



ODJEL ZA KEMIJU

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju



PRIRUČNIK ZA VIŠI PRAKTIKUM ANALITIČKE KEMIJE

Priredile:

Mateja Budetić

Mirela Samardžić

2026.

Izdavač:
SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
ODJEL ZA KEMIJU

Za izdavača:
izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić

Autorice:
doc. dr. sc. Mateja Budetić
prof. dr. sc. Mirela Samardžić

Recenzentice:
prof. dr. sc. Dajana Gašo-Sokač
prof. dr. sc. Mirna Habuda-Stanić

Lektor:
izv. prof. dr. sc. Borko Baraban

veljača, 2026. godine

ISBN 978-953-8154-36-2

CIP zapis je dostupan u nacionalnom skupnom katalogu knjižničkog sustava Bukinet pod
brojem 991005954870309366.



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Suglasnost za izdavanje ovog sveučilišnog priručnika
donio je Senat Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
na 5. sjednici održanoj 24. 2. 2026. godine pod brojem 3/26.

„... *analitička kemija, ili umjetnost razlikovanja različitih tvari i određivanja njihovih dijelova, zauzima istaknuto mjesto u znanosti jer omogućava davanje odgovora na pitanja koja se postavljaju uvijek kada se kemijski postupci primjenjuju u znanstvene ili tehničke svrhe.*

Izuzetna važnost analitičke kemije uzrok je činjenice da se ona neprestano njeguje od samih početaka kemije, a zapisi, koji uglavnom obuhvaćaju rezultate analitičkog rada, protežu se cijelom znanosti...”

Wilhelm Ostwald

Sadržaj

1. Rad u laboratoriju.....	1
2. Uvod u kemiju i osnovni pojmovi analitičke kemije.....	4
3. ANALIZA VODE	14
3.1. Određivanje temperature, mirisa i boje vode	16
3.1.1. Određivanje temperature vode	16
3.1.2. Određivanje mirisa vode.....	16
3.1.3. Vizualno određivanje boje vode	17
3.2. Određivanje pH-vrijednosti vode.....	18
3.3. Kolorimetrijsko određivanje ukupnog i slobodnog rezidualnog klora u vodi	20
3.4. Određivanje klorida Mohrovom metodom u vodi.....	25
3.5. Određivanje tvrdoće vode.....	26
3.5.1. Određivanje ukupne tvrdoće vode	29
3.5.2. Određivanje kalcijevih i magnezijevih iona u vodi.....	30
3.5.3. Određivanje karbonatne i nekarbonatne tvrdoće vode	31
3.6. Određivanje ukupnog alkaliteta u vodi	31
3.7. Određivanje aciditeta u vodi	34
3.8. Kvalitativno određivanje nitrata u vodi	35
3.9. Određivanje željezovih iona u vodi	36
3.9.1. Kvalitativno određivanje željezovih iona u vodi	36
3.9.2. Kvantitativno određivanje željezovih iona u vodi	37
4. ANALIZA TLA	40
4.1. Određivanje pH-vrijednosti tla	41
4.1.1. Određivanje aktualne kiselosti tla.....	43
4.1.2. Određivanje supstitucijske kiselosti tla	44
4.2. Kvantitativno određivanje sadržaja karbonata u tla	44
4.3. Određivanje puferskog kapaciteta tla	45
5. ANALIZA UMJETNIH GNOJIVA.....	49
5.1. Kvantitativno određivanje amonijeva i nitratnog oblika dušika u mineralnim gnojivima.....	50
5.2. Kinolinska metoda.....	52
6. ODREĐIVANJE ASKORBINSKE KISELINE	55
6.1. Određivanje askorbinske kiseline u farmaceutskom pripravku vitamina C	56
6.2. Određivanje askorbinske kiseline u kuhanom i svježem voću i povrću	57
7. POTENCIOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA HNO_3 I H_3PO_4 U SMJESI.....	60
8. POTENCIOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANIONSKIH TENZIDA U UZORKU	67
9. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ALKALOIDA U NAPITCIMA	75
9.1. Priprema standarda za određivanje kofeina i kinin hidroklorida	78
9.2. Spektrofotometrijsko određivanje kofeina.....	79
9.3. Spektrofotometrijsko određivanje kinina	81

10. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FOSFORA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA	84
11. ODREĐIVANJE SADRŽAJA 5-HIDROKSIMETILFURFURALA I SLOBODNE KISELOSTI U MEDU	89
11.1. Spektrofotometrijsko određivanje 5-hidroksimetilfurfurala.....	91
11.2. Određivanje slobodne kiselosti.....	92
12. VOLUMETRIJSKO ODREĐIVANJE PRIRODNOG I UKUPNOG INVERTA LUFF-SCHOORL METODOM	95

Predgovor

Ovaj je priručnik namijenjen studentima viših godina kemijskih i srodnih studija kao praktičan vodič za izvođenje vježbi iz analitičke kemije. Njegova svrha nije samo pružiti upute za izvođenje pojedinih vježbi već i potaknuti razvoj znanja, vještina i odgovornog pristupa radu u laboratoriju.

Analitička kemija zauzima ključno mjesto u razumijevanju kemijskih procesa i kontroli kvalitete tvari koje nas okružuju, uključujući vodu, tlo, prehrambene proizvode i farmaceutske pripravke. Laboratorijske vježbe koje su obuhvaćene ovim priručnikom osmišljene su kao poveznica između teorijskog znanja i njihove praktične primjene. Kroz rad na konkretnim primjerima studenti će usvojiti temeljne i napredne metode kvantitativne i kvalitativne analize, upoznati instrumente i razviti osjećaj za precizan i odgovoran znanstveni rad.

Priručnik je izrađen s namjerom da studentima bude vodič i potpora u praktičnom radu, ali i motivacija za dublje razumijevanje analitičke kemije. Vježbe nisu zamišljene kao puklo rješavanje zadataka, već kao prilika za razvijanje kritičkog razmišljanja, preciznosti, strpljenja i samostalnosti u laboratoriju.

doc. dr. sc. Mateja Budetić
prof. dr. sc. Mirela Samardžić



1. Rad u laboratoriju

Rad u kemijskom laboratoriju uvijek mora biti vođen znanjem, odgovornošću i pozornošću. Laboratorij nije samo mjesto za izvođenje laboratorijskih vježbi već i prostor u kojem se razvijaju profesionalna disciplina, preciznost i razumijevanje sigurnosnih postupaka. Svaka neopreznost, nepoznavanje pravila ili podcjenjivanje rizika može dovesti do ozbiljnih posljedica, stoga su sigurnost i dobra priprema neodvojivi dio svake laboratorijske vježbe.

U laboratorij nije dopušten ulazak bez propisane zaštitne opreme: laboratorijske kute, zaštitnih naočala i rukavica. Odjeća mora biti prilagođena uvjetima rada što podrazumijeva zatvorenu obuću i izbjegavanje lepršavih komada odjeće te nakita koji bi mogli doći u kontakt s kemikalijama ili otvorenim plamenom. Duga kosa mora biti uredno skupljena. U laboratoriju je strogo zabranjeno jesti, piti ili se koristiti laboratorijskim posuđem za hranu i piće, kao i koristiti se mobitelom tijekom izvođenja vježbi.

Prije početka svake vježbe studenti moraju pažljivo pročitati sve upute i razumjeti kemijske procese koji će se odvijati. Planiranje rada ključno je kako bi se svi zadatci izveli bez žurbe i nepotrebnih pogrešaka.

Kemikalije koje će se upotrebljavati tijekom izvođenja laboratorijskih vježbi bit će dostupne na zajedničkom ormaru, dok će studenti samostalno prirediti odgovarajuću koncentraciju prema danim uputama za pojedinu vježbu. Indikatore potrebne za izvođenje pojedine vježbe unaprijed će pripremiti laborant i bit će dostupni na zajedničkom ormaru.

Sav pribor potreban za izvođenje postupaka bit će naveden na popisu u uputama i dostupan studentima. Ipak, za jednostavnije aparature, poput one za destilaciju ili filtraciju ili potreban pribor za vaganje i vodenu kupelj, očekuje se da studenti posjeduju znanja stečena kroz prethodnu praktikumsku nastavu, stoga takav pribor neće biti posebno naveden u uputama.

Na početku svake vježbe student je obavezan pregledati svoj radni stol i provjeriti ispravnost opreme, a moguća oštećenja odmah prijaviti laborantu.

Pri zagrijavanju otvor epruvete uvijek mora biti okrenut od osobe, a zapaljive tvari potrebno je držati dalje od izvora plamena. Zagrijavanje se provodi na grijaćoj ploči ili otvorenom plamenu. Pri zagrijavanju na otvorenom plamenu potrebno je postaviti tronožac s mrežicom za zagrijavanje, a pribor koji se zagrijava, po potrebi, učvrstiti na stalak s pomoću mufe i kleme radi stabilnosti i sigurnosti.

Količina Erlenmeyerovih tikvica, laboratorijskih čaša, bireta, pipeta, kapalica te druge odgovarajuće laboratorijske opreme neće biti unaprijed navedena u uputama – studenti će

samostalno procijeniti je li potrebno uzeti veći broj komada ili će biti moguće između pojedinih analiza oprati i osušiti upotrijebljeno posuđe.

Studenti samostalno biraju količinu i veličine pipeta i menzura prema zahtjevima pojedine vježbe pridržavajući se općih laboratorijskih pravila zbog čega zapremnina pipeta i menzura neće biti navedena u uputama. Pipete se upotrebljavaju za precizno mjerenje manjih količina tekućina, najčešće do 25 mL, dok su menzure prikladnije za veće zapremnine kada nije potrebna visoka preciznost. Granica od 25 mL nije strogo pravilo, već praktična smjernica u akademskoj praksi koja odražava odnos između preciznosti i zapremnine između pipeta i menzura.

Prije početka mjerenja pH-vrijednosti potrebno je obavezno kalibrirati pH-metar pomoću standardnih puferских otopina unaprijed definiranih pH-vrijednosti. Detaljne upute o kalibraciji, pripremi uzoraka i pravilnom rukovanju uređajem nalaze se u priloženoj dokumentaciji proizvođača. Tijekom rada elektrodu je potrebno stabilno postaviti na stalak uz uporabu odgovarajuće mufe i kleme kako bi se osiguralo čvrsto, ali prilagodljivo fiksiranje u željenom položaju. Kalibracija se provodi tako da se pH-elektroda najprije ispere destiliranom vodom, nježno posuši ubrusom i postavi na stalak. Pripreme se puferске otopine pH 4, 7 i 9, uključi se pH-metar te u postavkama odabere opcija kalibracije. Elektroda se uranja redom u svaku puferску otopinu, počevši od pH 4, a prijelaz na sljedeću otopinu pufera provodi se tek nakon stabilizacije izmjerene pH-vrijednosti. Između pojedinih mjerenja elektrodu je potrebno isprati destiliranom vodom i posušiti. Nakon završetka kalibracije može se pristupiti mjerenju uzoraka.

Dodatne tehničke specifikacije pojedinih instrumenata neće biti posebno naglašene u uputama jer, bez obzira na moguću zamjenu modela, instrumentacija i metode rada uvijek ostaju iste.

Prije uključivanja izmjerenih vrijednosti u zadane izračune, studenti su se dužni koristiti vrijednostima izraženim u SI jedinicama (Međunarodni sustav mjernih jedinica, franc. *Système International d'Unités*). Ispravna konverzija jedinica ključna je za točnost izračuna i pravilnu interpretaciju rezultata. Nepravilno pretvorene jedinice mogu dovesti do značajnih pogrešaka i netočnih zaključaka.

Prije svake vježbe studenti moraju položiti kolokvij kojim se provjerava razumijevanje teorijskih pojmova i računske vještine potrebne za izvođenje vježbe. Time se osigurava spremnost studenata za rad u praktičnom, ali i u teorijskom smislu.

Tijekom rada u laboratoriju iznimno je važno poznavati osnovne sigurnosne postupke i pravila ponašanja u izvanrednim situacijama. Studenti moraju znati gdje se nalaze vatrogasni aparati, prva pomoć i druga sigurnosna oprema te kako postupiti u slučaju izlivanja opasnih tvari,

požara ili drugih nezgoda. Svako prolijevanje reagensa ili oštećenje opreme mora se odmah prijaviti laborantu. Posebna pozornost posvećuje se pravilnom zbrinjavanju kemikalija i otpada kako bi se spriječile nezgode i očuvala sigurnost okoliša pri čemu je tijekom rada s kemikalijama nužno paziti na štedljivo i pravilno rukovanje reagensima – upotrebljavati samo potrebne količine, a boce s kemikalijama odmah nakon uporabe zatvoriti i vratiti na predviđena mjesta. Pribor mora biti potpuno čist i suh prije uporabe, a otpadne otopine razvrstavaju se prema vrsti: organske otopine u posebne spremnike, a razrijeđene kiseline i baze ispiru se obilnom količinom vode.

Po završetku rada, radno mjesto mora biti u potpunosti očišćeno. Sva upotrijebljena oprema mora biti oprana, osušena i vraćena na predviđeno mjesto. Studenti predaju ispunjeni radni listić s rezultatima i zapažanjima koji je potvrda da je vježba uspješno završena.

Ova pravila i upute nisu puki popis obveza, nego temelj sigurnog i kvalitetnog rada u kemijskom laboratoriju. Samo student koji poštuje pravila, razumije načela sigurnosti i pristupa radu s ozbiljnošću, može izvući maksimalnu korist iz laboratorijskih vježbi i izgraditi čvrste temelje za budući stručni rad.

Rad u laboratoriju uči nas preciznosti, strpljenju i odgovornosti – osobinama koje čine razliku između površnog i istinski kvalitetnog kemičara.

***Napomena:** Nije potrebno donositi ispisani priručnik na praktikum.*

Sve potrebne upute za izvođenje vježbi bit će dostupne na radnom stolu tijekom svakog termina.

Međutim, ispisane radne tablice obvezno je imati na svakom terminu za vježbu koja se izvodi jer će ih nastavnik pregledavati i ovjeravati po završetku pojedine vježbe.

2. Uvod u kemiju i osnovni pojmovi analitičke kemije

Kemija je znanost koja proučava tvari, njihov sastav, strukturu, fizikalna svojstva i reaktivnost. Postoji mnogo načina proučavanja kemije, no tradicionalno se ona dijeli na pet područja: organska kemija, anorganska kemija, biokemija, fizikalna kemija i analitička kemija. Iako je ta podjela povijesna i donekle proizvoljna, tih pet grana i dalje pruža najučinkovitiji način za obuhvaćanje različitih aspekata kemije.

Analitička kemija predstavlja granu kemije koja se bavi metodama i alatima za dobivanje informacija o sastavu i strukturi materije, posebice u pogledu vrste, broja, energetskog stanja i geometrijskog rasporeda atoma i molekula općenito, ili unutar bilo koje zadane količine uzorka te time znatno utječe na razvitak raznih grana znanosti i tehnologije koje su na bilo koji način povezane s kemijom. U analitičkoj kemiji primjenjuju se posebne tehnike za obradu kemijskih signala koji uglavnom nastaju iz specifičnih interakcija tvari i energije radi dobivanja informacija i potpunijeg razumijevanje sastava i svojstava analiziranih tvari.

Definiranje analitičke kemije kao primjene kemijskog znanja zanemaruje jedinstvenu perspektivu koju analitički kemičari donose u proučavanje kemije. Zadaća analitičke kemije nije u obavljanju rutinske analize na rutinskom uzorku, što se prikladnije naziva kemijskom analizom, već u poboljšanju ustaljenih analitičkih metoda, u proširivanju postojećih analitičkih metoda na nove vrste uzoraka i u razvoju novih analitičkih metoda za mjerenje kemijskih pojava. Stoga se može zaključiti da analitička kemija ima veliku važnost u svakodnevnom životu kroz analitičko praćenje tehnoloških procesa te analitičku kontrolu sirovina, međuprodukata i gotovih proizvoda. Rezultati analize pružaju uvid koji omogućuje učinkovitu upotrebu sirovina, poboljšanje proizvodnih procesa i očuvanje okoliša.

Analitička kemija obuhvaća dva velika područja: kvalitativnu analizu i kvantitativnu analizu. Svako kvantitativnoj analizi koja daje brojčani uvid u količinu analita (kemijskih vrsta) koji ulaze u sastav uzorka prethodi kvalitativna analiza koja daje informacije o kemijskom identitetu proučavanog analita, tj. kemijskim vrstama koje ulaze u sastav uzorka.

Uzorkovanje i odabir metode dva su najvažnija koraka kemijske analize. Uzorak mora predstavljati cjelinu iz koje je uzet i sadržavati sve bitne značajke te cjeline, odnosno mora biti reprezentativan jer se smatra primarnom analitičkom informacijom i početkom svakog analitičkog postupka. Stoga je pravilno uzorkovanje jedna od najtežih zadataka u analitičkom procesu te je nužno definirati svrhu i cilj uzorkovanja i željenu kemijsku informaciju jer loše

uzorkovanje unosi najveću pogrešku u analitički proces. Cilj pripreme uzorka za analizu jest prevesti realan uzorak u uzorak pogodan za odabranu analizu. Pri odabiru analitičke metode potrebno je jasno definirati ciljeve analize kao i postaviti kriterije za točnost i preciznost koje želimo postići u rezultatima. Uzorak se priprema tako da se uklone svi mogući smetajući sastojci koji bi mogli negativno utjecati na točnost mjerenja. Istovremeno, važno je povećati koncentraciju analita te ga prilagoditi odgovarajućim postupcima razdvajanja i kvantifikacije. Kada je riječ o preciznosti, za tehnički čiste uzorke smatra se da je preciznost zadovoljavajuća ako koeficijent varijacije (CV, engl. *coefficient of variation*) ne prelazi 5 % [1] unutar cijelog koncentracijskog raspona, a tada se metoda smatra dovoljno stabilnom i pouzdanom za kvantitativne analize. Kod realnih uzoraka, koji su često složeniji i mogu sadržavati smetajuće tvari (komponente matrice koje uzrokuju sustavnu pogrešku u mjerenju jer utječu na signal analita ili na učinkovitost postupka pripreme uzorka), prihvatljiv prag CV-a može se povećati do 15 %, ovisno o analitu i specifičnostima metode. Metoda se smatra valjanom ako se preciznost zadrži unutar tih granica najmanje do donje granice kvantifikacije (DGK, engl. *limit of quantification*), odnosno u koncentracijskom području relevantnom za samu analizu.

Kemijske metode zasnivaju se uglavnom na kemijskim reakcijama i mjerenju volumena ili mase reaktanta ili produkta te izravnom izračunavanju količine analita, a instrumentalne metode podrazumijevaju djelovanje vanjske sile.

Rezultat svakog analitičkog postupka jest brojčana vrijednost koja, ovisno o izabranoj metodi, može biti izražena u jedinicama mase, volumena ili neke druge fizikalne veličine, a svaka analiza uključuje pogrešku koja se ne može izbjeći i koja je u najboljem slučaju svedena na minimum. Općenito, pogreška je razlika između izmjerene i stvarne vrijednosti, a s obzirom na uzrok.

Pojmovi:

- * **Analitička kemija** jest grana kemije koja se bavi istraživanjem kvalitativnog i kvantitativnog sastava tvari metodama kemijske analize.
- * **Analit** je dio uzorka (matrice) koji se može identificirati i odrediti analizom u prisutnosti drugih tvari.
- * **Kemijska jednadžba** jest način prikaza kemijske reakcije (npr. redoks i metateze) na kojoj se analize temelje.
- * **Reagensi** su tvari koje se upotrebljavaju u svrhu dokazivanja prisutnosti drugih tvari i sudjeluju u kemijskoj reakciji s promatranim analitom, dok **indikatori** imaju istu svrhu, no

ne sudjeluju u kemijskoj reakciji s promatranim analitom. Oba mogu biti u bilo kojem agregatnom stanju.

- * **Rezultat interakcije** prikazuje se kao posljedica točno određene analitičke reakcije reagensom (kemijske, fizikalne ili biološke) za pokretanje pogodnih promjena.
- * **Tijek analitičkog procesa:**
 1. studija podrijetla uzorka (uzorkovanje, reprezentativnost, priprema uzorka (maskiranje/odjeljivanje), skladištenje, stabilnost)
 2. plan analize / definiranje problema
 3. izbor metode rada (ovisi o prirodi uzorka te prirodi i koncentraciji analita)
 4. obrada i interpretacija dobivenih analitičkih informacija
- * **Kvalitativnom analizom** (*dokazivanje, detekcija*) određuje se **kemijski identitet** promatranog analita (bez obzira na stehiometrijski odnos analita i drugih komponenti unutar uzorka) na temelju kemijskih, bioloških i fizikalnih svojstava promatranog analita.
- * **Kvantitativnom analizom** određuje se **količina** ili **maseni udio** analita u ispitivanom uzorku radi dobivanja brojčane vrijednosti analita u odgovarajućim jedinicama.

S obzirom na količinu uzorka, kvantitativna se analiza dijeli na:

- *gramsku* u kojoj je količina uzorka od 0,1 do 10 g, volumen od 25 do 50 mL
 - *centigramsku* u kojoj je količina uzorka od 0,01 do 0,1 g, volumen otopine od 1 do 2 mL
 - *miligramsku* u kojoj je količina uzorka od 0,001 do 0,01 g, volumen otopine od 0,2 do 0,5 mL
 - *mikrogramsku* u kojoj je količina uzorka manja od 0,0001 g.
- * **Analitički signal** jest informacija o analitu i promatranom procesu (promjena boje otopine ili plamena, talozi, razlike u temperaturi, napon, struja, otpor, spektralne linije, apsorpcija, indeks loma itd.).

Prema **vrsti** analitičkog signala, analitičke se metode dijele na:

- *klasične*
 - odvajanje analita iz uzorka (filtracija, dijaliza, razdvajanje na osnovi veličina čestica, centrifugiranje, maskiranje, destilacija, sublimacija, prekrizacija, precipitacija, ionska izmjena, ekstrakcija, elektrodepozicija, ishlaplivanje)

- kvalitativna analiza pri kojoj nastaju produkti koji se identificiraju prema mirisu, topljivosti, vrelištu, talištu, optičkoj aktivnosti, indeksu loma itd.
- kvantitativna analiza kojoj pripadaju gravimetrija i titrimetrija
- *spektrometrijske* (emisijnska plazma spektrometrija, emisijnska plamena spektrometrija, atomska apsorpcijska spektrometrija, rendgenska emisijnska spektrometrija, γ -spektrometrija, ultraljubičasta/vidljiva spektrometrija (UV-Vis, engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*), infracrvena spektrometrija (IR, engl. *infrared spectroscopy*), Ramanova spektrometrija, spektrometrija nuklearne magnetske rezonancije (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*), masena spektrometrija (MS, engl. *mass spectrometry*), molekulska fluorescencijska spektrometrija)
- *separacijske* (tankoslojna kromatografija (TLC, engl. *thin-layer chromatography*), plinska kromatografija (GC, engl. *gas chromatography*), tekućinska kromatografija (LC, engl. *liquid chromatography*), elektroforeza)
- *elektrokemijske* (potenciometrija, voltometrija, kulometrija, konduktometrija, polarografija, elektrogravimetrija)
- *termičke* (termogravimetrijska analiza (TGA, engl. *thermogravimetric analysis*), diferencijska termička analiza (DTA, engl. *differential thermal analysis*), termomehanička analiza (TMA, engl. *thermomechanical analysis*), dinamička mehanička analiza (DMA, engl. *dynamic mechanical analysis*), diferencijska pretražna kalorimetrija (DSC, engl. *differential scanning calorimetry*)).
- * **Validacija** (regulativni zahtjev) **analitičke metode** jest postupak utvrđivanja prikladnosti metode za korištenje u određenu svrhu, a slijedi odmah nakon razvoja metode. Validirati je potrebno nove metode, modificirane metode (metode koje su podlegle bilo kakvoj promjeni), nestandardne metode te standardne metode koje se primjenjuju izvan svojeg opsega rada. Cilj je svake validacije osigurati da metoda ne zadovoljava kriterije samo naizgled ili formalno, već da je u potpunosti pouzdana i učinkovita u stvarnoj primjeni. Validacija se može provoditi među laboratorijima (tzv. vanjska validacija) ili unutar jednog laboratorija (tzv. unutarnja validacija).
- * **Najznačajniji su parametri ili značajke analitičke metode:**
 - *selektivnost/specifičnost* (engl. *selectivity/specificity*)

- odnosi se na sposobnost razlikovanja analita od drugih tvari pri čemu selektivne metode mogu identificirati više kemijskih komponenti, dok specifične metode omogućuju određivanje samo jednog analita u prisutnosti drugih komponenti
- pojam selektivnosti preporučuje IUPAC (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*), dok se pojam *specifičnosti* više primjenjuje u farmaceutskoj industriji

– *linearnost* (engl. *linearity*)

- opisuje sposobnost svake metode da unutar radnog područja daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku
- izravno govori o osjetljivosti metode što znači da će analitički signal biti prikazan kao linearna funkcija količine ili koncentracije analita u uzorku
- procjenjuje se matematički i grafički (umjerena krivulja ili kalibracijski pravac) prema sljedećoj jednadžbi:

$$y = a \cdot x + b \quad (1)$$

gdje y označava mjereni parametar; a označava nagib pravca, parametar koji izravno upućuje na osjetljivost metode, x označava koncentraciju, a b označava odsječak pravca na y osi koji može upućivati na sustavnu pogrešku

- ako je veza između analitičkog signala i koncentracije analita linearna, to se izražava koeficijentom determinacije (korelacije, R^2) pri čemu se smatra da su podatci prihvatljivo uklopljeni u regresijski pravac kada je $R^2 \geq 0,99$, dok se za vrlo niske koncentracije može prihvatiti kriterij $R^2 \geq 0,98$

– *granica detekcije* (GD, engl. *limit of detection*)

- najmanja količina analita u uzorku koju je metodom moguće detektirati, ali ne nužno i kvantitativno odrediti, a određuje se vizualno ili matematički prema sljedećoj jednadžbi:

$$GD = 3,3 s / a \quad (2)$$

gdje s (ili σ u nekoj literaturi) označava standardnu devijaciju dobivenu iz slijepe probe ili iz kalibracijske krivulje, a a označava nagib kalibracijske krivulje

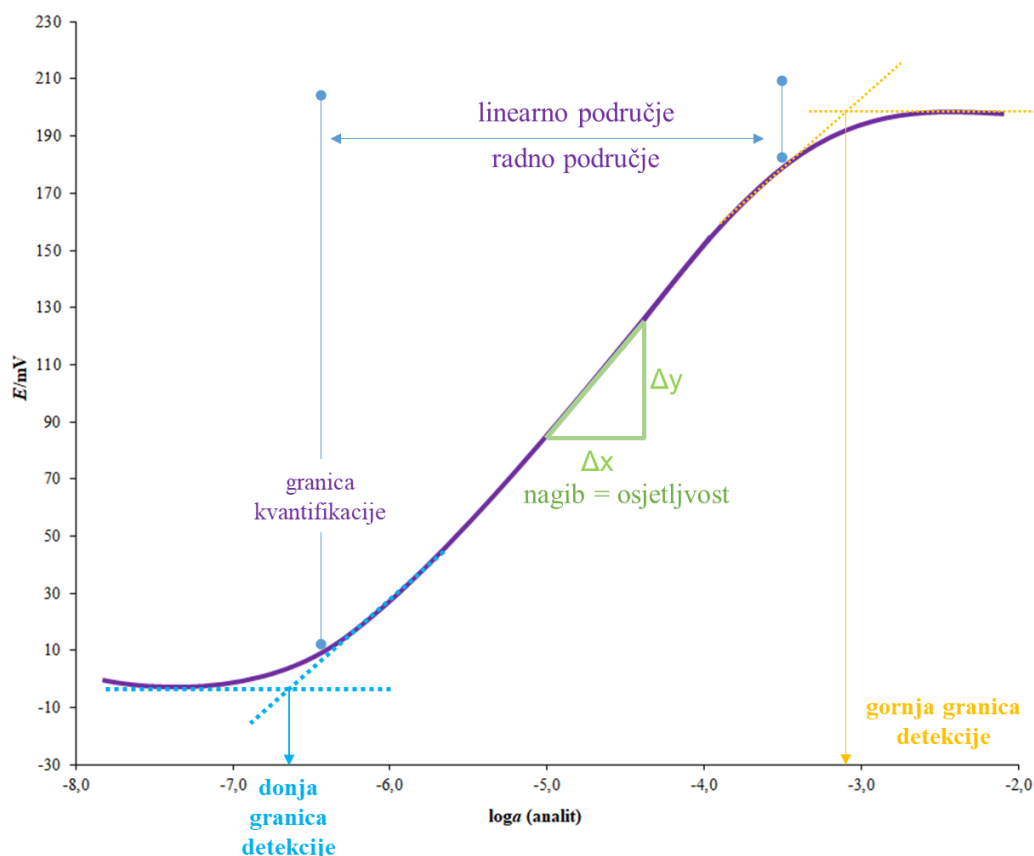
– *granica kvantifikacije* (GK, engl. *limit of quantification*)

- najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantitativno odrediti uz zadovoljavajuću preciznost i točnost, a određuje se vizualno, metodom omjera šuma

i signala (1 : 10) te na temelju standardne devijacije i nagiba pravca prema sljedećoj jednažbi:

$$GK = 10 s / a \quad (3)$$

- *radno područje* (engl. *working range*)
 - raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita (**Slika 1.**) u uzorku koje se mogu kvantificirati uz prihvatljivu točnost, preciznost i studiju linearnosti (linearna, kvadratna i logaritamska)
 - preporučeno je radno područje između 80 – 120 % koncentracije ispitivanog uzorka
 - za određivanje tog parametra nije potrebno provoditi zasebne eksperimente, nego se zaključci izvode iz studije linearnosti, a izražava se u jednakim mjernim jedinicama kao i rezultati ispitivanja

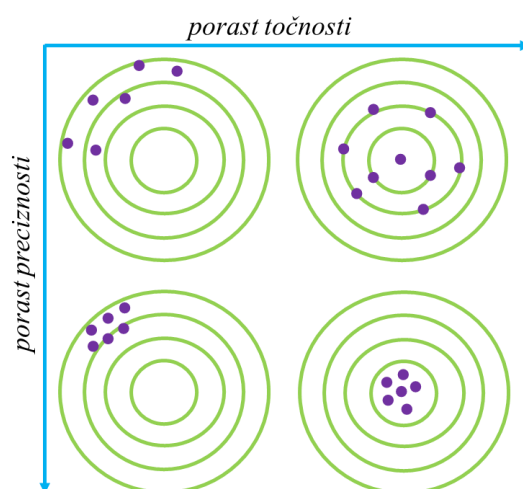


Slika 1. Krivulja odziva, dobivena instrumentalnom metodom, na kojoj su naznačeni parametri: gornja i donja granica detekcije, granica kvantifikacije, linearno i radno područje te osjetljivost

– *točnost* (engl. *accuracy*)

- stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti
- ako se mjerenje smatra točnim, eksperimentalni podatci ne smiju odstupati više od $\pm 5\%$ od poznate ili očekivane vrijednosti (**Slika 2.**)
- odstupanje (pogreška) se izračunava prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{pogreška (\%)} = \frac{\text{dobiveni rezultat} - \text{očekivani rezultat}}{\text{očekivani rezultat}} \cdot 100 \quad (4)$$



Slika 2. Slikoviti prikaz točnosti i preciznosti rezultata

- *sistematske pogreške* uvijek djeluju u istom smjeru i pomiču rezultate prema višim ili nižim vrijednostima od stvarne. Najčešće nastaju zbog pogrešno kalibriranih instrumenata, neispravnih standarda, nepravilne pripreme uzoraka ili konstantnih eksperimentalnih uvjeta koji uvode odstupanja. Sistematske pogreške moguće je otkriti i ispraviti, primjerice pravilnom kalibracijom instrumenata ili usporedbom s referentnim metodama.
- *slučajne pogreške* nastaju zbog nepredvidivih, često sitnih varijacija u mjerenju kao što su fluktuacije temperature, nestabilnost instrumenata ili čak ljudska nepreciznost. Te pogreške uzrokuju da se rezultati mjerenja nasumce raspršuju oko prosječne vrijednosti. Njih nije moguće potpuno ukloniti, ali se njihov utjecaj može smanjiti ponavljanjem mjerenja i statističkom analizom podataka.

