

**ΑΣΚΗΣΗ ΤΕΤΑΡΤΗ****ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΕΞΕΤΑΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ**

**Σκοπός:** Η εκτίμηση της μικροβιολογικής κατάστασης γάλακτος.

***Εισαγωγικές πληροφορίες***

Το γάλα και τα προϊόντα του έχουν μικροβιακή χλωρίδα, η οποία περιλαμβάνει μύκητες, ζύμες, βακτήρια και ιούς. Από τα παραπάνω άλλα σαπροφυτούν, με ορισμένες βιοχημικές δραστηριότητες και χωρίς πρακτικό ενδιαφέρον, άλλα σαπροφυτούν και αλλοιώνουν το γάλα και τα προϊόντα του (εντεροβακτηριακά, βάκιλλοι) και άλλα είναι παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα.

Η τεχνική της μεθόδου που εφαρμόζεται στο εργαστήριο λέγεται μέθοδος σποράς μέσα στο θρεπτικό υλικό και αποτελεί έμμεσο τρόπο εκτίμησης των μικροοργανισμών του γάλακτος, γιατί δε μετριοούνται απευθείας μικρόβια αλλά οι ορατές αποικίες (με γυμνό μάτι) που δημιουργούνται στο θρεπτικό υπόστρωμα των τρυβλίων.

Με τη μέθοδο αυτή μια ορισμένη ποσότητα γάλακτος αναμειγνύεται με ρευστό θρεπτικό υλικό που περιέχει άγαρ, το οποίο αφήνεται να σταθεροποιηθεί και μετά επωάζεται για ορισμένο χρόνο σε καθορισμένες συνθήκες. Ο αριθμός των αποικιών που αναπτύσσονται δίνουν το μέγεθος της μικροβιακής χλωρίδας του γάλακτος.

***Αντιδραστήρια – όργανα***

1. Τρυβλία Petri
  2. Αριθμημένα σιφώνια του 1mL
  3. Φιάλες και δοκιμαστικοί σωλήνες για να γίνουν οι αραιώσεις
  4. Κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει άγαρ
- Όλα τα παραπάνω θα πρέπει να είναι αποστειρωμένα.

***Παρασκευή θρεπτικού υλικού***

Το θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να είναι το κοινό θρεπτικό άγαρ ή οποιοδήποτε θρεπτικό υλικό, αφού τα περισσότερα είναι κατάλληλα για το σκοπό αυτό και δίνουν ισοδύναμα αποτελέσματα.

Ένα τέτοιο θρεπτικό υλικό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό έχει την παρακάτω σύσταση:

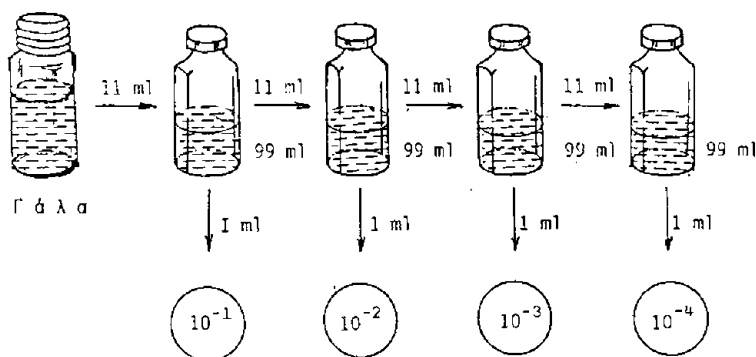
Υδρολυμένη καζεΐνη	5 g
Εκχύλισμα ζυμών	2,5 g
Γλυκόζη	1g
Άγαρ	15 g
Αποσταγμένο νερό	1000 mL

