

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МУРМАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

Допущено Министерством образования РФ в качестве учебного пособия для обучающихся в высших учебных заведениях по направлениям подготовки

19.03.01 «Биотехнология», профиль «Пищевая биотехнология»,

19.03.03 «Продукты питания животного происхождения», профиль

«Высокопродуктивные технологии обработки водных
биологических ресурсов»,

19.04.03 «Продукты питания животного происхождения», профиль

«Технологии продуктов из водного сырья»

Составители:

Николаенко Ольга Александровна, кандидат технических наук, профессор кафедры технологии пищевых производств ФГОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»

Шокина Юлия Валерьевна, кандидат технических наук, профессор кафедры технологии пищевых производств ФГОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»

Волченко Василий Игоревич, кандидат технических наук, доцент кафедры технологии пищевых производств ФГОУ ВПО «Мурманский государственный технический университет»

Рецензенты:

Мукатова Марфуга Дюсембаевна, доктор технических наук, профессор Астраханского государственного технического университета.

Мухин Вячеслав Анатольевич, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии гидробионтов ПИНРО.

Оглавление

Введение.....	6
Глава 1. Классификация методов исследования, их теоретические основы.....	8
1.1. Свойства рыбных продуктов.....	8
1.1.1. Классификация свойств рыбных продуктов.....	8
1.1.2. Общая характеристика отдельных свойств рыбы и рыбных продуктов	9
1.2. Классификация методов исследования.....	18
1.3. Химические методы исследования.....	23
1.3.1. Объёмные методы.....	23
1.3.2. Гравиметрические методы.....	25
1.4. Физико-химические методы исследования.....	26
1.4.1. Спектральные методы.....	26
1.4.2. Турбидиметрия и нефелометрия.....	50
1.4.3. Рефрактометрия.....	52
1.4.4. Поляриметрия.....	54
1.4.5. Электрохимические методы исследования.....	55
1.4.6. Хроматографические методы исследования.....	68
1.5. Физические методы исследования.....	80
1.5.1. Определение водоудерживающей способности рыбного фарша.....	80
Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 1 %. Опыт повторяется трижды. Среднее значение определяется как среднее арифметическое из трех параллельных измерений.....	82
1.5.3. Реологические методы исследования.....	83
1.6. Математическая обработка результатов исследования.....	86
1.6.1. Общие понятия.....	86
1.6.2. Определение средней ошибки измерений.....	88
Глава 2. Методы отбора проб и подготовки проб к исследованию.....	95

2.1. Отбор проб.....	95
2.2. Подготовка проб к анализу.....	96
3.1. Теория сенсорной оценки.....	98
3.2. Методы органолептической оценки.....	109
4. Исследование химического состава рыбы и рыбных продуктов.....	118
4.1. Методы определения массовой доли воды и сухих веществ.....	118
4.1.1. Метод определения массовой доли воды высушиванием при 100 - 105 °С.....	118
4.1.2. Определение массовой доли воды высушиванием при 130 °С.....	120
4.1.3. Определение массовой доли воды отгонкой (метод Дина-Старка)..	120
4.1.4. Метод определения массовой доли воды высушиванием на приборе ВЧМ (прибор Чижовой), УВО.....	123
4.2. Методы определения содержания, состава и свойств липидов.....	126
4.2.1. Определение массовой доли липидов.....	128
4.2.2. Определение показателей, характеризующих качество жиров.....	139
4.2.3. Определение жирнокислотного состава.....	151
4.3. Определение массовой доли азотсодержащих веществ в сырье и продуктах питания.....	156
4.3.1. Определение массовой доли белковых веществ.....	157
4.3.2. Определение массовой доли белковых, небелковых веществ и истинного протеина.....	170
4.3.3. Определение аминокислотного состава белков.....	179
4.3.4. Определение перевариваемости белков.....	181
4.3.5. Определение буферности рыбных продуктов.....	182
4.4. Определение содержания углеводов в рыбных продуктах.....	184
4.4.1. Определение редуцирующих сахаров.....	184
4.4.2. Определение крахмала.....	192
4.5. Определение содержания минеральных веществ.....	195

4.5.1. Определение массовой доли минеральных веществ (золы) в сырье и продуктах питания.....	195
4.5.2. Определение массовой доли поваренной соли в продуктах из гидробионтов.....	196
Глава 5. Методы определения показателей безопасности.....	200
5.1. Методы определения содержания токсичных элементов.....	201
5.1.1 Определения содержания массовой доли свинца, кадмия, меди, цинка методом атомно-абсорбционной спектрометрии.....	202
5.2. Определение содержания пестицидов.....	208
5.3. Методы определения содержания консервантов.....	211
5.3.1. Определение массовой доли бензойнокислого натрия (бензойной кислоты).....	212
5.3.2. Определение массовой доли уротропина (гексаметилентетрамина) методом тирования.....	215
5.3.3. Определение сорбиновой кислоты колориметрическим методом...	217
5.3.4. Совместное определение сорбиновой и бензойной кислот методом ВЭЖХ [14].....	219
5.4. Методы определения содержания канцерогенных веществ.....	220
5.5. Методы определения содержания фенолов.....	222
Список использованной литературы.....	224
Приложение 1.....	225
Приложение 2.....	227
Приложение 3.....	237
Приложение 4.....	240
Приложение 5.....	242

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время перед рыбной отраслью России стоят задачи, связанные как с расширением ассортимента выпускаемой продукции, так и с обеспечением ее высокого качества и безопасности. Они не могут быть решены без проведения исследований сырья, полуфабрикатов и готовой продукции.

Оценка качества любой партии сырья, поступающего на предприятие, или партии готовой продукции требует проведения сплошного или выборочного контроля с использованием стандартных методов исследования. Кроме того, методы исследования необходимо применять и при операционном контроле, т. е. контроле качества полуфабриката практически на каждой технологической операции.

Проведение глубоких исследований еще более важно при разработке новых видов продукции для того, чтобы разработать продукцию, наиболее привлекательную для потребителей, имеющую высокую пищевую и биологическую ценность, длительные сроки хранения и т. д. В этом случае также необходимо разработать систему показателей качества, по которой в дальнейшем будет контролироваться данный продукт.

В связи с этим, дисциплина «Методы исследования рыбы и рыбных продуктов» является очень важной в цикле подготовки технологов для рыбной отрасли. Без нее невозможно изучение вопросов, связанных с производственным контролем. Ее знание необходимо для написания выпускной квалификационной работы, а также в дальнейшей производственной работе выпускников высших учебных заведений. Не менее важно ее знание для студентов, привлекаемых к выполнению научно-исследовательской работы по специальности, особенно если в будущем они планируют продолжить исследования в аспирантуре.