– *preciznost* (engl. *precision*)

- slaganje između niza mjerenja provedenih na istim homogenim uzorcima prema propisanom analitičkom postupku pri čemu se eksperimenti za određivanje preciznosti provode u stvarnim ili pripremljenim homogenim uzorcima. Može varirati ovisno o uvjetima mjerenja, stoga se razlikuju sljedeće vrste preciznosti:
 - a) ponovljivost (engl. *repeatability*) – parametar kojim se izražava preciznost rezultata; analiza istog uzorka kojega pod istim uvjetima analizira isti analitičar koristeći se istom opremom u kratkom razdoblju
 - b) međupreciznost (engl. *intermediate precision*) – parametar koji opisuje rezultate ako su rađeni dulje vrijeme u istom laboratoriju, no uz očekivane promjene (različiti analitičari, instrumenti, reagensi iz različitih boca i različitih dobavljača)
 - c) obnovljivost (engl. *reproducibility*) – parametar koji opisuje rezultate ako su rađeni dulje vrijeme u različitim laboratorijima, a određuje se u svrhu normiranja metode i rijetko ga provodi sam laboratorij.
- najbolji su pokazatelji preciznosti **standardno odstupanje** (engl. *standard deviation*) (**Jednadžba (5)**), **varijanca** ili **srednje kvadratno odstupanje** (**Jednadžba (6)**) i relativno standardno odstupanje (RSO, engl. *relative standard deviation*) (**Jednadžba (7)**)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (6)$$

- u **Jednadžbama (5) i (6)** s označava standardno odstupanje, s^2 označava varijancu, n označava ograničeni broj mjerenja, \bar{x} označava srednju vrijednost, x_i označava izmjerenu vrijednost ($i = 1$ do n), a $n - 1$ označava stupanj slobode

$$RSO = s / \bar{x} \cdot 100 [\%] \quad (7)$$

Što je manja preciznost, veća je standardna devijacija.

– *istinitost* (engl. *trueness*)

- stupanj podudarnosti između srednje vrijednosti dobivene iz velikog niza rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Istinitost se obično izražava kao mjerno odstupanje. Brojčani pokazatelj istinitosti eksperimentalno je utvrđen kao

sustavna pogreška mjernog uređaja (engl. *bias*) koja se računa kao razlika aritmetičke sredine rezultata i referentne vrijednosti prema sljedećoj jednadžbi:

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad (8)$$

gdje b označava sustavnu pogrešku mjernog uređaja, \bar{x} označava srednju vrijednost, x_{ref} označava referentnu vrijednost ili sustavnu pogrešku mjernog uređaja, a za izražavanje u postocima primjenjuje se sljedeća jednadžba:

$$b (\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \cdot 100 \quad (9)$$

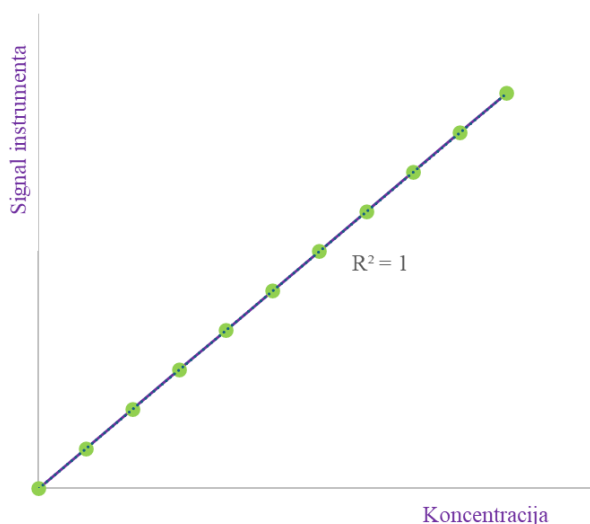
- istinitost se može procijeniti usporedbom rezultata ispitivane metode s rezultatima dobivenim referentnom metodom te analizom uzorka poznate koncentracije i na kraju nacjepljivanjem matice ili uzorka poznatom koncentracijom referentnog materijala
- *robustnost* (engl. *ruggedness/robustness*)
 - predstavlja podložnost analitičke metode na promjene uvjeta ispitivanja koji bi u praksi mogli biti podložni promjenama, a mogu utjecati na rezultat analize (npr. stabilnost reagensa, sastav uzorka, pH-vrijednost, temperatura, priprema uzorka, uvjeti okoliša, pohrana uzorka, tlak itd.).

Kombinacijom navedenih parametara ili značajki oblikuje se plan validacije za pojedinu metodu.

- * **Verifikacija** je proces koji se upotrebljava za metode koje su prethodno validirane, a kojim laboratorij potvrđuje da može primijeniti spomenutu metodu provedbom nekoliko eksperimenata koji pokazuju dobro funkcioniranje instrumenata u laboratoriju.
- * **Matrica uzorka** jest sredina u kojoj se nalazi analizirani spoj (analit). To može biti voda, tlo, hrana, krv ili bilo koji drugi kompleksan materijal. Matrica često može utjecati na točnost i preciznost analize jer može sadržavati tvari koje ometaju ili mijenjaju signal analita. Zbog toga je važno poznati i razumjeti sastav matrice te, po potrebi, primijeniti metode za uklanjanje ili maskiranje smetajućih tvari iz matrice tijekom pripreme uzorka.
- * **Standardi** su uzorci poznate koncentracije tvari koju želimo određivati, a služe kao referentne točke s pomoću kojih uspoređujemo rezultate mjerenja realnih uzoraka.

- * **Kalibracija** je proces kojim se uspostavlja veza između signala koji instrument očitava (npr. apsorbancija svjetlosti ili električni napon) i stvarne koncentracije analita u uzorku. U praksi najprije pripremimo nekoliko standardnih otopina poznatih koncentracija. Svaki od tih standarda analiziramo na instrumentu i zabilježimo mjereni signal. Zatim te podatke nacrtamo na grafu gdje je na horizontalnoj osi koncentracija standarda, a na vertikalnoj osi odgovarajući instrumentni signal.

Rezultat je tzv. **kalibracijska krivulja** ili pravac (**Slika 3.**) koji pokazuje kako se signal instrumenta mijenja s koncentracijom analita. U idealnim uvjetima ta je veza linearna što znači da se povećanjem koncentracije signal povećava proporcionalno. Točnost kalibracije ocjenjujemo s pomoću koeficijenta determinacije koji nam pokazuje koliko dobro podatci pristaju uz ravnu crtu – vrijednosti blizu 1 znače dobru linearnost.

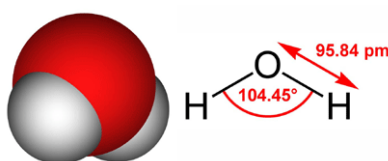


Slika 3. Prikaz primjera kalibracijske krivulje – ovisnost apsorbancije (signal instrumenta) o koncentraciji analita

- * **Slijepa proba** predstavlja analitički postupak koji obuhvaća sve korake analize, osim dodavanja samog uzorka. Njezin je cilj utvrditi i ispraviti moguće sustavne pogreške koje mogu nastati tijekom analitičkog procesa.

3. ANALIZA VODE

Voda je jedna od najvažnijih tvari na Zemlji i ima ključnu ulogu u održavanju života. Njezine jedinstvene fizikalne i kemijske osobine čine ju idealnim otapalom i ključnom komponentom mnogih biokemijskih reakcija. Voda je molekula sastavljena od dvaju atoma vodika i jednog atoma kisika kemijske formule H₂O. Atomi vodika i atom kisika u molekuli vode povezani su kovalentnom vezom pri čemu molekula vode ima savijeni oblik, s parcijalno negativnim nabojem na atomu kisika i parcijalno pozitivnim nabojem na atomima vodika (**Slika 4.**).



Slika 4. Prikaz molekule vode

Jedna od najvažnijih fizikalnih osobina vode jest visoka temperatura vrenja koja iznosi 100 °C pri atmosferskom tlaku od 101,3 kPa [2]. Visoka temperatura vrenja posljedica je jakih vodikovih veza među molekulama vode što zahtijeva značajnu količinu energije za razdvajanje molekula. Visoka temperatura vrenja omogućuje vodi postojanje kao tekućina u širokom rasponu temperatura što je idealno za mnoge kemijske reakcije.

Kemijske osobine vode, poput polarne strukture molekule i sposobnosti stvaranja vodikovih veza, čine ju izvrsnim otapalom jer može privlačiti i otapati druge polarne molekule, poput soli i šećera, što ju čini ključnom komponentom mnogih bioloških procesa, uključujući prijenos hranjivih tvari i otpadnih proizvoda unutar živih organizama.

Još jedna važna osobina vode jest visoki toplinski kapacitet. Ta osobina omogućuje vodi apsorpciju velike količine energije prije nego što se značajno poveća temperatura. Konkretno, to znači da je voda u stanju zadržati stabilnu temperaturu, čak i kada se izloži velikim količinama topline.

To ima mnogo praktičnih primjena u životu, primjerice regulacija tjelesne temperature kod ljudi. Kada tijelo proizvodi toplinu, kao što je to slučaj pri tjelesnom naporu ili u uvjetima visokih temperatura, krv cirkulira kroz kapilare u koži, a toplina se prenosi na vodu koja se znojenjem izlučuje iz tijela. Zbog visokog toplinskog kapaciteta vode, znojenje pomaže u rashlađivanju tijela [3].

Visoki toplinski kapacitet vode također ima značajne ekološke implikacije što ju čini idealnom za upotrebu u mnogim aplikacijama koje zahtijevaju stabilnost temperature. Na primjer, veliki vodeni sustavi poput oceana mogu akumulirati velike količine toplinske energije iz sunca tijekom dana, a zatim ju postupno otpuštati noću. To stvara stabilnije okruženje za morske organizme i regulira klimatske uvjete.

Voda koja se upotrebljava za piće i pripremu hrane treba imati kvalitete: mora biti čista, bistra, bez mirisa i boje te ne smije sadržavati patogene bakterije kao ni prevelike količine otopljenih soli i tragova metala. Takva voda naziva se *higijenski ispravnom vodom* za ljudsku potrošnju te je ujedno i jedan od osnovnih preduvjeta života i dobrog zdravlja.

Za ocjenu kvalitete vode provode se različite fizikalne, kemijske i biološke metode analize/ispitivanja vode [4].

Fizikalnim ispitivanjima određuju se svojstva vode koja se mogu kvantificirati instrumentima, primjerice temperatura, boja i prozirnost. S druge strane, **organoleptička svojstva**, koja se opažaju ljudskim osjetilima, uključuju miris i okus. Organoleptička svojstva ne određuju se instrumentalnim tehnikama ni egzaktnim mjerenjem.

Kemijskim ispitivanjima određuju se parametri propisani *Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitorinzima i planovima praćenja vode namijenjene za ljudsku potrošnju (NN 64/23)* među kojima su i koncentracija vodikovih iona (pH-vrijednost), vodljivost, kemijska potrošnja kisika, ukupni suhi ostatak, ukupna tvrdoća, suspendirane tvari, otopljeni kisik, slobodni ugljikov dioksid, sumporovodik, azbest te slobodni i ukupni rezidualni klor.

Ispravno uzorkovanje preduvjet je za pouzdanu analizu.

Uzorak mora biti *reprezentativan*.

Uzimanje uzoraka vode provodi se na sljedeće načine:

1. *iz hidranta ili slavine voda uzima se stavljanjem boce pod mlaz hladne vode pri čemu mlaz treba prethodno istjecati najmanje 3 – 5 minuta (po potrebi i dulje kako bi se izbjeglo uzorkovanje vode koja je stajala u instalacijama)*
2. *otvoriti bocu (paziti da ne dođe do slučajnog onečišćenja i ne dirati rukama grlo boce, unutarnji dio poklopca ili otvor slavine); bocu postaviti neposredno ispod izljevnog mjesta i puniti izravno bez dodirivanja slavine; prije potpunog punjenja boce, bocu isprati 2 – 3 puta vodom koja istječe*
3. *napuniti bocu do vrha te dobro zatvoriti (količina uzorka ovisit će o planiranom ispitivanju)*

4. na svaku bocu napisati datum, vrijeme uzorkovanja i osobu koja je uzrokovala, uz potrebne napomene.

3.1. Određivanje temperature, mirisa i boje vode

Svaki će student dobiti uzorak vode (vodovodnu ili otpadnu) koji će analizirati tijekom vježbe.

Otpadnu je vodu potrebno prvo profiltrirati.

3.1.1. Određivanje temperature vode

Temperatura je vode usko povezana s temperaturom okoliša te ovisi o temperaturi tla koje ju okružuje, godišnjem dobu te dotoku hladnih i vrućih podzemnih voda. Temperatura se isključivo mjeri na mjestu uzorkovanja i izražava u °C. Promjene u boji, mirisu i okusu mogu biti povezane s porastom temperature vode (viša temperatura pojačava rast mikroorganizama), dok niža temperatura usporava procese kao što su flokulacija i koagulacija. Zbog toga su poželjne manja temperaturna odstupanja, a u idealnim je slučajevima temperatura konstantna ili s malim varijacijama (8 – 14 °C).

Pribor i kemikalije: laboratorijska čaša (50 mL), uzorak vode i termometar.

Postupak: U čašu uliti 25 mL uzorka vode, uroniti termometar te nakon pola minute očitati temperaturu vode.

Postupak ponoviti tri puta, a nakon svih mjerenja upisati srednju vrijednost rezultata u **Radnu tablicu 1.**

3.1.2. Određivanje mirisa vode

Čista je pitka voda bez mirisa i okusa. Miris i okus vodi dolazi od raspadnutih organskih tvari životinjskog i biljnog podrijetla, proizvoda živih organizama, industrijskih otpadnih tvari te otopljenih plinova i soli. Miris se vode određuje na sobnoj temperaturi i pri temperaturi od 40 °C (jer porastom temperature dolazi do intenzivnijeg mirisa vode), dok se okus određuje na sobnoj temperaturi i na 12 °C (neposredno poslije uzorkovanja vode). Oba parametra određuju se opisno. Provjera okusa vode obavlja se ako je voda dezinficirana i kontrolirana.

Pribor i kemikalije: laboratorijska čaša (50 mL), uzorak vode, grijaća ploča i termometar.

Postupak: U čašu uliti 25 mL uzorka vode i odrediti ima li uzorak kakav miris, zatim taj isti uzorak vode zagrijati na 40 °C i zagrijanom uzorku vode odrediti miris.

Ocijeniti intenzitet mirisa prema **Tablica 1.** i rezultat upisati u **Radnu tablicu 1.**

Tablica 1. Sustav bodovanja intenziteta okusa i mirisa od 0 do 5 bodova [5]

Broj bodova	Intenzitet	Opisno određivanje
0	bez mirisa	miris se ne osjeća
1	vrlo slab miris	osjećaju samo iskusne osobe
2	slab miris	potrošači ne osjećaju sve dok im se ne skrene pozornost
3	osjetan miris	miris se lako osjeća i može biti povod za žalbu
4	jasan i upadljiv miris	miris se zapaža i može izazvati nelagodu kod potrošača
5	vrlo jak miris	miris je takvog intenziteta da voda nije pogodna za piće

3.1.3. Vizualno određivanje boje vode

Boju vode moguće je odrediti vizualno ili spektrofotometrijski. Boja vode može biti *prava* koja potječe od otopljenih tvari (npr. željezove i manganove soli u vodi uzrokuju crvenkasto obojenje, dok bjelančevine, ugljikohidrati, taninske i huminske kiseline uzrokuju žutosmeđu boju), a može biti i *prividna* koju su uzrokovale raspršene tvari koje se uklanjaju filtriranjem (suspenzija). Boja se vode mora ukloniti kako bi se mogla primijeniti za opću i industrijsku primjenu. Intenzitet boje u vodi u velikoj mjeri ovisi o pH-vrijednosti: pri višim pH-vrijednosti obojenost se obično povećava zbog otapanja huminskih kiselina ili povećane topljivosti metala, dok se pri nižim pH-vrijednostima obojenost smanjuje zbog taloženja metala i smanjene topljivosti huminskih kiselina.

Boja se utvrđuje promatranjem na bijeloj podlozi, gledajući odozgo prema dolje, a određuje se prema **Tablica 2.**

Tablica 2. Vizualna procjena boje vode za ljudsku potrošnju [6]

Vizualna procjena	Opis boje vode	Prikladnost za piće
bistra	bezbojna	prikladna za piće
blago obojena	blago žućkasta	potencijalno prikladna, treba provjeriti dodatne parametre
obilno obojena	žuta, smeđa, zelena	nije prikladna za piće
mutna	mutna ili neprozirna	nije prikladna za piće

Pribor i kemikalije: laboratorijska čaša (50 mL), uzorak vode, destilirana voda i komad bijelog papira (veličine 10 cm²).

Postupak: Jedna se laboratorijska čaša napuni s 25 mL uzorka vode te se procijeni nijansa vode u odnosu na drugu čašu u kojoj se nalazi 25 mL destilirane vode.

Rezultat upisati u *Radnu tablicu 1*.

3.2. Određivanje pH-vrijednosti vode

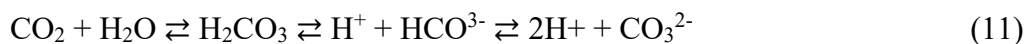
pH-vrijednost jest mjera relativne kiselosti i lužnatosti vode i definira se kao negativan logaritam koncentracije vodikovih iona (točnije oksonijevih iona, H₃O⁺) gdje p označava matematičku funkciju negativnog logaritma uz simbol vodika prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+] \quad (10).$$

Uobičajeno je da se za pH-ljestvicu tvrdi da je u rasponu od 0 do 14 ili možda od 1 do 14, međutim pH-vrijednost nema gornju ni donju granicu (pri promjeni temperature i otapala mijenja se konstanta ravnoteže, a sukladno tomu i pH-skala). Najčešće su koncentracije H⁺ iona u vodenim otopinama između 1 M (pH = 0) i 10⁻¹⁴ M (pH = 14) te je zbog toga raspon od 0 do 14. U vodi se pH-vrijednost može spustiti nešto ispod nule i podići nešto iznad 14 jer koncentracije H⁺ iona ili OH⁻ iona mogu biti veća od 1 M [7].

U kemiji vode uloga pH-vrijednosti povezuje se s procesom korozije, alkalitetom, tvrdoćom, kloriranjem i koagulacijom vode, tj. pH-vrijednost vode utjecat će na njezina kemijska i biološka svojstva i jedan je od bitnih parametara koji utječu na kvalitetu vode. U prirodnim vodama ravnoteža između CO₂ i CO₃²⁻ izravno utječe na pH-vrijednost zbog čega pH-vrijednost prirodnih voda varira od 4,5 (kisele vode) do 8,5 (slabo lužnate vode); otapanjem CO₂ nastaje ugljična (karbonatna kiselina, H₂CO₃) koja disocira na H⁺ i HCO₃⁻ (bikarbonatne)

ione, a zatim do CO_3^{2-} (karbonatnog) iona. Povećanje koncentracije CO_2 dovodi do porasta H_2CO_3 i posljedično povećanja H^+ iona čime se pH-vrijednost vode smanjuje, a povećana koncentracija CO_3^{2-} rezultira povišenom pH-vrijednosti (**Jednadžba (11)**).



Čista je voda vrlo slabo ionizirana, stoga je množinska koncentracija oksonijevih i hidroksidnih iona vrlo mala ($[\text{H}_3\text{O}^+] = [\text{OH}^-] = 10^{-7} \text{ M}$, pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$) te pH-vrijednost takve vode iznosi 7. Kod jako onečišćenih voda, kao što su otpadne vode, pH-vrijednost može jako varirati.

pH-vrijednost određuje se izravnom potenciometrijom s pH-elektrodom čiji je potencijal ovisan o koncentraciji H^+ iona, sustavom za mjerenje pH-vrijednosti ili pH-metrom (voltmetrom kalibriranim na pH-vrijednost 2 – 3). pH-elektroda sastoji se od unutrašnjeg elektrolita (najčešće 3 M KCl jer je pH-neutralan), unutrašnje referentne elektrode (najčešće Ag/AgCl, $E^0 = 222 \text{ mV}$) i (polupropusne) staklene membrane (**Slika 5.**). Uranjanjem elektrode u vodenu otopinu dolazi do promjene koncentracije H^+ iona i do izmjene H^+ iona iz vodene otopine i iona alkalijskih metala iz kristalne rešetke stakla te je nastali elektrodni potencijal posljedica izmjene tih iona. Selektivnost prema određenom ionu može se postići promjenom sastava stakla, npr. sastav je stakla pH-elektrode 72 % SiO_2 , 8 % CaO i 20 % Na_2O . Razlika od jedne pH-jedinice stvara promjenu potencijala od 58,16 mV na $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ili 59,16 mV na $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

pH-elektrodu određuje velika osjetljivost, široko mjerno područje i ekstremno velik električni otpor (od $30 \text{ M}\Omega$ do $600 \text{ M}\Omega$, debljine stakla od 0,03 mm do 0,1 mm).

Prema Nernstovoj jednadžbi, potencijal staklene elektrode odgovara potencijalu za redoks reakciju (**Jednadžba (12)**):



Vrijednost potencijala staklene elektrode dana je sljedećim jednadžbama:

$$E_{2\text{H}^+/\text{H}_2} = E_{2\text{H}^+/\text{H}_2}^0 - \frac{0,0059}{2} \log \frac{1}{[\text{H}^+]^2} \quad (13)$$

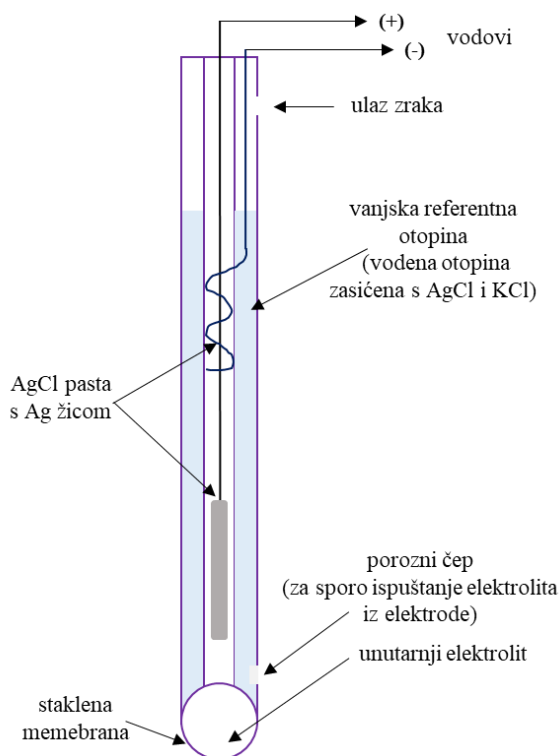
$$E_{\text{staklene}} = E_{2\text{H}^+/\text{H}_2}^0 - \frac{0,0059}{2} \log \frac{1}{[\text{H}^+]^2} \quad \log \frac{1}{[\text{H}^+]^2} = -\log([\text{H}^+]^2) \quad (14)$$

$$E_{\text{staklene}} = E_{2\text{H}^+/\text{H}_2}^0 + \frac{0,0059}{2} \cdot 2 \cdot \log[\text{H}^+] \quad E_{2\text{H}^+/\text{H}_2}^0 = 0,00 \text{ mV} \quad (15)$$

$$E_{\text{staklene}} = 0,00 + 0,059 \log[\text{H}^+] \quad \text{pH} = -\log[\text{H}^+] \quad (16)$$

$$E_{\text{staklene}} = -0,059 \text{ pH} \quad (17)$$

$$\text{pH} = -\frac{E_{\text{staklene}}}{0,059} \quad (18).$$



Slika 5. Shematski prikaz pH-elektrode

Pribor i kemikalije: prijenosni pH-metar, pH-elektroda, laboratorijska čaša (100 mL), uzorak vode, papirnati ubrus, destilirana voda, menzura i boca za ispiranje.

Postupak: Nakon kalibracije pH-metra, elektrodu isprati destiliranom vodom (kapljice lagano posušiti s papirnatim ubrusom) i uroniti u uzorak (50 mL) te očitati pH-vrijednost.

Ako pH-vrijednost nije moguće izmjeriti na mjestu uzorkovanja, bocu treba napuniti do vrha i dobro začepiti kako bi se spriječio gubitak CO₂.

Mjerenje *ponoviti tri puta* te srednju vrijednost rezultata upisati u *Radnu tablicu 1*.

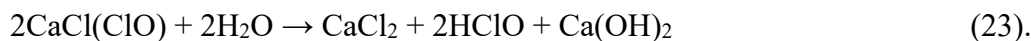
3.3. Kolorimetrijsko određivanje ukupnog i slobodnog rezidualnog klora u vodi

Higijenski ispravna voda za piće mora biti zdravstveno ispravna što znači da ne smije sadržavati patogene mikroorganizme kao ni štetne kemijske tvari poput teških metala, pesticida ili nusprodukata dezinfekcije. Kako bi krajnji korisnici dobili takvu vodu, voda se svakodnevno (nakon ostalih faza pročišćavanja-koagulacije, taloženja i filtracije) podvrgava dezinfekciji.

Osnovna je svrha dezinfekcije uklanjanje ili inaktiviranje patogenih mikroorganizama prisutnih u vodi. Dezinfekcijski procesi mogu biti termički, zračenje (UV, γ ili X), primjena ultrazvuka i kemijski. Zasad je kemijska dezinfekcija najpovoljnija kada je riječ o dezinficiranju većih količina vode. Kao kemijski dezinficijensi rabe se elementarni klor (Cl_2) (**Jednadžba (19)**), klorni dioksid (ClO_2) (**Jednadžba (20)**), natrijev hipoklorit (NaClO) (**Jednadžba (21)**) i kalcijev hipoklorit ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) (**Jednadžba (22)**), kalcijev klorid hipoklorit ($\text{CaCl}(\text{ClO})$) (**Jednadžba (23)**) te kloramini.



Zatim slijedi stvaranje hipokloritne kiseline koja je iznimno nestabilna u vodi i raspada se te stvara HCl i nascentni kisik (O) prema **Jednadžbi (20)**:



Prema Izvještaju o zdravstvenoj ispravnosti vode za ljudsku potrošnju u Republici Hrvatskoj za 2024. godinu [8], najčešće je upotrebljavano dezinfekcijsko sredstvo u sustavima javne vodoopskrbe natrijev hipoklorit (31,6 %), slijedi elementarni klor (19,7 %), dok je klorni dioksid primijenjen u 11,1 % slučajeva. Iako je njegova primjena manja, klorni se dioksid pokazao kao vrlo učinkovit dezinficijens zbog svoje snažne oksidacijske moći i bolje učinkovitosti protiv određenih mikroorganizama [9].

Klorni dioksid, iako vrlo učinkovit i kemijski stabilan u širem rasponu uvjeta, rjeđe se upotrebljava u hrvatskom vodoopskrbnom sustavu zbog više cijene i složenijeg rukovanja. U sljedećoj tablici prikazane su razlike koje mogu utjecati na odabir sredstva u vodoopskrbnim sustavima.

Tablica 3. Obilježja i usporedba dezinfekcijskih svojstava klornog dioksida i klora

Cl₂	ClO₂
pH-vrijednost snažno utječe na aktivnost pH = 7,5 → 50 %-tni učinak pH = 8,5 → 5 %-tni učinak	pH-vrijednost ne utječe na aktivnost pH = 7,5 → 100 %-tni učinak pH = 8,5 → 100 %-tni učinak
stabilnost SRK*-a maksimalno 15 dana	stabilnost SRK*-a 17 – 20 dana
reagira s huminskim tvarima – nastanak trihalometana	reagira s huminskim tvarima – nastaju vrlo male količine trihalometana
reagira s NH ₃ – nastanak kloramina (troše klor, neugodan miris, produljuju dezinfekciju)	reagira s NH ₃ – bez nastanka kloramina
reagira s fenolima – nastanak klorfenola (troše klor, neugodan miris, toksični)	ne reagira s fenolima
skladišti se u čeličnim bocama, može se transportirati	ne skladišti se i ne transportira; obično se proizvodi na licu mjesta

*slobodni rezidualni klor (SRK)

Kloriranjem se voda prvenstveno dezinficira pri čemu klor uništava ili inaktivira mikroorganizme. Tijekom kloriranja dolazi i do reakcija s različitim prirodnim i antropogenim spojevima prisutnim u vodi što može dovesti do nastanka nusprodukata dezinfekcije koje je potom potrebno ukloniti odgovarajućim postupcima obrade vode. Nastanak nusprodukata dezinfekcije može se smanjiti uklanjanjem organske tvari i anorganskih nečistoća (npr. spojeva željeza i mangana) prije kloriranja jer te tvari mogu povećati potrošnju klora ili potaknuti reakcije koje vode do nusprodukata. Organsko opterećenje vode odnosi se na prirodne organske spojeve (huminske i fulvinske kiseline, proteini, aminokiseline, ugljikohidrati i produkti razgradnje biljnog ili mikrobiološkog materijala) koji služe kao prekursori nusprodukata dezinfekcije, primjerice trihalometana i halooctenih kiselina. Kako bi se ti prekursori uklonili prije dezinfekcije, primjenjuju se konvencionalni postupci obrade vode (koagulacija, flokulacija, taloženje i filtracija) koji značajno smanjuju koncentraciju suspendiranih i koloidnih tvari, dok se za dodatno smanjenje otopljenih organskih spojeva i već nastalih nusprodukata primjenjuju metode poput adsorpcije na aktivni ugljen, aeracije, nanofiltracije i reverzne osmoze.

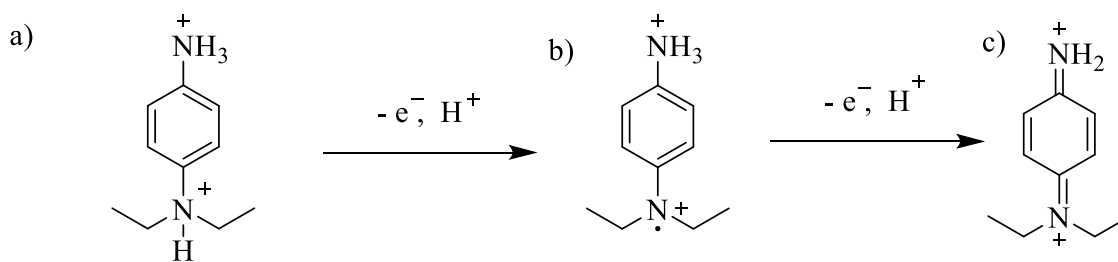
Nakon završetka reakcije i uspostavljanja ravnoteže, u vodi ostaje određena količina (višak) klora koja se naziva SRK. Maksimalna dopuštena koncentracija (MDK) SRK-a u vodi za ljudsku potrošnju iznosi 0,5 mg/L na mjestu potrošnje čime se osigurava zaštita od naknadne

kontaminacije uz izbjegavanje negativnog utjecaja na okus i miris vode te očuvanje zdravstvene ispravnosti vode.

Ako je koncentracija SRK-a viša od 0,5 mg/L, nakon dezinfekcije potrebno je provesti dekloriranje vode. Najčešći su načini dekloriranja: kemijskim procesom (natrijevim sulfitom) (**Jednadžba (24)**), propuštanjem kroz sloj aktivnog ugljena (**Jednadžba (25)**) ili aeracijom pri određenoj pH-vrijednosti.



Klor u vodi može biti prisutan kao SRK i kao vezani klor. I SRK i vezani klor (najčešće kloramini ili oblici klora nastali reakcijom SRK-a s organskim tvarima ili nečistoćama) mogu biti istovremeno prisutni u istom uzorku vode i određuju se kao ukupan klor. SRK predstavljaju hipoklorasta kiselina, hipokloritni ion i molekularni klor, a vezanom kloru pripadaju spojevi klora, najčešće monokloramini, dikloramini, dušik-trikloridi itd. U ovoj vježbi bit će određeni SRK i ukupan klor u uzorku vode primjenom kolorimetrijske metode, tzv. DPD metode koja se koristi reagensom *N,N*-dietil-*p*-fenilendiamin (DPD) (**Slika 6.**). Dodatkom reagensa u uzorak vode dolazi do oksidacije reagensa zbog prisutnosti klora i nastaje ružičasto obojeni spoj poznatiji kao Wüster boja (**Slika 6.b**) i bezbojni iminski spoj (**Slika 6.c**). Intenzitet Wüster boje izravno je proporcionalan količini SRK-a prisutnog u uzorku. Međutim bezbojni iminski spoj prije će se formirati u uvjetima jače oksidacije što je razlog zašto DPD metoda postaje nepouzdana pri vrlo visokim koncentracijama SRK-a.



Slika 6. Strukturni prikaz: a) DPD-a, b) Wüster boje i c) iminskog spoja

Iako ta metoda vrlo točno određuje koncentraciju SRK-a i ukupnog klora, glavni joj je nedostatak što ne razlikuje dvije forme SRK-a: HOCl i OCl⁻, koje ovise o pH-vrijednosti. Ako pH-vrijednost uzorka poraste (iznad 7,5 – 8,5), cjelokupan SRK u otopini bit će prisutan kao

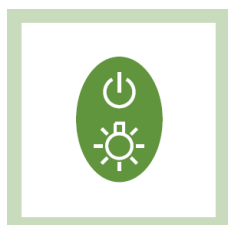
OCI, manje učinkovit dezinficijens, ali razine ukupnog SRK-a, koje se DPD metodom određuju, ostaju iste. Intenzitet boje odgovara ukupnoj koncentraciji SRK-a ili ukupnog klora.

Pribor i kemikalije: uzorak vode, prijenosni kolorimetar (*Hach DR3000*), tri odgovarajuće kivete za uređaj (10 mL), standardi i DPD reagensi (HACH, SAD) za SRK i ukupan klor.

Postupak: Slijediti upute koje su prikazane na **Slici 7**.



1. Napuniti kivetu uzorkom. Zatvoriti.
Napomena: Uzorci moraju biti odmah analizirani i ne mogu se čuvati za kasniju analizu.