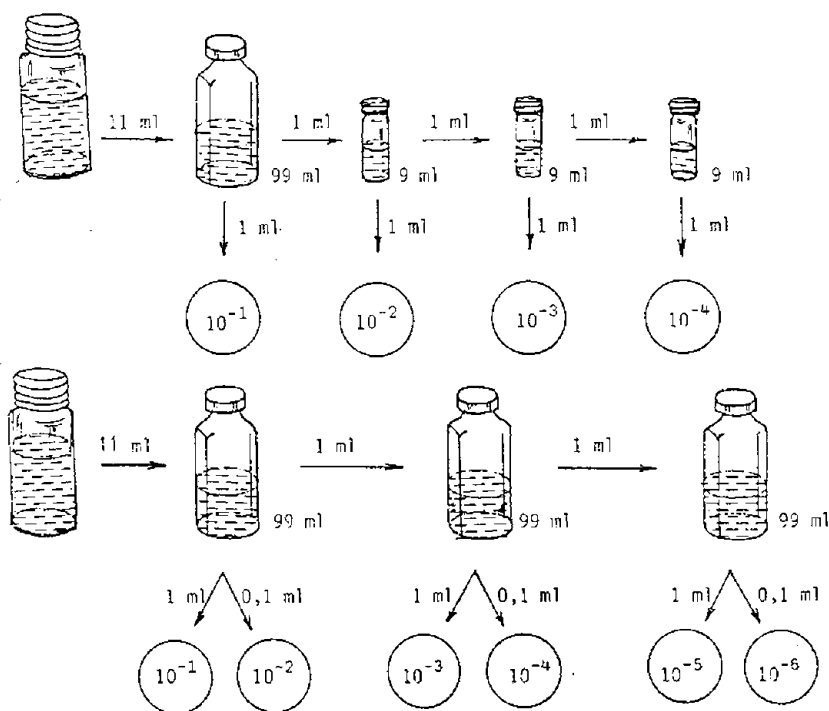
Τα συστατικά αυτά αναμειγνύονται, προστίθενται στο νερό και θερμαίνονται μέχρι βρασμού για να διαλυθούν. Στη συνέχεια κατανέμονται σε σωλήνες ή φιάλες και αποστειρώνονται στους 121 °C για 15 min. Η θέρμανση σε υψηλότερη θερμοκρασία ή η παράταση της θέρμανσης πρέπει να αποφεύγεται, γιατί έχει δυσμενή επίδραση στα θρεπτικά συστατικά του μείγματος.

### Πορεία εργασίας

Γίνεται προσεκτική ανάμειξη του δείγματος του γάλακτος με ένα αποστειρωμένο αραιωτικό όπως είναι το Ringer 1/4 ή το πεπτονούχο νερό. Το πρώτο βήμα για την αρίθμηση των μικροοργανισμών με τη μέθοδο αυτή είναι η αραιώση του δείγματος, ώστε οι αποικίες των βακτηρίων που θα αναπτυχθούν στα τρυβλία μετά την επώαση να βρίσκονται σε τέτοια απόσταση μεταξύ τους που να μετρίζονται εύκολα και τα αποτελέσματα να ανταποκρίνονται στην πραγματικότητα. Επιδιώκεται ύπαρξη 30 – 300 αποικιών ανά τρυβλίο. Στο παρακάτω σχήμα φαίνεται πώς γίνονται οι διάφορες αραιώσεις. Συνήθως οι αραιώσεις που γίνονται είναι : 1/10, 1/100, 1/1000 και 1/10000

### ΠΙΝΑΚΑΣ ΑΡΑΙΩΣΕΩΝ





### Διαδικασία Παρασκευής Δεκαδικών Αραιώσεων

Πρέπει να σημειωθεί ότι τόσο το αρχικό γάλα όσο το αραιωμένο πρέπει να υφίστανται καλή ανάμειξη πριν από τη μεταφορά τους στα τρυβλία.

Το θρεπτικό υπόστρωμα με το άγαρ τοποθετείται αρχικά σε ζέον υδατόλουτρο για να λιώσει το άγαρ και στη συνέχεια μειώνεται η θερμοκρασία στους 45-50 °C.

Μεταφέρεται 1 mL ή 0,1 mL από κάθε κατηγορία αραιωμένου γάλακτος σε αποστειρωμένα τρυβλία. Τα χείλη των σωλήνων και των φιαλών αραιώσης πρέπει να αποστειρώνονται με φλόγα πριν από τη μεταφορά δείγματος ή των κατηγοριών του αραιωμένου γάλακτος στα τρυβλία.

Κατόπιν προσθέτουμε 10 mL από το λιωμένο άγαρ σε κάθε τρυβλίο και αναμειγνύουμε με προσοχή, ώστε να μην εκτιναχθεί στο κάλυμμα και την περιφέρεια του τρυβλίου. Ο χρόνος από τη στιγμή που γίνονται οι αραιώσεις μέχρι να γίνει η ανάμειξή τους με το θρεπτικό υπόστρωμα δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 15 min.

Στη συνέχεια τοποθετούνται τα τρυβλία ανεστραμμένα σε επωαστικό κλίβανο για 72 ώρες στους 30 °C. Τα τρυβλία μπορούν να τοποθετηθούν ανεστραμμένα το ένα επάνω στο άλλο μέχρι 3 το πολύ.