Изучение дисциплины «Методы исследования рыбы и рыбных продуктов» опирается на знания в области аналитической, неорганической, органической,

физической и коллоидной химии, инженерной реологии, метрологии, стандартизации и сертификации, в меньшей степени — физики и высшей математики.

ГЛАВА 1. КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ, ИХ ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ

1.1. Свойства рыбных продуктов

1.1.1. Классификация свойств рыбных продуктов

Главной задачей, стоящей перед любым предприятием пищевой, и, в частности, рыбной промышленности, является выпуск качественной продукции, поэтому при подготовке инженеров-технологов особое внимание уделяется вопросам, связанным с качеством продукции.

Свойство – это (в данном случае) объективная особенность продукции, которая проявляется при её создании, производстве и эксплуатации.

Для количественной характеристики одного или нескольких свойств продукции используют **показатели качества**.

С одной стороны, все свойства и характеризующие их показатели качества можно классифицировать на показатели, характеризующие возможность использования продукции по назначению, показатели сохраняемости, включающие срок хранения¹, срок годности² и срок реализации³, показатели, направленные на обеспечение безопасности продукции для жизни и здоровья потребителей, показатели, необходимые для идентификации данной группы продукции, а также эргономические, эстетические, экологические и технологические показатели. С другой стороны, показатели качества бывают единичными (если они характеризуют одно свойство продукции) и

¹ Срок хранения — период, в течение которого при соблюдении условий хранения в продукте не изменяются потребительские свойства, указанные в нормативной документации.

$$\Delta E \quad X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

² Срок годности — период, по истечении которого продукция становится негодной для использования по назначению.

$$\Delta E \quad X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

³ Срок реализации — период, в течение которого продукт может продаваться потребителю. При этом учитывается, что какое-то разумное время продукт будет еще храниться в холодильнике.

$$\Delta E \quad X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

комплексными (если они характеризуют несколько свойств).

Исследование любого пищевого продукта – сложная аналитическая задача. Использование комплекса методов анализа позволяет контролировать качество сырья, полуфабрикатов, технологические процессы производства, а также готовую продукцию.

Из-за индивидуального состава и многокомпонентности продуктов необходимо приспособлять стандартные методы к особенностям состава и физико-химической структуре продукта, при этом необходимо учитывать физическое состояние вещества и сопутствующих определяемому веществу компонентов.

При исследовании свойств рыбы и рыбных продуктов используют качественные и количественные методы измерений. При идентификации веществ выбор метода зависит от их свойств, количества и цели исследования. Общая схема измерений включает следующие стадии:

- постановка задачи;
- выбор метода и средств измерений;
- отбор и подготовка пробы продукта для исследований;
- проведение измерений;
- обработка результатов и их оформление.

Качество— это совокупность свойств, обуславливающих способность продукции удовлетворять определенные потребности в соответствии со своим назначением.

1.1.2. Общая характеристика отдельных свойств рыбы и рыбных продуктов Физические свойства рыб

Для практики рыбообработки необходимо знать физические свойства рыбы как сырья:

Форма тела- принято различать следующие основные формы тела рыб:

торпедообразные - это рыбы, у которых тело в форме веретена или торпеды - спереди сильно утолщено, сзади – утоньшено, с боков слегка приплюснуто (многие промысловые рыбы, осетровые, тунцовые, сельдевые);

Стреловидные – тело удлинненное, примерно равной высоты по всей длине; спинной и анальный плавники отодвинуты далеко назад к хвостовому плавнику (щука, акула-сарга, сабля-рыба и др. в основном рыбы хищники, имеющие высокую скорость передвижения);

Змеевидные – тело очень длинное, круглое или слегка сжато с боков (угри, миноги, вьюны);

плоская форма – тело рыб сильно сжато с боков или сверху (лещ, камбала);

неопределенная форма – в основном присуща рыбам, вылавливаемым в тропических водах (солнечник, горбылевые, бычок).

Удельная поверхность рыб – это отношение площади поверхности рыбы к ее объему или массе. Измеряется в $\text{м}^2/\text{кг}$ или $\text{см}^2/\text{г}$, или $\text{см}^2/\text{см}^3$. Чем крупнее рыба, тем меньше ее удельная поверхность. Большое значение удельной поверхности является благоприятным фактором для многих процессов обработки рыбы: нагрева, охлаждения, посола и т.д.

Плотность рыбы ρ , $\text{кг}/\text{м}^3$ – отношение массы рыбы к ее объему, для рыб, как правило, больше плотности воды. Для большинства рыб находится в пределах $1020\text{-}1070 \text{ кг}/\text{м}^3$ имеет свойство изменяться с изменением температуры тела рыбы.

Насыпная масса рыбы, $\text{кг}/\text{м}^3$ - это масса рыбы, вмещающаяся в единице объема при свободном насыпании. Зависит от вида и состояния рыбы.

Центр тяжести – у рыб находится в передней части тела, т.е. ближе к голове.

Угол скольжения, $^\circ$ – угол наклона плоскости, при которой положенная

на плоскость рыба начинает скользить вниз под действием силы тяжести, преодолевая силу трения.

Тепловые свойства рыбы

Характеризуются такими показателями как: теплоемкость, теплопроводность, температуропроводность, температура замерзания, теплосодержание рыбы.

Теплоемкость рыбы – это количество тепла, которое необходимо подвести к рыбе или отнять, чтобы изменить температуру единицы массы рыбы на 1 градус. Единицы измерения: $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{К})$.

Теплоёмкость рыбы зависит от ее химического состава и может быть рассчитана по следующей формуле:

$$C_0 = C_{\text{в}} \cdot \text{В} + C_{\text{ж}} \cdot \text{Ж} + C_{\text{б}} \cdot \text{Б} + C_{\text{з}} \cdot \text{З}, \quad (1.1.1)$$

где C_0 - теплоемкость рыбы, $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{К})$;

$C_{\text{в}}$ - теплоемкость воды, $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{К})$;

$C_{\text{ж}}$ - теплоемкость жира, $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{К})$;

$C_{\text{б}}$ - теплоемкость белка, $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{К})$;

$C_{\text{з}}$ - теплоемкость золы, $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{К})$;

В, Ж, Б, З – долевое содержание соответственно воды, жира, белка и золы или минеральных веществ.

В температурном интервале от 0 до 30...40 °С теплоемкость рыбы практически не изменяется, т.к. в этом интервале не изменяются теплоемкости отдельных ее компонентов.

Для инженерных расчётов формула может быть упрощена:

$$C_0 = C_{\text{в}} \cdot \text{В} + C_{\text{сух.в-в}} \cdot (1 - \text{В}), \quad (1.1.2)$$

где $C_{\text{сух.в-в}}$ - теплоемкость сухих веществ рыбы, $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{K})$, составляет от 1,21 до 1,41 $\text{кДж}/(\text{кг}\cdot\text{K})$;

Теплоемкость тощей рыбы больше, чем теплоемкость рыбы жирной. При обработке теплоемкость рыбы существенно изменяется.