2. Za uključivanje mjerača pritisnuti tipku **POWER** (UKLJUČIVANJE). Strjelica treba označavati kanal niskog raspona (LR).



3. Ukloniti poklopac mjerača. Postaviti kivetu u držač za kivete **s oznakom kvadrata okrenutom prema izvoru**. Namjestiti poklopac mjerača preko odjeljka za kivetu; **prekriti ju**.
Napomena: Obrisati višak tekućine i otiske prstiju s kivete s uzorkom.



4. Pritisnuti tipku **NULA / POMIKANJE**. Zaslom prikazuje “- - - -” potom **“0,00”**.



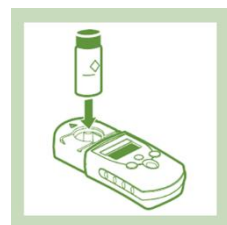
5. Napuniti drugu kivetu s uzorkom **do crte**.
Napomena: Ne upotrebljavati iste kivete s uzorkom za analizu slobodnog i ukupnog klora ako kivete nisu temeljito oprane.



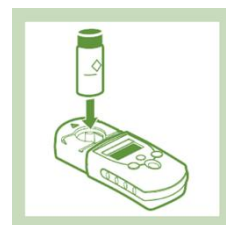
6. Dodati sadržaj jedne vrećice s praškom za **slobodan klor ili jedne vrećice s praškom za ukupan klor** u kivetu s uzorkom (pripremljeni uzorak).



7. Zatvoriti i lagano mućkati **20 sekundi**. Ružičasta boja označava prisutnost klora.
Napomena: Mućkanje razlaže mjehuriće koji se mogu formirati u uzorku s otopljenim plinovima.



8. Za SRK postaviti pripremljeni uzorak u držač za kivete. Pokriti poklopcem instrumenta i nakon dodavanja DPD reagensa za SRK nastaviti korak 10 unutar **jedne minute**.
Napomena: Obrisati kivetu s uzorkom.



9. Za ukupan klor postavite pripremljeni uzorak u držač kivete i pokrijte kivetu poklopcem instrumenta. Nakon dodavanja DPD reagensa za ukupan klor pričekati od **tri do šest minuta**. **Nastaviti korak 10**.
Napomena: Obrisati kivetu s uzorkom.



10. Pritisnuti tipku **UČITAJ / ENTER**. Instrument prikazuje “- - - -” te slijede rezultati klora u **mg/L**.

Slika 7. Upute proizvođača za određivanje SRK-a i ukupnog klora s pomoću kompleta *Hach DR 3000* i DPD reagens

(preuzeto s <https://www.hach.com/colorimeters/dr300pocketcolorimeter/>)

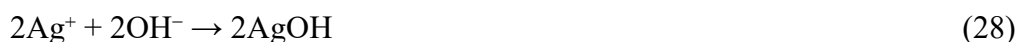
Dobivene rezultate upisati u **Radnu tablicu 1**.

3.4. Određivanje klorida Mohrovom metodom u vodi

Mohrova je metoda kemijska metoda za određivanje klorida u uzorcima vode koja se temelji na taloženju netopivog AgCl nakon reakcije uzorka s AgNO₃ u prisutnosti K₂CrO₄ kao indikatora. U analitu se nalaze dva različita iona, Cl⁻ i CrO₄²⁻, koji reagiraju s Ag⁺ pri čemu nastaju netopivi talozi različite topljivosti u vodi. Na temelju konstanti produkta topljivosti, AgCl ($K_{pt} = 1,56 \cdot 10^{-10} \text{ mol}^2/\text{L}^2$) manje je topiv od Ag₂CrO₄ ($K_{pt} = 9,0 \cdot 10^{-12} \text{ mol}^3/\text{L}^3$) što znači da će u otopini najprije nastati talog AgCl (**Jednadžba (26)**), a potom talog Ag₂CrO₄ (**Jednadžba (27)**) koji se pojavljuje kao crvenosmeđi talog kada svi prisutni kloridi reagiraju s Ag⁺ ionima.



Mohrova se metoda primjenjuje u neutralnom ili blago bazičnom mediju jer u kiselom mediju ion CrO₄²⁻ prelazi u ion Cr₂O₇²⁻, a u jako bazičnom mediju može se istaložiti smeđi Ag₂O prema sljedećim reakcijama:



Prednosti su te metode jednostavnost i brzina, a nedostaci mala preciznost, visoka granica detekcije i smetajuće tvari kao što su bromidi i jodidi koji mogu utjecati na točnost rezultata. Mohrova metoda omogućuje izravno određivanje koncentracije otopljenih klorida u vodi u rasponu od 5 do 150 mg/L, dok se koncentracije do 400 mg/L mogu odrediti razrjeđivanjem uzorka.

Pribor i kemikalije: uzorak vode, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), pipeta, propipeta, bireta (50 mL), kapalica, AgNO₃ (0,02 M), indikatorska otopina K₂CrO₄, NaCl (0,02 M), HNO₃ (0,1 M) i NaOH (0,1 M).

Prije priprave otopine, krutinu AgNO₃ osušiti na 105 °C. Tako je pripremljena otopina stabilna nekoliko mjeseci ako se čuva na tamnom mjestu i u boci od tamnog stakla.

Postupak: *Ako je pH uzorka izvan raspona od 7 do 10, korigirati pH dodavanjem HNO₃ ili NaOH te zabilježiti utrošen volumen kiseline ili lužine.*

U Erlenmeyerovu tikvicu otpipetirati 100 mL uzorka vode koji sadržava kloride, a zatim dodati 1 mL otopine K₂CrO₄ kao indikatora. Titrirati otopinom AgNO₃ sve dok se boja otopine ne promijeni u crvenosmeđu što označava da su svi kloridi, u uzorku vode, izreagirali. Nakon toga, dodati jednu kap otopine NaCl čime bi boja otopine trebala nestati jer se kloridi iz NaCl

vežu s ionima srebra i formiraju netopivi AgCl. Ako se boja ne promijeni ili ne nestane, to upućuje na činjenicu da su možda ostali neizreagirani kloridi u uzorku što sugerira da titracija nije bila dovoljno učinkovita i da bi trebalo ponoviti postupak.

Za slijepu probu potrebno je otpipetirati 100 mL uzorka destilirane vode u Erlenmeyerovu tikvicu. Titraciju provoditi na isti način. Utrošeni volumen AgNO₃ zabilježiti, no taj volumen ne smije prelaziti 0,2 mL. Ako utrošak AgNO₃ premaši tu vrijednost, to može upućivati na prisutnost nečistoća ili smetajućih tvari što može utjecati na točnost mjerenja. U slučaju da potrošnja ne prelazi 0,2 mL i ne dođe do promjene boje, rezultati titracije bit će smatrani pouzdanima. Potrošnja AgNO₃ u slijepoj probi uzima se u obzir pri izračunu koncentracije klorida (**Jednadžba (30)**) u analiziranom uzorku.

Svaku titraciju (uzorak i slijepu probu) *ponoviti tri puta* te se za izračun koristiti srednjom vrijednosti potrošnje AgNO₃ za svaku titraciju zasebno.

Količinu kloridnih iona u mg/L zapisati u *Radnu tablicu 1*.

$$\gamma_{\text{kloridnih iona u uzorku}} = \frac{(\bar{V}_{\text{AgNO}_3, \text{uzorak}} - \bar{V}_{\text{AgNO}_3, \text{slijepa proba}}) \cdot c_{\text{AgNO}_3} \cdot A_{r\text{Cl}}}{V_{\text{uzorka}}} \quad [\text{mg/L ili ppm}] \quad (30)$$

Sukladno hrvatskoj zakonskoj regulativi, voda za ljudsku potrošnju ne smije sadržavati više od 250 mg/L klorida.

3.5. Određivanje tvrdoće vode

Tvrdoća je svojstvo vode iz kojeg se dobiva podatak o količini otopljenih minerala u vodi. Kalcijevi i magnezijevi ioni najčešće su prisutni u većini sedimentnih stijena (vapnenac, dolomit i kalcit), stoga se tvrdoća vode i klasificira prema količini otopljenih kalcijevih ili magnezijevih soli.

Razlikuju se karbonatna (T_K), nekarbonatna (T_N) i prolazna (T_P) tvrdoća vode.

T_K predstavljaju kalcijevi i magnezijevi bikarbonati i karbonati. Pri duljem zagrijavanju (90 °C – 100 °C) vode, bikarbonati se raspadaju na teško topive karbonate prema sljedećim jednadžbama:



Poslije izdvajanja teško topivih karbonata u otopini ostaje vrlo mala količina Ca²⁺ i Mg²⁺ koji su u ravnoteži s drugim anionima (SO₄²⁻, Cl⁻, NO₃⁻ i SiO₃²⁻) i predstavljaju T_N .

Ukupna se tvrdoća vode izražava prema sljedećoj jednadžbi:

$$T_U = T_K + T_N \quad (33).$$

Tvrdoća se vode izražava u njemačkim, francuskim i engleskim stupnjevima tvrdoće:

- a) njemačkim: $1 \text{ }^\circ\text{d} = 10 \text{ mg CaO/L vode}$
- b) francuskim: $1 \text{ }^\circ\text{f} = 10 \text{ mg CaCO}_3\text{/L vode} = 5,6 \text{ mg CaO/L}$
- c) engleskim: $1 \text{ }^\circ\text{e} = 14,3 \text{ mg CaCO}_3\text{/L vode} = 0,56 \text{ mg CaO/L}$.

Sljedeća tablica prikazuje klasifikaciju vode prema različitim stupnjevima tvrdoće.

Tablica 4. *Klasifikacija vode prema tvrdoći*

VRSTA VODE	$^\circ\text{d}$	mg CaCO ₃ /L
meka	< 4	< 71,4
lagano tvrda	4 – 8	71,4 – 142,8
umjereno tvrda	8 – 18	172,8 – 321,4
tvrda	18 – 30	321,4 – 535,7
jako tvrda	> 30	> 535,7

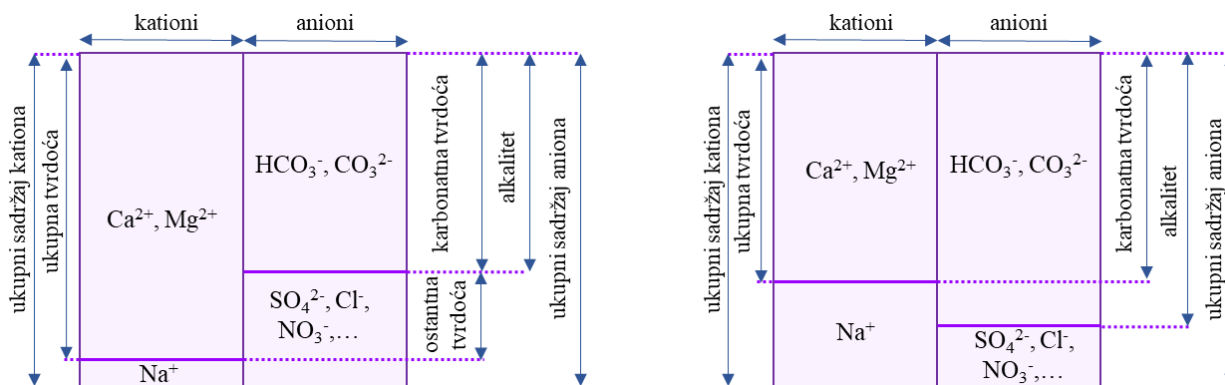
Pri ispitivanju tvrdoće vode određuju se T_K i T_U .

T_N se izračunava prema razlici T_U i T_K (**Jednadžba (34)**):

$$T_N = T_U - T_K \quad (34)$$

za slučaj kad je T_U veća od T_K .

U slučaju ako je $T_K > T_U$, u vodi se nalazi veća količina natrijevih i kalijevih karbonata i hidrogenkarbonata, iz čega slijedi $T_K = T_U$, a $T_N = 0$ (**Slika 8.**).



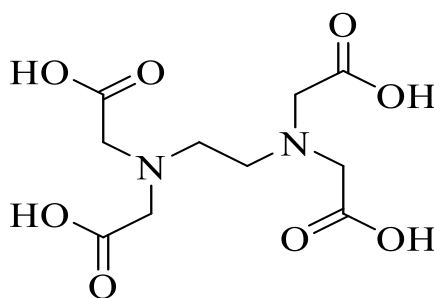
Slika 8. Različiti slučajevi odnosa tvrdoće i alkaliteta vode

Voda koja će se dalje upotrebljavati u tehničke svrhe mora se „omekšati“ (uklanjanje kalcijevih i magnezijevih iona fizikalno-kemijskim metodama), a to znači da je neophodno analitički odrediti ukupnu tvrdoću vode koja potječe od kalcijevih i magnezijevih iona.

Određivanje ukupne tvrdoće vode zasniva se na titraciji uzorka vode s dinatrijevom soli etilendiamintetraoctene kiseline ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{L}$) (Slika 9.) pri čemu dolazi do stvaranja stabilnog kelatnog kompleksa, s kalcijevim i magnezijevim ionima, u lužnatoj sredini prema **Jednadžbama (35) i (36)**:



Deprotonirani oblik (L^{4-}) etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA, H_4L) veže se s metalnim ionima uvijek u omjeru 1 : 1 bez obzira na naboj iona. Nastali H^+ ioni u prethodnim reakcijama snižavaju pH-vrijednost pa se zbog toga prilikom titracije dodaje pufer kako bi se reakcija odvijala u potpunosti bez smanjenja kvantitete reagensa.



Slika 9. Struktura EDTA

Reakcija nastajanja kompleksa može se koristiti u volumetrijskoj analizi jer je brza, stehiometrijska i kvantitativna.

EDTA je slaba kiselina koja disocira u četiri stupnja, dajući sljedeće ionske vrste (**Jednadžbe (37) – (40)**):



3.5.1. Određivanje ukupne tvrdoće vode

Pribor i kemikalije: uzorak vode, pipeta, propipeta, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), bireta (50 mL), špatula, Eriokrom crno-T (indikator), amonijačni pufer (pH = 10) i EDTA (0,1 M).

Postupak: Otpipetirati 100 mL uzorka vode u Erlenmeyerovu tikvicu te dodati 2 mL amonijačnog pufera i na vrh špatule indikatora. Titrirati s otopinom EDTA do promjene boje iz vinskocrvene u plavu. Očitati utrošak EDTA te *ponoviti titraciju tri puta*, srednju vrijednost uzeti za izračunavanje T_U (**Jednadžba (41)**).

Ako je utrošak EDTA veći od 15 mL, ponoviti titracije s manjom količinom uzorka (50 mL), a ako uzorak vode ne sadržava Mg^{2+} ione, prije titracije dodati malo krutog Na_2MgY radi boljeg uočavanja promjene boje.

$$T_U = \frac{\bar{V}_{EDTA} \cdot c_{EDTA}}{V_{uzorak; \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}}} \cdot M(\text{CaO}) \cdot 1000 \quad [\text{mg CaO/L}] \quad (41)$$

$$1 \text{ }^\circ\text{d} = 10 \text{ mg CaO}$$

Rezultat upisati u **Radnu tablicu 1**.

U sljedećoj tablici prikazana je usporedba tvrdoće vode izražene u različitim mjernim jedinicama.

Tablica 5. Prikaz odnosa mjernih jedinica za tvrdoću vode

Stupanj	°d	°f	°e	mg CaCO ₃ /L
njemački	1	1,79	1,29	17,9
francuski	0,56	1	1,70	10,0
engleski	0,80	1,43	1	14,3
mg CaCO ₃	0,056	0,1	0,07	1

3.5.2. Određivanje kalcijevih i magnezijevih iona u vodi

Pribor i kemikalije: uzorak vode, menzura, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), bireta (50 mL), špatula, mureksid (indikator), NaOH (30 %), menzura i EDTA (0,1 M).

Postupak: Otpipetirati 100 mL uzorka vode u Erlenmeyerovu tikvicu, dodati 2 mL NaOH i na vrh špatule indikatora. Titrirati otopinom EDTA do promjene boje iz ružičastocrvene u ljubičastu. Očitati utrošak EDTA te *ponoviti titraciju tri puta*, srednju vrijednost uzeti za izračunavanje količine Ca²⁺ u uzorku (**Jednadžba (42)**).

$$\gamma(\text{Ca}^{2+}) = \left(\frac{\bar{V}_{EDTA} \cdot c_{EDTA}}{V_{uzorak; \text{Ca}^{2+}}} \right) \cdot M(\text{Ca}^{2+}) \cdot 1000 \quad [\text{mg/L}] \quad (42)$$

Nakon izračunane količine kalcijevih iona u uzorku, količina se magnezijevih iona određuje računski prema sljedećoj jednadžbi:

$$\gamma(\text{Mg}^{2+}) = \left(\frac{\bar{V}_{EDTA} \cdot c_{EDTA}}{V_{uzorak; \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}}} - \frac{\bar{V}_{EDTA} \cdot c_{EDTA}}{V_{uzorak; \text{Ca}^{2+}}} \right) \cdot M(\text{Mg}^{2+}) \cdot 1000 \quad \frac{\bar{V}_{EDTA} \cdot c_{EDTA}}{V_{uzorak; \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}}} = T_U \quad (43)$$

$$\gamma(\text{Mg}^{2+}) = (T_U - \frac{\bar{V}_{EDTA} \cdot c_{EDTA}}{V_{uzorak; \text{Ca}^{2+}}}) \cdot M(\text{Mg}^{2+}) \cdot 1000 \quad [\text{mg/L}] \quad (44).$$

Rezultat upisati u **Radnu tablicu 1**.

Budući da tvrdoću vode čine Ca²⁺ i Mg²⁺ ioni, ako želimo provjeriti slažu li se dobivene količine tih iona s T_U, možemo to napraviti s pomoću sljedećih jednadžbi:

$$\gamma(\text{Ca}^{2+}) = \gamma_{\text{Ca}^{2+}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \frac{M_{\text{CaO}}}{M_{\text{Ca}^{2+}}} \quad [\text{mg CaO/L}]$$

$$\gamma(\text{Mg}^{2+}) = \gamma_{\text{Mg}^{2+}} \left[\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right] \frac{M_{\text{CaO}}}{M_{\text{Mg}^{2+}}} \quad [\text{mg CaO/L}]$$

$$T_U = \text{ili} \approx (\gamma(\text{Ca}^{2+}) + \gamma(\text{Mg}^{2+})).$$

3.5.3. Određivanje karbonatne i nekarbonatne tvrdoće vode

Pribor i kemikalije: uzorak vode, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), bireta (50 mL), pipeta, propipeta, HCl (0,1 M), kapalica i metiloranž.

Postupak: Otpipetirati 100 mL uzorka vode u Erlenmayerovu tikvicu te dodati tri kapi metiloranža. Titrirati s HCl do promjene boje iz žute u narančastu. Očitati utrošak HCl te *titraciju ponoviti tri puta*, dobivenu srednju vrijednost uzeti za izračunavanje T_K prema sljedećoj jednadžbi:

$$T_K = \frac{\bar{V}_{HCl} \cdot c_{HCl}}{V_{uzorka}} \cdot 1000 \cdot 2,8 \quad [^\circ d] \quad (44).$$

Nakon dobivenog rezultata za T_K slijedi, prema sljedećoj jednadžbi:

$$T_N = T_U - T_K \quad [^\circ d] \quad (45).$$

Rezultat upisati u *Radnu tablicu 1*.

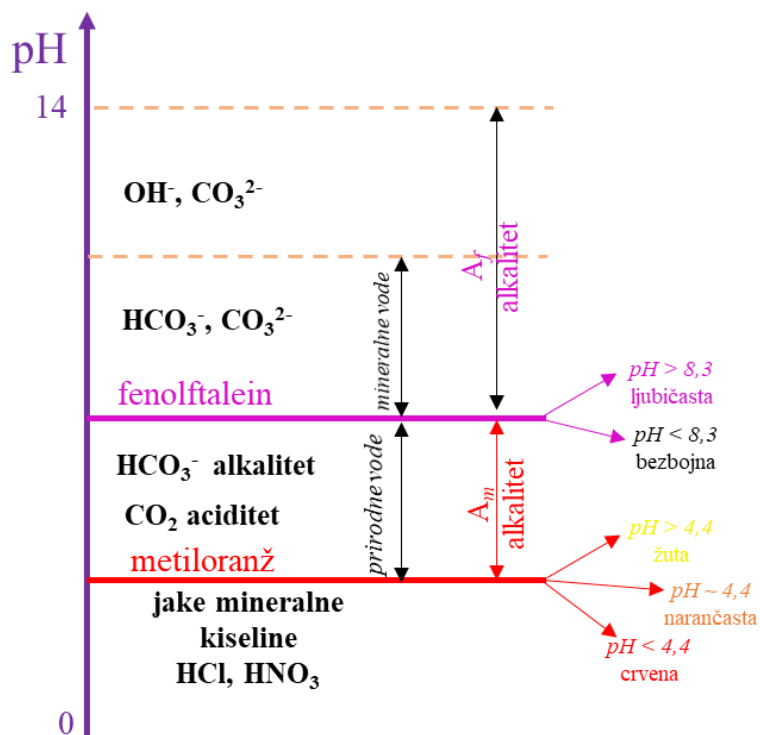
3.6. Određivanje ukupnog alkaliteta u vodi

Alkalitet (bazičnost) vode predstavlja sposobnost vode za neutralizaciju jakih kiselina do određene pH-vrijednosti, a čine ga hidroksidi, karbonati i bikarbonati alkalijskih i zemnoalkalijskih metala (Na, Mg i Ca) (**Jednadžba (47)**):

$$\text{Alkalitet vode} = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{OH}^-] + [\text{H}^+] \quad [\text{mol/L}] \quad (46).$$

Što je alkalitet vode veći, to je veći kapacitet vode za neutralizaciju kiselina.

Voda s visokim alkalitetom obično ima veću pH-vrijednost što je poželjno za mnoge korisnike kao što su biljni i životinjski organizmi, tehnološki procesi ili potrošači koji žele vodu koja nije previše kisela. Metoda određivanja alkaliteta jest titracija uzorka vode otopinom klorovodične ili sumporne kiseline uz indikatore fenolftalein i metiloranž, dok se završna točka titracije određuje vizualno promjenom boje indikatora. Ukupan alkalitet (A_u) čine alkalitet prema fenolftaleinu (A_f) (udio svih hidroksida i polovica udjela karbonata u vodi) i alkalitet prema metiloranžu (A_m) (udio svih karbonata, hidrogenkarbonata i hidroksida u vodi) što je i ilustrativno prikazano na **Slici 10**. Istovremena prisutnost hidroksida i bikarbonata u uzorku nije moguća jer oni reagiraju međusobno, stoga se u nekome uzorku vode, ako se određuju oba alkaliteta, određuje prvo A_f .



Slika 10. Alkalitet vode u zavisnosti od pH-vrijednosti

Ovisno o odnosu A_m i A_f , moguće je zaključiti o koncentraciji pojedinih vrsta iona prema Tablici 6.

Tablica 6. Udjeli HCO_3^- , CO_3^{2-} i OH^- u alkalitetu vode u ovisnosti o rezultatima titracije

Rezultat titracije	HCO_3^-	CO_3^{2-}	OH^-
$A_f = 0$	A_m	0	0
$2A_f < A_m$	$A_m - 2A_f$	$2A_f$	0
$2A_f = A_m$	0	$2A_f$	0
$2A_f > A_m$	0	$2(A_m - A_f)$	$2A_f - A_m$
$A_f = A_m$	0	0	A_m

Fenolftalein i metiloranž djeluju kao indikatori pH-vrijednosti. Pri pH-vrijednosti između 8,3 i 10,0 fenolftalein se mijenja u ljubičastocrvenu boju, dok se metiloranž mijenja iz crvene u žutu boju kada pH-vrijednost raste između 3,1 i 4,4. Kada se dosegne točka ekvivalencije, dolazi do promjene boje indikatora i zaustavlja se titracija.

Alkalitet se vode izražava kao sadržaj CaCO_3 u mg/L vode. Optimalan je alkalitet pitke vode 20 – 200 mg CaCO_3/L [6]. Ako je alkalitet niži od 20 mg CaCO_3/L , voda može biti korozivna i imati nestabilnu pH-vrijednost što može negativno utjecati na vodovodne sustave i kvalitetu vode. S druge strane, visoki alkalitet, iznad 200 mg CaCO_3/L , može uzrokovati okusne probleme i stvaranje kamenca u cijevima.

Pribor i kemikalije: uzorak vode, pH-metar, pipeta, metiloranž (0,5 %), fenolftalein (2 %), laboratorijska čaša (200 mL), kapalica, bireta (50 mL) i HCl (0,1 M).

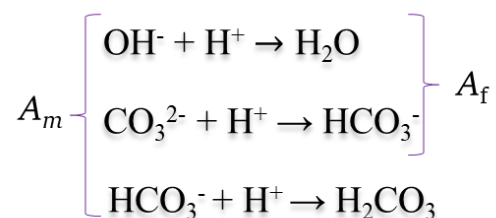
Postupak: Prije početka titracije odrediti pH-vrijednost uzorka vode. Ako uzorak vode ima nižu pH-vrijednost od 8,2 – 8,4, dodatkom fenolftaleina voda neće promijeniti boju, stoga se može zaključiti da su u vodi prisutni HCO_3^- ioni (**Slika 11.**), odnosno da je $A_f = 0$. Titracija se izvodi u samo jednom stupnju (**Jednadžba (48)**), određuje se samo A_m :



Za uzorke kojima je početna pH-vrijednost veća od 8,4, titracija se izvodi u dvama koracima:

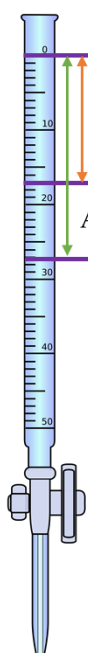
I. korak: uz fenolftalein, dok se indikator ne obezboji (A_f alkalitet)

II. korak: uz metiloranž, do prelaska boje indikatora iz žute u narančastu (A_m alkalitet).



Slika 7. *Kemijske reakcije koje određuju alkalitet: interakcije OH^- , HCO_3^- i CO_3^{2-} iona*

Otpipetirati 100 mL uzorka (kojem je prethodno provjerena pH-vrijednost) i dodati u uzorak 10 kapi fenolftaleina. Uzorak titrirati s 0,1 M HCl sve do obezbojenja uzorka. U trenutku promjene boje pH-vrijednost uzorka trebala bi iznositi 8,2 – 8,4 (*provjeriti!*). Na osnovi utrošene HCl izračunati A_f (**Jednadžba (49)**). *U isti uzorak* dodati 6 – 7 kapi metiloranža (pojava žute boje) i titrirati do promjene boje iz žute u narančastocrvenu. U trenutku promjene boje u narančastu, pH-vrijednost trebala bi iznositi 4,2 – 4,4 (*provjeriti!*). Na osnovi dodatne utrošene HCl izračunati A_m (**Jednadžba (50)**).



$$A_f = \frac{V_{HCl_f} \cdot c_{HCl} \cdot f}{V_{uzorka}} \quad [\text{mg CaCO}_3/\text{L}] \quad (47)$$

gdje je V_{HCl_f} (mL) utrošak u prvom koraku titracije, a V_{uzorka} (mL) volumen otpipetiranog uzorka.

$$A_m = \frac{V_{HCl_m} \cdot c_{HCl} \cdot f}{V_{uzorka}} \quad [\text{mg CaCO}_3/\text{L}] \quad (50)$$

gdje je V_{HCl_m} (mL) utrošak u drugom koraku titracije.

f je konverzijski faktor za prikaz rezultata u mg CaCO_3/L te iznosi 50,04 ($M(\text{CaCO}_3) = 100,08 \text{ g/mol}$; $2n(\text{CaCO}_3) = n(\text{HCl})$).

Ukupan alkalitet izražava se prema sljedećoj jednadžbi:

$$A_u = A_f + A_m \quad [\text{mg/L}] \quad (51).$$

Rezultate upisati u **Radnu tablicu 1**.

3.7. Određivanje aciditeta u vodi

Aciditet (A) vode podrazumijeva ukupnu količinu prisutnih kiselina ili sposobnost vode za neutralizaciju dodane baze čime se izražava stupanj kiselosti vode. Prirodne vode mogu imati različit aciditet koji je rezultat različitih čimbenika, uključujući geološke procese, antropogene utjecaje i biološke aktivnosti. Niski aciditet obično znači da je voda blago kisela ili neutralna. To se često događa u prirodnim vodama koje su u dodiru s vapnencem ili drugim sedimentnim stijinama koje imaju alkalni učinak na vodu. S druge strane, visoki aciditet može biti rezultat raznih antropogenih utjecaja kao što su industrijski otpad, poljoprivredni pesticidi ili kiseline iz oborina koje su apsorbirane u tlo.

Određivanje aciditeta prirodnih voda važno je za praćenje kvalitete vode i očuvanje okoliša. To se često radi mjerenjem pH-vrijednosti koja je pokazatelj kiselosti ili bazičnosti vode.

Pribor i kemikalije: uzorak vode, pipeta, propipeta, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), bireta (50 mL), NaOH (0,1 M), fenolftalein i metiloranž.

Postupak: Otpipetirati 100 mL uzorka i dodati u uzorak dvije kapi metiloranža, uzorak titrirati s pomoću NaOH do promjene boje u žutu. **Napomena:** ako uzorak odmah promijeni boju metiloranža u žuto, to znači da je pH već iznad granice promjene boje indikatora ($pH > 4,4$) te se u tom slučaju titracija s pomoću NaOH u ovom koraku preskače i pristupa se izravnoj titraciji fenolftaleinom. Nakon promjene boje dodati dvije kapi fenolftaleina i nastaviti titrirati do promjene boje u ružičastu (ljubičastocrvenu). Titraciju ponoviti tri puta te srednju vrijednost rezultata zapisati, a prema sljedećoj jednadžbi izračunati A uzorka i zapisati vrijednost u **Radnu tablicu 1.:**

$$A = \frac{\bar{V}_{\text{NaOH; ukupni}} \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot f}{V_{\text{uzorka}}} \quad [\text{mg CaCO}_3/\text{L}] \quad (52).$$

U skladu s važećim zakonodavstvom Europske unije koje regulira standarde za vodu za ljudsku potrošnju, uključujući Hrvatsku, propisani su brojni parametri koji obuhvaćaju kemijske, mikrobiološke i fizikalne aspekte kvalitete vode. Ipak, pojam *aciditet* nije zasebno definiran ili naveden kao obvezni parametar u tim regulativama. Umjesto toga, analiza se temelji na mjerenjima kao što su pH-vrijednost, ukupna alkalnost te koncentracija određenih kemijskih spojeva. Kombinacijom tih mjerenja može se procijeniti razina kiselosti ili bazičnosti vode što neizravno odražava vrijednost aciditeta.

Stoga, iako aciditet nije zasebno propisan parametar, njegova procjena može biti korisna za razumijevanje kiselosti ili bazičnosti vode što je važno za očuvanje zdravlja ljudi i zaštitu infrastrukture vodoopskrbe.

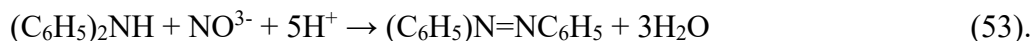
3.8. Kvalitativno određivanje nitrata u vodi

Nitrati su dušikovi spojevi koji se često nalaze u vodi, a potječu iz prirodnih i antropogenih izvora poput poljoprivrede i otpadnih voda. Visoke koncentracije nitrata u vodi za piće mogu predstavljati zdravstveni rizik, posebice za dojenčad i trudnice, jer se u tijelu pretvaraju u nitrite koji mogu uzrokovati ozbiljne zdravstvene probleme. Stoga je važno redovito pratiti i kontrolirati koncentraciju nitrata u vodi kako bi se osigurala njezina sigurnost za piće i zaštitilo javno zdravlje.

Pribor i kemikalije: uzorak vode, epruveta, pipeta, propipeta, kapalica, koncentrirana H_2SO_4 i difenilamin.

Postupak: U epruvetu uliti 3 mL uzorka vode, zatim dodati 5 kapi H_2SO_4 i 5 kapi difenilamina. Ako je u uzorku prisutan nitrat, uzorak će poprimiti plavo ili plavozelenu obojenje.

Difenilamin djeluje kao reagens. Reagira s nitratima i formira azo-spoj koji uzorku daje plavo ili plavozelena obojenje prema sljedećoj jednadžbi:



Napomena: Pri ovoj kvalitativnoj analizi treba imati na umu da sam test s difenilaminom nije precizan kad je riječ o vrlo niskim koncentracijama NO_3^- , kakve se najčešće nalaze u vodi za ljudsku potrošnju, tj. obrađenoj vodi. Naime, voda koja je već prošla kroz postupke pročišćavanja najčešće sadržava premalo nitrata da bi izazvala jasnu promjenu boje u reakciji.

Sukladno hrvatskoj zakonskoj regulativi, voda za ljudsku potrošnju ne smije sadržavati više od 50 mg/L NO_3^- . No u praksi, posebice kad se ispituje vodovodna voda, vrijednosti znaju biti mnogo niže od navedene.