## *Μέτρηση των αποικιών*

Για τη μέτρηση των αποικιών επιλέγονται τα τρυβλία που έχουν 30-300 αποικίες. Η αρίθμηση γίνεται με τη βοήθεια μετρητή αποικιών, ο οποίος φέρει πλάκα-οδηγό που είναι διαιρεμένη σε  $\text{cm}^3$  και πάνω στην οποία τοποθετείται το τρυβλίο για να διευκολυνθεί η όλη εργασία, με φακό που μεγεθύνει τις αποικίες μέχρι 2.5 φορές και αριθμητή χειρός που αθροίζει τις αποικίες καθώς τις μετράμε. Υπολογίζεται ο αριθμός των μικροοργανισμών ανά mL γάλακτος από τον αριθμό των αποικιών των τρυβλίων και από την αραίωση που έχει υποστεί το γάλα. Αν δύο ή περισσότερα τρυβλία της ίδιας αραίωσης έχουν αποικίες μεταξύ 30 και 300, τότε λαμβάνεται ο μέσος όρος τους και πολλαπλασιάζεται επί την αραίωση. Αν ο αριθμός των αποικιών δύο διαδοχικών αραιώσεων είναι στα όρια αυτά, τότε βγάζουμε το μέσο όρο μόνο σε περίπτωση που ο αριθμός των μικροοργανισμών που δίνει η μεγαλύτερη αραίωση διαιρούμενος με εκείνο της μικρότερης αραίωσης δίνει συντελεστή μικρότερο του 2, αλλιώς χρησιμοποιούμε τα αποτελέσματα της μεγαλύτερης αραίωσης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η προετοιμασία των τρυβλίων και η αρίθμηση των αποικιών γίνεται σήμερα με τη χρησιμοποίηση ειδικών μηχανημάτων σε μικρό χρονικό διάστημα και με μεγάλη ακρίβεια.

## *Πληροφορίες*

Ringer 1/4: Είναι διάλυμα μιας ταμπλέτας σε 500 mL αποιονισμένου νερού ισοτονικό με τα βακτήρια. Χρησιμοποιείται ως διαλύτης για την προετοιμασία υποστρωμάτων στις μικροβιολογικές εξετάσεις (ειδικά του γάλακτος) αφού αποστειρωθεί και παρέχει  $\text{pH}: 6,9 \pm 0,1$  στους  $25^\circ \text{C}$ .

Η σύσταση του αραιωτικού Ringer κανονικής δύναμης είναι:  $\text{NaCl}$  20 g,  $\text{KCl}$  0,42 g,  $\text{CaCl}_2$  0,48 g,  $\text{NaHCO}_3$  0,02 g και 1 L αποιονισμένο νερό.

Δύναμη Ringer 1/4: ένα μέρος του αραιωτικού κανονικής δύναμης με 3 μέρη αποιονισμένου νερού.

**ΑΣΚΗΣΗ ΠΕΜΠΤΗ****ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΥΤΗΤΑΣ ΕΛΑΙΟΥ**

**Σκοπός:** Η μέτρηση των λιπαρών οξέων που περιέχονται στη λιπαρή ύλη και η διαπίστωση της καταλληλότητάς της προς βρώση.

*Μέθοδος Κώδικα Τροφίμων και Ποτών της Ελληνικής νομοθεσίας.*

**Αντιδραστήρια – όργανα**

1. Διάλυμα 0,1M KOH σε αλκοόλη.
2. Δείκτης φαινολοφθαλεΐνης (διάλυμα 1% σε αιθανόλη)
3. Μείγμα αιθανόλης – διαιθυλαιθέρα 1:1 εξουδετερωμένο με 0,1 M KOH
4. Κωνική φιάλη των 250 mL
5. Προχοΐδα των 10 mL

**Τρόπος εργασίας**

1. Σε κωνική φιάλη των 100 mL φέρονται 10 g ή 11mL δείγματος ελαιόλαδου.
2. Προσθέτουμε 20 mL μείγμα ίσων μερών αλκοόλης και αιθέρα, το οποίο έχει εξουδετερωθεί.
3. Αναδεύουμε για τη διάλυση των λιποσφαιρίων και ογκομετρούμε παρουσία τριών σταγόνων φαινολοφθαλεΐνης με διάλυμα 0,1 M KOH μέχρι να μετατραπεί το χρώμα από αχυροκίτρινο σε ροζ.
4. Έστω ότι καταναλώθηκαν 1,8 mL KOH για την εξουδετέρωση του ελαϊκού οξέος.

**Αντίδραση εξουδετέρωσης.**

## Υπολογισμοί

Τα 1000 mL 0,1M KOH εξουδετερώνουν Τα 1,8 mL	28,2 g ελαϊκού οξέος x;
$x = 0,051 \text{ g}$	
Στα 10 g ελαίου περιέχονται Στα 100 g	0,051 g ελαϊκού οξέος x;
$x = 0,51 \text{ g}$	
Τα αποτελέσματα της οξύτητας εκφράζονται σε g ελαϊκού οξέος επί τοις εκατό. Ελαιόλαδο με οξύτητα 0-1 % θεωρείται α' ποιότητας, 1-2 % β' ποιότητας και 2-3 % γ' ποιότητας.	

