint élelmiszer-biztonsági és -minőségi mérnök. 2018-tól a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola PhD-hallgatója. Jelenleg a Takarmányok fehérjetartalmának és aminosav-összetételének meghatározása fotometriás módszerekkel témában kutat.

Az elemek rendszáma, vegyjele és atomtömege

Elem	Vegyjel	Rendszám	Atomtömeg
Aktínium	Ac	89	(277)
Alumínium	Al	13	26,9815
Amerícium	Am	95	(243)
Antimon	Sb	51	121,45
Arany	Au	79	196,9665
Argon	Ar	18	39,948
Arzén	As	33	74,9216
Asztácium	At	85	(210)
Bárium	Ba	56	137,34
Berillium	Be	4	9,01218
Berkélium	Bk	97	(249)
Bizmut	Bi	83	208,9806
Bór	B	5	10,81
Bróm	Br	35	79,904
Cérium	Ce	58	140,12
Cézium	Cs	55	132,9055
Cink	Zn	30	65,37
Cirkónium	Zr	40	91,22
Diszpróziium	Dy	66	162,50
Einsteinium	Es	99	(254)
Erbium	Er	68	167,26
Európium	Eu	63	151,96
Ezüst	Ag	47	107,868
Fermium	Fm	100	(253)
Fluor	F	9	18,9984
Foszfor	P	15	30,9738
Francium	Fr	87	(223)
Gadolínium	Gd	64	157,25
Gallium	Ga	31	69,72
Germánium	Ge	32	72,59
Hafnium	Hf	72	178,49
Hélium	He	2	4,00260
Hidrogén	H	1	1,0080

354 ■ Az elemek rendszáma, vegyjele és atomtömege

Elem	Vegyjel	Rendszám	Atomtömeg
Higany	Hg	80	200,59
Holmium	Ho	67	164,9303
Indium	In	49	114,82
Írídium	Ir	77	192,22
Itterbium	Yb	70	173,04
Ittrium	Y	39	88,9059
Jód	I	53	126,9045
Kadmium	Cd	48	112,40
Kalcium	Ca	20	40,08
Kalifornium	Cf	98	(251)
Kálium	K	19	39,102
Kén	S	16	32,06
Klór	Cl	17	35,453
Kobalt	Co	27	58,9332
Kripton	Kr	36	83,80
Króm	Cr	24	51,996
Kúrium	Cm	96	(247)
Lantán	La	57	138,9055
Laurencium	Lr	103	(257)
Lítium	Li	3	6,941
Lutécium	Lu	71	174,97
Magnézium	Mg	12	24,305
Mangán	Mn	25	54,9380
Mendeléviium	Md	101	(256)
Molibdén	Mo	42	95,94
Nátrium	Na	11	22,9898
Neodímium	Nd	60	144,24
Neon	Ne	10	20,179
Neptúnium	Np	93	(237,0482)
Nikkel	Ni	28	58,71
Nióbium	Nb	41	92,9064
Nitrogén	N	7	14,0067
Nobélium	No	102	(254)
Ólom	Pb	82	207,2
Ón	Sn	50	118,69
Oxigén	O	8	15,9994
Ozmium	Os	76	190,2

Elem	Vegyjel	Rendszám	Atomtömeg
Palládium	Pd	46	106,4
Platina	Pt	78	195,09
Plutónium	Pu	94	(242)
Polónium	Po	84	(210)
Prazeodímium	Pr	59	140,9077
Prométium	Pm	61	(145)
Protaktínium	Pa	91	231,0359
Rádium	Ra	88	(226,0254)
Radon	Rn	86	(222)
Rénium	Re	75	186,2
Réz	Cu	29	63,546
Ródium	Rh	45	102,9055
Rubídium	Rb	37	85,4678
Ruténium	Ru	44	101,07
Stroncium	Sr	38	87,62
Szamárium	Sm	62	150,4
Szelén	Se	34	78,96
Szén	C	6	12,011
Szilícium	Si	14	28,086
Szkandium	Sc	21	44,9559
Tallium	Tl	81	204,37
Tantál	Ta	73	180,9479
Technécium	Tc	43	(98,9062)
Tellúr	Te	52	127,60
Terbium	Tb	65	158,9254
Titán	Ti	22	47,90
Tórium	Th	90	232,0381
Túlium	Tm	69	168,9342
Urán	U	92	238,029
Vanádium	V	23	50,9414
Vas	Fe	26	55,847
Volfrám	W	74	183,85
Xenon	Xe	54	131,30

SAPIENTIA TANKÖNYVEK SOROZAT KÖTETEI

Megjelent:

Varga Attila

Alkotmányjogi és államszervezési alapismeretek. 2003.

Roth Endre

Szociológia és társadalom. 2004.

Albert-Lőrincz Enikő

A csoportokkal való munka módszertani kérdései. 2004.

Albert-Lőrincz Enikő

Önpusztító lázadás. A drogfogyasztás mint kóros viselkedésminta. 2004.

Bakacsi Gyula

Szervezeti magatartás és vezetés. 2004.

Antal-Mokos Zoltán–Balaton Károly–Drótos György–Tari Ernő

Stratégia és szervezés. 2005.

Bakacsi Gyula–Bokor Attila–Császár Csaba–Gelei András–

Kováts Klaudia–Takács Sándor

Stratégiai emberi erőforrás menedzsment. 2005.

Dobák Miklós és munkatársai

Szervezeti formák és vezetés. 2005.

Márton László Ferenc

Jelek és rendszerek. 2006.

Puskás Attila

Idült vénás betegségek. Patológia, diagnózis, terápia. 2007.

Dósa Zoltán

Tanulás, emlékezés, képzelet. 2007.

Ambrus Zoltán

Szociálpszichológia. Alapismeretek, feladatok, gyakorlatok. 2008.

Hollanda Dénes

A forgácsolás alapjai. 2008.

Márton Lőrinc

Irányítástechnika. 2009.

Nótári Tamás

Római köz- és magánjog. 2011.

Csapó János (szerk.)–Fenyvessy József–Csanádi József–Csapóné Kiss Zsuzsanna

Tejipari technológia. Tej és tejtermékek a táplálkozásban. 2014.

Csapó János–Albert Csilla–Csapóné Kiss Zsuzsanna

Élelmiszer-hamisítás és kimutatása. 2016.

Csapó János–Albert Csilla–Csapóné Kiss Zsuzsanna

Funkcionális élelmiszerek. 2017.

Csapó János–Csapóné Kiss Zsuzsanna
Általános kémia agrármérnököknek. 2018.

Csapó János–Csapóné Kiss Zsuzsanna
Biokémia agrármérnököknek. 2018.

Scientia Kiadó

400112 Kolozsvár (Cluj-Napoca)
Mátyás király (Matei Corvin) u. 4. sz.
Tel./fax: +40-364-401454
E-mail: scientia@kpi.sapientia.ro
www.scientiakiado.ro

Korrektúra:

Szenkovics Enikő

Borító:

Tipotéka Kft.

Műszaki szerkesztés:

Metaforma Kft.

Tipográfia:

Könczey Elemér

Nyomdai munkálatok:

F&F INTERNATIONAL Kft.
Felelős vezető: Ambrus Enikő igazgató

sapientia
tankönyvek

ISBN 978-606-975-034-6



9 786069 750346