Ako se tijekom kvalitativne analize ne uoči nikakva promjena, preporučuje se uzeti uzorak sirove vode, primjerice otpadne, koja još nije prošla filtraciju. U takvim slučajevima koncentracija nitrata zna biti veća pa postoji veća vjerojatnost da će reakcija biti vidljiva.

Rezultat upisati u *Radnu tablicu 1*.

3.9. Određivanje željezovih iona u vodi

Željezo je jedan od najčešćih metala u prirodi, stoga se može pronaći u mnogim vodama koje se koriste za piće ili druge svrhe. U vodi se željezo obično nalazi u obliku željezovih iona, Fe^{2+} i Fe^{3+} . Njihova prisutnost u vodi može biti prirodna ili uzrokovana ljudskim aktivnostima kao što su ispuštanje otpadnih voda ili uporaba gnojiva i pesticida.

Prisutnost željezovih iona u vodi može uzrokovati različite probleme, ovisno o njihovoj koncentraciji. Koncentracije do 0,3 mg/L obično ne uzrokuju probleme i čak mogu biti korisne za neke biološke procese. Međutim, koncentracije iznad 0,3 mg/L mogu uzrokovati neugodan okus, miris i boju vode te oštetiti cijevi i opremu za vodu zbog stvaranja taloga. Uklanjanje željezovih iona iz vode može se postići različitim metodama, uključujući kemijske tretmane, mehaničko uklanjanje i upotrebu specijaliziranih filtara.

3.9.1. Kvalitativno određivanje željezovih iona u vodi

Pribor i kemikalije: uzorak vode, kalijev tiocijanat (KSCN, 2 M), koncentrirana H_2SO_4 (konzervirajuća otopina), epruveta, pipete, kapalica i univerzalni indikatorski papir.

Postupak: Dodati 1 – 2 kapi H_2SO_4 u 5 mL uzorka vode. Uzorku provjeriti pH-vrijednost s univerzalnim indikatorskim papirom, trebao bi biti 2 ili manje. Zatim u isti uzorak dodati

nekoliko kapi KSCN-a. Ako su u uzorku prisutni Fe^{3+} ioni, uzorak će poprimiti tamnocrveno obojenje prema sljedećoj jednadžbi:



Izraz „konzervirajuća otopina“ upotrebljava se za opisivanje dodavanja male količine sumporne kiseline u uzorak vode kako bi se smanjila pH-vrijednost i time spriječile neželjene kemijske reakcije koje mogu promijeniti sastav uzorka tijekom skladištenja. Dodavanjem sumporne kiseline snižava se pH-vrijednost ≤ 2 što sprječava oksidaciju Fe^{2+} iona u Fe^{3+} i taloženje željezovih spojeva.

Napomena: Pri ovoj kvalitativnoj analizi treba imati na umu da ovaj kvalitativni test nije precizan kada je riječ o vrlo niskim koncentracijama željezovih iona, kakve se najčešće nalaze u pitkoj, obrađenoj vodi. Naime, voda koja je već prošla postupke pročišćavanja obično sadržava prenisku koncentraciju nitrata koja ne izaziva jasnu promjenu boje u reakciji.

Sukladno hrvatskoj zakonskoj regulativi, voda za ljudsku potrošnju ne smije sadržavati više od 0,2 mg/L željeza. No u praksi, posebice kada se ispituje vodovodna voda, vrijednosti znaju biti mnogo niže od navedene MDK vrijednosti.

Ako se tijekom kvalitativne analize ne uoči nikakva promjena, preporučuje se uzeti uzorak sirove vode, primjerice sirove podzemne vode koja još nije prošla filtraciju. U takvim slučajevima koncentracija nitrata zna biti veća pa postoji veća vjerojatnost da će reakcija biti vidljiva.

Rezultat upisati u **Radnu tablicu 1**.

3.9.2. Kvantitativno određivanje željezovih iona u vodi

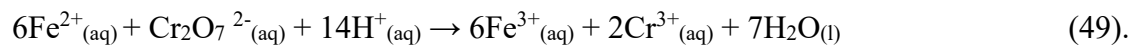
Pribor i kemikalije: uzorak vode, pipete, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), bireta (50 mL), HCl (6 M), H_2SO_4 (0,1 M), indikatorski papir, vaga, posudica za vaganje, žlica, askorbinska kiselina (vitamin C, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) (0,1 M), grijaća ploča, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (0,1 M) i $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (standard, 0,001 M).

Postupak: Otpipetirati 50 mL uzorka vode u Erlenmeyerovu tikvicu, zatim dodati 5 mL HCl i 5 mL H_2SO_4 (pH-vrijednost trebala bi biti oko 1 kako bi željezo bilo prisutno kao Fe^{2+} , provjeriti) te zagrijavati tikvicu dok se ne pojave pare (zagrijavanjem se uklanjaju smetajuće tvari). Nakon pojava para, maknuti s grijaće ploče i ostaviti da se reakcijska smjesa ohladi. Nakon hlađenja dodati 2 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (redukcijsko sredstvo) koji će reducirati sve zaostale oksidacijske produkte i osigurati prisutnost Fe^{2+} iona. Zatim dodati 5 mL otopine $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ koja

će oksidirati Fe^{2+} u Fe^{3+} . Titrirati otopinom $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sve dok se ne postigne promjena boje u zelenu.

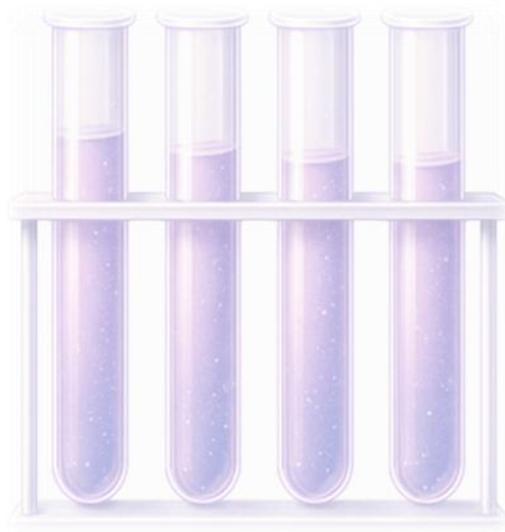
Zabilježiti utrošen volumen $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Reakcija se može prikazati na sljedeći način (redoks):



Izračunati koncentraciju željezovih iona u mol/L prema sljedećoj jednadžbi te rezultat zapisati u **Radnu tablicu 1.**:

$$c_{\text{željezovih iona u uzorku}} = \frac{(V_{\text{titranta}} \cdot c_{\text{titranta}} \cdot A_{\text{rFe}})}{V_{\text{uzorka}}} \quad [\text{mol/L}] \quad (50).$$



Radna tablica 1.

Analitičko izvješće			
Student/ica:			
Datum uzorkovanja:			Uzorak:
Parametar		Mjerna jedinica	Rezultat
temperatura		°C	
miris		<i>kvalitativno određivanje</i>	
boja		<i>kvalitativno određivanje</i>	
pH _{ELEKTROKEMIJSKI}		/	
SRK		mg/L	
ukupni klor		mg/L	
γ (Cl ⁻), Mohorovom metodom		mg/L	
T_U		°d	
γ (Ca ²⁺)		mg/L	
γ (Mg ²⁺)		mg/L	
T_K		°d	
T_N		°d	
A_u		mg CaCO ₃ /L	
A		mg CaCO ₃ /L	
NO ₃ ⁻		<i>kvalitativno određivanje</i>	
Fe ³⁺		<i>kvalitativno određivanje</i>	
c (Fe ³⁺)		mol/L	
		Pregledao/la:	
		Datum:	

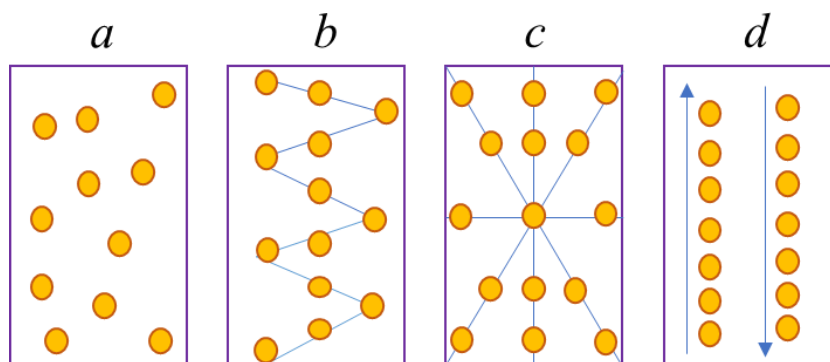
*Kod kvalitativnog određivanja naznačiti samo je li ion prisutan ili nije prisutan.

4. ANALIZA TLA

Tlo je rahli površinski sloj Zemljine kore koji nastaje trošenjem svih vrsta stijena i predstavlja ključan resurs u poljoprivredi jer utječe na rast, razvoj i prinos biljaka. Kvaliteta tla, određena čimbenicima poput teksture, strukture i pH-vrijednosti, presudna je za optimalan rast i zdravlje usjeva. Primjena odgovarajućih gnojiva održava plodnost tla i osigurava odgovarajuću prehranu biljaka, a njihova podjela prema izvoru i sastavu omogućuje prilagodbu uzgojnih praksi specifičnim zahtjevima tla i biljaka. Kombinacijom različitih vrsta gnojiva i pravilnom analizom tla mogu se postići optimalni uvjeti za uzgoj biljaka čime se doprinosi i održivosti poljoprivredne proizvodnje.

Uzimanje uzoraka tla provodi se prema sljedećim koracima:

- 1. uzorak se tla uzima u porušenom stanju (mekano, rastresito, već obrađeno ili prirodno rahlo) jer ne zahtijeva posebnu opremu*
- 2. preporučuje se uzimanje uzoraka nakon žetve ili berbe, prije pripreme tla za novi usjev, uz uvjet da je prošlo najmanje 2 – 4 tjedna od posljednje gnojidbe*
- 3. potrebno je procijeniti homogenost površine i odrediti broj uzoraka koji će najbolje predstaviti cijelu ispitivanu površinu*
- 4. definirati raspored uzimanja uzoraka (Slika 12.) na osnovi homogenosti površine i odabrati lokacije za uzimanje uzoraka. Nakon odabira načina uzorkovanja tla, ponoviti uzorkovanje ravnomjerno s različitih mjesta koristeći se određenom shemom i uzimajući u obzir dubinu i vrstu površine.*



Slika 8. Shema uzimanja uzorka tla: (a) nesistematski način uzorkovanja ili (b, c i d) sistematski način uzorkovanja

5. uzorci se trebaju uzimati s dubine 5 – 15 cm (za poljoprivredne površine) ili 2 – 5 cm (za travnjake), za jednogodišnje kulture uzima se uzorak s dubine 20 – 40 cm, dok se za višegodišnje nasade uzima s dubine 20 – 60 cm

6. svaki uzorak treba jasno označiti (na vodootpornoj vrećici) s podacima o dubini, lokaciji i datumu uzorkovanja.

Slijedeći te korake i raspored uzimanja uzoraka, osigurava se točno i pouzdano uzimanje uzoraka tla, ključno za analizu plodnosti tla i primjenu agrotehničkih mjera u poljoprivredi.

Svaki će student donijeti 200 grama tla iz svojeg područja stanovanja koje će prethodno osušiti 24 sata na zraku te će ga tijekom vježbe analizirati.

4.1. Određivanje pH-vrijednosti tla

Reakcija se tla mjeri i prikazuje kao pH-vrijednost koja je pokazatelj važnih agrokemijskih svojstava tla bitnih za rast bilja te kvalitetu prinosa. pH-vrijednost tla i njezin oksido-redukcijski potencijal određeni su mineralnim (**Tablica 7.**) i organskim dijelom tla. Promjena pH-vrijednosti tla može biti uzrokovana prirodno ili antropogeno, s čimbenicima kao što su gnojidba, kalcizacija (tretiranje tla kalcijevim spojevima (najčešće kalcit) u svrhu povećanja pH-vrijednosti tla) i industrijsko zagađenje. Različite biljke različito podnose kiselost ili alkalnost tla. Kiselost tla može uzrokovati lošu strukturu, zbijanje, slabu dreniranost i probleme s hranjivima, dok alkalnost tla, česta u suhim klimama, može dovesti do problema s isparavanjem vode i toksičnim efektima natrija. Tla se odupiru promjenama pH-vrijednosti jer čestice tla (poput mineralnih i organskih čestica) vežu ione (npr. kalcija, magnezija, natrija, amonijaka itd.) na svoju površinu, stvarajući adsorpcijski kompleks (čestica-ion). Adsorpcijski kompleks tla doprinosi stabilizaciji pH-vrijednosti prihvaćanjem ili otpuštanjem iona čime se neutralizira prekomjerna kiselost ili lužnatost. U kiselom tlu dolazi do otpuštanja bazičnih iona, poput kalcija, koji ublažavaju kiselost, dok u bazičnom tlu kompleks veže katione i anione čime se smanjuje prekomjerna lužnatost i regulira dostupnost hranjivih tvari. Hranjive tvari, uključujući nitrate, fosfate i kalcij, zadržavaju se unutar adsorpcijskog kompleksa na površinama čestica tla što povećava puferski kapacitet tla i smanjuje osjetljivost na nagle promjene pH-vrijednosti izazvane obradom, gnojidbom ili padalinama. Viši puferski kapacitet

znači da tlo učinkovitije regulira promjene pH-vrijednosti čime se održava ravnoteža hranjivih tvari i omogućuju optimalni uvjeti za rast biljaka.

Tablica 7. Prisutnost soli u tlu ovisno o pH-vrijednosti [10]

pH tla	Vrsta soli	Primjer
< 4,5	slabo topljive soli metala i topljive soli jakih kiselina	$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, AlCl_3 , FeCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$
4,5 – 6,5	slabo topljive soli metala i soli slabo topljivih kiselina	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, MgSO_4 , FeSO_4
6,5 – 7,5	soli slabo topljivih baza i soli slabih kiselina	K_2SO_4 , CaCO_3 , MgCO_3
7,5 – 8,5	soli umjereno topljivih kiselina i baznih kationa	Na_2CO_3 , NaHCO_3 , CaSO_4 , NaCl
> 8,5	soli slabo topljivih baza i visoko topljivih alkaljskih metala	NaOH , KOH , Na_2SO_4 , K_2CO_3 , NaCl

Razlikuju se tri različite pH-reakcije tla koje su važne za razumijevanje kemijskih svojstava tla:

a) *aktualna* ili *trenutačna kiselost* tla odnosi se na koncentraciju slobodnih H^+ i OH^- (manjoj mjeri Al^{3+}) iona u vodenoj suspenziji tla, izraženu kroz pH-vrijednost, a izravno utječe na rast biljaka i aktivnosti mikroorganizama pri čemu visoka kiselost može smanjiti dostupnost hranjivih tvari i ograničiti rast biljaka

b) *supstitucijska kiselost* tla predstavlja prisutnost vodikovih (H^+) iona, a djelomice i aluminijevih (Al^{3+}) i željezovih (Fe^{3+}) iona koji se mogu izmijeniti na adsorpcijskom kompleksu tla pri tretiranju neutralnim solima, najčešće otopinom KCl. Pri dodavanju KCl-a u tlo određuju se ne samo slobodni H^+ ioni već i H^+ ioni vezani na adsorpcijskom kompleksu koji se istiskuju s K^+ kationima čime supstitucijska kiselost daje neposredan uvid u stanje adsorpcijskog kompleksa

c) *hidrolitička kiselost* tla predstavlja ukupnu potencijalnu kiselost tla, odnosno količinu vodikovih (H^+) iona koja se može osloboditi iz adsorpcijskog kompleksa pri neutralizaciji tla baznim solima. Mjeri se neutralizacijom tla, najčešće s natrijevim acetatom (CH_3COONa) ili kalcijevim acetatom ($(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$).

4.1.1. Određivanje aktualne kiselosti tla

Pribor i kemikalije: uzorak tla, vaga, laboratorijska čaša (100 mL), prokuhana destilirana voda, satno staklo, stakleni štapić, filter papir (5 – 13 μm), aparatura za filtraciju, pH-metar, otopine pufera za kalibraciju, pH-elektroda i ubrus.

Postupak: U čašu odvažite 20 g uzorka tla, prethodno osušenog na zraku i dodajte 50 mL prokuhane destilirane vode. *Destilirana se voda prokuhava radi odstranjivanja otopljenog CO_2 koji može utjecati na pH-vrijednost (sniziti pH). Voda se zagrije do vrenja, a zatim ohladi do sobne temperature.* Promiješati suspenziju, poklopiti satnim staklom i ostaviti ju 30 minuta uz povremeno miješanje. Nakon stajanja suspenziju profiltrirati.

Kalibrirati pH-elektrodu, uroniti je u uzorak tla nepoznate pH-vrijednosti i očitati pH.

Izmjerenu pH-vrijednost tla upisati u **Radnu tablicu 2**.

Prema dobivenoj pH-vrijednosti moguće je klasificirati tlo s obzirom na pH-vrijednosti prema sljedećoj tablici.

Tablica 8. Klasifikacija tla prema pH-vrijednosti [11]

Grupa tla	pH
vrlo jako kisela	< 4
jako kisela	4 – 5
umjereno kisela	5 – 6
slabo kisela do neutralna	6 – 7
neutralna do slabo lužnata	7 – 8
umjereno lužnata	8 – 9
jako lužnata	9 – 10
vrlo jako lužnata	> 10

4.1.2. Određivanje supstitucijske kiselosti tla

Pribor i kemikalije: uzorak tla, laboratorijska čaša (200 mL), menzura, KCl (0,1 M), satno staklo, stakleni štapić, filter-papir (5 – 13 μm), aparatura za filtraciju, pH-metar, destilirana voda i ubrus.

Postupak: U čašu odvagati 20 g uzorka tla (prethodno osušenog na zraku) i dodati 50 mL KCl. Promiješati suspenziju, poklopiti satnim staklom i ostaviti ju 30 minuta uz povremeno miješanje. Nakon stajanja suspenziju profiltrirati i izmjeriti pH-vrijednost tla.

Izmjerenu pH-vrijednost tla upisati u **Radnu tablicu 2**.

4.2. Kvantitativno određivanje sadržaja karbonata u tla

Karbonati u tlu potječu najčešće od vapnenca i dolomita u geološkoj podlozi koji se kroz eroziju i kemijske procese raspadaju, oslobađajući CaCO_3 . Taj proces može biti potaknut podzemnim vodama koje otapaju karbonate, a zatim ih talože u tlu. Također, biološki procesi, poput aktivnosti biljaka i mikroorganizama, mogu doprinosti stvaranju i taloženju karbonata u određenim uvjetima. Karbonati u tlu imaju ključnu ulogu u regulaciji kiselosti tla što je presudno važno za rast biljaka. Oni djeluju kao prirodni puferi koji neutraliziraju kisele tvari te održavaju pH-vrijednost tla unutar optimalnog raspona za većinu poljoprivrednih kultura. Određivanje koncentracije karbonata važno je za razumijevanje plodnosti tla i prilagodbu gnojidbenih strategija. Visok sadržaj karbonata može utjecati na dostupnost hranjivih tvari poput fosfora, željeza i mangana. Također, karbonati igraju ulogu u strukturi tla, pomažući u stvaranju stabilnih agregata koji poboljšavaju prozračnost i vodopropusnost. Na temelju analize karbonata, agronomi mogu preciznije planirati mjere za poboljšanje kvalitete tla i povećanje prinosa usjeva. Udio karbonata u tlu može varirati ovisno o vrsti tla i geološkim uvjetima regije. Općenito, karbonati se najčešće nalaze u većim količinama u vapnenačkim tlima, dok ih u kiselim tlima gotovo nema (**Tablica 9**).

Tablica 9. Podjela tla s obzirom na udio karbonata u tlu [11]

Grupa tla	w _{karbonata} (%)
vrlo nisko do niskokarbonatna	< 1
umjereno karbonatna	1 – 5
visokokarbonatna	5 – 15
vrlo visokokarbonatna	> 15

Pribor i kemikalije: vaga, posudica za vaganje, uzorak tla, odmjerna tikvica (500 mL), menzura, HCl (1 M), grijaća ploča, destilirana voda, filter-papir (5 – 13 μm), aparatura za filtraciju, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), kapalica, metiloranž, bireta (50 mL), NaOH (1 M) i laboratorijska čaša (200 mL).

Postupak: U čašu odvagati 2 g uzorka tla (prethodno osušenog na zraku) i dodati 50 mL HCl. Smjesu zagrijavati dok ne prestane pjenjenje, a zatim ju ohladiti. Kvantitativno smjesu prenijeti u odmjernu tikvicu i dopuniti do oznake destiliranom vodom te dobro promućkati. Smjesu profiltrirati kroz filter-papir. Iz filtrata uzeti alikvotni dio uzorka od 100 mL te ga prelići u Erlenmeyerovu tikvicu i dodati nekoliko kapi metiloranža. Uzorak titrirati s pomoću NaOH do promjene boje. *Titraciju ponoviti tri puta*, zabilježiti srednju vrijednost utrošenog volumena NaOH te izračunati % karbonata prema sljedećoj jednadžbi:

$$w(\text{CaCO}_3) = \frac{\bar{V}_{\text{utrošenog NaOH u L}} \cdot M_{\text{NaOH}} \cdot M_{\text{CaCO}_3} \cdot V_{\text{filtrata tla}}}{m_{\text{uzorak tla u g}} \cdot V_{\text{aliquot}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (51).$$

$$V_{\text{filtrata tla}} = 500 \text{ mL}$$

Dobiveni rezultat upisati u **Radnu tablicu 2**.

4.3. Određivanje puferskog kapaciteta tla

Tlo s visokim puferskim kapacitetom uspješno neutralizira pH-promjene, bez obzira na to je li riječ o dodavanju kiselina, baza ili iona. To svojstvo proizlazi iz djelovanja adsorpcijskog kompleksa (skupine površinskih čestica u tlu koje imaju ključnu ulogu u održavanju stabilne pH-vrijednosti). Adsorpcijski kompleks omogućuje privlačenje, zadržavanje i izmjenu iona čime doprinosi konstantnosti pH-vrijednosti tla. Puferski kapacitet tla stabilizira pH-vrijednost neutralizirajući djelovanje dodanih kiselina ili baza, sprječavajući nagle promjene prema

kiselom ili lužnatom smjeru i osiguravajući optimalne uvjete za rast biljaka unatoč vanjskim promjenama.

Pribor i kemikalije: uzorak tla, vaga, posudica za vaganje, Erlenmeyerove tikvice (250 mL), magnetska miješalica, destilirana voda, magnet, magnetni štap, pH-metar, pH-elektroda, bireta (50 mL), HCl (0,1 M), NaOH (0,1 M) i kapalica (kapacitet 1 mL).

Postupak: Odvagati dva puta po 10 g uzorka tla (prethodno osušenog na zraku) i prenijeti u Erlenmeyerove tikvice. U obje Erlenmeyerove tikvice dodati 100 mL destilirane vode i dobivenu suspenziju miješati dvije minute na magnetskoj miješalici. Nakon miješanja izmjeriti početnu pH-vrijednost.

Nakon prvog mjerenja, dodati 2 mL NaOH u jednu Erlenmeyerovu tikvicu i 2 mL HCl u drugu Erlenmeyerovu tikvicu, promiješati suspenzije i izmjeriti pH-vrijednosti. Ponavljati dodavanje po 2 mL (HCl i NaOH) u obje Erlenmeyerove tikvice dok ukupno dodani volumen ne dosegne 20 mL (*ukupno 10 dodataka*).

Nakon svakog dodatka izmjeriti pH-vrijednost i zabilježiti ih u **Radnu tablicu 2**.

Prisutnost kalcijeva karbonata u tlu ima ključnu ulogu u neutralizaciji kiselina (**Jednadžba (58)**).



Međutim, reakcija karbonata (kao što je kalcijev karbonat, CaCO_3) s pomoću NaOH u vodi ne dovodi do značajne kemijske reakcije jer je karbonatni ion (CO_3^{2-}) već baza, a NaOH je jaka baza. Obje su tvari baze, stoga neće doći do tipične neutralizacije kao što bi se dogodilo između kiseline i baze. Međutim, ako bi u tlu bile prisutne kiseline ili kiseli produkti, karbonati bi mogli reagirati s njima. NaOH može reagirati s kiselinama koje su možda prisutne u tlu čime neutralizira te kiseline i tako povećava pH-vrijednost tla.

Huminske i organske kiseline mogu reagirati s dodanim bazama (**Jednadžba (59)**) ili kiselinama (**Jednadžba (60)**), neutralizirajući ih i formirajući soli čime reguliraju pH-vrijednost tla.

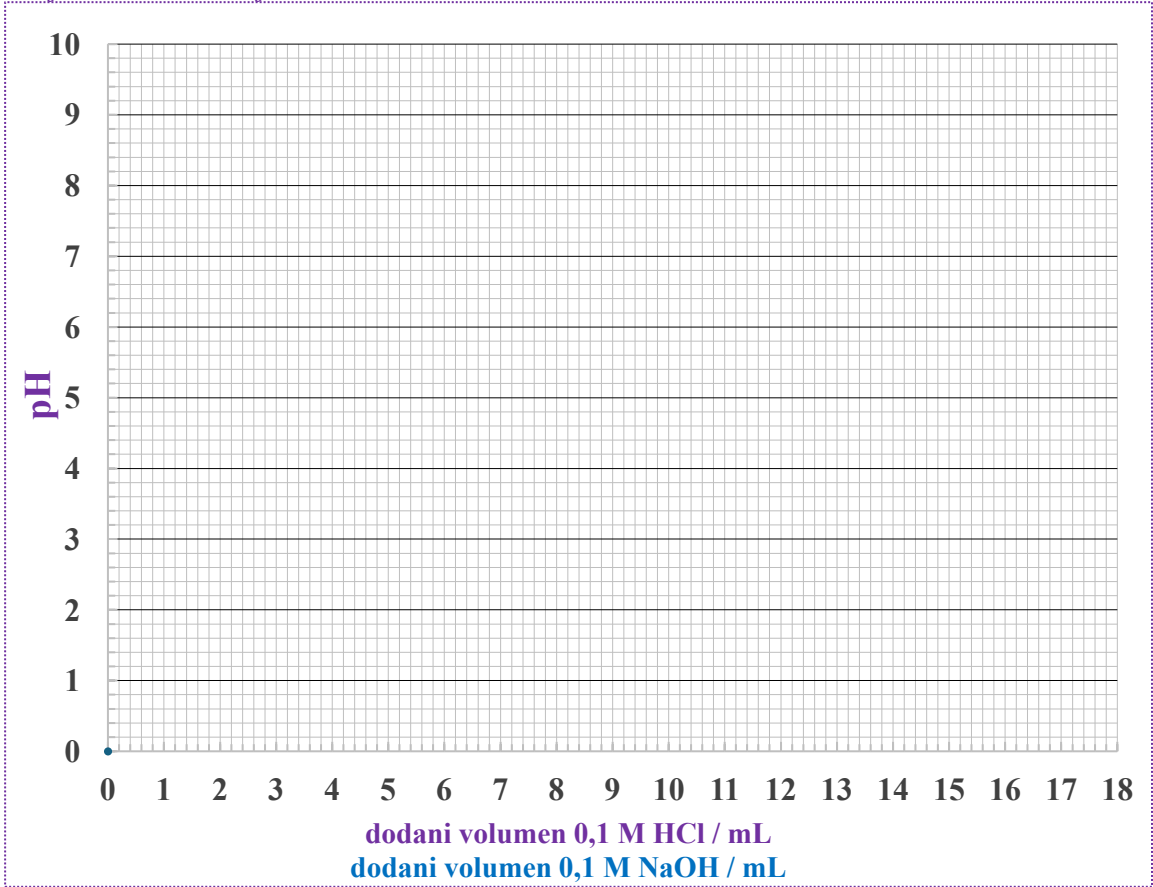


Do određenog volumena dodane kiseline ili baze puferski kapacitet tla uspješno će neutralizirati promjene pH-vrijednosti pa će pH-vrijednost biti gotovo konstantna (ravna crta),

a kada pufer tla više ne može spriječiti promjenu pH-vrijednosti, pH-vrijednost naglo pada (kod kiseline) ili raste (kod baze).



Radna tablica 2.

Analitičko izvješće			
Student/ica:			
Datum uzorkovanja:		Uzorak:	
Parametar	Mjerna jedinica	Rezultat	
pH _{AKTUALNA}	/		
pH _{SUPSTITUCIJSKA}	/		
w (CaCO ₃)	%		
puferski kapacitet tla			
<i>Unijeti dobivene vrijednosti:</i>			
			
Puferska je sposobnost tla bolja u <i>kiselom</i> ili <i>lužnatom</i> mediju. (zaokruži točan odgovor)			
		Pregledao/la:	
		Datum:	

5. ANALIZA UMJETNIH GNOJIVA

Umjetna su gnojiva sintetske tvari koje se dodaju tlu kako bi se poboljšali plodnost i optimalan rast biljaka. Umjetna gnojiva sadržavaju ključne makroelemente za ishranu biljaka koji su često prikazani kao NPK gnojiva s različitim udjelima makroelemenata.

Dušik (N)

Dušik je neophodan za sintezu proteina i nukleinskih kiselina te je dio klorofila. Većina se biljaka koristi dušikom u obliku nitrata (NO_3^-) ili amonijeva iona (NH_4^+).

Fosfor (P)

Kao dio adenzin trifosfata, fosfor je neophodan za energetske procese u biljkama. Također je važan za formiranje korijena i cvatnju. Fosfor se najčešće dodaje u obliku fosfata (PO_4^{3-}).

Kalij (K)

U biljci kalij regulira osmotski tlak i aktivira mnogo enzima potrebnih za metabolizam. Također je ključan za sintezu proteina i škroba. Kalij se u gnojivima najčešće nalazi kao sol kalijev sulfat (K_2SO_4) ili kalijev klorid (KCl).

Mikroelementi

Osim makroelemenata, biljkama su u malim količinama potrebni i mikroelementi poput željeza (Fe), mangana (Mn), cinka (Zn), bakra (Cu), molibdena (Mo), bora (B) i klora (Cl). Ti elementi sudjeluju u enzimskim procesima i sintezi klorofila.

Prema kemijskom sastavu umjetna gnojiva dijele se na jednostavna (mineralna) i kompleksna gnojiva. Jednostavna (mineralna) gnojiva sadržavaju samo jedan hranjivi element, a u tu skupinu ubrajaju se dušična gnojiva (amonijev nitrat (NH_4NO_3), urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), kalcijev nitrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$)), fosforna gnojiva (superfosfat ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), troska ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)) i kalijeva gnojiva (kalijev klorid (KCl), kalijev sulfat (K_2SO_4)). Kompleksna gnojiva sadržavaju dva primarna hranjiva elementa ili više njih i primjerice mogu biti dvokomponentna ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ i KNO_3) ili trokomponentna (mješavina dušika, fosfora i kalija u različitim omjerima).

S primjenom umjetnih gnojiva treba biti vrlo oprezan zbog mogućeg ekološkog utjecaja. Njihova pretjerana uporaba može dovesti do eutrofikacije vodenih tijela što uzrokuje prekomjeren rast algi i smanjenje koncentracije kisika u vodi. Stoga je važno pridržavati se preporučenih doza i redovito provoditi analizu tla radi optimalne primjene umjetnih gnojiva.

Svaki će student dobiti uzorak umjetnog gnojiva koji će analizirati kroz vježbu.

5.1. Kvantitativno određivanje amonijeva i nitratnog oblika dušika u mineralnim gnojivima

Metoda određivanja amonijeva i nitratnog oblika dušika u mineralnim gnojivima temelji se na načelima:

- ekstrakcije (uzorak se gnojiva ekstrahira destiliranom vodom kako bi se dušični spojevi (amonijak i nitrat) prenijeli u tekuću fazu)
- redukcije (nitrati se reduciraju u amonijak upotrebom Devardove legure)
- destilacije (amonijak se destilira iz uzorka u kiselinu što omogućuje odvajanje amonijaka od ostatka uzorka)
- titracije (amonijak u destilatu titrira se s pomoću NaOH kako bi se odredila točna koncentracija amonijaka te se iz mase potrošenog NaOH može izračunati sadržaj koji se nalazi u obliku amonijaka).

Ta metoda omogućuje precizno određivanje različitih oblika dušika u gnojivima što je ključno za ocjenu njihove kvalitete i učinkovitosti.

*Devardova legura jest legura bakra, aluminijska i cinka (49 – 51 % Cu, 44 – 46 % Al, 4 – 6 % Zn) koja se upotrebljava za određivanje nitrata nakon njihove redukcije do amonijaka u lužnatom mediju (**Jednadžba (61)**).*



Pribor i kemikalije: vaga, posudica za vaganje, uzorak umjetnog gnojiva, tarionik i tučak, destilirana voda, menzura, termometar, boca za izmućkivanje (500 mL), odmjerne tikvice (250 mL), pipeta, propipeta, aparatura za destilaciju, tikvica za destilaciju (250 mL), etanol (96 %), Devardova legura, NaOH (40 %), Erlenmeyerova tikvica (300 mL), H₂SO₄ (0,05 M), tašir indikator, NaOH (0,1 M), mrežica za zagrijavanje, tronožac i plamenik/kartuša.