## Παρατηρήσεις – πληροφορίες

1. Επειδή η αιθυλική αλκοόλη και ο αιθέρας περιέχουν ελεύθερα οξέα, πριν από την προσθήκη του μείγματός τους στο υπό εξέταση δείγμα της λιπαρής ύλης εξουδετερώνονται με 0,1 M KOH
2. Η προσθήκη του αιθέρα είναι απαραίτητη για την παραλαβή των οξέων, οπότε αποφεύγεται η αντίδραση της σαπωνοποίησης.
3. Για ευκολία, αντί να ζυγίσουμε 10 g ελαιόλαδου, λαμβάνουμε 11 mL από αυτό, επειδή το ειδικό βάρος του είναι 0,91 g/mL.
4. Για να μη δημιουργείται σύγχυση των όρων βαθμός και αριθμός οξύτητας δίνονται οι ορισμοί τους: α) Βαθμός οξύτητας είναι ο αριθμός των mL 1M διαλύματος NaOH ή KOH, που απαιτείται για την πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων που περιέχονται σε 100 g λιπαρής ύλης. β) Αριθμός οξύτητας είναι τα mg KOH, που απαιτούνται για την πλήρη εξουδετέρωση των ελεύθερων λιπαρών ουσιών που περιέχονται σε 1 g λιπαρής ύλης.
5. Η οξύμετρηση μπορεί να γίνει και με "εμπειρικό" διάλυμα NaOH (14,2 g NaOH/L) σε 11 mL λαδιού με προσθήκη 15 mL διαλύτη που περιέχει φαινολοφθαλεΐνη. Ο αριθμός των mL που καταναλώθηκαν είναι και η οξύτητα των δειγμάτων επί τοις % σε ελαϊκό οξύ.
6. Επειδή ο διαιθυλαιθέρας είναι εύφλεκτος, πρέπει να λαμβάνεται ειδική μέριμνα κατά τη χρήση του.



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ



## ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Ποια σχέση συνδέει το ειδικό βάρος του ελαιόλαδου με το βάρος και τον όγκο του προκειμένου να πραγματοποιηθεί η μέτρηση της οξύτητάς του;
2. Η κατανάλωση διαλύματος  $0,1M$   $KOH$  για την εξουδετέρωση των ελευθέρων λιπαρών οξέων σε δείγμα ελαιόλαδου  $10\text{ g}$  είναι  $1,3\text{ mL}$ . Ποια είναι η οξύτητά του εκφρασμένη σε ελαϊκό οξύ;
3. Ο βαθμός οξύτητας ελαίου είναι  $1\text{ mL NaOH} / 100\text{ g}$ . Ποιος είναι ο αριθμός οξύτητάς του;

## ΑΣΚΗΣΗ ΕΚΤΗ

### ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΣΑΠΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

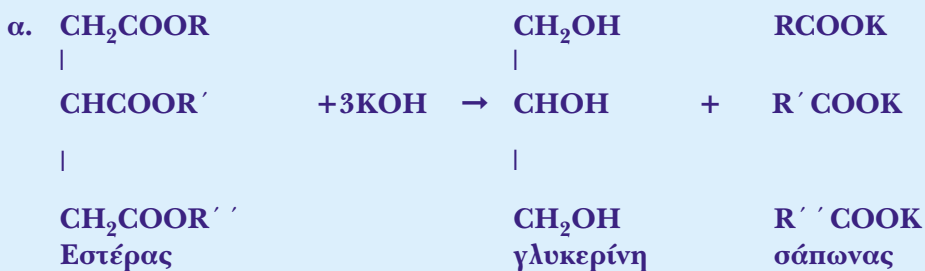
**Σκοπός:** Η μέτρηση της περιεκτικότητας των σαπωνοποιημένων γλυκεριδίων των λιπών και ελαίων.

**Αριθμός σαπωνοποίησης** ενός λαδιού ή λίπους είναι τα mg του ΚΟΗ που απαιτούνται για να εξουδετερώσουν (σαπωνοποιήσουν) τα λιπαρά οξέα και τους εστέρες που περιέχονται σε 1 g δείγματος.

Οι εστέρες των κατώτερων λιπαρών οξέων απαιτούν περισσότερο άλκαλι για τη σαπωνοποίησή τους, επομένως ο αριθμός σαπωνοποίησης είναι αντιστρόφως ανάλογος του μέσου μοριακού βάρους των λιπαρών οξέων που υπάρχουν στη λιπαρή ύλη.

#### *Τρόπος εργασίας*

1. Σε κωνική φιάλη των 250 mL φέρονται 1-2 g λιπαρής ύλης και προστίθενται με ακρίβεια (προχοΐδα) 25 mL 0,5 M αλκοολικού διαλύματος ΚΟΗ.
2. Η φιάλη συνδέεται με κάθετο ψυκτήρα και τοποθετείται σε ατμόλουτρο ή θερμαντικό μανδύα, όπου θερμαίνεται επί 15 min.
3. Κατά διαστήματα αναταράσσεται με προσοχή, για να επιτευχθεί η ομογενοποίηση του μείγματος, ενώ συνεχίζουμε τη θέρμανση για 30 min.
4. Όταν τα σταγονίδια λίπους δεν είναι πια ορατά και έχουμε τέλεια διάλυση του μείγματος, διακόπτουμε τη θέρμανση, ενώ αρχίζει η σαπωνοποίηση.
5. Στο θερμό διάλυμα προσθέτουμε 3-4 σταγόνες φαινολοφθαλεΐνης και ογκομετρούμε με διάλυμα 0,5M HCl, εξουδετερώνοντας την περίσσεια του ΚΟΗ. Το τέλος της αντίδρασης καθορίζεται από τη μεταβολή του χρώματος από ροζ σε κίτρινο.
6. Για κάθε σειρά προσδιορισμών πρέπει να εκτελείται και ένας λευκός προσδιορισμός.
7. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά το στάδιο των προσδιορισμών είναι:



(αντίδραση σαπωνοποίησης)



Εξουδετέρωση της περίσσειας του αλκάλειου (αντίδραση ογκομέτρησης).

### Υπολογισμοί

Έστω ότι τα καταναλωθέντα mL 0,5 M HCl για το λευκό δείγμα είναι 20,6 mL και για το δείγμα 8,4 mL 0,5 M HCl. Το βάρος του δείγματος είναι 2 g.

Από τη διαφορά  $20,6 - 8,4 = 12,2$  mL 0,5 M HCl γνωρίζουμε πόσα mg KOH δεσμεύθηκαν από το λίπος για τη σαπωνοποίηση, επειδή τα διαλύματα KOH και HCl είναι της ίδιας κανονικότητας.

Τα 1000 mL 0,5M HCl ισοδυναμούν με 28000 mg KOH  
Τα 12,2 mL  $x$ ;

$$x = 341,6 \text{ mg KOH}$$

Τα 2 g λίπους, για να σαπωνοποιηθούν, απαιτούν 341,6 mg KOH  
Το 1 g  $x$ ;

$$x = 170,8 \text{ mg KOH} = \text{Α.Σ.}$$

Άρα ο αριθμός σαπωνοποίησης του δείγματος είναι 170,8 mg KOH / g λιπαρής ύλης.

Ο Α.Σ. των σπουδαιότερων λιπών και ελαίων, με βάση τις προδιαγραφές, είναι:

Ελαιόλαδο	187 – 196
Βαμβακέλαιο	189 – 198
Αραβοσιτέλαιο	188 – 193
Σογιέλαιο	189 – 195
Σησαμέλαιο	188 – 195
Ηλιανθέλαιο	188 – 194
Καπνέλαιο	189 – 196
Βούτυρο αγελάδας	220 – 232
Χοιρινό λίπος	193 – 200

Ο αριθμός σαπωνοποίησης δε δίνει σημαντικές πληροφορίες για την αναγνώριση των λαδιών, αφού είναι παραπλήσιος σε πολλά από αυτά, όπως φαίνεται στον ανωτέρω πίνακα. Χρησιμεύει όμως στην ανίχνευση του λαδιού του κοκκοκάρυδου, του φοινικοπυρηνελαίου και του βουτύρου, που περιέχουν μεγάλα ποσοστά κατώτερων λιπαρών οξέων.



## ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ

1. Γιατί χρησιμοποιείται αλκοολικό διάλυμα  $KOH$  για την αντίδραση σαπωνοποίησης της λιπαρής ύλης;
2. Σε τί εξυπηρετεί ο προσδιορισμός του αριθμού σαπωνοποίησης ενός ελαίου;

**ΑΣΚΗΣΗ ΕΒΔΟΜΗ****ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΡΙΘΜΟΥ ΙΩΔΙΟΥ  
(ΜΕΘΟΔΟΣ HUBL)**

**Σκοπός:** Η έκφραση του μέτρου της περιεκτικότητας του λίπους ή ελαίου σε ακόρεστα λιπαρά οξέα.

***Εισαγωγικές πληροφορίες***

Η μέθοδος βασίζεται στον κορεσμό των διπλών δεσμών και στις αρχές της ιωδιομετρίας.

Παρέχει το επί τοις % ποσό του αλογόνου, εκφρασμένου σε ιώδιο, που απαιτεί λιπαρή ουσία για τον κορεσμό των περιεχομένων σε αυτήν ακόρεστων οξέων.

***Αντιδραστήρια - όργανα***

- Κωνική φιάλη ιωδίου 250 mL.
- Ζυγός ακριβείας.
- Προχοΐδα 25 mL.
- Σιφόνιο 1 mL.
- Ογκομετρικός κύλινδρος των 25 mL.
- Χλωροφόρμιο  $\text{CHCl}_3$ .
- Διάλυμα  $\text{HgCl}_2 - \text{I}_2$ .
- Διάλυμα  $\text{KI}$  10%.
- Διάλυμα 0.1 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ .
- Δείκτης αμύλου 1%.
- Λύχνος Bunsen ή πλάκα ηλεκτρική.