Теплопроводность – способность рыбы проводить тепло при нагревании ее или при охлаждении, характеризуется коэффициентом теплопроводности, который зависит не только от химического состава рыбы, но и от структурных свойств её тканей. Для практических расчетов коэффициент теплопроводности рыбы рассчитывают как для двухкомпонентной системы, пренебрегая влиянием особенностей структуры.

$$\lambda_0 = \lambda_{\text{в}} \cdot V + \lambda_{\text{сух.в-в}} \cdot (1-V), \quad (1.1.3)$$

где λ_0 – теплопроводность свежей рыбы, $\text{Вт}/\text{м}\cdot\text{K}$;

$\lambda_{\text{в}}$ – теплопроводность воды, $\text{Вт}/\text{м}\cdot\text{K}$;

$\lambda_{\text{сух.в-в}}$ – теплопроводность сухих веществ, $\text{Вт}/\text{м}\cdot\text{K}$;

V – содержание воды в рыбе, доли единицы.

В интервале температур от 0 до 40 °С коэффициент теплопроводности рыбы изменяется незначительно, однако при замораживании его значение резко возрастает. Теплопроводность мороженой рыбы почти в четыре раза больше, чем свежей.

Температуропроводность – способность рыбы с некоторой скоростью изменять температуру при охлаждении или нагревании, характеризуется коэффициентом температуропроводности:

$$a_0 = \lambda_0 / (C_0 \cdot \rho), \quad (1.1.4)$$

где a_0 – коэффициент температуропроводности, м²/с.

Из формулы следует, что температуропроводность прямо пропорциональна теплопроводности и обратно пропорциональна теплоемкости. Зависит от химсостава, при температуре от 0 до 40 °С изменяется незначительно.

Температура замерзания рыбы (криоскопическая) – это температура, при которой содержащаяся в тканях рыбы вода начинает превращаться в лед. Зависит от концентрации растворенных в тканевом соке веществ. Морские рыбы имеют температуру замерзания от минус 2 до минус 2,5 °С, а пресноводные от –1,4 до минус 1,6 °С.

Электрические свойства.

Разработка новых способов обработки рыбы (электрокопчение, проварка с помощью токов высокой частоты, электроразмораживание) требует знания ее электрических свойств. Наиболее изученным является электросопротивление тканей рыбы (показатель обратный электропроводности). В значительной степени зависит от вида – химсостава рыбы, частоты тока и температуры.

Оптические свойства.

Наиболее изучена люминесценция – свечение тканей рыбы при ультрафиолетовом облучении. Свежая рыба люминесцирует голубым светом, если в ней начались процессы порчи, то цвет люминесценции меняется на фиолетовый. Это свойство может быть использовано для объективной оценки качества рыбы-сырца.

Химический состав рыбы.

Элементный химический состав - показывает содержание в рыбе отдельных химических элементов. Элементный химический состав обусловлен свойствами воды в которой обитает рыба и свойствами пищи, которой она питается. В рыбе обнаружено свыше 60 различных химических элементов. В

наибольших количествах в ней содержатся: кислород – 75%; водород – 10%; углерод – 9,5%; азот – 2,5...3 %; кальций 1,2...1,5 %; фосфор – 0,6...0,8 %; сера – 0,3 %. Остальные элементы содержатся в рыбе в очень малых количествах.

Молекулярный химический состав – это содержание в рыбе отдельных химических веществ по отношению к массе рыбы.

Общий химический состав.

При оценке химического состава рыбы обработчики учитывают четыре основных компонента: содержание белков, жира, воды и минеральных веществ. Кроме них, в рыбе находятся и другие вещества – витамины, гормоны, фосфатиды, стерины, гликоген, углеводы, пигменты. Общий химический состав рыбы непостоянен и изменяется в зависимости от возраста, пола, места обитания, сезона лова и вида рыб. Средний химический состав рыб определяется следующими данными: вода от 60 до 85 %, белок (или сырой протеин) от 16 до 18 %, жир от 0,1 до 30 %, зола от 2,5 до 4,5 %. Характерной особенностью химического состава рыб является то, что имеет место взаимосвязь между содержанием жира и воды, а именно, чем больше рыба содержит воды, тем меньше жира, и наоборот. Суммарное содержание в рыбе воды и жира есть величина относительно постоянная (около 80 %).

Азотистые вещества мышечной ткани рыб.

Общий азот (ОА) или сырой протеин (СП) мышечной ткани рыб распределен между белковым и небелковым. Соотношение белкового и небелкового азота для костистых рыб составляет в среднем соответственно 85 и 15 %. В белках рыб обнаружено свыше 25 аминокислот, как заменимых, так и незаменимых. Мышечная ткань рыб содержит все незаменимые аминокислоты, поэтому белки мышечной ткани рыб являются полноценными. Небелковый азот (НБА) мало влияет на пищевую ценность мяса рыб, однако является важной составляющей мышечной ткани, т.к. придает мясу специфический вкус,

запах, способствуют или не способствуют возбуждению аппетита и выделению пищеварительного сока. НБА рыб весьма неустойчивые соединения, при хранении подвержены быстрой порче, продукты которой активно используются в питании микрофлоры. К НБА относятся следующие соединения:

1. Азотистые основания
2. Свободные аминокислоты (САК)
3. Амиды кислот
4. Производные гуанидина
5. Производные пурина
6. Производные имидазола.

Азотистые основания подразделяются на летучие и триметиламмониевые. Летучие основания (ЛО) – это аммиак, метиламин, диметиламин, триметиламин, накапливаются в рыбе в результате жизнедеятельности микрофлоры, поэтому по содержанию ЛО судим о свежести рыбы (в свежей рыбе содержание ЛО составляет 10-15 до 20 мг%). Триметиламмониевые основания содержатся в основном в мясе морских рыб. В эту группу входят триметиламиноксид (ТМАО), карнитин, холин. Содержание ТМАО: в мясе костистых рыб от 100 до 1000 мг%, в мясе пресноводных от 200 до 1400 мг%. Высокое содержание ТМАО отрицательно влияет на качество многих продуктов переработки рыб (вызывает химический бомбаж консервов и ухудшение их внешнего вида, присутствие в кормах вызывало массовые заболевания животных анемией).