Postupak: Usitniti uzorak umjetnog gnojiva i 2,5 g usitnjenog uzorka dodati u bocu za izmućkivanje. Zatim dodati 25 mL vode (prethodno zagrijane na 60 °C) i mućkati uzorak (*na rotacijskoj mućkalici ili rukama*) 30 minuta. Izmućkani uzorak prenijeti u odmjernu tikvicu i dopuniti destiliranom vodom do oznake.

Pripremiti dvije tikvice za destilaciju te u jednu dodati 25 mL prethodno pripremljenog uzorka, 75 mL destilirane vode, 2,5 mL etanola (*radi smanjenja pjenjenja*) i 10 mL NaOH (40 %), a u drugu 25 mL prethodno pripremljenog uzorka, 75 mL destilirane vode, 2,5 mL etanola, 10 mL NaOH (40 %) i 1,5 g Devardove legure. Tako pripremljene smjese u tikvicama ostaviti da odstoje 15 minuta. Nakon stajanja, uzorke destilirati zagrijavanjem tikvica na mrežici (na tronošcu) iznad plamenika, a destilat prikupljati u obje tikvice predloška (*predložak*: 25 mL H₂SO₄ i 5 – 8 kapi tašir indikatora u Erlenmeyerovoj tikvici). Destilacija je završena kada je ukupan volumen oko 150 mL (destilata i predloška).

Količina prikupljenog destilata ne utječe na izračun udjela dušika jer se kvantitativna analiza temelji na reakciji amonijaka s točno odmjerenim volumenom sumporne kiseline u predlošku. Destilacija se provodi do zapremine od približno 150 mL kako bi se osiguralo potpuno prijelazno „hvatanje“ hlapljivog amonijaka.

Nakon destilacije, uzorak titrirati s pomoću NaOH (0,1 M) do prijelaza boje iz ljubičastosmeđe u zelenu.

Na temelju dobivenih vrijednosti izračunati udio dušika u gnojivu, rezultat zapisati u **Radnu tablicu 3**.

Ukupan dušik (ukupni N): dobiven analizom uz dodatak Devardove legure.

Amonijev dušik (NH₄⁺): dobiven analizom bez Devardove legure.

Nitratni dušik (NO₃⁻): izračunava se kao razlika između ukupnog N i amonijeva N, prema sljedećim jednadžbama:

$$w(\text{NO}_3^-) = w(N_{\text{ukupni}}) - w(N_{\text{NH}_4^+}) \quad [\%] \quad (62)$$

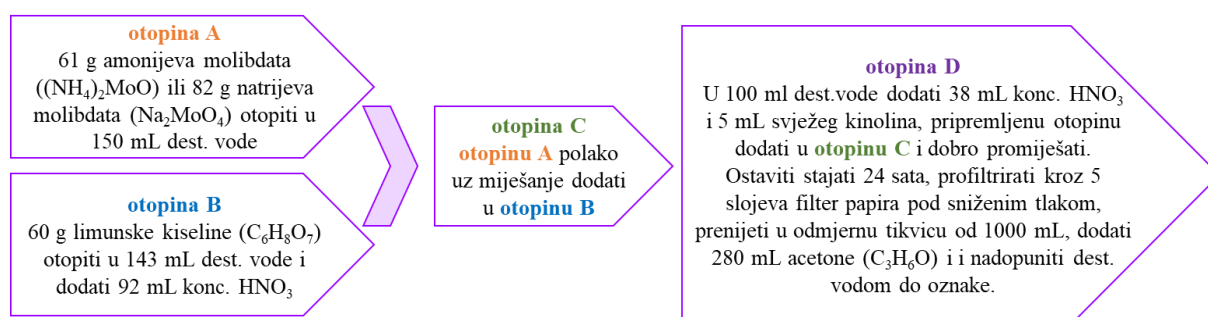
$$w(N_{\text{ukupni; amonijacni}}) = \left(\frac{(V_{\text{H}_2\text{SO}_4} - (V_{\text{NaOH}} \cdot f_b)) \cdot 0,0014}{m_{\text{umjetnog gnojiva}}} \right) \cdot 100 \quad [\%] \quad (63)$$

gdje je $V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$ volumen kiseline koji je dodan u predložak (mL), V_{NaOH} je volumen NaOH utrošen u titraciji, f_b faktor lužine (ako se koristi, titrival iznosi 1, ako se ne koristi, izračunati ga prema $f_b = \frac{c_{\text{nominalna}}}{c_{\text{dobivena}}}$), 0,0014 predstavlja masu dušika koja na sebe veže 1 mL 0,05 M H₂SO₄ (*svaki mililitar 0,05 M H₂SO₄ otopine može neutralizirati 0,0014 grama dušika iz amonijaka*), $m_{\text{umjetnog gnojiva}}$ označava alikvotnu masu uzorka gnojiva, a računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$m_{\text{umjetnog gnojiva}} = \frac{V_{\text{otopine gnojiva za analizu (aliquot)}}}{V_{\text{ukupni volumen pripremljene otopine gnojiva}}} \cdot m_{\text{početna masa gnojiva}} \quad [\text{g}] \quad (64).$$

5.2. Kinolinska metoda

Kinolinska je metoda pouzdana gravimetrijska metoda za određivanje fosfora u mineralnim gnojivima. Uključuje formiranje stabilnog kompleksa kinolin fosformolibdenskog kompleksa $((C_9H_6N)_3PO_4Mo_{12}O_{36})$ izrazito žutog obojenja. Ta se metoda primjenjuje u laboratorijima za provjeru kvalitete gnojiva i drugih poljoprivrednih proizvoda [12]. Prije provođenja kinolinske metode priprema se otopina koja se upotrebljava za kvantitativno određivanje fosfora u umjetnim gnojivima, tzv. **otopina D**. Postupak pripreme te otopine prikazan je na **Slici 13**.



Slika 13. Postupak pripreme otopine D za određivanje fosfora kinolinskom metodom (otopinu priprema laborant, čuva se u hladnjaku)

Pribor i kemikalije: uzorak umjetnog gnojiva, tarionik, tučak, posudica za vaganje, vaga, reagens boca, limunska kiselina $(C_6H_8O_7, 2 \%)$, destilirana voda, filter-papir $(5 - 13 \mu m)$, aparatura za filtraciju, odmjerna tikvica (500 mL), koncentrirana HNO_3 , **otopina D**, kapalica, menzure, mrežica za zagrijavanje, tronožac, plamenik/kartuša, vata, Büchnerov lijevak, termometar i ladice.

Postupak: Odvagati 5 g prethodno usitnjenog umjetnog gnojiva. U jednu reagens bocu dodati 300 mL otopine limunske kiseline (**uzorak 1** koji predstavlja slijepu probu), dok u drugu dodati 300 mL otopine limunske kiseline i izvagani uzorak umjetnog gnojiva (**uzorak 2**). Mućkati reagens boce 30 minuta (*na rotacijskoj mućkalici ili rukama*). Nakon mućkanja prenijeti sadržaj u odmjerne tikvice i dopuniti destiliranom vodom do oznake. Nakon što se sadržaji odmjernih tikvica promućkaju, otopine se filtriraju. Prvih približno 50 – 70 mL filtrata odbacuje se kako bi se uklonile moguće početne nečistoće ili mutnoće koje bi mogle utjecati na točnost određivanja. Filtracija se potom nastavlja izravno u čiste Erlenmeyerove tikvice.

Nakon što je cijeli volumen otopina profiltriran, iz svakog filtrata (**uzorak 1** i **uzorak 2**) odmjeri se po 20 mL otopine/uzorka za nastavak analize.

U obje Erlenmeyerove tikvice dodati: 16 mL HNO₃, 64 mL destilirane vode i 50 mL **otopine D**. Zatvoriti ih vatom i zagrijati na mrežici (na tronošcu) iznad plamenika do 75 °C (*Provjeravati temperaturu termometrom!*). Nakon zagrijavanja do zadane temperature, sadržaj tikvica ohladiti te profiltrirati preko Büchnerova lijevka. Taloge staviti na prethodno izrađene, označene i izvagane lađice te ih ostaviti sušiti u eksikatoru do idućeg termina.

U idućem terminu izvagati lađice s talozima i prema masi taloga izračunati udio fosfora (**Jednadžba (65)**) u danom uzorku umjetnog gnojiva te rezultat upisati u **Radnu tablicu 3**.

$$w(\text{P}_2\text{O}_5) = \frac{(m_{\text{uzorak 2}} - m_{\text{uzorak 1}}) \cdot f_{\text{konverzije}}}{m_{\text{umjetnog gnojiva}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (65)$$

gdje je $m_{\text{uzorak 2}}$ masa **uzorka 2** u gramima (kinolin fosfomolibdata), $m_{\text{uzorak 1}}$ je masa **uzorka 1** u gramima, $f_{\text{konverzije}}$ jest faktor konverzije kinolin fosfomolibdata u P₂O₅ = 0,032074, $m_{\text{umjetnog gnojiva}}$ označava alikvotnu masu uzorka gnojiva, a računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$m_{\text{umjetnog gnojiva}} = \frac{V_{\text{otopine gnojiva za analizu (aliquot)}}}{V_{\text{ukupni volumen pripremljene otopine gnojiva}}} \cdot m_{\text{početna masa gnojiva}} \quad [\text{g}] \quad (66).$$

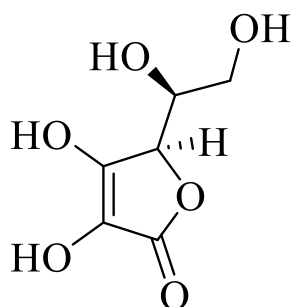


Radna tablica 3.

Analitičko izvješće		
Student/ica:		
Uzorak:		
Parametar	Mjerna jedinica	Rezultat
$w(N_{\text{ukupni}})$	%	
$w(N_{\text{NO}_3^-})$	%	
$w(N_{\text{NH}_4^+})$	%	
$w(P_2O_5)$	%	
	Pregledao/la:	
	Datum:	

6. ODREĐIVANJE ASKORBINSKE KISELINE

Askorbinska kiselina, poznatija kao vitamin C ($C_6H_8O_6$, (5*R*)-[(1*S*)-1,2-dihidroksietil]-3,4-dihidroksifuran-2(5*H*)-on) (**Slika 14.**), pojavljuje se kao bijela do blijedožuta kristalinična tvar bez mirisa, karakterističnog kiselkastog okusa. Ta tvar pripada skupini vitamina topljivih u vodi, dobro se otapa i u alkoholu, a njezina je topljivost u kloroformu i eteru zanemariva.



Slika 14. Strukturni prikaz molekule vitamina C

Vitamin C ima snažna antioksidacijska svojstva i sudjeluje u brojnim metabolički važnim procesima, najčešće kao pomoćna molekula (kofaktor) u djelovanju enzima. Za razliku od mnogih životinjskih vrsta koje ga sintetiziraju same, čovjek nije sposoban endogeno ga proizvesti što ga svrstava u skupinu esencijalnih mikronutrijenata koje je potrebno unositi hranom ili dodacima prehrani. Preporučeni dnevni unos za zdravu odraslu populaciju iznosi 90 mg za muškarce i 75 mg za žene iako potrebe mogu varirati ovisno o dobi, zdravstvenom stanju, navikama i izloženosti stresu. Nedostatna konzumacija može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema – najpoznatiji je skorbut, bolest koja se javlja zbog poremećaja u sintezi kolagena što se očituje krvarenjem desni, slabim zacjeljivanjem rana, ispadanjem zubi i općim slabljenjem organizma.

Najbolji su izvori vitamina C svježe voće i povrće. Međutim, njegova količina u namirnicama može znatno varirati (**Tablica 10.**), ovisno o vrsti biljke, stupnju zrelosti, uvjetima uzgoja, načinu skladištenja te načinu termičke obrade. Budući da se askorbinska kiselina lako razgrađuje pod utjecajem topline i kisika, dulje čuvanje i kuhanje mogu znatno smanjiti njezinu koncentraciju [13].

Tablica 10. Sadržaj vitamina C u namirnicama [14]

Namirnica	Veličina porcije	Količina (µg)
peršin	2 žlice	10,0
jagode	1 šalica	81,7
cvjetača	1 šalica	54,9
limunov sok	0,25 šalice	28,1
naranče	1	69,7
rajčice	1 šalica	34,4
maline	1 šalica	30,8
tikvice	1 šalica	9,9

Vitamin C prvi je put izolirao 1927. godine dr. A. Szent-Györgyi, a već nekoliko godina kasnije započela je njegova komercijalna primjena u obliku dodataka prehrani. Danas je postao jedno od najčešće upotrebljivanih sredstava u prevenciji prehlada i za potporu imunološkom sustavu. Pri analizi pripravaka koji sadržavaju vitamin C valja uzeti u obzir i ostale sastojke u formulaciji jer oni mogu utjecati na izbor metode određivanja koncentracije askorbinske kiseline u uzorku.

6.1. Određivanje askorbinske kiseline u farmaceutskom pripravku vitamina C

Titracijska je metoda uobičajena metoda za određivanje askorbinske kiseline u uzorku. Titracija se najčešće provodi s pomoću NaOH gdje dolazi do reakcije slabe askorbinske kiseline i jake lužine prema sljedećoj jednadžbi:



Tijekom titracije, promjena boje indikatora signalizira točan trenutak neutralizacije koji ujedno predstavlja završnu točku titracije. Na temelju tog utroška i poznate koncentracije NaOH, određuje se točna koncentracija askorbinske kiseline u uzorku.

Svaki će student dobiti farmaceutski pripravak vitamina C u kojem određuje količinu askorbinske kiseline.

Pribor i kemikalije: posudica za vaganje, vaga, uzorak vitamina C, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), menzura, bireta (50 mL), destilirana voda, fenolftalein i NaOH (0,1 M).

Postupak: Odvagati 40 – 50 mg uzorka vitamina C te zabilježiti točnu masu. Sadržaj prebaciti u Erlenmeyerovu tikvicu i otopiti u 50 mL zagrijane destilirane vode (*ne vruće!*). Nakon što se cjelokupan sadržaj otopi, titrirati s pomoću NaOH uz fenolftalein kao indikator.

Titraciju ponoviti tri puta.

Izračunati prosječnu vrijednost dobivenih rezultata, zatim prema **Jednadžbi (68)** odrediti masu askorbinske kiseline u uzorku, a na temelju **Jednadžbe (69)** izračunati iskorištenje.

$$m(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = c_{\text{NaOH}} \cdot \bar{V}_{\text{NaOH}} \cdot M_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6} \quad [\text{g}] \quad (68)$$

gdje je c_{NaOH} koncentracija NaOH upotrijebljenog za titraciju, V_{NaOH} utrošeni volumen NaOH u litrama, $M_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6}$ je molarna masa vitamina C koja iznosi 176,124 g/mol.

$$\text{Iskorištenje} = \frac{m_{\text{vitamin C;eksperimentalno}}}{m_{\text{vitamin C;teorijski}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (69)$$

Rezultat zapisati u **Radnu tablicu 4**.

6.2. Određivanje askorbinske kiseline u kuhanom i svježem voću i povrću

Svaki će student dobiti svježi uzorak paprike i limuna kako bi odredio količinu askorbinske kiseline te usporedio rezultate između sirova i kuhanjem pripremljena uzorka.

Pribor i kemikalije: uzorak svježe paprike (400 g) i limuna (400 g), kuhinjska sjeckalica, gaza, vaga, posudica za vaganje, odmjerna tikvica (100 mL), laboratorijska čaša (200 mL), grijaća ploča, Erlenmeyerova tikvica (250 mL), kapalica, škrob (1 %), otopina joda (0,025 M), bireta (50 mL).

Postupak:

Priprema voća i povrća: Odvagano je po 200 g svježeg i 200 g prethodnog skuhanog (otprilike 25 minuta u laboratorijskoj čaši na grijaćoj ploči) uzorka paprike i limuna. Uzorci se trebaju usitniti s pomoću sjeckalice, a zatim procijediti kroz gazu u odmjernu tikvicu. Ako je potrebno, tikvicu dopuniti destiliranom vodom te sadržaj dobro promućkati (ručno).

Priprema uzorka za titraciju: Za titraciju uzeti 25 mL od svakog uzorka (sveukupno 4 uzorka), prenijeti u Erlenmeyerovu tikvicu i dodati deset kapi škroba. Uzorak titrirati otopinom joda. Tijekom titracije pojaviti će se plavoljubičasto obojenje koje će biti postojano i nakon dvadesetak sekundi. Zabilježiti utrošenu količinu joda, a *titraciju ponoviti tri puta.*

Srednju vrijednost dobivenih rezultata zabilježiti i izračunati masenu koncentraciju askorbinske kiseline u kuhanom i svježem uzorku prema sljedećoj jednadžbi:

$$w(\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6) = \frac{c_{\text{jod}} \cdot V_{\text{jod}} \cdot M_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6} \cdot V_{\text{ukupno}}}{V_{\text{aliquot}} \cdot m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (70)$$

$$n_{\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6} = n_{\text{jod}}; m_{\text{ukupno}} = m_{\text{aliquot}} \cdot \frac{V_{\text{ukupno}}}{V_{\text{aliquot}}}.$$

Rezultate zapisati u **Radnu tablicu 4**.



Radna tablica 4.

Analitičko izvješće			
Student/ica:			
Datum :			
Uzorak	Parametar	Mjerna jedinica	Rezultat
iskorištenje	$C_6H_8O_6$	%	
kuhana paprika	$w(C_6H_8O_6)$	%	
svježa paprika	$w(C_6H_8O_6)$	%	
kuhani limun	$w(C_6H_8O_6)$	%	
svježi limun	$w(C_6H_8O_6)$	%	
	Pregledao/la:		
	Datum:		

7. POTENCIOMETRIJSKO ODREĐIVANJE SADRŽAJA HNO₃ I H₃PO₄ U SMJESI

Potenciometrija je elektroanalitička metoda kojom se mjeri razlika potencijala između referentne i indikatorske elektrode uz ravnotežne uvjete. Pri mjerenju kroz sustav teče vrlo mala struja koja ne može utjecati na mjerljivo stanje ravnoteže na elektrodama. Mjerni je potencijal proporcionalan logaritmu aktiviteta analita. Osnovu potenciometrije čini Nernstova jednadžba (**Jednadžba (71)**) koju je 1889. godine razvio Walther Nernst u svojoj poslijedoktorskoj disertaciji pod naslovom *Elektromotorna djelotvornost iona* čime je postavio temelje moderne elektrokemije:

$$E = E^0 + \frac{2,303RT}{zF} \log a_{analit} \quad (71)$$

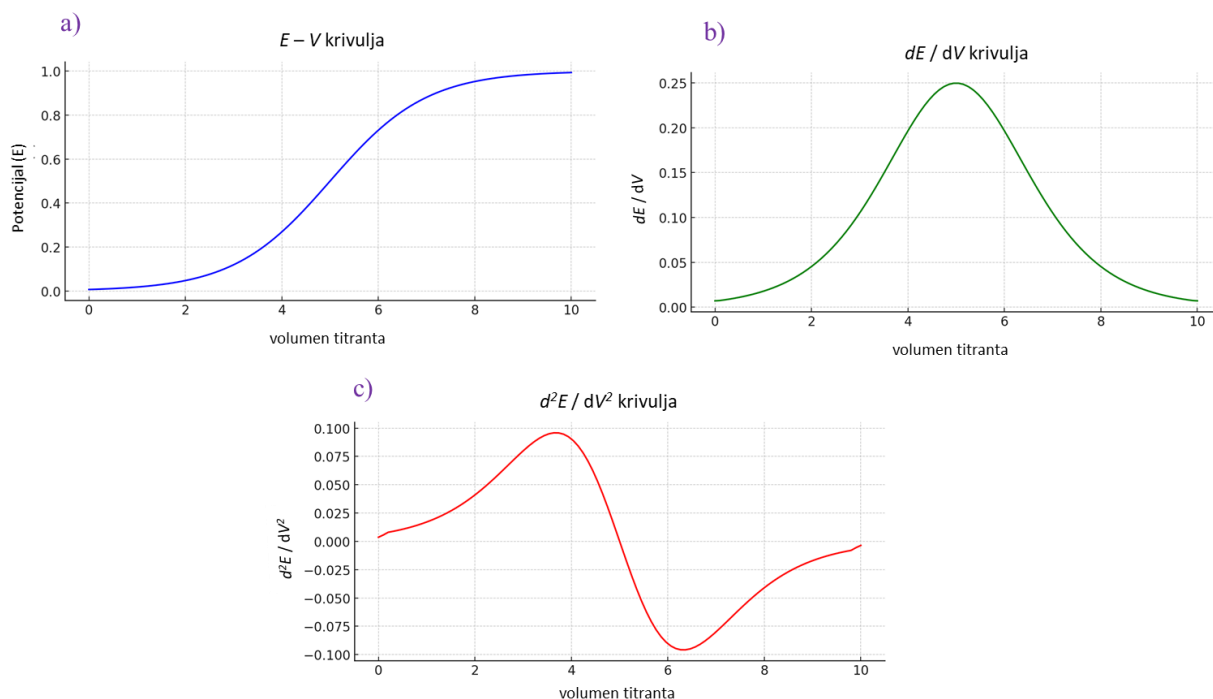
gdje je E potencijal indikatorske elektrode, E^0 je standardni redukcijski potencijal, R je opća plinska konstanta (8,3143 J/Kmol), F je Faradayeva konstanta (96 487 C/mol), T je apsolutna temperatura (K), a_{analit} je aktivitet analita, dok je z naboj iona analita.

Izraz u razlomku ($\frac{2,303RT}{zF}$) predstavlja Nernstov nagib elektrode (S , engl. *slope*) i on pri standardnoj temperaturi (298 K) iznosi 0,059 za jednovalentne katione ($z = 1$). Nagib odgovara promjeni potencijala sustava uzrokovanoj pri promjeni aktiviteta analita za jedan red veličine (faktor 10), što znači kad se aktivitet iona poveća ili smanji 10 puta, potencijal se promijeni za 59 mV. Taj izraz vrijedi samo pri idealnim uvjetima, odnosno kada elektroda ima odziv samo na ione analita.

Potenciometrijska je titracija volumetrijska metoda kojom se mjeri potencijal između dviju elektroda kao funkcija dodanog volumena titranta. Kod klasične titracije potreban je indikator za uočavanje završne točke titracije, no kod potenciometrijske titracije nije potreban jer se završna točka titracije određuje s pomoću instrumenta što otklanja subjektivnost analitičara, a mjerenje postaje preciznije i točnije. Ako se potenciometrijska titracija izvodi automatiziranim uređajem, prilikom mjerenja instrument dodaje točno određeni, unaprijed zadani volumen titranta te se nakon dodatka bilježe potencijal, pH-vrijednost, temperatura i dr.

Postoje tri različita oblika potenciometrijske krivulje, a prema njima i tri načina određivanja završnih točki titracije (**Slika 15.**):

- a) E - V krivulja – prikazuje ovisnost potencijala o volumenu titranta, a volumen završne točke titracije određuje se vizualno pri čemu je točka infleksije i završna točka titracije
- b) dE/dV krivulja – prikazuje ovisnost prve derivacije potencijala po volumenu, a volumen završne točke titracije jest maksimum krivulje
- c) d^2E/dV^2 krivulja – ovisnost druge derivacije po volumenu, nema točke infleksije, a volumen završne točke titracije određuje se iz sjecišta krivulje druge derivacije s x-osi.



Slika 15. Grafički prikaz krivulja : a) E - V krivulja, b) dE/dV krivulja i c) d^2E/dV^2 krivulja

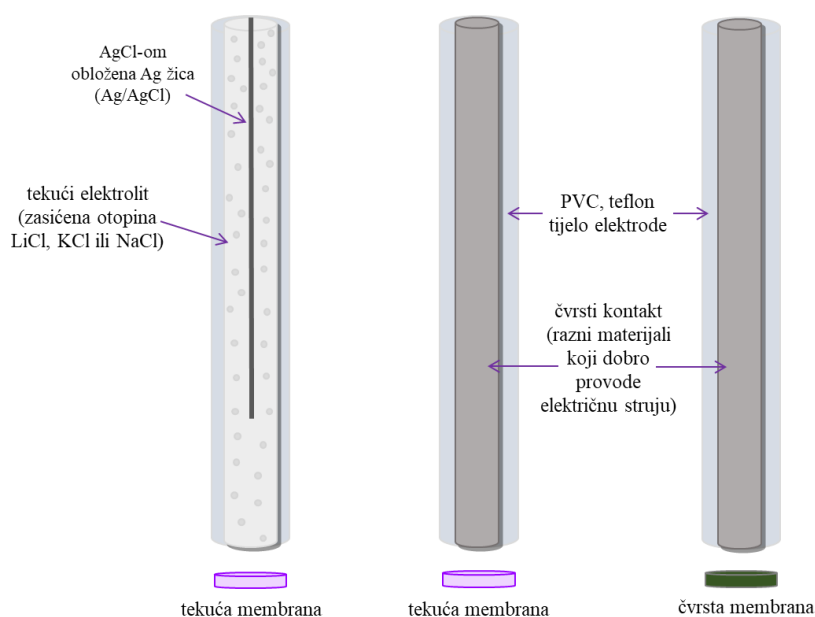
Svaki potenciometrijski sustav sadržava indikatorsku i referentnu elektrodu.

Referentne elektrode jesu elektrode čiji je potencijal točno poznat te ne ovisi o koncentraciji analita i drugih prisutnih iona u otopini. One pri prolasku malih struja zadržavaju stalan potencijal (pri 25 °C). Neki su primjeri referentnih elektroda: kalomel elektroda (Hg/HgCl , +0,244 V), srebro / srebrov klorid elektroda (Ag/AgCl , +0,197 V), standardna vodikova elektroda (SHE, 0,000 V) i sulfatna elektroda ($\text{Hg}/\text{Hg}_2\text{SO}_4$, +0,611 V).

Indikatorske su elektrode one čiji će potencijal ovisiti o aktivitetu analita. Većina indikatorskih elektroda daje visokoselektivan odziv na ione analita koji bi u idealnom slučaju trebao biti brz i reproducibilan. Razlikuju se prema načinu nastajanja razlike potencijala na dodirnoj površini

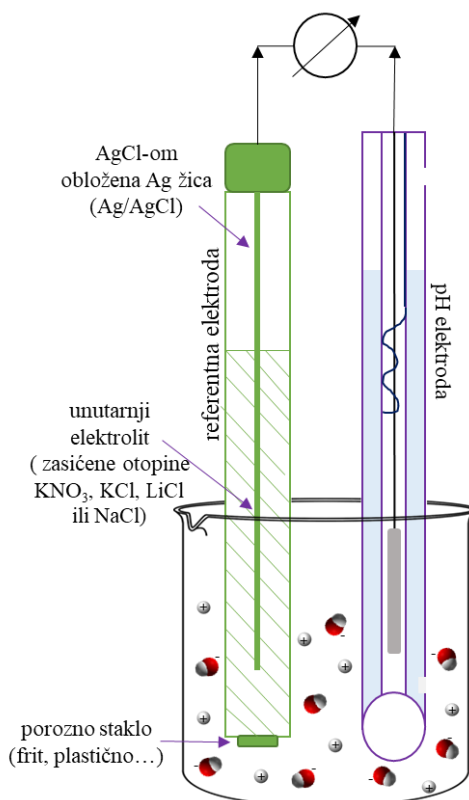
elektrode i otopine, stoga se dijele na kovinske i membranske elektrode. Membranske elektrode nazivaju se još i p-ionske elektrode zbog toga što se dobiveni rezultati najčešće pokazuju kao p-funkcije (npr. pH-vrijednost). Kod kovinskih elektroda redoks-reakcija na elektrodi uzrokuje razliku potencijala, dok se kod membranskih elektroda potencijal dobiva promjenom slobodne entalpije prijelaza iona, ionskom izmjenom ili nekom drugom reakcijom u međusloju između membrane i otopine analita.

Ion-selektivne elektrode (ISE) pripadaju najstarijoj skupini indikatorskih (membranskih) elektroda, a danas su rutinski alat za različite analize u industriji, klinikama, u analizi okoliša itd. Prema IUPAC-u dijele se na ISE s čvrstom membranom i čvrstim unutarnjim kontaktom (engl. *all-solid-state*), staklene elektrode s tekućim unutarnjim elektrolitom te ISE s tekućom membranom koje mogu biti klasične s tekućim elektrolitom ili s čvrstim kontaktom i tekućom polimernom membranom (engl. *solid-state*) (**Slika 16.**).



Slika 16. Slikoviti prikaz različitih vrsta ISE-a

Staklena elektroda osjetljiva na H^+ ione u otopinama, točnije pH-elektroda, najstarija je ISE, a počela se upotrebljavati još davne 1930. godine (**Slika 17.**).



Slika 17. Slikoviti prikaz elektrodnog sustava za mjerenje pH-vrijednosti
(Detaljan opis građe pH-elektrode prikazan je na slici 5.)

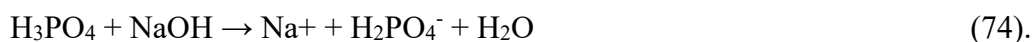
Načelo rada pH-elektrode temelji se na razlici potencijala koja nastaje između pH-elektrode i referentne elektrode. Donji dio pH-elektrode sadržava membranu koja je osjetljiva na H^+ ione, a razlika potencijala koja nastaje ovisi o koncentraciji H^+ iona u otopini čime se precizno određuje kiselost ili lužnatost otopine. Razlika potencijala proporcionalna je pH-vrijednosti te se može izračunati prema Nernstovoj jednadžbi:

$$E = E^0 - \frac{2,303RT}{nF} \text{pH} \quad (72).$$

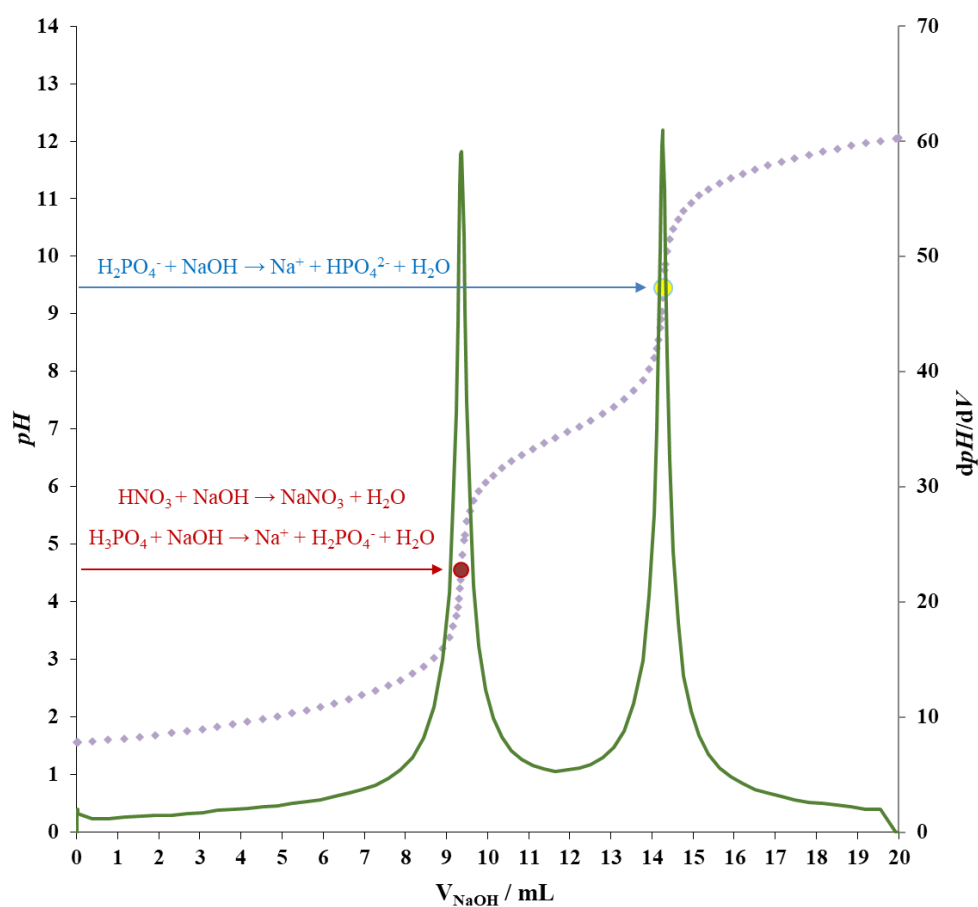
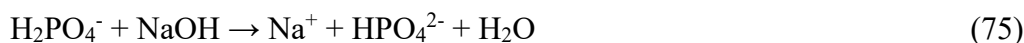
Svaki će student dobiti uzorak koji sadržava smjesu kiselina, a na temelju rezultata dobivenih potenciometrijskom titracijom odredit će točan sadržaj kiselina u smjesi.