***Τρόπος εργασίας***

1. Σε φιάλη ιωδίου φέρονται 0,15 – 0,8 g ουσίας. Η ποσότητα του δείγματος διαλύεται με την προσθήκη 15 mL  $\text{CHCl}_3$ .
2. Προσθέτουμε 30 mL μείγματος διαλυμάτων (ίσων όγκων)  $\text{HgCl}_2$  και  $\text{I}_2$ .
3. Το μείγμα αναδεύεται και, αν δεν παρατηρηθεί διαύγαση, ακολουθεί μικρή προσθήκη  $\text{CHCl}_3$ .

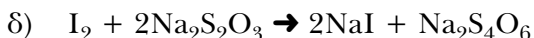
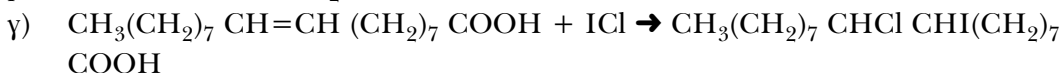
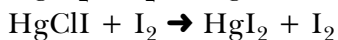
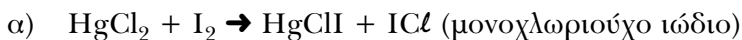
4. Αν γίνει αποχρωματισμός του υγρού μείγματος, απαιτείται νέα προσθήκη μείγματος.
5. Μετά από όλα αυτά αφήνεται το μείγμα σε ηρεμία για 1 ½ ώρα σε σκοτεινό μέρος και σε θερμοκρασία 15 – 18°C.
6. Έπειτα από την αντίδραση των πολλαπλών διπλών δεσμών, προσθέτουμε στο μείγμα 15 mL διαλύματος KI 10% και 100 mL H<sub>2</sub>O.

Αν παρατηρηθεί αποβολή κόκκινου ιζήματος, αυτό σημαίνει ότι το ποσό του KI είναι ανεπαρκές.

Η περίσσεια του I<sub>2</sub> ογκομετρείται παρουσία δείκτη αμύλου (μπλε – λευκού) με διάλυμα 0.1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Για κάθε σειρά προσδιορισμών εκτελείται και ένας τυφλός.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά σειρά που επιβάλλει η μεθοδολογία είναι:



### Υπολογισμοί

Έστω τ τα mL 0,1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> που καταναλώθηκαν με το τυφλό δείγμα και δ για τον προσδιορισμό του δείγματος βάρους 0,4 g.

Άρα τ-δ=Π mL τα πραγματικά για τον κορεσμό των διπλών δεσμών του λίπους.

Έτσι:

Τα 1000 mL 0,1 N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> αντιδρούν με 12,7 g I<sub>2</sub>

Π

x;

$$x = 0,0127 * \Pi \text{ g I}_2$$

Τα 0,4 g λιπαρής ύλης απαιτούν 0,0127 Π g I<sub>2</sub>

100

x;

$$x = 3,18 \Pi \%$$

**Παρασκευή διαλύματος Hubl**

25 g  $I_2$  διαλύονται σε 500mL  $CH_3CH_2OH$  95°

30 g  $HgCl_2$  διαλύονται σε 500mL  $CH_3CH_2OH$  95°

Τα διαλύματα αναμειγνύονται (σε ίσους όγκους) 48 ώρες πριν να χρησιμοποιηθούν.

**Πληροφορίες**

1. Ο τυφλός ή λευκός προσδιορισμός αποβλέπει στον έλεγχο της καθαρότητας των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιεί η μέθοδος και στον καθορισμό του τίτλου του διαλύματος  $HgCl_2 - I_2$ .
2. Η τιμή του αριθμού ιωδίου εξαρτάται:
  - α) Από την εκατοστιαία περιεκτικότητα των λιπών και ελαίων σε ακόρεστα γλυκερίδια.
  - β) Από τη φύση των ακόρεστων λιπαρών οξέων.
  - γ) Από τον τρόπο παραλαβής, διατηρήσης και την ηλικία των λιπαρών υλών.
3. Το διάλυμα Hubl διατηρείται περισσότερο, όσο καθαρότερη είναι η (άνυδρη)  $CH_3CH_2OH$  που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του.
4. Ο προσδιορισμός του αριθμού ιωδίου γίνεται και με τη μέθοδο Wijs (αντιδραστήριο  $ICl$ : 19g μονοχλωριούχου ιωδίου σε 1 L μείγματος  $CCl_4:CH_3COOH$  3:7). Η μέθοδος αυτή έχει ως μειονέκτημα ότι το αντιδραστήριο είναι δύσκολο να παρασκευαστεί και επιπλέον ότι απαιτεί μεγάλο χρόνο για την επίδραση επί του δείγματος.
5. Ο αριθμός ιωδίου των βασικότερων λιπαρών υλών, σύμφωνα με τις προδιαγραφές, είναι:

Ελαιόλαδο	78 – 90
Βαμβακέλαιο	94 – 106
Αραβοσιτέλαιο	110 – 125
Βούτυρο αγελάδας	26 – 46
Χοιρινό λίπος	46 – 77.

**ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ**

1. Η μέθοδος προσδιορισμού του Α.Ι. είναι άμεση ή έμμεση και γιατί;
2. Ποιος είναι ο αριθμός ιωδίου του ελαιϊκού οξέος;
3. Από ποιους παράγοντες εξαρτάται η τιμή του Α.Ι. μιας λιπαρής ύλης;

## ΟΔΗΓΙΑ

### *Τρόπος έκφρασης στις συγκέντρωσης των προτύπων διαλυμάτων.*

Ο όρος **κανονικότητα N** χρησιμοποιείται ακόμη σε πολλούς προσδιορισμούς κατά την εφαρμογή των μεθόδων της ογκομετρικής ανάλυσης και του ποιοτικού ελέγχου υλικών. Η πορεία όμως της αναλυτικής χημείας έδειξε ότι σήμερα η **μοριακότητα M**, που χρησιμοποιείται για τον ίδιο σκοπό, τείνει να εκτοπίσει πλέον την κανονικότητα ο οποίος είναι όρος ασαφής και δημιουργεί σύγχυση.

Το γεγονός αυτό συμβαίνει γιατί στην κανονικότητα η ισοδύναμη μάζα (g-eq) μιας ουσίας εξαρτάται από την αντίδραση, ενώ το mole εκφράζει μια *καθορισμένη ποσότητα* ουσίας ανεξάρτητη από την αντίδραση που πραγματοποιείται. Παράδειγμα χαρακτηριστικό της μεταβολής της ισοδύναμης μάζας είναι μερικές αντιδράσεις της εξουδετέρωσης (βάση-οξύ) και κυρίως οι αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, συγκεκριμένα:

Το υπερμαγγανικό κάλιο  $\text{KMnO}_4$  ανάλογα με τις συνθήκες έχει ισοδύναμα 1:5, 1:3, 1:1. Έτσι η φράση «διάλυμα  $\text{KMnO}_4$  1N» δημιουργεί σύγχυση όταν δεν αναφέρονται οι συνθήκες (όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον) όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση.

Συνεπώς η συγκέντρωση ενός πρότυπου διαλύματος μπορεί να εκφράζεται σε mole/l, δηλαδή μοριακότητα M, αν και η χρησιμοποίηση της κανονικότητας N και του γραμμοϊσοδύναμου g-eq αφθονεί στη χημική και βιοχημική βιβλιογραφία όπως επίσης και σε διάφορες μονογραφίες και συλλογές επίσημων αναλυτικών μεθόδων:  $N = n \times M$ , όπου  $n = \text{o αριθμός των } [\text{H}^+] \text{ ή } [\text{OH}^-] \text{ ή μεταβολή των αριθμών οξείδωσης για κάθε μόριο ουσίας και ακόμη: } 1\text{g-eq} = 1\text{mol}/n$ , το δε  $n$  εξαρτάται από το είδος της αντίδρασης.

Τέλος, ως συμπέρασμα, ένα διάλυμα 0,1 N  $\text{KMnO}_4$ , όταν υφίσταται μεταβολή του αριθμού οξείδωσης κατά 5 σε μία αντίδραση, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση μοριακότητας:  $N = n \times M \geq 0,1 = 5 \times M \geq M = 0,1/5 = 0,02$ .

**ΑΣΚΗΣΗ ΟΓΔΟΗ****ΑΡΙΘΜΟΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΩΝ**

**Σκοπός:** Η εκτίμηση της κατάστασης οξειδώσεων των λιπαρών υλών μέσω του προσδιορισμού του Α.Υ.

Ο αριθμός υπεροξειδίων αναφέρεται στο υπεροξειδικό οξυγόνο των οξειδωμένων λιπαρών υλών. Η μέθοδος προσδιορισμού του είναι εφαρμόσιμη σε όλα τα φυτικά λίπη και έλαια καθώς και τη μαργαρίνη και τα SHORTENINGS.

Ο Αριθμός Υπεροξειδίων (Α.Υ.) εκφράζει την ποσότητα αυτών των συστατικών του δείγματος (εκφρασμένη σε χιλιοστοϊσοδύναμα ενεργού οξυγόνου ανά kg) που οξειδώνουν το ιωδιούχο κάλιο κάτω από τις περιγραφόμενες συνθήκες ανάλυσης.