Липиды

Основную массу жиров рыб составляют простые липиды – триглицериды жирных кислот (известно свыше 90 высокомолекулярных ненасыщенных жирных кислот, в том числе высоконепредельных с 4-мя, 5-ю и 6-ю двойными связями). В последние годы большое значение придается высоконепредельным

жирным кислотам с 5-ю и 6-ю двойными связями – эйкозапентоеновой и докозагексаеновой, т.к. они являются предшественниками особых гормоноподобных веществ – простагландинов, обладающих высокой биологической и фармакологической активностью (уменьшают свертываемость белков крови, снижают опасность коронарных тромбозов, оказывают лечебное действие при артритах, мигрени, мощная профилактика онкозаболеваний, особенно рака молочной железы). В состав жира рыб в сравнительно небольших количествах входят различные органические соединения – фосфолипиды, стерины, каратиноиды, воски, углеводороды, а также витамины.

Минеральные вещества.

Количественно преобладают P, Ca, K, Na, Mg, S, Cl. Эти элементы содержатся в десятых и сотых долях единицы и относятся к макроэлементам. В незначительных количествах в рыбе содержатся Fe, Cu, Mn, Co, Br, J – микроэлементы

Витамины

Разделяются на 2 основные группы: жирорастворимые (A, D, E, K) и водорастворимые (группа B, витамины C и P).

Углеводы

Представлены, преимущественно, гликогеном и полисахаридами, в частности, гексозаминами. При термической обработке продуктов образуют темноокрашенные вещества – меланоидины, ухудшающие товарный вид продукции.

Вопросы для самоконтроля:

1. Перечислите тепловые свойства рыб.
2. Какие группы небелковых азотистых веществ характерны для рыбы?

3. Что такое качество продукции?
4. В чём разница между понятиями «срок хранения» и «срок годности»?

1.2. Классификация методов исследования

Метод исследования – это совокупность правил применения определённых принципов для оценки свойств продукции.

Все методы исследования можно разделить на две широкие группы: объективные и субъективные. Объективные методы – это методы, результат которых не зависит от желания, настроения и других особенностей испытателя (при условии, что испытатель будет строго следовать методу). К объективным методам относятся все измерительные методы, а также расчётные и тестовые методы. Результат субъективных методов в определённой степени зависит от испытателя. К этой группе относятся, в частности, эвристические методы.

Эвристические методы основаны на совокупности логических приемов и методических правил теоретических исследований для достижения конечного результата. Общим для всех этих методов является субъективность при оценке результатов. К ним относятся органолептические, экспертные, социологические методы. Общим для всех этих методов является субъективность при оценке результатов.

При *органолептических исследованиях* оценка свойств (вкуса, цвета, запаха, внешнего вида) осуществляется с помощью органов чувств. К достоинствам этого метода можно отнести простоту реализации, доступность, небольшие затраты времени и средств. Главным его недостатком является субъективность результата. Следует отметить, что использование измерительных приборов для определения показателей, традиционно относящихся к органолептическим (например, определение цвета с помощью фотоколориметра), не является органолептическим методом.

При *социологическом методе* сбор информации о качестве производится на основании опросов, анкет, выставок. В настоящее время это немаловажно, т.к. позиция профессионально подготовленного эксперта может отличаться от позиции рядового потребителя, который может не быть готовым приобрести

продукцию, имеющую высокую ценность и приятные, на взгляд специалиста, характеристики или, наоборот, приобретать менее ценную и даже небезопасную, но традиционно выпускаемую продукцию, или же просто готового высказать определённые пожелания. В этом случае важно узнать мнение потребителей ещё до того, как будет организовано производство и выпущены партии не пользующегося спросом продукта, а также постепенно готовить потребителей к более перспективным видам продукции. Некоторые методы могут одновременно относиться к социологическим и к органолептическим.

Экспертный метод основан на учете мнений экспертов при проведении независимой экспертизы. Он применяется обычно, когда затруднительно определить численные значения показателей качества экспериментальным или расчетным путем, в особенности – когда следует отдать предпочтение тому или иному показателю. В ряде случаев некоторые экспертные методы также могут одновременно быть и органолептическими.

Расчётные методы основаны на определении неизвестного показателя путём расчёта исходя из значений известных показателей и известных закономерностей.

Измерительные методы – методы, основанные на определении характеристик путем измерений и/или регистрации показателей. При измерительных методах пользуются техническими устройствами, а при регистрационных – визуальный отсчет числа объектов, выбранных по определенному признаку. Измерительные методы подразделяются в соответствии с признаками, указанными на рис.1.1:

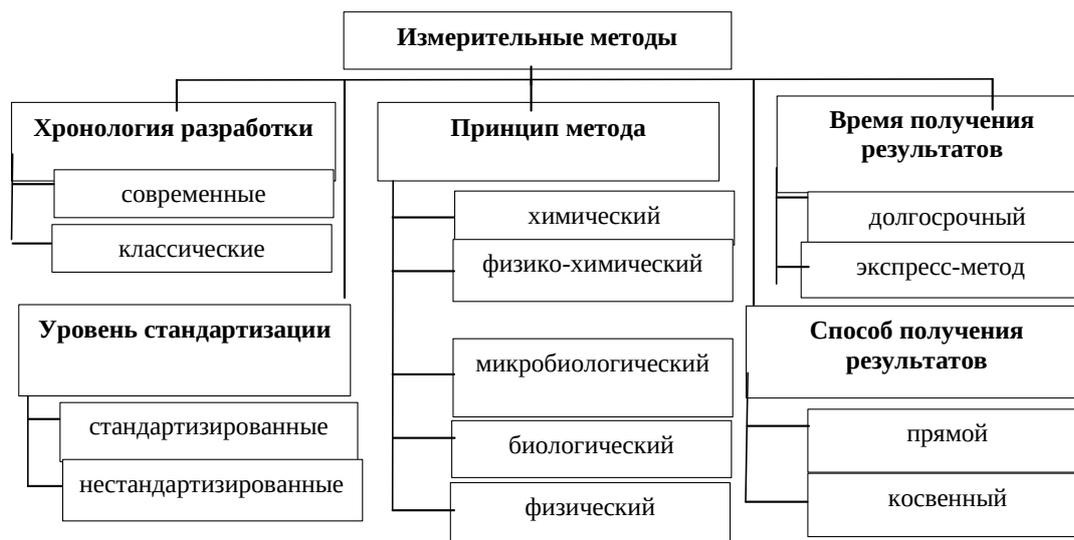


Рис. 1.1.1. Классификация измерительных методов

По хронологическому признаку методы делятся на *классические* и *современные*. К классическим относятся методы разработанные в 19-20 веках и не утратившие значение на современном этапе (например, определение содержания белка по Кьельдалю).

К современным методам относятся физико-химические методы исследования (люминесцентный, спектроскопия ядерного магнитного резонанса, ИК-спектрометрия и т.д.). Эти методы отличаются от классической большей чувствительности, меньшими затратами времени, использованием современных средств измерений, они так же требуют высококвалифицированных специалистов.