Određivanje sadržaja HNO_3 i H_3PO_4 u smjesi zasniva se na potenciometrijskoj titraciji s pomoću NaOH uz pH-elektrodu kao detektor završne točke titracije. Na titracijskoj krivulji bit će vidljive dvije infleksijske točke, tj. dvije završne točke titracije. Prva završna točka titracije odgovarat će neutralizaciji HNO_3 (jaka kiselina i neutralizirat će se prva (**Jednadžba (73)**)), a istovremeno će se neutralizirati prvi proton iz H_3PO_4 tvoreći H_2PO_4^- ion (**Jednadžba (74)**). U

tom će slučaju završna točka titracije biti između pH 4 i 5. Iako pK_a od H_3PO_4 iznosi 2,15, prisutnost HNO_3 rezultirat će porastom pH-vrijednosti u toj završnoj točki titracije. Neutralizacija jake kiseline (HNO_3) prije slabije kiseline (H_3PO_4) dovodi do stvaranja slabije kiselog oblika (H_2PO_4^-) što uzrokuje višu pH-vrijednost nego da je u otopini prisutna samo fosforna kiselina:



Druga će završna točka titracije biti u trenutku neutralizacije drugog protona iz H_3PO_4 (**Jednadžba (75)**) pri pH-vrijednosti 8 – 9 što odgovara $pK_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 7,2$. Ako se dobije veća pH-vrijednost pri drugoj završnoj točki titracije (pH = 9,2 – 9,5), kao što je prikazano na **Slici 18.**, može se objasniti lužnatijim uvjetima nakon prve završne točke titracije.



Slika 18. Potenciometrijska titracijska krivulja i njezina prva derivacija smjese HNO_3 i H_3PO_4 uz NaOH kao titrant i pH-elektrodu kao detektor završnih točaka titracije

Pribor i kemikalije: uzorak smjese kiselina (H_3PO_4 i HNO_3), vaga, laboratorijska čaša (100 mL), automatski titrator, pH-elektroda, referentna elektroda, odmjerna tikvica (50 mL), NaOH (0,5 M), destilirana voda, pipeta i propiteta.

Postupak: Izvagati laboratorijsku čašu prije dodavanja uzorka, zatim i s uzorkom, kako bi se dobila masa uzorka. Nakon vaganja dodati u čašu s uzorkom 50 mL destilirane vode i uzorak titrirati s pomoću NaOH i automatskog titratora.

Dobivene pH-vrijednosti i volumene završnih točaka titracije unijeti u **Radnu tablicu 5** za obje kiseline te izračunati sadržaj kiselina u uzorku prema sljedećim jednadžbama:

$$w(\text{H}_3\text{PO}_4) = \frac{2 \cdot (V_2 - V_1) \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot M_{\text{H}_3\text{PO}_4}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (76)$$

$$w(\text{HNO}_3) = \frac{[V_2 - (2 \cdot (V_2 - V_1))] \cdot c_{\text{NaOH}} \cdot M_{\text{HNO}_3}}{m_{\text{uzorka}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (77)$$

gdje je V_1 volumen NaOH potreban do prve završne točke titracije koja odgovara potpunoj neutralizaciji HNO_3 i neutralizaciji prvog protona iz H_3PO_4 ; V_2 označava volumen NaOH potreban do druge završne točke titracije pri kojoj se dodatno neutralizira i drugi proton iz H_3PO_4 .

Volumen NaOH potrošen za neutralizaciju fosforne kiseline računa se prema sljedećem izrazu iz **Jednadžbe (76)**: $2 \cdot (V_2 - V_1)$.

Budući da H_3PO_4 u tom slučaju donira dva protona, ukupna količina NaOH potrebna za neutralizaciju H_3PO_4 mora biti dvostruka u odnosu na razliku između druge i prve završne točke.

Volumen NaOH koji je utrošen isključivo za neutralizaciju HNO_3 računa se prema sljedećem izrazu iz **Jednadžbe (77)**: $V_2 - 2 \cdot (V_2 - V_1) = V_2 - 2V_2 + 2V_1 = 2V_1 - V_2$.

Tim oduzimanjem volumena potrošenog na neutralizaciju H_3PO_4 od ukupnog volumena do V_2 dobiva se volumen NaOH koji je neutralizirao samo HNO_3 :

$$m(\text{H}_3\text{PO}_4) = \frac{m_{\text{uzorka}} \cdot w_{\text{H}_3\text{PO}_4}}{100} \quad [\text{g}] \quad (78)$$

$$V(\text{H}_3\text{PO}_4) = \frac{m_{\text{H}_3\text{PO}_4}}{\rho_{\text{H}_3\text{PO}_4}} \quad [\text{mL}] \quad \rho_{\text{H}_3\text{PO}_4} = 1,685 \text{ g/mL} \quad (79)$$

$$m(\text{HNO}_3) = \frac{m_{\text{uzorka}} \cdot w_{\text{HNO}_3}}{100} \quad [\text{g}] \quad (80)$$

$$V(\text{HNO}_3) = \frac{m_{\text{HNO}_3}}{\rho_{\text{HNO}_3}} \quad [\text{mL}] \quad \rho_{\text{HNO}_3} = 1,51 \text{ g/mL} \quad (81).$$

Radna tablica 5.

Analitičko izvješće		
Student/ica:		
Oznaka uzorka:		
Parametar	Mjerna jedinica	Rezultat
V_1	mL	
pH_{V_1}	/	
V_2	mL	
pH_{V_2}	/	
$w(\text{H}_3\text{PO}_4)$	%	
$w(\text{HNO}_3)$	%	
$V(\text{H}_3\text{PO}_4)$	mL	
$V(\text{HNO}_3)$	mL	

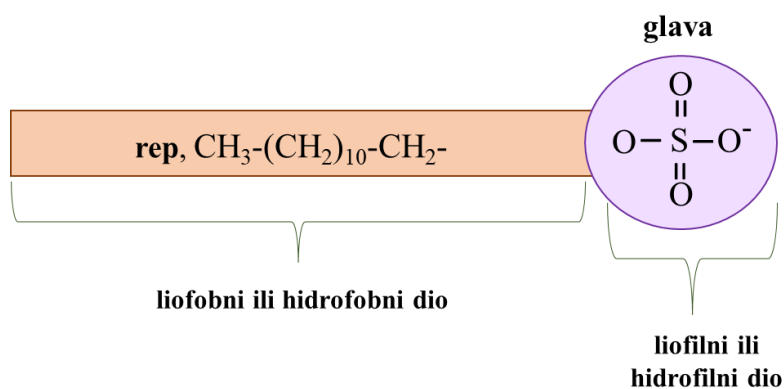
Skicirati dobivenu potenciometrijsku krivulju:

Pregledao/la:	
Datum:	

8. POTENCIOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ANIONIŠKIH TENZIDA U UZORKU

Površinski aktivne tvari (engl. *surface active agents* ili *surfactants*) ili tenzidi (lat. *tendo*, *tendere* = napinjati, engl. *tension* = napetost) jesu tvari koje imaju svojstvo snižavanja površinske napetosti. Tipični je tenzid alifatska molekula s dugim nepolarnim lancem i polarnom glavom. Najčešće je riječ o ugljikovodičnom, a ponekad i fluorougljičnom lancu. Tenzidi se nalaze u prirodi, a mogu se dobiti i sintetskim putem. U prirodi se nalaze kao fosfolipidi od kojih su građene stanične membrane. Oni dobiveni sintetskim putem mogu biti u praškastom obliku (praškasti deterdženti), u obliku vodenih otopina (tekući deterdženti, šamponi, dezinficijensi) i emulzija (kozmetički preparati, sredstva za čišćenje podova i metalnih površina).

To su bifunkcionalni spojevi koji se sastoje od polarne ili liofilne (engl. *solvent-loving group*) glave i nepolarnog ili liofobnog (engl. *solvent-fearing group*) repa, no ako je otapalo voda, tada je riječ o hidrofilnoj glavi i hidrofobnom repu (**Slika 19.**). Hidrofilna skupina čini tenzid topljivim u polarnim otapalima poput vode, a hidrofobna skupina čini tenzid topljivim u nepolarnim otapalima kao što je ulje. Hidrofilna je skupina uglavnom pozitivno ili negativno nabijena, a hidrofobna je skupina dugački ugljikovodični lanac koji nema naboja. Hidrofilna skupina može biti sastavljena od iona (poput sulfonata, sulfata, karbonata, fosfata i kvaternih amonijevih soli), polarnih skupina (primarnih amina, amin oksida, sulfoksida i fosfooksida) i nepolarnih skupina s elektronegativnim atomom (kisikov atom u eterima, aldehydima, ketonima, esterima i dušikov atom u amidima, nitroalkanima i aminima).



Slika 19. Shematski prikaz dijelova molekule anionskog tenzida

Prema hidrofilnom dijelu molekule i njihovu elektrokemijskom ponašanju tenzidi se dijele u četiri glavne skupine (**Slika 20.**):

a) *anionski tenzid (AT)*

- površinski aktivne tvari koje u vodenim otopinama ioniziraju na negativno nabijene površinski aktivne organske ione
- najčešće ih nalazimo u praškastim deterdžentima za pranje rublja i dodaju se proizvodima za osobnu njegu
- po kemijskom su sastavu alkil sulfati, alkilbenzen sulfati, sulfosukcinati i sulfati masnih alkohola

b) *kationski tenzidi (KT)*

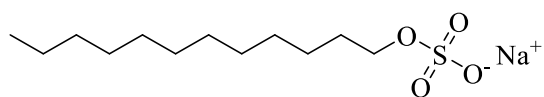
- površinski aktivne tvari koje u vodenim otopinama ioniziraju na pozitivno nabijene površinski aktivne organske ione
- najčešće ih nalazimo u omekšivačima za rublje, dezinficijensima, antisepticima i proizvodima za njegu kože, u sastavu fungicida i u sredstvima za inhibiciju korozije
- po kemijskom sastavu su kvaterne amonijeve soli, soli amina i piridinske soli

c) *neionski tenzidi (NT)*

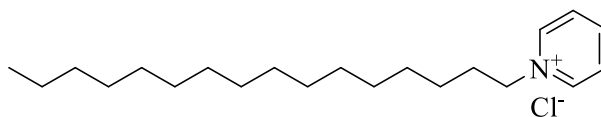
- površinski aktivne tvari koje ne disociraju u vodenoj otopini
- topljivost neionskih tenzida u vodi potječe od funkcionalnih grupa u njihovoj strukturi s jakim afinitetom prema vodi, biorazgradivi su, blago djeluju na kožu i imaju veliku moć pjenjenja
- po kemijskom su sastavu derivati etilen oksida (etoksilati), masni alkanolamidi, amin oksidi i esteri

d) *amfolitski tenzidi (AT)*

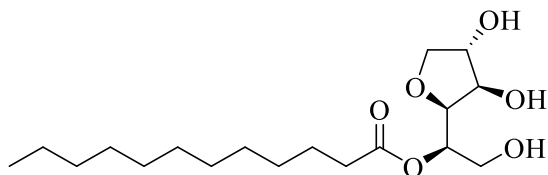
- površinski aktivne tvari ovisno o uvjetima sredine (osobito pH-vrijednost), mogu ionizirati u anionski ili kationski oblik
- ionizacija amfolitskih tenzida u širem je smislu analogna ponašanju amfoternih spojeva
- po kemijskom su sastavu aminopropionati i iminodipropionati, imidazoli i betaini.



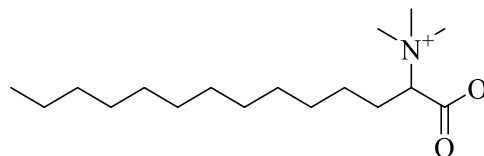
Anionski tenzid
natrijev dodecilsulfat ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$,
 $M_r=288,37$)



Kationski tenzid
cetilpiridinijev klorid ($\text{C}_{21}\text{H}_{38}\text{ClN}$), $M_r=358,00$



Neionski tenzid
Span 20 ($\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_6$), $M_r=346,46$

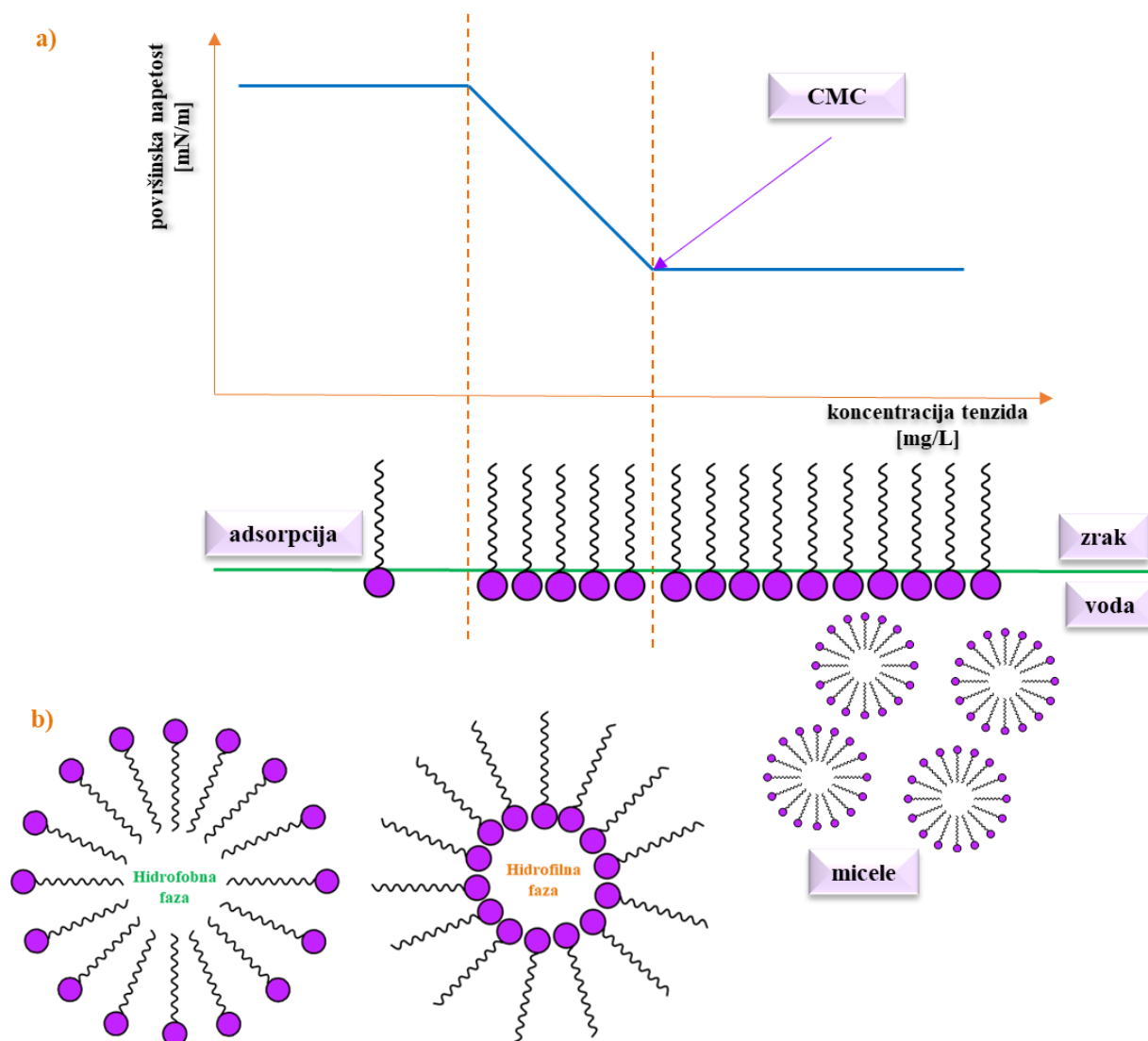


Amfolitski tenzid
lauril betain ($\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{NO}_2$), $M_r=271,45$

Slika 20. Strukturni prikaz tenzida s njihovom molekulskom formulom i molarnom masom

Monomeri molekula tenzida slabo su topljivi u vodi i nagomilavaju se na graničnim površinama, stoga se malim promjenama koncentracije tenzida jako smanjuje površinska napetost. Daljnjim povećanjem koncentracije tenzida u otopini se formiraju micide koje su vrlo topljive u vodi i ne utječu na površinsku napetost. Micide se u tom području nalaze u termodinamičkoj ravnoteži s monomerima. Karakteristična koncentracija pri kojoj su monomeri i micide u termodinamičkoj ravnoteži naziva se kritična micelarna koncentracija (CMC, engl. *critical micelle concentration*) (**Slika 21.**). Područje koncentracije tenzida u kojem se stvaraju micide relativno je usko područje i za svaki tenzid specifično. U tom području koncentracije dolazi do naglih promjena svojstava otopine tenzida kao što su osmotski tlak, površinska napetost, električna vodljivost i raspršivanje svjetlosti (promjena mutnoće otopine). Te promjene utječu na određivanje tenzida, stabilnost formulacija proizvoda u kojima se tenzidi nalaze, a usto dolazi i do smanjenja učinkovitosti tenzida. Stoga je pri određivanju i analizi tenzida ključno znati pri kojoj koncentraciji dolazi do CMC-a.

CMC se može odrediti praćenjem mutnoće otopine (micide raspršuju svjetlost), površinske napetosti, električne vodljivosti i osmotskog tlaka. NT općenito ima nižu kritičnu micelarnu koncentraciju u usporedbi s AT-om i KT-om.



Slika 21. Ilustrativni prikaz: a) područje u kojem dolazi do CMC-a i b) orijentacija micela u odnosu na prirodu faze u kojoj se nalaze

Oblik micela ovisi o koncentraciji, duljini i razgranatosti ugljikovodičnog lanca, prirodi polarne grupe, temperaturi, ionskoj jakosti otopine, pH-vrijednosti te prisutnosti različitih dodataka. Oblici micela mogu se podijeliti na sferne, cilindrične (ili štapićaste) te lamelarne. Sferni oblik micela najčešći je pri nižim koncentracijama ($< 10\%$) i temperaturama, dok se s porastom koncentracije, temperature, pH ili ionske jakosti mogu oblikovati cilindrični ili lamelarni oblici.

Praćenje i određivanje tenzida u okolišu vrlo je važno jer mogu imati štetan utjecaj na ekosustave. Visoke koncentracije tenzida u vodama mogu biti toksične za vodene organizme, izazvati eutrofikaciju te smanjiti površinsku napetost vode što negativno utječe na njihov metabolizam i može dovesti do narušavanja ravnoteže cijelog ekosustava.

Za određivanje tenzida u okolišu dostupne su različite metode, uključujući spektrofotometrijske, titracijske, kromatografske i potenciometrijske tehnike. Potenciometrijska metoda ističe se kao ekološki prihvatljiva („zelena“ metoda) jer je jednostavna za primjenu, ne zahtijeva skupe kemikalije ili sofisticirane uređaje te proizvodi minimalnu količinu otpada.

Tenzidi imaju sposobnost formiranja ionskih asocijata s ionima suprotnog naboja što je i temelj potenciometrijskog određivanja tenzida, a prikazuje se sljedećom jednačicom:



gdje KT^+ mogu biti kationske boje, veliki kompleksni kationi, veliki organski kationi itd., a AT^- mogu biti veliki organski i anorganski anioni.

Nastali ionski parovi, tj. ionski asocijati najčešće su netopljivi u vodi te se mogu ekstrahirati u nepolarnim otapalima. U praksi se upotrebljavaju samo jednovalentni anioni i kationi te su ioni unutar ionskih asocijata uvijek u odnosu 1 : 1.

ISE koje se primjenjuju za određivanje tenzida nazivaju se još i tenzidne ISE [15–17]. Prvu takvu elektrodu razvili su Gavach i suradnici 1970. godine [18,19]. Do danas postoji više od 200 različitih tenzidnih ISE-a te su postale primaran alat za određivanje tenzida.

Ion-selektivna membrana ima veliku ulogu u svim potenciometrijskim sensorima: određuje obilježja senzora i ponašanje prema određenim ionima prisutnim u otopini. Priroda i količina tvari od kojih se ion-selektivna membrana sastoji te njihov omjer imaju presudan utjecaj na obilježja senzora.

Membrana se ISE-a najčešće sastoji od [20]:

a) *polimerne matrice*

- osigurava mehaničku stabilnost membrane, smanjuje viskoznost, osigurava dobru mobilnost pri izmjeni iona
- pri odabiru matrice treba voditi računa o tome da bude kemijski inertna i ne reagira kemijski s ionima analita
- najčešće se upotrebljava polivinil klorid (PVC)

b) *plastifikatora*

- dodaje se u membranu jer smanjuje viskoznost i osigurava dobru mobilnost sastojaka kroz membranu
- dominantna je komponenta u polimernim membranama
- djeluje i kao membransko otapalo te može utjecati na lipofilnost, topljivost, selektivnost i izlučivanje iz membrane

- plastifikator mora biti lipofilan, ne smije otapati membranu i mora omogućiti konstantnu viskoznost membrane kako bi se ionofor i njegov kompleks mogli dovoljno gibati što je važno za uspostavu stabilnog unutarnjeg polja
- mora biti kompatibilan s polimerom kako bi se postigla homogena organska faza, a svi ostali dijelovi membrane moraju biti topljivi u plastifikatoru

c) *lipofilnih dodataka*

- onemogućuju koekstrakciju značajnih količina protuiona u membranu, s ionima analita i tako osiguravaju elektroneutralnost membrane zbog čega je membrana propusna samo za ione istog predznaka naboja kao što su ioni analita (Donnanova isključivost) što je nužno za Nernstov odziv elektrode (**Jednadžba (71)**)
- promjena količine lipofilnih dodataka u membrani bitno utječe na selektivnost membrane tako da se povećavanjem njihove količine preferiraju dvovalentni ioni u odnosu na jednovalentne ione
- membrane selektivne na katione, kao lipofilno mjesto, najčešće sadržavaju derivate tetrafenilborata, a membrane selektivne na anione sadržavaju tetraalkilamonijeve soli

d) *ionofora* (senzorski materijal)

- ima najveći utjecaj na selektivnost membrane jer omogućava reverzibilno vezanje određenog iona
- u idealnom slučaju formira reverzibilne i relativno jake komplekse s ciljanim ionom, a ne kompleksira s drugim ionima, stoga nema smetnji
- mora biti zadržan unutar membrane kako bi se sastav membrane održao konstantnim – zato osim centra za vezanje, mora sadržavati i brojne lipofilne grupe.

Određene kemijske molekule mogu djelovati kao ionofori samo ako zadovoljavaju specifične kemijske uvjete. Kao što i sam naziv kaže, ionofor kao prenositelj naboja mora biti mobilan i mehanizmom difuzije mora na sebi prenositi ciljani ion kroz membranu. Pri kompleksiranju s analitom, konstanta nastajanja kompleksa trebala bi biti oko 10^6 za 1 : 1 kompleks čime se osigurava da je ciljani ion dominantna kemijska vrsta u membrani. Osim toga, ionofor mora biti lipofilan, imati relativno velike molekule kako bi spriječio sparivanje iona i biti dovoljno mobilan za prijenos ciljanog iona kroz membranu [21].

Uobičajena ion-selektivna membrana sastoji se od oko 30 % PVC-a, 65 % plastifikatora i nekoliko % ionofora te lipofilnih dodataka [22]. Postotci izražavaju maseni udio konstituenata membrane.

Svaki student dobit će uzorak s određenom količinom anionskog tenzida, čija će koncentracija biti određena pomoću potenciometrijske titracije.

U ovoj vježbi određivanje AT-a provodit će se potenciometrijskom titracijom s pomoću ISE-a tekućim elektrolitom (3 M NaCl) i tekućom (ion-selektivnom) membranom. Membrana je sastavljena od ionofora (dimetildioktadecilamonijev tetrafenilborat, DDA-TPB), PVC-a, 2-nitrofeniloktiletera (*o*-NPOE) kao plastifikatora, dok je tetrahidrofuran (THF) upotrijebljen kao otapalo pri pripremi membrane. Membrana je smještena u komercijalnom tijelu elektrode Philips IS-561, dok je kao referentna elektroda upotrijebljena komercijalna srebro / srebrov(I) klorid s 3 M kalijevim kloridom kao unutarnjim elektrolitom. Za izvođenje potenciometrijskih titracija upotrijebljen je automatski potenciometrijski titrator.

Pribor i kemikalije: uzorak AT-a (natrijev dodecil sulfat (NaDDS)), laboratorijska čaša (50 mL), pipeta, propipeta, automatski titrator, referentna elektroda (Ag/AgCl, 3 M KCl), odmjerne tikvice (50 mL), cetilpiridinijev klorid (CPC) ($4 \cdot 10^{-3}$ M), pipete i destilirana voda.

Postupak: Svaki uzorak nosi svoju oznaku. Postupiti na sljedeći način: uzorak označen kao a) „A“ sadrži 2 mL NaDDS-a i zahtijeva dodavanje 23 mL destilirane vode, b) „B“ sadrži 3 mL NaDDS-a i zahtijeva dodavanje 22 mL destilirane vode, dok c) „C“ sadrži 4 mL NaDDS-a i zahtijeva dodavanje 21 mL destilirane vode u laboratorijsku čašu s dobivenim uzorkom. Svi se uzorci titriraju prethodno pripremljenom otopinom CPC-a (*titrant*). Volumene i potencijale završne točke titracije potrebno je zapisati u **Radnu tablicu 6** i na temelju rezultata izračunati koncentraciju AT-a u uzorku prema sljedećoj jednadžbi:

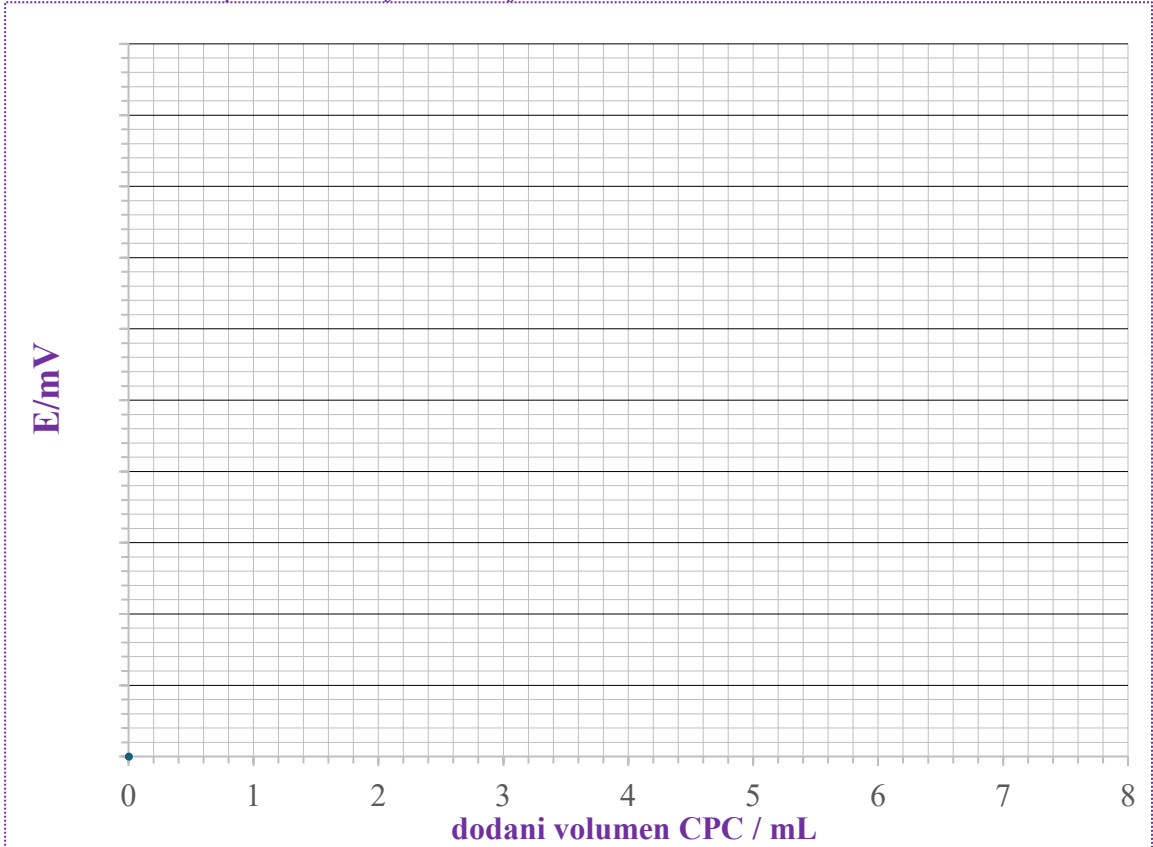
$$c_{AT} = \frac{c_{CPC} \cdot V_{CPC}}{V_{NaDDS}} \quad [M] \quad (83).$$

Nakon određivanja koncentracije AT-a u uzorku, student će dobiti očekivanu vrijednost koncentracije karakterističnu za njegov uzorak. Na temelju danog podatka izračunava se udio pogreške (**Jednadžba (84)**).

$$pogreška = \frac{dobivena c_{AT} - očekivana c_{AT}}{očekivana c_{AT}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (84).$$

Rezultat zapisati u **Radnu tablicu 6**.

Radna tablica 6.

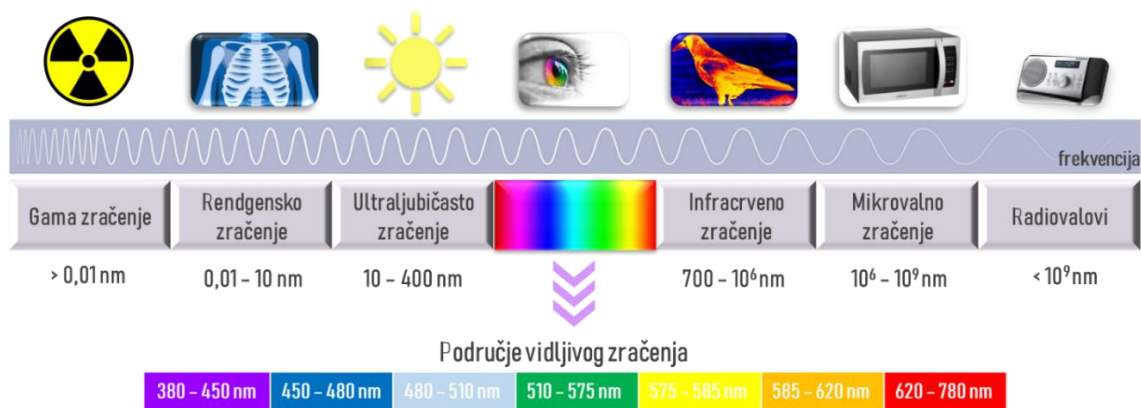
Analitičko izvješće		
Student/ica:		
Oznaka uzorka:		
Parametar	Mjerna jedinica	Rezultat
$V_{\text{završne točke titracije}}$	mL	
$E_{\text{završne točke titracije}}$	mV	
<p>Skicirati dobivenu potenciometrijsku krivulju:</p> 		
$V_{\text{dodanog uzorka, AT}}$	mL	
c_{AT}	M	
<i>pogreška</i>	%	
	Pregledao/la:	
	Datum:	

9. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE ALKALOIDA U NAPITCIMA

Pojmovi spektroskopija i spektrometrija često se upotrebljavaju naizmjenice iako predstavljaju dvije različite analitičke metode s različitim svrhom. Spektroskopija se uglavnom bavi identifikacijom tvari kroz analizu spektra zračenja koje tvar može apsorbirati ili emitirati, a spektrometrija pruža mogućnost preciznog mjerenja koncentracije tvari u uzorku. U laboratorijskoj praksi spektrometrija se češće primjenjuje jer daje točne podatke o količini sastojaka što je neophodno za pouzdane kemijske analize.

Ta instrumentalna tehnika temelji se na proučavanju interakcije elektromagnetskog zračenja s materijalom što omogućuje kvantitativnu analizu uzoraka i pruža uvid u njihov sastav.

Svjetlost, kao oblik elektromagnetskog zračenja, može biti opažena ljudskim okom u području valnih duljina između otprilike 390 i 750 nanometara (Slika 22.). Elektromagnetsko zračenje može se zamisliti kao niz čestica nazvanih fotoni pri čemu svaki foton nosi određenu količinu energije. Upravo su ta svojstva fotona ključna za razumijevanje načela spektrometrije. Poznavanje načina na koji svjetlost djeluje na tvari pomaže ne samo u otkrivanju svojstava uzoraka nego i u razvoju naprednih spektroskopskih metoda za analizu složenih smjesa.



Slika 22. Ilustrativni prikaz spektra elektromagnetskog zračenja

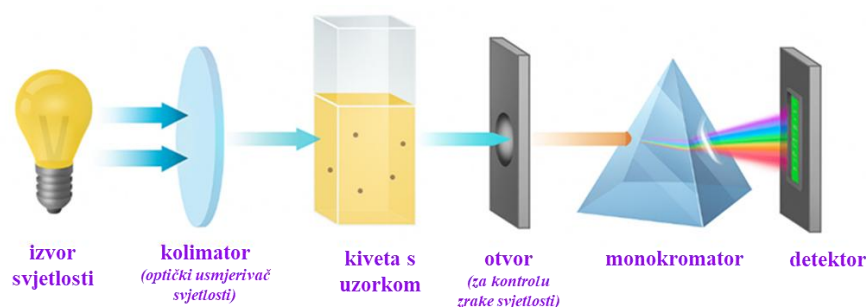
Elektromagnetska zračenja razlikuju se frekvencijom, odnosno valnom duljinom. Frekvencija ν i valna duljina λ povezane su sljedećom jednačbom:

$$v = \lambda \cdot f \quad (85)$$

gdje je v brzina širenja vala, f je frekvencija (Hz), dok λ označava valnu duljinu (nm).