***Αντιδραστήρια – όργανα***

1. Χλωροφόρμιο "Pro Analysi".
2. Οξικό οξύ (το χλωροφόρμιο και το οξικό οξύ πρέπει να είναι ελεύθερα διαλυμένου οξυγόνου). Η εκδίωξη του οξυγόνου επιτυγχάνεται με ρεύμα καθαρού, ξηρού, αδρανούς αερίου.
3. Κορεσμένο υδατικό διάλυμα ΚΙ, απαλλαγμένο από ιώδιο και ιωδικά άλατα. (Διαλύονται 4 μέρη καθαρού ΚΙ σε 3 μέρη αποσταγμένου νερού. Το διάλυμα διατηρείται σε σκοτεινόχρωμη φιάλη. Εάν κατά το "λευκό" προσδιορισμό καταναλωθούν περισσότερα από 0,2 mL 0,002 N θειοθειικού, το διάλυμα πρέπει να απορρίπτεται.
4. Υδατικό διάλυμα  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,002 N ή 0,01 N. Συνιστάται το διάλυμα αυτό να παρασκευάζεται κατά την ημέρα της ανάλυσης από ακριβώς τιτλοδοτημένο διάλυμα 0,1 N.
5. Δείκτης αμύλου. Διάλυμα 1% πρόσφατα παρασκευασμένο.
6. Κωνική φιάλη 250 mL με εσφυρισμένο πώμα.
7. Προχοΐδα 25 mL.

***Τρόπος εργασίας***

Σε κωνική φιάλη 250 mL, με εσφυρισμένο πώμα, ζυγίζεται ποσότητα λαδιού με ακρίβεια 0,001 g. Η ποσότητα του δείγματος πρέπει να είναι ανάλογη με την τιμή του Α.Υ. που αναμένεται:

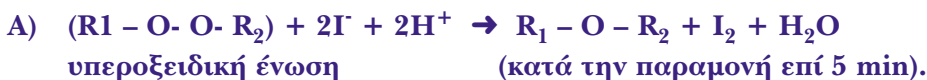
Αναμενόμενη τιμή Α.Υ.	Ποσότητα δείγματος
0 – 150 meq/kg	2,0 – 1,2g
150 – 250	1,2 – 0,8
250 – 400	0,8 – 0,5
400 – 700	0,5 – 0,3

Στην κωνική φιάλη προστίθενται 10 mL χλωροφορμίου, 15 mL CH<sub>3</sub>COOH και 1 mL κορεσμένου διαλύματος KI.

Η φιάλη πωματίζεται γρήγορα, ανακινείται επί 1 λεπτό και αφήνεται να παραμείνει στο σκοτάδι επί 5 min. Κατόπιν στο μίγμα προστίθενται 15 mL νερού και το ιώδιο που απελευθερώθηκε ογκομετρείται με Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,002 N για τιμές Α.Υ. μικρότερες του 100 ή με διάλυμα 0,01N για τιμές αριθμού υπεροξειδίων μεγαλύτερες του 100, μαζί με λίγα mL δείκτη διαλύματος αμύλου.

Συγχρόνως εκτελείται και «Λευκός» προσδιορισμός κατά τον οποίο η κατανάλωση του θειοθειικού είναι συνήθως αμελητέα. Οποσδήποτε αυτή δεν πρέπει να ξεπερνά το 1 mL Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,01N.

### Αντιδράσεις Προσδιορισμού :



### Υπολογισμός

Έστω: Βάρος δείγματος του ελαίου 1,5310 g

Όγκος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> για την ογκομέτρηση 4,8 mL

Όγκος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> για το τυφλό δείγμα 0,5 mL

Κανονικότητα του διαλύματος Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,002N

Συνεπώς: Όγκος πραγματικής κατανάλωσης για το δείγμα : 4,8 – 0,5 = 4,3 mL

Τα 1000 mL 0,002N Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ισοδυναμούν με 0,002\*16 g οξυγόνου  
 Τα 4,3 mL x;

$$x = \frac{0,002 * 16 * 4,3}{1000} = 0,1376 \text{ mg O (αφού 1 g = 1000 mg)}$$

Τα 1,5310 g περιέχουν 0,1376 mg υπεροξειδίων  
 1000 x;

$$x = 89,87 \text{ mg (89,87 : 16 = 5,62 meq/kg)}$$

*Παρατηρήσεις – Πληροφορίες*

1. Για το παρθένο ελαιόλαδο θεωρείται ως ανώτερο όριο Α.Υ. η τιμή των 20 meq/kg.
2. Τα φρέσκα λάδια συνήθως έχουν Α.Υ. κατώτερο από 10 meq/kg.
3. Στα εξευγενισμένα λάδια που χρησιμοποιούνται ως λάδια σαλάτας ή στην παρασκευή μαργαρινών και μαγειρικών λιπών, ο Α.Υ. πρέπει να είναι μικρότερος από 1 meq/kg.
4. Στις μαργαρίνες ο προσδιορισμός του Α.Υ. πρέπει να γίνεται στην ελαιώδη φάση, αφού απομακρυνθεί προηγουμένως η υδατική.
5. Μια ταγγή γεύση αρχίζει να γίνεται αισθητή όταν ο Α.Υ. είναι μεταξύ 20 και 40 meq/kg.
6. Για την ερμηνεία των Α.Υ. είναι απαραίτητο να λαμβάνεται υπόψη το συγκεκριμένο λάδι ή λίπος.