Измерительные методы по **принципам действия** можно разделить на физические, химические, физико-химические и биологические (включая микробиологические).

Физические методы – методы, основанные на регистрации аналитического сигнала, фиксирующего некоторое свойство, как результат физического процесса. С помощью физических методов определяют, например, массу, длину, цвет, реологические свойства. Это метод наиболее объективный и прогрессивный. К преимуществам метода можно отнести быстроту

определения, точность результата, к недостаткам - невозможность определения многих показателей, в основном аналитических.

Химический (аналитический) метод основан на фиксировании аналитического сигнала, возникающего как результат химической реакции, применяется для оценки состава и свойств продукта. Эти методы наиболее точные и объективные, однако, они требуют подготовки реактивов, большого количества посуды и, зачастую, длительны.

Химические методы подразделяются на титриметрические и гравиметрические.

Физико-химические методы основаны на регистрации сигнала, возникающего как результат химической реакции, но который при этом фиксируется в виде измерения какого-либо физического свойства. Эти методы в настоящее время являются наиболее прогрессивными.

Физико-химические методы подразделяются на оптические, электрохимические, хроматографические, ультразвуковые и др.

Биологические методы исследования предполагают изучение биологических систем. Эти методы основаны на том, что жизнедеятельность живых существ очень сильно зависит от среды их обитания; при изменении состава этой среды биологические объекты дают ответный сигнал [1].

Для исследования пищевых продуктов среди биологических наиболее часто используют *микробиологические методы*, применяемые для установления степени обсеменения микроорганизмами сырья, полуфабрикатов, вспомогательных материалов, оборудования и готовой продукции.

По способу получения результата измерительные методы делят на **прямые** и **косвенные**. В прямых методах измеряют непосредственно искомое значение определяемой величины⁴, а в косвенных – сначала определяют одну

⁴ При определении относительных и удельных показателей это может быть не совсем точно: если результат, полученный путём измерения, относят к массе навески и/или выражают в процентах, метод всё равно

величину, а потом через неё рассчитывают другую (т.е., косвенный метод – это комбинация измерительного и расчётного метода).

Стандартизованный (стандартный) метод – это метод определения данного показателя качества для данного продукта, приведённый в стандарте (ГОСТ, ГОСТ Р) или в аналогичном утверждённом документе (МУ, МУК). Только такие методы могут быть использованы для получения официальных результатов в рамках технического регулирования. **Нестандартизированные (нестандартные) методы** не являются официально утверждёнными и могут использоваться для внутренних целей и (в определённых случаях) в рамках научных исследований. При этом следует помнить, что метод, являющийся стандартным для одной группы продуктов, может быть нестандартным для другой группы (или вообще быть неприменимым для неё).

В спорных случаях используют **арбитражный метод**, как наиболее точный. Такой метод выбирают, если для определения одного и того же показателя для одной и той же группы продуктов существует два или более стандартных метода. В этом случае, как правило, в качестве арбитражного выбирают наиболее точный или наиболее апробированный метод, а в стандарте его располагают первым по списку среди методов определения данного показателя для данной группы продуктов.

Тестовые методы основаны на проведении различных тестов, позволяющих ответить на вопрос положительно или отрицательно⁵. К таким тестам, например, могут относиться качественные химические реакции

считают прямым.

$$\Delta E \quad X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

⁵ В ряде случаев в тестовом методе делают попытку разделить градации проявления признака, например, «-» - отсутствие признака, «±» - признак едва проявляется; «+» - признак явно наблюдается; «++» - признак ярко выражен и т.д. Однако границы между такими градациями носят в значительной степени субъективный характер.

(например, тест на наличие крахмала – посинение с йодом), тесты на разрыв и т.п. Тестовые методы в настоящее время получили определённое распространение, однако они не позволяют установить числовое значение показателя.

Вопросы для самоконтроля.

1. В чём особенность всех эвристических методов?
2. Когда и для чего можно применять нестандартизованные экспресс-методы?
3. В чём отличие химических методов от физикохимических?
4. Что такое арбитражный метод?
5. Может ли один и тот же метод быть одновременно и социологическим, и экспертным?

1.3. Химические методы исследования

1.3.1. Объёмные методы

Методы количественного определения, основанные на измерении объема раствора реагента, израсходованного на реакцию с определяемым веществом, называются **титриметрического** или **объемного** анализа.

Объемные методы анализа основаны на протекании реакций нейтрализации, окисления – восстановления, осаждения и др.

Процесс приливания одного раствора, находящегося в бюретке, к другому раствору для определения концентрации одного из них называется **титрованием**. Обычно измеряют объем раствора реагента, концентрация которого точно известна. Титриметрические определения подразделяют на прямое, косвенное и обратное титрование.

Прямым титрованием называют метод, когда к анализируемому раствору вещества непосредственно добавляют раствор известной

$$\Delta E \quad X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

концентрации (рабочий раствор).

При *косвенном титровании* анализируемое вещество замещают эквивалентным количеством другого вещества, а затем титруют рабочим раствором. Косвенное титрование применяют, когда нет подходящего индикатора для прямого титрования.

Обратное титрование используют в тех случаях, когда прямое титрование невозможно. При этом берут два рабочих раствора, один из которых добавляют в избытке, а вторым титруют избыток первого.

При всех расчетах результатов анализа используется зависимость (закон эквивалентов):

$$V_1C_1=V_2C_2, \quad (1.3.1)$$

где V_1 и V_2 – объемы реагирующих веществ;

C_1 и C_2 – молярные концентрации эквивалента⁶ растворов реагирующих веществ.

Процентное содержание вещества в каком-либо объекте, рассчитывают по формуле

$$X = \frac{V \cdot M_{\text{экв}} \cdot C \cdot K}{m \cdot 10},$$

$$(1.3.2)$$

где V – объем раствора, пошедшего на титрование, см³;

$M_{\text{экв}}$ – молярная масса эквивалента определяемого вещества, г/моль;

C – молярная концентрация эквивалента титрованного раствора,

K – поправочный коэффициент к концентрации;

m – масса продукта, г.

Газовольметрический (газометрический) метод – метод, основанный на

⁶ Использованный ранее термин «нормальность» сейчас считается устаревшим, хотя его ещё можно встретить в обиходе.

$$\Delta E \quad X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

измерении объёма выделяющегося или поглощающегося газа.

1.3.2. Гравиметрические методы

Методы количественного анализа, основанные на точном определении массы вещества, выделенного в виде органических или неорганических соединений, называются *гравиметрическим* или *весовым анализом*.