Taj se izraz primjenjuje na bilo koji val, bilo da je to elektromagnetski val, zvučni val ili val u vodi. Brzina širenja vala ovisi o mediju kroz koji se val kreće.

Za snimanje spektra potrebni su osnovni dijelovi: izvor zračenja, uzorak, monokromator i detektor (Slika 23.).



Slika 23. Shematski prikaz polikromatskog UV-Vis spektrofotometra

Elektromagnetsko zračenje usmjerava se s izvora prema uzorku koji može svjetlost apsorbirati, raspršiti ili odbiti. Ako uzorak sam emitira zračenje, tada on postaje izvor. Nakon interakcije s uzorkom, zračenje se usmjerava prema monokromatoru koji filtrira i propušta samo određenu valnu duljinu do detektora.

U većini se modernih instrumenata za monokromatore upotrebljavaju optičke rešetke, dok su u prošlosti češće primjenjivane optičke prizme, no one imaju ograničenja zbog nepravilnog loma svjetlosnih zraka. Pravilan odabir i upotreba tih komponenti od velike su važnosti za postizanje preciznosti i ponovljivosti rezultata što je ključno za pouzdanost u znanstvenim istraživanjima i industrijskoj praksi. Budući da su uzorci vrlo različiti, dostupni su i različiti tipovi monokromatora i detektora koji se biraju prema specifičnim zahtjevima analize.

Detektor pretvara primljeno zračenje u električni signal koji se zatim može prikazati kao spektar. Analizom tog spektra moguće je dobiti informacije o prisutnosti i koncentraciji tvari u uzorku.

Postoje različite vrste spektroskopije koje se dijele prema području elektromagnetskog zračenja kojim se koriste: IR, NMR, rendgenske (X-ray) i UV-Vis spektroskopija.

UV-Vis spektroskopija predstavlja pristupačnu, jednostavnu i svestranu analitičku metodu koja je neinvazivna i primjenjiva na velik broj organskih spojeva, ali i nekih anorganskih tvari, a upotrebljava se u mnogim područjima istraživanja uključujući poljoprivredu, prehrambenu industriju, farmaceutiku, zaštitu okoliša i druge discipline [23].

Osnovno načelo UV-Vis metode temelji se na povezanosti energije zračenja i kemijskog sastava analizirane tvari. Za mjerenja u UV, Vis i infracrvenom području spektra upotrebljavaju se spektrofotometri. Uređaji koji mjere apsorbanciju elektroničkim putem nazivaju se apsorpcijski spektrometri. Glavni dijelovi takvih instrumenata uključuju izvor svjetlosti, monokromator, kivete i njihove držače te sustav za mjerenje intenziteta svjetlosti koja prolazi kroz uzorak. UV-Vis spektroskopija najbolje funkcioniра na tekućim uzorcima i otopinama, dok kod suspenzija čvrstih čestica dolazi do raspršenja svjetlosti što može iskriviti rezultate.

Za vidljivi spektar obično se upotrebljava volframova žarulja, dok je za ultraljubičasti spektar primarna deuterijska svjetiljka. Monokromator ima važnu ulogu jer pretvara polikromatsko svjetlo u svjetlo s jednom valnom duljinom što omogućuje precizna mjerenja. Za vidljivi dio spektra upotrebljavaju se staklene kivete, dok se za UV dio spektra upotrebljavaju kivete od kvarca jer staklo ne propušta UV zračenje.

Podatci dobiveni UV-Vis spektroskopijom omogućuju dobivanje i kvalitativnih, i kvantitativnih informacija o ispitivanom spoju ili molekuli. Za precizno kvantificiranje potrebno je provesti kalibraciju instrumenta uporabom otopina poznatih koncentracija analita u istom otapalu kao i ispitivani uzorak. Ako je cilj isključivo potvrda prisutnosti spoja u uzorku, izrada kalibracijske krivulje nije nužna. Međutim, u slučajevima ispitivanja kinetike reakcija, studija degradacije ili drugih procesa u kojima je potrebno odrediti koncentraciju spoja u otopini, kalibracijska krivulja predstavlja ključan korak analize.

Za konstrukciju kalibracijske krivulje preporučuje se uporaba minimalno triju različitih koncentracija analita, dok se za povećanje točnosti i pouzdanosti rezultata preporučuje primjena pet koncentracijskih točaka. Raspon koncentracija treba obuhvatiti vrijednosti od nešto viših od procijenjene koncentracije nepoznatog uzorka pa sve do približno jednog reda veličine niže od najviše upotrijebljene koncentracije. Apsorbancijske vrijednosti izmjerene na valnoj duljini karakterističnoj za maksimalnu apsorpciju pojedinog spoja bilježe se za svaku koncentraciju, a zatim se na osnovi tih podataka izrađuje grafički prikaz apsorbancije u funkciji koncentracije. Za prihvatljivost kalibracije smatra se R^2 jednak ili veći od 0,9. U slučaju nižih

vrijednosti preporučuje se ponoviti pripremu standardnih otopina kako bi se isključile moguće pogreške u eksperimentalnoj proceduri.

Kvantitativna analiza temelji se na Beer-Lambertovu zakonu koji empirijski opisuje linearnu vezu između apsorbancije i koncentracije apsorberajuće tvari prema sljedećoj jednadžbi:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad [\text{bezdimenzijska veličina}] \quad (86)$$

gdje A označava apsorbanciju, ε je molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent (L/molcm), svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, d je duljina puta svjetlosti kroz uzorak (cm), a c je koncentracija tvari u otopini (mol/L).

Studentima će biti dodijeljen po jedan uzorak Coca-Cole ili Schweppes Bitter Lemona u kojem će provesti kvantitativnu analizu sadržaja kofeina (za Coca-Colu) ili kinina (za Schweppes Bitter Lemon).

9.1. Priprema standarda za određivanje kofeina i kinin hidroklorida

Pribor i kemikalije: čisti kofein (ili kinin hidroklorid), odmjerna tikvica (100 mL), HCl (0,5 M) i kapalica.

Postupak: Otopiti 100 mg analitički čistog kofeina (ili kinina) prethodno sušenog tri sata na 100 °C, u odmjerne tikvici od 100 mL s pomoću 20 mL 0,5 M HCl, a zatim dopuniti do oznake vodom.

Tako se pripremljena otopina naziva *stock solution* (matična otopina) koja sadržava 1 mg kofeina (ili kinin hidroklorida) u 1 mL. Matična otopina jest otopina točno poznate koncentracije pripremljena kako bi se iz nje, razrjeđivanjem, pripremile otopine nižih koncentracija potrebne za analitička ispitivanja.

Iz matične otopine odmjeriti po 1, 2, 3, 4, 5 mL u odmjerne tikvice od 100 mL zatim dodati 20 mL 0,5 M HCl i dopuniti do oznake vodom.

Dobivene otopine standarda pažljivo se prenese u kivete u kojima se zatim mjeri apsorbancija na 272 nm za kofein (ili 347,5 nm za kinin hidroklorid).

Napomena: Za mjerenja se upotrebljavaju kvarcne kivete ili prozirne plastične kivete koje su pogodne za mjerenje u području valnih duljina od 200 nm do 1600 nm.

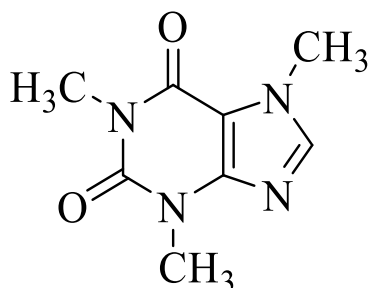
Za slijepu probu upotrebljava se destilirana voda čija se apsorbancija mjeri i oduzima od vrijednosti uzoraka i standarda radi točne analize.

Na temelju izmjerenih apsorbancija standardnih otopina konstruira se kalibracijska krivulja (graf apsorbancije u odnosu na koncentraciju). S pomoću jednadžbe pravca dobivene regresijskom analizom određuje se koncentracija kofeina (ili kinin hidroklorida) u ispitivanom uzorku, i to unosom izmjerene apsorbancije uzorka u jednadžbu.

U *Radnu tablicu 7* upisati dobivenu jednadžbu pravca i R^2 .

9.2. Spektrofotometrijsko određivanje kofeina

Kofein je alkaloid iz skupine purina, točnije 1,3,7-trimetilksantin, molekulske formule $C_8H_{10}N_4O_2$ (**Slika 24.**).



Slika 24. Prikaz strukturne formule molekule kofeina

U čvrstom obliku pojavljuje se kao bijele kristalne iglice koje su netopive u hladnoj vodi, no dobro se otapaju u toploj vodi i organskim otapalima poput etanola i kloroforma. Njegova je molekulska masa 194,19 g/mol, a točka taljenja približno 235 °C. U UV-Vis spektru pokazuje maksimalnu apsorbanciju na oko 272 nm što se često koristi za njegovu analizu u raznim uzorcima, dok njegova stabilnost ovisi o pH-vrijednosti, temperaturi i prisutnosti oksidacijskih sredstava. Zbog umjerene polarnosti, sposobnosti adsorpcije na različite sorbense i topljivosti u vodenim i organskim medijima, kofein je pogodan modelni spoj za spektrofotometrijsku, kromatografsku i ekstrakcijsku analizu u raznim uzorcima.

Pribor i kemikalije: laboratorijska čaša (100 mL), uzorak (*Coca-Cola*), pribor za sastavljanje vodene kupelji, stakleni štapić, pipeta, propipeta, odmjerna tikvica (50 mL), lijevak za odjeljivanje, kloroform, laboratorijska čaša (50 mL), vata, destilirana voda, koncentrirana HCl,

etanol (95 %), odmjerna tikvica (5 mL), kapalica, UV-Vis spektrofotometar i odgovarajuće kivete.

Postupak: U laboratorijsku čašu volumena 100 mL odmjeri se 25 mL uzorka za ispitivanje (*Coca-Cole*). Uzorak se zagrijava pet minuta na vodenoj kupelji (*zagrijavanjem se olakšava oslobađanje kofeina iz matrice te se može pomoći u djelomičnoj denaturaciji proteina ili drugih organskih tvari koje bi mogle utjecati na ekstrakciju*), uz povremeno miješanje staklenim štapićem. Nakon zagrijavanja, otopina se hladi na sobnoj temperaturi (*ekstrakcija hlapljivim organskim otapalima (poput kloroforma) ne smije se provoditi dok je otopina vruća zbog rizika od isparavanja otapala i povećanja tlaka u lijevku za odjeljivanje*). Nakon hlađenja, otpipetirati 5 mL uzorka u odmjernu tikvicu volumena 50 mL i dopuniti destiliranom vodom do oznake. Sadržaj tikvice dobro promiješati. Zatim iz tog uzorka otpipetirati 5 mL u lijevak za odjeljivanje i dodati 10 mL kloroforma (*kloroform je nepolarno organsko otapalo koje selektivno ekstrahira kofein (umjereno polarni alkaloid), dok druge tvari, poput šećera i bojila, ostaju u vodenom sloju*). Lijevak se zatvori i sadržaj se snažno promućka tijekom jedne minute, uz povremeno otpuštanje tlaka. Nakon što se slojevi odvoje, kloroformski se sloj (donji sloj) pažljivo ispusti (*odvajanje slojeva omogućuje selektivno prikupljanje kloroforma koji sada sadržava ekstrahirani kofein*), a vodeni se sloj baci. Ekstrakcija se ponovi još dva puta, svaki put s dodatnih 10 mL svježeg kloroforma, a svi se kloroformski ekstrakti spoje. Sjedinjeni kloroformski ekstrakti isperu se s 5 mL destilirane vode, uz snažno mućkanje (*ispiranje kloroformskog sloja vodom uklanja moguće ostatke topljivih tvari (npr. kiselina, šećera ili drugih nečistoća) koje su nepoželjne u završnoj analizi*). Nakon ispiranja sav se prikupljeni kloroformski sloj filtrira u laboratorijsku čašu kroz komadić vate (*filtracija kroz vatu uklanja moguće mehaničke nečistoće i omogućuje dobivanje bistrog uzorka za daljnju obradu*). Filtriranom se uzorku doda pet kapi zakiseljenog alkohola (pripremljenog u omjeru HCl : etanol = 1 : 9) nakon čega se uzorak upari do suha na vodenoj kupelji (*uparavanje uklanja kloroform i etanol ostavljajući kofein kao suhi ostatak*).

Nakon uparavanja suhi se ostatak otopi u 5 mL destilirane vode. Pripremljena otopina uzorka pažljivo se ulije u kivetu u kojoj se zatim mjeri apsorbancija na **272 nm**. Sadržaj kofeina u uzorku odrediti iz kalibracijske krivulje i upisati podatak u **Radnu tablicu 7**.

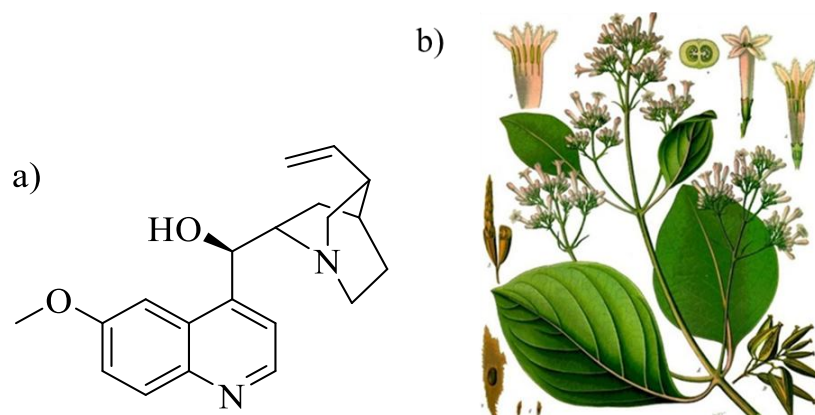
$$C_{\text{kofeina}} = C_{\text{kofeina koncentracija iz kalibracijske krivulje}} \cdot \text{faktor razrjeđenja} \quad (87)$$

gdje faktor razrjeđenja iznosi **0,2** u ovome slučaju.

Napomena: Poželjne koncentracije kofeina u uzorku Coca-Cole obično se kreću između 80 i 110 $\mu\text{g/mL}$.

9.3. Spektrofotometrijsko određivanje kinina

Kinin je prirodni alkaloid koji pripada skupini kinolinskih spojeva, a dobiva se prvenstveno iz kore drveta kininovca (lat. *Cinchona*). Njegova kemijska struktura temelji se na kinolinskom prstenu, a molekulska mu je formula $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2$ (Slika 25. a)).



Slika 25. Prikaz: a) strukturalne formule kinina i b) ilustrativni prikaz biljke kininovca

U čistom obliku kinin je bijela kristalinična tvar izrazito gorkog okusa. Slabo je topljiv u vodi, osobito hladnoj, ali se bolje otapa u toploj vodi i organskim otapalima poput etanola i kloroforma. Molekulska mu masa iznosi 324,42 g/mol, a točka taljenja kreće se oko 177 °C. Njegova prisutnost u otopinama može se odrediti s pomoću UV-Vis spektroskopije, s karakterističnim maksimumom apsorpcije u području od 330 – 350 nm.

Kinin je poznat po svojem antimalarijskom djelovanju koje je još od 17. stoljeća upotrebljavano za liječenje i ublažavanje simptoma malarije, bolesti uzrokovane parazitima iz roda *Plasmodium*. Djeluje tako da ometa metabolizam parazita unutar eritrocita čime sprječava njegov daljnji razvoj.

Osim u farmaciji, kinin se upotrebljava i u prehrambenoj industriji, a najpoznatiji je kao sastojak bezalkoholnog pića poznatog kao *Schwepes Bitter Lemon* gdje je zaslužan za karakterističnu gorčinu. Iako se u tim napitcima nalazi u vrlo malim koncentracijama, količina je dovoljna za osjet gorčine, a istodobno sigurna za konzumaciju.

Pribor i kemikalije: uzorak (*Schweppes Bitter Lemon*), propipeta, pipeta, laboratorijska čaša (100 mL), HCl (0,5 M), odmjerna tikvica (100 mL), destilirana voda, kapalica, UV-Vis spektrofotometar i odgovarajuće kivete.

Postupak: Bocu bezalkoholnog pića *Schweppes Bitter Lemon* potrebno je ohladiti prije otvaranja. Nakon otvaranja, otpipetira se 70 mL pića i više se puta prelijeva iz jedne čaše u drugu kako bi se uklonio CO₂ koji može utjecati na mjerenje i pH-vrijednost uzorka.

Nakon degaziranja otpipetira se 50 mL uzorka u odmjernu tikvicu od 100 mL. Uzorak se zakiseli dodatkom 20 mL HCl-a, a zatim se tikvica dopuni destiliranom vodom do oznake. Dobro promućkati pripremljenu otopinu.

Pripremljena otopina uzorka pažljivo se ulije u kivetu u kojoj se zatim mjeri apsorbancija na 347,5 nm. Sadržaj kinina u uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje i podatak upisuje u **Radnu tablicu 7**.

$$C_{\text{kinina}} = C_{\text{kinina koncentracija iz kalibracijske krivulje}} \cdot \text{faktor razrjeđenja} \quad (88)$$

gdje je faktor razrjeđenja 2 u ovome slučaju.

Napomena: Poželjne koncentracije kinina u uzorku Schweppes Bitter Lemon približno su između 20 i 50 µg/mL.

Radna tablica 7.

Analitičko izvješće		
Student/ica:		
Podatci:	kofein	kinin
jednadžba kalibracijskog pravca		
R^2		
γ [mg/L]		
	Pregledao/la:	
	Datum:	

10. SPEKTROFOTOMETRIJSKO ODREĐIVANJE FOSFORA U PREHRAMBENIM PROIZVODIMA

Fosfor (P, atomski broj 15) u prirodi se pojavljuje isključivo u obliku spojeva, najčešće u mineralima fosforitu i apatitima, a najveća nalazišta nalaze se u Africi i SAD-u. Postoji u trima alotropskim modifikacijama: bijeli, crveni i crni, koje se razlikuju po gustoći, reaktivnosti i stabilnosti pri čemu je bijeli fosfor vrlo reaktivan i otrovan, dok su crveni i crni stabilniji i manje opasni (**Slika 26.**).



Slika 26. Slikoviti prikaz alotropskih modifikacija fosfora: a) bijeli, b) crveni i c) crni

Fosfor tvori brojne anorganske i organske spojeve među kojima su fosfati posebno važni za proizvodnju gnojiva, deterdženata i prehrambenih aditiva, ali i potencijalno problematični zbog onečišćenja voda i poticanja eutrofikacije. Neki spojevi fosfora, poput fosfina i organofosfornih estera, izrazito su toksični i upotrebljavaju se u poljoprivredi, industriji te u specijaliziranim kemijskim primjenama.

Fosfor je esencijalni element i smatra se makroelementom. Oko 85 % fosfora nalazi se u kostima te uz kalcij ojačava izdržljivost kostiju. Iako sudjeluje u nizu funkcija u ljudskom organizmu (održavanju jakih i čvrstih zubi i kostiju, osiguravanju pravilnih mišićnih kontrakcija, filtriranju i izlučivanju otpada iz bubrega, proizvodnji DNA i RNA itd.), u prekomjernim količinama može biti štetan jer će uzrokovati neravnotežu i može doći do nakupljanja fosfora pogotovo kod ljudi koji imaju problema s bubrezima. Stalan povećani unos fosfora može prouzročiti kalcifikaciju u vaskularnom i bubrežnom sustavu kao i ozljede unutar bubrega [24].

Prirodni su izvori fosfora meso, riba, mliječni proizvodi, orašasti plodovi i sjemenke, dok se u prehrambenim proizvodima često dodaje u obliku fosfatnih soli.

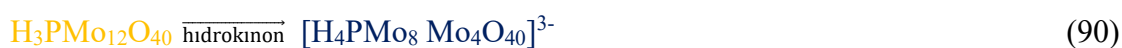
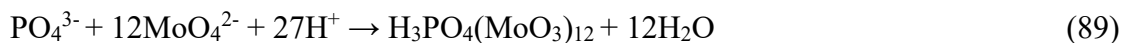
Maksimalna dopuštena količina fosfora u proizvodima ovisi o vrsti hrane i obliku fosfata koji se upotrebljava. U pečenim proizvodima, poput keksa i štapića, količina fosfata u pravilu se kreće u rasponu od 0,5 % do 1 %. Fosfati se dodaju radi poboljšanja teksture, stabilizacije strukture, vezanja vode i produljenja roka trajanja prehrambenih proizvoda.

U prehrambenoj industriji Europske unije upotreba fosfata regulirana je i oni koji su odobreni aditivi imaju svoje numeričke oznake kao što su: E338 (fosforna kiselina), E339 (natrijev fosfat), E340 (kalijev fosfat), E341 (kalcijev fosfat), E343 (magnezijev fosfat), E450 (difosfati) i E451 (trifosfati).

S obzirom na to da se fosfati mogu unositi u organizam iz više različitih prehrambenih proizvoda, lako je prekoračiti preporučene dnevne vrijednosti, osobito kod osoba s osjetljivim zdravstvenim stanjem. Zbog toga je važno pratiti količinu u prehrambenim proizvodima jer prekomjeran unos može ostaviti dugoročne posljedice na ljudski organizam.

U ovoj vježbi fosfor će se određivati u uzorcima petit keksa i slanih štapića. Za analizu se primjenjuje metoda poznata kao molibden plava metoda (engl. *molybdenum blue method*) koja se temelji na spektrofotometrijskom mjerenju intenziteta boje nastalog kompleksa.

Načelo se određivanja zasniva na reakciji anorganskih ortofosfata s molibdenskom kiselinom (H_2MoO_4) pri čemu nastaje žuti kompleks fosfomolibdenske kiseline ($\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$) poznatije kao heteropolianionska struktura tipa Keggin, prema sljedećim jednadžbama [25]:



gdje se u kiselim uvjetima i uz prisutnost hidrokinona fosfomolibdenska kiselina reducira i poprimi intenzivno modro obojenje. Intenzitet će boje izravno biti pokazatelj koncentracije fosfora u uzorku: što je boja intenzivnija, to je koncentracija fosfora veća.

Kako bi se izbjegle smetnje koje mogu utjecati na točnost rezultata, nusprodukti oksidacije hidrokinona uklanjaju se s pomoću sulfita koji ih reduciraju u bezbojne spojeve čime se osigurava preciznije očitavanje apsorbancije spektrofotometrom.

Mjerenje će se provoditi na valnoj duljini od 650 nm na kojoj nastali modri kompleks pokazuje maksimalnu apsorbanciju.

Ta je metoda pogodna za rutinsku kontrolu fosfora u različitim vrstama hrane jer je vrlo osjetljiva i jednostavna za provedbu.

Studentima će biti dodijeljen po jedan uzorak petit keksa ili štapića na kojem će odrediti sadržaj fosfora.

Pribor i kemikalije: uzorak (*petit keks* ili *štapići*), porculanski lončić, mufolna peć, koncentrirana HCl, destilirana voda, odmjerna tikvica (5 mL), satno staklo, grijača ploča, filter-papir (5 – 13 μm), odmjerna tikvica (25 mL), menzura, čaša, propipeta, pipeta, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (amonijev molibdat) (0,0405 M), koncentrirana H_2SO_4 , odmjerna tikvica (100 mL), Na_2SO_3 (11 %), hidrokinon (0,5 %), kapalica, KH_2PO_4 (standard), UV-Vis spektrofotometar i odgovarajuće kivete.

Postupak: *Studenti će 5 g uzorka (petit keks ili štapići) na prethodnom terminu spaliti u peći na 550 °C u porculanskom lončiću.*

Nakon spaljivanja u lončić dodati 5 mL HCl (u omjeru 1 : 2 = HCl : $\text{H}_2\text{O}_{\text{destilirana}}$, točnije 1,67 mL HCl i 3,33 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{destilirana}}$), pokriti satnim staklom te zagrijavati 30 minuta ispod temperature vrenja. Nakon zagrijavanja satno staklo isprati destiliranom vodom u lončić (*s malom količinom destilirane vode*), zatim sadržaj u lončiću filtrirati i preko filter-papira isprati vrućom HCl (*s malom količinom*), prethodno pripremljenom u omjeru 1 : 3. Filtrat se prenese u odmjernu tikvicu i dopuni destiliranom vodom.

Standard prirediti dodavanjem KH_2PO_4 0,4394 g/L u 250 mL destilirane vode, a otopinu $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pripremiti otapanjem 5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ u odmjernoj tikvici (100 mL) s pomoću 2,8 mL koncentrirane H_2SO_4 i dopuniti destiliranom vodom.

Na temelju **Tablice 11.** pripremiti otopine za kalibracijski pravac i analizu uzorka.

Napomena: Za mjerenja se upotrebljavaju kvarcne kivete ili prozirne plastične kivete koje su pogodne za mjerenje u području valnih duljina od 200 nm do 1600 nm.

Tablica 11. Postupak pripreme otopina za kalibraciju i analizu uzoraka

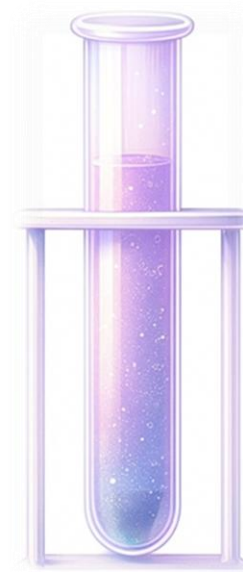
Standard [mL]	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O [mL]	Na ₂ SO ₃ [mL]	Hidrokinon [mL]	H ₂ O
2	5	11	1	<i>Količinu vode dodati po potrebi kako bi dopunili do oznake odmjernu tikvicu od 100 mL.</i>
4	5	11	1	
6	5	11	1	
8	5	11	1	
10	5	11	1	
Uzorak (10 mL)	5	11	1	

Pripremljene otopine uzorka i standarda pažljivo se uliju u kivete u kojima se zatim mjeri apsorbanca na **650 nm**. Sadržaj fosfora u uzorku određuje se iz kalibracijske krivulje, a podatak upisuje u *Radnu tablicu 8*.

$$C_{\text{kinina}} = C_{\text{kinina koncentracija iz kalibracijske krivulje}} \cdot \text{faktor razrjeđenja} \quad (91)$$

gdje je faktor razrjeđenja **10** u ovome slučaju.

Napomena: Količina fosfora u slanim štapićima obično iznosi od 0,4 do 0,8 mg/g, dok je u petit keksima približno od 0,3 do 0,7 mg/g, no te vrijednosti mogu varirati ovisno o proizvođaču i recepturi proizvoda.

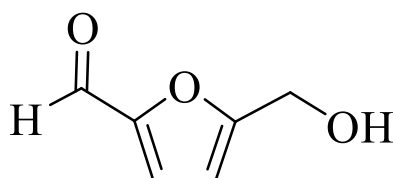


Radna tablica 8.

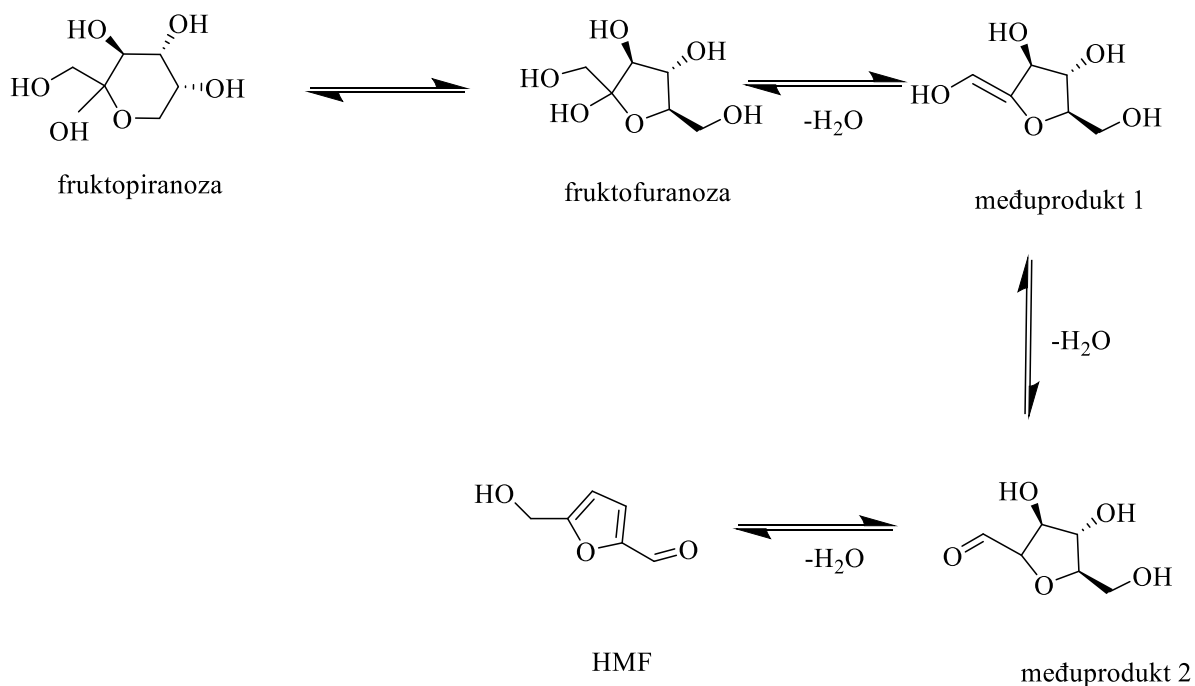
Analitičko izvješće	
Student/ica:	
Podatci:	fosfor
jednadžba kalibracijskog pravca	
R^2	
γ [mg/L]	
	Pregledao/la:
	Datum:

11. ODREĐIVANJE SADRŽAJA 5-HIDROKSIMETILFURFURALA I SLOBODNE KISELOSTI U MEDU

Med je smjesa vode, prirodnih šećera (glukoze i fruktoze), aminokiselina, enzima, minerala, vitamina i različitih antioksidansa. Jedan od spojeva prisutnih u medu jest 5-hidroksimetilfurfural (HMF) (Slika 27.), organski spoj sa šest atoma ugljika, aldehidnom i hidroksimetilnom skupinom. HMF nastaje razgradnjom fruktoze i glukoze pri čemu se proces ubrzava zagrijavanjem, svjetlom i visokom vlagom (Slika 28.).



Slika 27. Prikaz strukturne formule kinina HMF-a



Slika 28. Shematski prikaz reakcije tvorbe HMF-a [26]

Svježi med iz košnice sadržava vrlo malo HMF-a, obično ispod 1 mg/kg, dok količina raste tijekom skladištenja i obrade. Pri temperaturama iznad 20 °C sadržaj HMF-a polako raste, a iznad 40 °C formira se znatno brže. U toplim geografskim područjima do 10 mg/kg u svježem medu smatra se normalnim, dok više vrijednosti često upućuju na pregrijavanje.

Europska unija propisuje gornju granicu od 40 mg/kg HMF-a u medu za ljudsku potrošnju. Vrijednosti iznad te granice mogu značiti smanjenu nutritivnu vrijednost i kraći rok trajanja proizvoda. HMF se ne nalazi samo u medu, nego i u drugim proizvodima bogatim šećerima poput melase, kruha, voćnih sokova, pa čak i gaziranih pića.

Prosječan dnevni unos HMF-a iz hrane može iznositi od 30 do 150 mg što većinom ne predstavlja ozbiljan zdravstveni rizik. Ipak, neka istraživanja upućuju na moguće negativne učinke poput citotoksičnosti, mutagenosti i kancerogenosti, dok druga navode i potencijalna antioksidacijska i protuupalna svojstva [27].

Stvaranje HMF-a u medu može se smanjiti čuvanjem na hladnom, tamnom i suhom mjestu, daleko od izvora topline i svjetlosti. U svježem medu razina HMF-a raste i do 10 % godišnje, čak i bez dodatne toplinske obrade. Zbog HMF-a i drugih čimbenika med ima ograničen rok trajanja od 2 do 3 godine od punjenja iako se često može upotrebljavati i dulje ako je pravilno skladišten. Čuvanje meda u zatvorenim posudama, na temperaturi do 20 °C i izvan dosega sunčeve svjetlosti, najbolji je način za očuvanje njegove kvalitete i niskog HMF-a.

Tijekom skladištenja meda, kontakt s reaktivnim metalima poput bakra ili željeza može ubrzati nastanak HMF-a [28] i upravo zbog toga promijeniti okus meda. Stoga je vrlo vjerojatno to povezano s mitom da med ne smije dolaziti u dodir s metalom. Međutim, metalni spremnici od nehrđajućeg čelika ne reagiraju s medom i pomažu u očuvanju njegove kvalitete, potvrđujući da nije svaki metal štetan za med, već samo oni reaktivni koji mogu narušiti njegovu svježinu tijekom dugotrajnog skladištenja.

S obzirom na navedeno može se zaključiti da dugotrajno i nepravilno skladištenje meda može potaknuti nastanak HMF-a te uzrokovati promjene u kiselinsko-baznoj ravnoteži, stoga praćenje parametara poput sadržaja HMF-a, slobodne kiselosti i pH-vrijednosti meda predstavlja pouzdanu metodu procjene svježine i stabilnosti meda. Stalno praćenje navedenih pokazatelja predstavlja osnovu sustavne kontrole kvalitete meda te osigurava zadržavanje hranjivih vrijednosti.

Svaki će student dobiti uzorak meda u kojem će spektrofotometrijski odrediti količinu HMF-a, elektrokemijski pH-vrijednost i titracijskom metodom slobodnu kislost.

11.1. Spektrofotometrijsko određivanje 5-hidroksimetilfurfurala

Količina HMF-a odredit će se spektrofotometrijskom metodom mjerenjem apsorbancije na valnim duljinama 284 nm i 336 nm poznatijom kao metoda po Whiteu [29]. HMF apsorbira na 284 nm, dok je mjerenje apsorbancije na 336 nm referentno radi uklanjanja interferencija i pozadinskog signala što omogućuje točnije i preciznije određivanje HMF-a u medu.

Pribor i kemikalije: uzorak meda, laboratorijska čaša (100 mL), menzura, destilirana voda, odmjerna tikvica (50 mL), Carrez I (kalijev ferocijanid trihidrat, $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$) i Carrez II (cinkov acetat dihidrat, $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$) otopine, propipeta, pipeta, filter-papir (5 – 13 μm), menzura, laboratorijska čaša (50 mL), odmjerna tikvica (10 mL), $NaHSO_3$ (0,2 %), vortex miješalica, UV-Vis spektrofotometar i odgovarajuće kivete.

Napomena 1: Za mjerenja se upotrebljavaju kvarcne kivete ili prozirne plastične kivete koje su pogodne za mjerenje u području valnih duljina od 200 nm do 1600 nm.

Napomena 2: Carrez I priprema se tako što se otopi 15 g $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$ u 100 mL destilirane vode, dok se Carrez II priprema otapanjem 30 g $Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$ u 100 mL destilirane vode.

Postupak: Odvagati 5 g uzorka meda u laboratorijsku čašu te dodati približno 25 mL destilirane vode kako bi se med potpuno otopio. Nakon otapanja kvantitativno prebaciti u odmjernu tikvicu (50 mL) i dodati 0,5 mL otopine Carrez I i promiješati sadržaj, zatim dodati istu količinu i Carrez II otopine (*dodatkom Carrez I i II otopina talože se proteini i druge nečistoće te se razbistruje uzorak kako bi mjerenje apsorbancije bilo preciznije i pouzdanije*) i promućkati sadržaj. Nakon mućkanja dopuniti destiliranom vodom do oznake. Pripremljenu otopinu profiltrirati, odbaciti prvih 10 mL filtrata, a ostatak upotrijebiti za daljnju pripremu uzorka. Zatim u jednu odmjernu tikvicu uliti 5 mL filtrata od pripremljenog uzorka i 5 mL destilirane vode (**uzorak 1**), dok u drugu tikvicu uliti 5 mL filtrata od pripremljenog uzorka i 5 mL otopine $NaHSO_3$ (**uzorak 2**). Oba pripremljena uzorka promiješati na vortex miješalici.

Pripremljene otopine uzorka, iz objiju tikvica, uliti u kivete te izmjeriti apsorbanciju na **284 i 336 nm**. Sadržaj HMF-a u uzorku određuje se prema sljedećim jednadžbama:

$$A_{284 \text{ nm}} = A_{\text{uzorak 1}} - A_{\text{uzorak 2}} \quad (92)$$

$$A_{336 \text{ nm}} = A_{\text{uzorak 1}} - A_{\text{uzorak 2}} \quad (93)$$

$$A = A_{284 \text{ nm}} - A_{336 \text{ nm}} \quad (94)$$

$$\text{udio HMF} = \frac{A \cdot f \cdot 5}{m_{\text{uzorka}}} \quad [\text{mg/kg}] \quad (95)$$

gdje je f konverzijski faktor za HMF prema ovoj metodi, a iznosi 149,7; 5 se odnosi na nominalnu masu uzorka.

Dobiveni rezultat zapisati u **Radnu tablicu 9**.

11.2. Određivanje slobodne kiselosti

Slobodna kiselost meda upućuje na prisutnost slobodnih organskih kiselina u uzorku, a njezina vrijednost daje uvid u kemijsko stanje i kvalitetu meda. Kiselost meda proizlazi iz organskih kiselina koje potječu iz nektara, djelovanja enzima glukoza oksidaze koja stvara glukonsku kiselinu, tijekom dozrijevanja te prisutnosti mineralnih tvari. Organske kiseline (u najvećoj mjeri mravlja, oksalna, maslačna, octena, limunska i vinska kiselina) često su prisutne u obliku estera te tako utječu na okus i miris meda.

Slobodna se kiselost određuje titracijskom metodom uporabom lužine, najčešće NaOH, pri čemu se mjeri količina lužine koja je potrebna za neutralizaciju slobodnih kiselina u medu. Rezultati su izraženi u miliekvivalentima (mEq/kg) ili milimolima kiseline po kilogramu meda (mmol/kg).

Europska unija propisuje da slobodna kiselost ne smije prelaziti 50 mEq/kg za med koji je namijenjen za ljudsku potrošnju. Svjetliji medovi imaju nižu vrijednost slobodne kiselosti, dok će tamniji imati veću vrijednost slobodne kiselosti.

Pribor i kemikalije: uzorak meda, stakleni štapić, destilirana voda, menzura, laboratorijska čaša, Erlenmeyerova tikvica (300 mL), fenolftalein, kapalica, bireta (50 mL) i NaOH (0,1 M).

Postupak: Odvagati 10 g uzorka meda i otopiti ga u 75 mL destilirane vode (koja je prethodno prokuhana i ohlađena radi uklanjanja CO₂). Nakon otapanja, u otopljeni uzorak dodati 4 – 5 kapi fenolftaleina te titrirati otopinom NaOH do prijelaza boje u svjetloružičastu koja će se zadržati najmanje 10 sekundi.

Zapisati utrošeni volumen NaOH i izračunati slobodnu kiselost prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{slobodna kiselost} = 10 \cdot V_{\text{NaOH}} \quad [\text{mEq/kg}] \quad (96).$$

Dobiveni rezultat zapisati u *Radnu tablicu 9*.

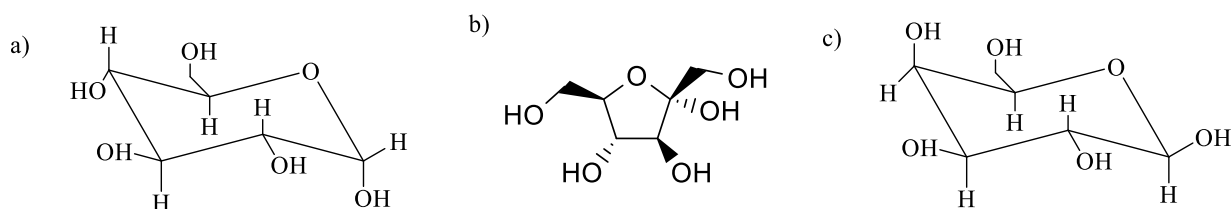


Radna tablica 9.

Analitičko izvješće		
Student/ica:		
Uzorak:		
Parametar	Mjerna jedinica	Rezultat
HMF	mg/kg	
<i>slobodna kiselost</i>	mEq/kg	
	Pregledao/la:	
	Datum:	

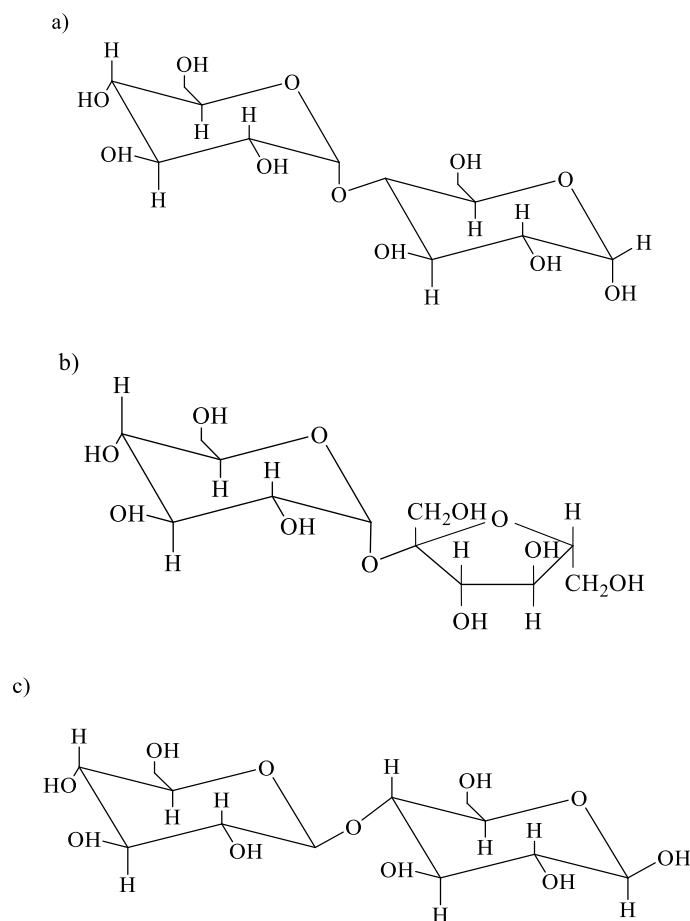
12. VOLUMETRIJSKO ODREĐIVANJE PRIRODNOG I UKUPNOG INVERTA LUFF-SCHOORL METODOM

Šećeri su ugljikohidrati, organski spojevi građeni od ugljika, vodika i kisika. Oni su glavni izvor energije tijela. Dijelev se na monosaharide, oligosaharide i polisaharide. Monosaharidi predstavljaju temeljnu strukturu ugljikohidrata. Nisu podložni hidrolizi što znači da se ne razgrađuju na jednostavnije šećere poput disaharida ili oligosaharida. Monosaharidi su najjednostavniji ugljikohidrati koji sadržavaju jednu karbonilnu skupinu – aldehidnu ili ketonsku i više hidroksilnih skupina. Stoga se mogu klasificirati kao polihidroksialdehidi ili polihidroksiketoni. Imaju osnovnu funkciju u sintezi nukleinskih kiselina i djeluju kao izvori energije u glikolizi. Položaj karbonilne skupine, ukupan broj atoma ugljika i relativna konfiguracija, koja se upotrebljava za određivanje D- i L-serije, tri su glavna kriterija za kategorizaciju monosaharida. Monosaharidi koji sadržavaju aldehidnu skupinu klasificiraju se kao aldoze, dok se oni koji sadržavaju keto klasificiraju kao ketoze. Najpoznatiji i najčešći predstavnici monosaharida u prehrani i metabolizmu čovjeka jesu glukoza, fruktoza i galaktoza (**Slika 29.**).



Slika 29. Strukturni prikaz molekule: a) glukoze, b) fruktoze i c) galaktoze

Oligosaharidi su ugljikohidrati sastavljeni od kratkih lanaca monosaharida (2 – 10 ugljikovih atoma) povezanih glikozidnim vezama. Najzastupljeniji su oligosaharidi disaharidi koji se sastoje od dviju monosaharidnih jedinica povezanih *O*-glikozidnom vezom pri čemu kisik hidroksilne skupine jednog monosaharida reagira s anomernim ugljikovim atomom drugog monosaharida. Monosaharidi također mogu tvoriti *N*-glikozidne veze, kada se anomerni ugljik šećera poveže s dušičnom bazom, kao u nukleozidima, ili druge vrste glikozidnih veza s različitim molekulama. Glukoza tvori glikozidne veze sama sa sobom, fruktozom i galaktozom formirajući tri nutritivno važna disaharida: maltozu (glukoza + glukoza), saharozu (glukoza + fruktoza) (konzumni šećer) i laktozu (glukoza + galaktoza) (mliječni šećer) (**Slika 30.**).



Slika 30. Strukturni prikaz molekule: a) maltoze, b) saharoze i c) laktoze

Polisaharidi su makromolekule koje čini više od deset monosaharida povezanih glikozidnim vezama. Oni, uz proteine, nukleinske kiseline i lipide, čine četiri osnovne skupine bioloških makromolekula u organizmima. U stanicama služe kao dugotrajni izvori energije i strukturni elementi. Najpoznatiji su primjeri škrob (biljke) i glikogen (životinje).

Šećeri su prisutni u gotovo svim živim organizmima i služe kao ključan izvor energije; prekomjerna koncentracija u krvi može dovesti do zdravstvenih problema zbog čega se njihova količina u prehrambenim proizvodima analitički prati radi kontrole nutritivne vrijednosti i kvalitete proizvoda.

Razvijene su mnoge metode s pomoću kojih se može odrediti ukupna koncentracija pojedinih ugljikohidrata u hrani. Dijelev se na fizikalne metode (mjerjenje indeksa refrakcije, mjerjenje gustoće otopine i polarimetrijsko određivanje) i kemijske metode (gravimetrijski, titrimetrijski i kolorimetrijski). Sve se kemijske metode temelje na reducirajućim svojstvima šećera,

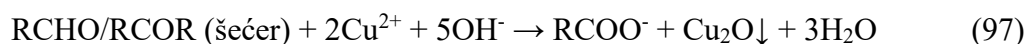
odnosno na sposobnosti redukcije iona metala iz soli metala pri povišenim temperaturama. Tu sposobnost imaju samo šećeri koji u svojoj strukturi imaju slobodnu aldehidnu (-CHO) ili keto (>C=O) skupinu.

Monosaharidi su snažna redukcijska sredstva za niz metalnih soli u alkalnoj otopini, i to zbog prisutnosti aldo i keto skupina te stvaranja hemiacetalnih ili acetalnih skupina. Stupanj redukcije razlikuje se među različitim monosaharidima. Važni su spojevi koji nastaju na taj način šećerni alkoholi.

Disaharidi i oligosaharidi mogu pokazivati redukcijska svojstva ako sadržavaju slobodnu hemiacetalnu skupinu, no postoje šećeri koji posjeduju tu skupinu, ali ne pokazuju redukcijska svojstva, primjerice saharoza. Međutim, u kiselom mediju dolazi do hidrolize saharoze na glukozu i fruktozu, koji su reducirajući šećeri, a smjesa šećera koja nastaje naziva se *invertni šećer*. Naziv je proizišao iz toga što nastala smjesa zakreće ravninu polarizirane svjetlosti u suprotnom smjeru od saharoze. Ukupna topljivost fruktoze i glukoze u invertnom šećeru veća je nego topljivost saharoze, stoga se invertni šećer upotrebljava u industriji za kontrolu kristalizacije. Invertni je šećer poželjan pri pripremi slastica jer je fluidan, nema neželjenih grudica, a najpoznatiji je prirodni invertni šećer med.

U ovoj vježbi određivanje prirodnog i ukupnog invertnog šećera u uzorku petit keksa provodit će se Luff-Schoorl metodom. Primjenom metode provode se dva mjerenja: prvo se određuje prirodni invertni šećer, koji predstavlja *reducirajuće šećere* već prisutne u uzorku, a zatim se određuje ukupan invertni šećer koji uključuje sve šećere nakon hidrolize *nereducirajućih šećera*, pa i prirodne reducirajuće šećere. Razlika između ukupnog i prirodnog invertnog šećera odgovara količini šećera nastaloj hidrolizom saharoze.

Luff-Schoorl metoda jest volumetrijska metoda koja se temelji na kemijskoj reakciji reducirajućih šećera s bakrovim(II) ionima (Cu^{2+}) iz Luff-Schoorlova reagensa, koja sadržava bakrov(II) sulfat, natrijev karbonat i natrijev citrat. U alkalnim uvjetima šećeri sa slobodnom aldehidnom ili keto skupinom, poput glukoze i fruktoze, reduciraju bakrove ione na bakrov(I) oksid (Cu_2O) koji se taloži prema jednadžbi:



pri čemu šećer oksidira do aldonske kiseline (u otopini prisutne kao aldonski anion/sol zbog alkalnog medija).

Nakon što šećeri reduciraju bakrove ione, u otopinu se dodaje KI u kiselom mediju. Preostali Cu^{2+} (nereducirani) oksidira jodidne ione (I^-) do elementarnog joda (I_2) koji će se zatim istaložiti u otopinu prema sljedećoj jednačbi:



dok se nastali jod titrira otopinom $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ uz škrob kao indikator (**Jednadžba (99)**).



pri čemu je utrošen volumen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ proporcionalan količini preostalog bakra, a posredno se izračunava količina reducirajućih šećera u uzorku.

Svaki će student dobiti određenu količinu uzorka petit keksa u kojem će odrediti količinu prirodnog i ukupnog inverta.

Pribor i kemikalije: uzorak petit keksa, tarionik, tučak, grijaća ploča, stakleni štapić, odmjerna tikvica (250 mL), destilirana voda, Carrez I (kalijev ferocijanid trihidrat, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) i Carrez II (cinkov acetat dihidrat, $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) otopine, filter-papir (5 – 13 μm), Erlenmeyerova tikvica s brušenim čepom (300 mL), propipeta, pipeta, menzura, kamenčići za vrenje, Luff-Schoorlov reagens, mrežica za zagrijavanje, tronožac, plamenik/kartuša, povratno hladilo, KI (30 %), H_2SO_4 (6 M), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,1 M), bireta (50 mL), otopina škroba (2 %), Erlenmeyerova tikvica (300 mL), koncentrirana HCl, NaOH (20 %), metiloranž, odmjerna tikvica (100 mL).

Postupak:

Filtrat I: Odvagati 5 g prethodno usitnjenog uzorka petit keksa. Kvantitativno prenijeti u laboratorijsku čašu i otopiti u vrućoj vodi (60 – 70 °C). Nakon što se uzorak otopio, prenijeti ga u odmjernu tikvicu od 250 mL i dodati 5 mL Carezz I i 5 mL Carezz II otopine (*radi uklanjanja nečistoća*). Nakon dodatka svake otopine sadržaj tikvice dobro promiješati, dopuniti destiliranom vodom do oznake i na kraju filtrirati sadržaj u tikvici.

Napomena: Carezz I i Carezz II otopine pripremaju se na jednak način kao i u prethodnoj vježbi.

Priprema slijepa probe: U Erlenmeyerovu tikvicu s brušenim čepom uliti 25 mL Luff-Schoorlova reagensa i 25 mL destilirane vode. Sadržaj u Erlenmeyerovoj tikvici zagrijavati s povratnim hladilom točno 10 minuta od trenutka početka vrenja. Po isteku vremena

zagrijavanje prekinuti i Erlenmeyerovu tikvicu ostaviti da se ohladi. Nakon hlađenja dodati 10 mL KI, 25 mL H₂SO₄ (*oprezno dodavati!*) i titrirati sadržaj s pomoću Na₂S₂O₃ do pojave žutog obojenja. Nakon toga dodati dvije pune kapalice otopine škroba i nastaviti titrirati do nestanka (golublje) plavog obojenja.

Zabilježiti količinu utrošenog volumena Na₂S₂O₃.

Priprema uzorka za određivanje prirodnog inverta: U Erlenmeyerovu tikvicu s brušenim čepom uliti 10 mL **filtrata I**, 15 mL destilirane vode, 25 mL Luff-Schoorlova reagensa i dodati nekoliko kamenčića za vrenje. Sadržaj u Erlenmeyerovoj tikvici zagrijavati s povratnim hladilom točno deset minuta od trenutka vrenja. Po isteku vremena zagrijavanje prekinuti i Erlenmeyerovu tikvicu ostaviti da se ohladi. Nakon hlađenja dodati 10 mL KI, 25 mL H₂SO₄ (*Opresno dodavati!*) i titrirati sadržaj s pomoću Na₂S₂O₃ do pojave žutog obojenja. Nakon toga dodati dvije pune kapalice otopine škroba i nastaviti titrirati do nestanka (golublje) plavog obojenja. Zabilježiti količinu utrošenog volumen Na₂S₂O₃ te izračunati % prirodnog inverta prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{prirodni invert} = \frac{m_{\text{tablica}}}{m_{\text{uzorka u alikvotu}}} \cdot 100 \text{ [\%]} \quad (100)$$

gdje je m_{tablica} količina šećera očitana iz tablice 12. prema utrošku Na₂S₂O₃ (utrošeni $V_{\text{slijepa proba}} - V_{\text{prirodni invert}}$ (*Pogledaj napomenu ispod tablice 12.!*)), dok je $m_{\text{uzorka u alikvotu}}$ 200 mg.

Priprema uzorka za određivanje prirodnog inverta: U Erlenmeyerovu tikvicu uliti 20 mL **filtrata I** i dodati 0,5 mL HCl. Zatim sadržaj tikvice zagrijavati deset minuta u vodenoj kupelji (70 °C). Po isteku vremena zagrijavanje prekinuti i Erlenmeyerovu tikvicu ostaviti da se ohladi. Nakon hlađenja sadržaj tikvice titrirati (neutralizirati) s pomoću NaOH uz metiloranž kao indikator. Kvantitativno prenijeti sadržaj u odmjernu tikvicu od 100 mL, dopuniti do oznake destiliranom vodom i na kraju sadržaj filtrirati (**filtrat II**).

U Erlenmeyerovu tikvicu s brušenim čepom uliti 10 mL **filtrata II**, 15 mL destilirane vode, 25 mL Luff-Schoorlova reagensa i dodati nekoliko kamenčića za vrenje. Sadržaj u Erlenmeyerovoj tikvici zagrijavati s povratnim hladilom točno deset minuta od trenutka vrenja. Po isteku vremena zagrijavanje prekinuti i Erlenmeyerovu tikvicu ostaviti da se ohladi. Nakon hlađenja dodati 10 mL KI, 25 mL H₂SO₄ (*Opresno dodavati!*) i titrirati sadržaj s pomoću Na₂S₂O₃ do pojave žutog obojenja. Nakon toga dodati dvije pune kapalice otopine škroba i

nastaviti titrirati do nestanka (golublje) plavog obojenja. Zabilježiti količinu utrošenog volumena $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ te izračunati % ukupnog inverta prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{ukupni invert} = \frac{m_{\text{tablica}}}{m_{\text{uzorka u alikvotu}}} \cdot 100 \quad [\%] \quad (101)$$

gdje je m_{tablica} količina šećera očitana iz **Tablice 12.** prema utrošku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (utrošeni $V_{\text{slijepa proba}} - V_{\text{ukupni invert}}$ (*Pogledaj napomenu ispod tablice 12.!*)), dok je $m_{\text{uzorka u alikvotu}}$ 40 mg.

Dobivene rezultate za % prirodnog i ukupnog inverta kao i utrošeni volumen $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zapisati u **Radnu tablicu 10.**

Prema dobivenim podacima za prirodan i ukupan invert izračunati % saharoze u uzorku petik keksa prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{saharoza} = (\% \text{ ukupni invert} - \% \text{ prirodni invert}) \cdot 0,95 \quad [\%] \quad (102)$$

gdje je $0,95 = \frac{M_{\text{saharoze}}}{M_{\text{inverta (glukoze i fruktoze)}}}$.

Dobiveni rezultat zapisati u **Radnu tablicu 10.**



Tablica 12. Izračunavanje šećera po Luff-Schoorl metodi

0,1 M Na ₂ S ₂ O ₃ [mL]	Glukoza / fruktoza [mg]
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	14,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

Napomena: Radi dobivanja boljeg rezultata potrebno je napraviti interpolaciju vrijednosti:

$$mg = mg_{donja\ vrijednost} + (V_{traženi} - V_{donja\ vrijednost}) \cdot [(mg_{gornja\ vrijednost} - mg_{donja\ vrijednost}) / (V_{gornja\ vrijednost} - V_{donja\ vrijednost})]$$

Primjer: $V_{slijepa\ proba} = 25,4\ mL$, $V_{prirodni\ invert} = 22,8\ mL$

$$V_{traženi} = V_{slijepa\ proba} - V_{prirodni\ invert} = 2,6\ mL$$

$$interpolacija\ mg = 4,8 + (2,6 - 2,0) \cdot [(7,2 - 4,8) / (3,0 - 2,0)] = 6,24.$$

Radna tablica 10.

Analitičko izvješće		
Student/ica:		
Uzorak:		
Parametar	Mjerna jedinica	Rezultat
<i>V (Na₂S₂O₃, slijepa proba)</i>	mL	
<i>V (Na₂S₂O₃, prirodni invert)</i>	mL	
<i>prirodni invert</i>	%	
<i>V (Na₂S₂O₃, ukupni invert)</i>	mL	
<i>ukupni invert</i>	%	
<i>saharoza</i>	%	
	Pregledao/la:	
	Datum:	

Popis kratica i pokrata:

AT: amfolitski tenzid

AT: anionski tenzid

CMC: kritična micelarna koncentracija (engl. *critical micelle concentration*)

CV: koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*)

DDA-TPB: dimetildioktadecilamonijevom tetrafenilborat

DGK: donja granica kvantifikacije (engl. *lower limit of quantification*)

DMA: dinamička mehanička analiza (engl. *dynamic mechanical analysis*)

DPD: *N,N*-dietil-*p*-fenilendiamin

DSC: diferencijska pretražna kalorimetrija (engl. *differential scanning calorimetry*)

DTA: diferencijska termička analiza (engl. *differential thermal analysis*)

GC: plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

GD: granica detekcije (engl. *limit of detection*)

GK: granica kvantifikacije (engl. *limit of quantification*)

HMF: 5-hidroksimetilfurfural

IR: infracrvena spektrometrija (engl. *infrared spectroscopy*)

ISE: ion-selektivna elektroda

IUPAC: međunarodna unija čiste i primijenjene kemije (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

KT: kationski tenzid

LC: tekućinska kromatografija (engl. *liquid chromatography*)

MDK: maksimalna dozvoljena koncentracija

MS: masena spektrometrija (engl. *mass spectrometry*)

NaDDS: natrijev dodecil sulfat

NMR: spektrometrija nuklearne magnetne rezonancije (engl. *nuclear magnetic resonance spectroscopy*)

NT: neionski tenzid



o-NPOE: *o*-2-nitrofeniloktiletter

PVC: polivinil klorid

RSO: relativno standardno odstupanje (engl. *relative standard deviation*)

SI: Međunarodni sustav mjernih jedinica (franc. *Système International d'Unités*)

SRK: slobodni rezidualni klor

TGA: termogravimetrijska analiza (engl. *thermogravimetric analysis*)

THF: tetrahidrofuran

TLC: tankoslojna kromatografija (engl. *thin-layer chromatography*)

TMA: termomehanička analiza (engl. *thermomechanical analysis*)

UV-Vis: ultraljubičasta/vidljiva spektrometrija (engl. *ultraviolet-visible spectroscopy*)

LITERATURA:

- [1] International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, ICH Harmonised Guideline: Validation of Analytical Procedures Q2(R2).
- [2] K. J. Laidler, J. H. Meiser, B. C. Sanctuary, *Physical Chemistry*, Houghton Mifflin, 4th ed., 2003.
- [3] B. Nielsen, J. R. Hales, S. Strange, N. J. Christensen, J. Warberg and B. Saltin, *Human circulatory and thermoregulatory adaptations with heat acclimation and exercise in a hot, dry environment*, J. Physiol. 460 (1993) 85 – 467. DOI: 10.1113/jphysiol.1993.sp019482
- [4] *Pravilnik o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnost javne vodoopskrbe*, Narodne novine 64/2023, dokument br. 1057, str. 26, URL: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2023_06_64_1057.html (15. 9. 2025.)
- [5] M. Kuleš, M. Habuda-Stanić, *Analiza vode*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2000.
- [6] Vlada Republike Hrvatske, *Uredba o izmjenama i dopunama uredbe o klasifikaciji voda*, Narodne novine 137/2008, dokument br. 3843, URL: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_11_137_3843.html
- [7] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 7th ed., Cengage Learning, 2016.
- [8] Hrvatski zavod za javno zdravstvo, *Izveštaj o zdravstvenoj ispravnosti vode za ljudsku potrošnju u Republici Hrvatskoj za 2024. godinu*, Zagreb, svibanj 2025., URL: https://www.hzjz.hr/wp-content/uploads/2025/07/IZVJESTAJ_Voda-za-ljudsku-potrosnju_2024.pdf (15. 9. 2025.)
- [9] U. H. N. M. Jefri, A. Khan, Y. C. Lim, K. S. Lee, K. B. Liew, Y. W. Kassab, C.-Y. Choo, Y. M. Al-Worafi, L. C. Ming, A. Kalusalingam, *A systematic review on chlorine dioxide as a disinfectant*, J. Med. Life 15(3) (2022) 313-318. DOI:10.25122/jml-2021-0180
- [10] H. L. Bohn, *Soil Chemistry*, Wiley-Interscience, 2nd edition, 1985.
- [11] A. Škorić, *Postanak, razvoj i sistematika tla*, Fakultet poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, 1986.
- [12] International Organization for Standardization. (1985). ISO 6598:1985 – Fertilizers – Determination of phosphorus content – Quinoline phosphomolybdate gravimetric method. International Organization for Standardization. (<https://cdn.standards.iteh.ai/samples/13009/ed58eb5e10d24d1984ff1708d48d575d/ISO-6598-1985.pdf>, 15. 9. 2025.)
- [13] S. Lee, Y. Choi, H. S. Jeong, J. Lee, J. Sung, *Effect of different cooking methods on the content of vitamins and true retention in selected vegetables*, Food Sci. Biotechnol 27(29) (2017) 333 – 342. DOI: 10.1007/s10068-017-0281-1
- [14] G. Mateljan, *Najzdravije namirnice svijeta*, Planetopija, 2008.

- [15] N. V. Shvedene, T. V. Shishkanova, I. V. Pletnev, N. V. Belchenko, V. V. Kovalev, A. K. Rozov, E. A. Shokova, *Surfactant ion selective membrane electrodes*, Anal. Lett. 29(6) (1996) 843 – 858.
- [16] J. Seguí, J. Lizondo-Sabater, A. Benito, R. Martínez-Mañez, T. Pardo, F. Sancenón, J. Soto, *A new ion-selective electrode for anionic surfactants*, Talanta 71 (2007) 333 – 338. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.04.005
- [17] J. Wang, Z. Du, W. Wang, W. Xue, *Ion-selective electrode for anionic surfactants using hexadecyl trimethyl ammonium bromide-sodium dodecylsulfate as an active ionophore*, Int. J. Electrochem. (2011) 1 – 7.
- [18] C. Gavach, P. Seta, *Dosage potentiometrique des ions alkyl-trimethyl-ammonium a longue chaine et tetrabutyl-ammonium*, Anal. Chim. Acta 5 (1970) 407 – 412. DOI: 10.1016/0003-2670(70)80037-X
- [19] C. Gavach, C. Bertrand, *Electrodes specifiques d'anions a longue chains hydrocarbonee: application au dosage potentiométrique e détergents anioniques*, Anal. Chim. Acta 55 (1971) 385 – 393. DOI: 10.1016/S0003-2670(01)82391-6
- [20] F. Faridbod, M. R. Ganjali, R. Dinarvand, P. Norouzi, *The fabrication of potentiometric membrane sensors and their applications*, Afr. J. Biotechnol. 6 (2007) 2960 – 2987. DOI: 10.5897/AJB2007.000-2464
- [21] M. Nägele, E. Bakker, E. Pretsch, *General description of the simultaneous response of potentiometric ionophore-based sensors to ions of different charge*, Anal. Chem. 71(5) (1999) 1041 – 1048. DOI: 10.1021/ac980962c
- [22] K. Msksymiuk, A. Michalska, *Ion-selective electrodes – classical systems and new ideas*, Chemik 69(7) (2015) 373 – 382.
- [23] K. Khalid, R. Ishak, Z. Z. Chowdhury, *Chapter 15 – UV-Vis spectroscopy in non-destructive testing*, Non-Destr. Mater. Charact. Methods (2024) 391 – 416. DOI: 10.1016/B978-0-323-91150-4.00021-5
- [24] A. R. Chang and C. Anderson, *Dietary phosphorus intake and the kidney*, 37 (2017) 321 – 346. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071816-064607
- [25] E. A. Nagul, I. D. McKelvie, P. Worsfold, S. D. Kolev, *The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box*, Anal. Chim. Acta 890 (2015) 60 – 82. DOI: 10.1016/j.aca.2015.07.030
- [26] U. M. Shapla, M. Solayman, N. Alam, M. I. Khalil, S. H. Gan, *5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health*, Chem. J. 12(35) (2018). DOI: 10.1186/s13065-018-0408-3
- [27] M.R. Farag, M. Alagawany, M. Bin-Jumah, S. I. Othman, A. F. Khafaga, H. M. Shaheen, D. Samak, A. M. Shehata, A. A. Allam and M. E. Abd El-Hack, *The Toxicological Aspects of the Heat-Borne Toxicant 5-Hydroxymethylfurfural in Animals: A Review*, Molecules 25(8) (2020) 1941. DOI: 10.3390/molecules25081941
- [28] O. O. Anam and R. K. Dart, *Influence of metal ions on hydroxymethylfurfural formation in honey*

Anal. Proc. 32(12) (1995) 515 – 517.

[29] J. W. White, *Spectrophotometric method for hydroxymethylfurfural in honey*, J Assoc Off Anal Chem 62(3) (1979) 14 – 509. PMID: 479072