Гравиметрический анализ — один из наиболее точных методов. Диапазон содержания определяемых веществ колеблется в пределах от сотых долей до десятков процентов.

Основным недостатком гравиметрического метода является длительность анализа. Однако в некоторых случаях этот метод незаменим.

Для разделения определяемого и мешающих веществ используют методы осаждения, экстракции, высушивания и др., основанные на переводе компонентов в твердую, жидкую или газообразную фазу.

В методах осаждения к раствору вещества прибавляют раствор осадителя и определяемый компонент выделяют в виде трудно растворимого (практически нерастворимого) соединения. После осаждения определяемого вещества осадок выделяют фильтрованием и отмывают от посторонних веществ, которые могут быть захвачены поверхностью осадка. Затем осадок высушивают, если необходимо, прокаливают и после охлаждения взвешивают.

При экстрагировании определяемый компонент извлекают каким-либо растворителем с последующим отделением растворителя и взвешиванием определяемого вещества.

Метод сушки, иначе называемый термогравиметрическим, основан на удалении влаги из исследуемого объекта в результате повышения температуры. Навеску объекта исследования взвешивают до сушки и после получения сухого остатка, а затем определяют убыль массы, которая условно принимается за влагу.

Некоторые продукты могут содержать различные вещества, способные в

процессе сушки улетучиваться вместе с влагой, что приводит к ошибкам анализа, т. е. результат получается завышенным. Такого рода ошибки могут возникнуть и по причине разложения сухого остатка при нагревании с образованием летучих компонентов. В процессе сушки может произойти также некоторое увеличение массы высушиваемого объекта, что приводит к искажению результатов анализа. Это происходит, например, в результате окисления некоторых составных частей сухого вещества исследуемого объекта кислородом воздуха. Наибольшей способностью к такому окислению обладают жиры, в состав которых входят непредельные жирные кислоты. Увеличение массы сухого вещества может возникнуть и в результате гидролиза некоторых веществ, входящих в состав сухого вещества исследуемого объекта. При этом часть воды, вступая в реакцию с гидролизуемым веществом, не улетучивается в процессе сушки, а остается в составе сухого остатка.

Вопросы для самоконтроля.

1. Выберите из перечисленных методов химический: определение массы нетто консервов; йодометрическое титрование при определении пероксидного числа; кондуктометрическое титрование при определении содержания поваренной соли argentометрическим методом.
2. Что такое закон эквивалентов? Как его применяют при титриметрическом исследовании?

1.4. Физико-химические методы исследования

1.4.1. Спектральные методы

К спектральным методам исследования относят методы, основанные на изучении спектра электромагнитного излучения (в радиоволновом, инфракрасном, видимом, ультрафиолетовом или рентгеновском диапазоне), поглощаемого или излучаемого молекулами или атомами (соответственно, абсорбционная или эмиссионная молекулярная или атомная спектроскопия).

Спектры, наблюдаемые в отдельных интервалах радиоволнового диапазона (сантиметровые и метровые), связаны соответственно с явлениями электронного парамагнитного и ядерного магнитного резонансов [2].

Иногда к этой группе методов относят также масс-спектрометрию, на самом деле, не имеющую отношения к электромагнитному излучению, но тоже основанную на получении спектра.

В таблице 1.4.1 приведена классификация спектральных методов.

Таблица 1.4.1 (по [3])

Спектрометрия	Источник аналитического сигнала	Аналитический сигнал	Метод
Молекулярная	Молекула	Поглощение (абсорбция)	Молекулярно-абсорбционной спектрометрии (МАС)
		Испускание (люминесценция)	Молекулярно-люминесцентной спектрометрии (МЛС), или флуориметрии
Атомная	Атом	Поглощение (абсорбция)	Атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС)
		Испускание (эмиссия)	Атомно-эмиссионной спектрометрии (АЭС)
Магнитного резонанса	Ядро атомов	Ядерный магнитный резонанс – ЯМР-спектр	Спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ЯМР)
	Электрон	Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР-спектр)	Спектрометрия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР)
Масс-спектрометрия	Ион	Масс-спектр	Масс спектрометрия

В спектральных методах (кроме масс-спектрометрии) вещества идентифицируют по возможности перехода в атоме или молекуле с одного

энергетического уровня на другой. Если такой переход осуществится, то выделится или поглотится энергия ΔE в виде кванта света с частотой

$$\nu = \frac{\Delta E}{h}, \quad (1.4.1)$$

где h – постоянная Планка ($6,626 \cdot 10^{-34}$ Дж·с)

Изменения энергии, которым соответствует длина волны от 3 пм до 700 нм (рентгеновская, УФ и видимая спектроскопия), вызывается электронными переходами (с одной орбитали в атоме или молекуле на другую); от 3 мкм до 3 мм (в основном, ИК-спектроскопия) – внутримолекулярными колебательными переходами; от 3 мм до 3 см – вращательными молекулярными переходами; на сантиметровом диапазоне – электронным парамагнитным резонансом (ЭПР), а на метровом диапазоне – ядерным магнитным резонансом (ЯМР) [2].

Молекулярно-абсорбционная спектроскопия основана на изучении спектров поглощения молекул, т.е. может проводиться не только (и, как правило, не столько) с газообразными, но и с жидкими веществами и растворами, что широко используется при анализе пищевых продуктов.

Ультрафиолетовая и видимая спектроскопия, как уже было отмечено, связана с переходами электронов в атомах или молекулах из одного состояния в другое. Как известно из курса физики и физической химии, электроны в атомах и молекулах находятся на так называемых орбиталях, представляющих собой решения волнового уравнения Шредингера. Каждая из орбиталей характеризуется определённым энергетическим состоянием, при этом за 0 принимают энергетическое состояние свободного электрона. В обычных условиях атом и молекула находятся в основном состоянии, т.е. в состоянии, характеризующемся наименьшей энергией. При поглощении атомом (молекулой) энергии, он (она) переходит в какое-либо возбуждённое состояние, т.е. один из электронов переходит с одной орбитали на другую свободную.

Энергия может быть сообщена атому (молекуле) в виде фотона, т.е. кванта света. При этом фотон будет поглощён атомом (молекулой) только в том случае, если его энергия (связанная с длиной волны) будет равна⁷ разности энергии двух орбиталей, между которыми возможен переход (или энергии, необходимой для отрыва электрона). Если пропускать через образец вещества электромагнитное излучение, длины волн которого равномерно распределены в рассматриваемом интервале, то в спектре прошедшего излучения будут наблюдаться «провалы», т.е. полосы или зоны с меньшей интенсивностью. Для молекул сложного состава наличие той или иной зоны соответствует наличию той или иной группы атомов (так называемого **хромофора**), что может быть использовано как для идентификации молекулы по уже имеющемуся спектру стандартных молекул, так и для анализа структуры неизвестной молекулы [2]. Следует отметить, что поскольку в молекуле отдельные группы атомов сильно влияют друг на друга (например, оттягивая на себя или, наоборот, отталкивая электронную плотность), то положение максимумов поглощения для одного и того же хромофора в разных молекулах будет несколько различаться. Также на это положение будет влиять растворитель, способный, в некоторой степени, изменить конфигурацию молекулы и распределение её энергетических уровней [2]. В таблице 1.4.2 приведены максимумы длин волн поглощения некоторых хромофоров.

Таблица 1.4.2. Максимумы поглощения некоторых хромофоров [2]

<i>Хромофор (выделен жирным)</i>	<i>Максимум(ы) поглощения, нм</i>	<i>Растворитель</i>
R-NC=CH-R (цис)	180	–

⁷ На самом деле, точного равенства здесь может и не наблюдаться, но чем больше разность энергии фотона и ΔE , тем меньше вероятность поглощения фотона для такого перехода и, как следствие, тем меньше интенсивность поглощения, поэтому характеризуя длину волны поглощения, имеют в виду его максимум.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

<i>Хромофор (выделен жирным)</i>	<i>Максимум(ы) поглощения, нм</i>	<i>Растворитель</i>
(транс)	183	–
HC≡CH	173	–
CH ₃ (C=O)CH ₃	190	n-гексан
	280	
– N=O (в нитрозобутане)	300	эфир
	665	
CH ₂ =CH-CH=CH ₂	217	–

Таким образом, изучая спектры поглощения исследуемого вещества, можно определить наличие в нём тех или иных групп атомов. Кроме того, можно составлять библиотеки спектров эталонных веществ, а потом определять наличие того или иного вещества в исследуемой смеси, проводя сравнение с изученными спектрами. Между тем, этот метод достаточно эффективен лишь для индивидуальных веществ или несложных смесей; в сложных смесях веществ, какими является большинство пищевых продуктов спектры отдельных компонентов будут накладываться друг на друга и, в лучшем случае, исследование можно будет проводить только по одному-двум характерным максимумам. В этом случае чаще всего проводят выделение исследуемых веществ из смеси, как правило, химическими и физико-химическими методами (осаждение, растворение, экстракция, хроматография и т.д.).

Исследование спектров поглощения применяется при качественном анализе; для количественного анализа необходимо применять методы фотометрии. В этом случае выбирают наиболее характерный максимум на спектре поглощения и по его величине (т.е. по степени поглощения света) судят о концентрации исследуемого вещества в смеси. В соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, интенсивность света I длиной волны λ , прошедшего через образец, связана с интенсивностью падающего светового потока соотношением:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C}, \quad (1.4.2)$$

где I_0 – интенсивность падающего светового потока;

ε_λ – молярный коэффициент поглощения при длине волны λ ;

l – толщина поглощающего слоя;

C – молярная концентрация исследуемого вещества.

Как правило, при фотометрии определяют оптическую плотность D –

логарифм отношения $\frac{I_0}{I}$. Исходя из формулы (1.4.2), [3]

$$D = \varepsilon_\lambda \cdot C \cdot l \quad (1.4.3)$$

Из этого соотношения следует, что величина оптической плотности прямо пропорциональна концентрации определяемого вещества, что и используют на практике, не подставляя значения молярного коэффициента поглощения и толщины слоя, а проводя построение калибровочного графика⁸.

Физический смысл ε становится ясным, если принять $l = 1$ см и $C = 1$ моль/дм³, тогда $D = \varepsilon$. Следовательно, молярный коэффициент поглощения равен оптической плотности одномолярного раствора при толщине светопоглощающего слоя 1 см.

⁸ ΔE Исходя из формулы (1.4.3), очевидна пропорциональность оптической плотности лишь с молярной концентрацией определяемого вещества. На практике часто используют и другие способы выражения концентрации. Это, безусловно, допустимо в случае, если форма выражения концентрации прямо пропорциональна молярной концентрации (например, титр). В случае массовой доли это не совсем справедливо, т.к. молярная концентрация относится к объёму, а массовая доля – к массе, но при небольших концентрациях с ростом массовой доли плотность раствора меняется незначительно, поэтому погрешность, получающаяся при использовании массовой доли в качестве концентрации, незначительна и, как правило, намного меньше, чем отклонение от закона Бугера-Ламберта-Бера.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

Следует отметить, что закон Бугера-Ламберта-Бера не всегда выполняется очень точно, особенно в области высоких концентраций. Очень часто калибровочный график имеет следующий вид:

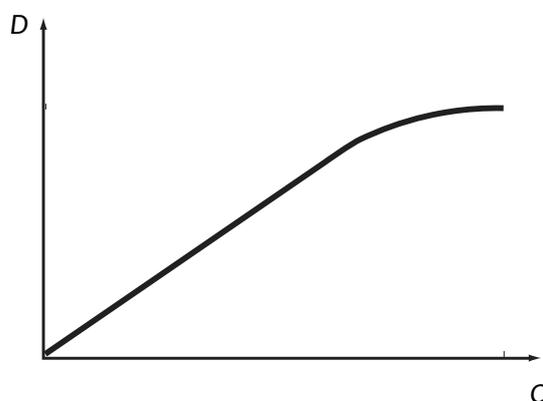


Рисунок 1.4.1 – Пример отклонения от закона Бугера-Ламберта-Бера

В этом случае необходимо, во-первых, как можно более точно построить калибровочный график, а, во-вторых, работать с концентрациями, находящимися в области графика, в которой зависимость близка к линейной.

Для успешного определения концентрации веществ фотометрическим методом необходимо, чтобы исследуемое вещество интенсивно поглощало свет с длиной волны λ , чтобы в системе отсутствовали (или присутствовали всегда в постоянной концентрации) другие вещества, заметно поглощающие свет при этой длине волны, а также, чтобы система пропускала, но не рассеивала свет⁹. На практике эти условия требуют специальной пробоподготовки, при которой исследуемое вещество отделяют от мешающих примесей, а иногда и концентрируют. Очень часто само исследуемое вещество плохо поглощает свет, но перед фотометрированием проводят так называемую **цветную реакцию**, в результате которой образуется «окрашенное» соединение,

⁹ ΔE В принципе, фотометрическое определение вещества в системе, рассеивающей или отражающей свет возможно путём комбинации фотометрического и нефелометрического методов.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

количество которого точно соответствует количеству исследуемого вещества (т.е. все реагенты добавляют в избытке). Например, содержание азота свободных аминокислот в ряде случаев определяют нингидриновым методом. В нингидриновую реакцию вступают аминокислоты (слабоокрашенные вещества), в результате чего из двух молекул нингидрина и аминогруппы аминокислоты образуется так называемый комплекс Руэмана, который и определяют фотометрически.

При построении калибровочного графика, как правило, берут стандартный раствор исследуемого вещества. Иногда фотометрическим методом определяют содержание не одного конкретного вещества, а целой группы веществ (например, всех альдегидов в случае альдегидного числа; фенолов в копчёных продуктах). В этом случае для построения калибровочного графика берут наиболее удобное для анализа (или встречающееся в данной группе продуктов чаще всего) вещество из этой группы. Если результат выражают в виде массовой концентрации, то его указывают в пересчёте на это вещество (например, альдегидное число равно 2,4 мг коричневого альдегида на 1 г жира¹⁰; содержание фенолов в продукте составляет 2 мг % в пересчёте на гваякол). Из стандартного раствора готовят несколько разведений (их выбирают таким образом, чтобы концентрация исследуемого вещества в пробе реального продукта перед анализом гарантированно оказалась в диапазоне от самого меньшего до самого большего разведения), после чего проводят цветную реакцию (если в ней есть необходимость) точно так же, как и с пробой исследуемого продукта. Для каждого разведения определяют оптическую

¹⁰ ΔE Это означает не то, что в жире содержится 2,4 мг/г именно коричневого альдегида (и даже не то, что в 1 г жира находится ровно 2,4 мг альдегидов), а то, что все альдегиды, вступившие в цветную реакцию из 1 г жира приведут к такому же поглощению света, как и 2,4 мг коричневого альдегида, т.е. говорят, что их количество эквивалентно 2,4 мг коричневого альдегида.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

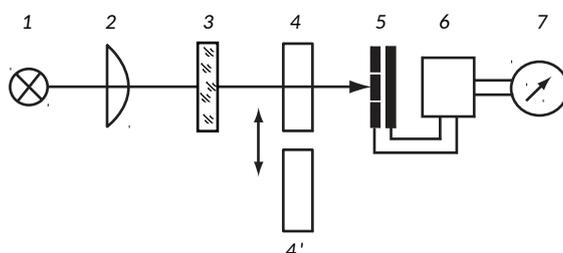
плотность и на графике откладывают по оси абсцисс концентрацию для данного разведения, а по оси ординат – оптическую плотность. После проведения фотометрирования исследуемой пробы, зная оптическую плотность, по калибровочному графику находят концентрацию определяемого вещества.

В настоящее время выпускают различные приборы для проведения фотоэтрического анализа: колориметры, фотометры, фотоэлектроколориметры, спектрофотометры и т. д., в которых присутствуют различные комбинации источников света, монохроматизаторов и рецепторов. Существуют следующие варианты классификации таких приборов [3]:

- по способу монохроматизации светового потока – спектрофотометры, в которых монохроматизация осуществляется за счёт разложения света в спектр при прохождении его через призму (призменные монохроматизаторы) или дифракционную решётку (решётчатые монохроматизаторы), что позволяет достичь высокой степени монохроматизации рабочего излучения; а также фотоэлектроколориметры, в которых монохроматизация достигается с помощью светофильтров, пропускающих свет в очень узком диапазоне длин волн;
- по способу измерения – однолучевые с прямой схемой измерения и двухлучевые с компенсационной схемой;
- по способу регистрации измерений — регистрирующие и нерегистрирующие.

Схема однолучевого фотометра приведена на рис. 1.4.2. Кюветы поочередно устанавливают на пути светового пучка. Кювету 4 заполняют контрольной пробой и устанавливают на пути светового пучка. Затем устанавливают стрелку гальванометра 7 на нулевое деление (нуль поглощения или 100 % пропускания) и помещают на пути светового потока кювету с

исследуемой пробой 4'. Проводят измерения и снимают отсчет по шкале, отградуированной в единицах оптической плотности и в процентах пропускания [3].



1 – источник света; 2 – линза; 3 – светофильтр; 4 – кювета с раствором сравнения; 4' – кювета с исследуемым раствором; 5 – фотоэлемент; 6 – усилитель; 7 – гальванометр

Рисунок 1.4.2. Схема однолучевого фотометра (по [3])

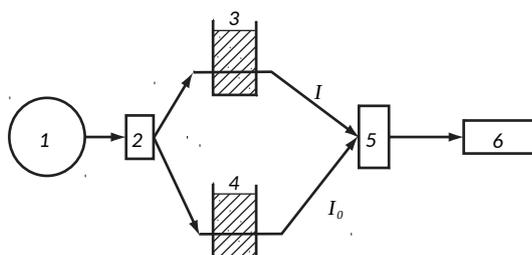
Чаще всего среди этой группы приборов применяют фотоэлектроколориметры марок КФК-2, КФК-3, предназначенные для измерения поглощения в диапазоне длин волн от 315 до 980 нм. Спектральные характеристики светофильтров представлены в таблице 1.4.3.

Таблица 1.4.3 – Спектральные характеристики светофильтров

№ светофильтра	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Длина волны, нм	315	364	400	440	490	540	590	670	750	870	980

В настоящее время для получения спектров поглощения применяют, как правило, двухлучевые спектрометры СФ-14, СФ-18, в которых измеряют оптическую плотность прозрачных и мутных сред (рис. 1.4.3). Пучки монохроматического излучения проходят параллельно через кюветы 3и 4, наполненные соответственно исследуемой и контрольной пробами. Оба луча попадают на фотоэлементы 5, где сравниваются интенсивности излучений, прошедших через контрольную пробу I_0 и исследуемую пробу I . Результат

сравнения регистрируется блоком 6 [3].



1 – источник излучения; 2 – монохроматор (призма или дифракционная решетка); 3 – кювета с исследуемым раствором; 4 – кювета с раствором сравнения; 5 – фотоэлементы сравнения; 6 – блок регистрации.

Рисунок 1.4.3 – Схема двухлучевого спектрометра (взята из [3])

Замена светофильтров монохроматором в виде призмы или дифракционной решётки существенно увеличивает возможности фотометров, позволяя устанавливать любую длину волны, что позволяет значительно повысить чувствительность и точность измерения, снизить влияние примесей. Источником света в ультрафиолетовой области служит водородная лампа, а в видимой области – лампа накаливания [3].

Фотометрический метод широко используется при определении состава и свойств сырья и пищевых продуктов, контроля технологического процесса. В настоящее время в пищевой промышленности до 15 % исследований осуществляются этим методом. Он используется для определения массовой доли белка, витаминов, фенолов, ионов металлов и т.д.

ИК-спектроскопия, которая также относится к молекулярно-абсорбционной спектроскопии, несмотря на то что связана с другим явлением, на практике позволяет достичь похожих результатов, т.е. выявить наличие и количество тех или иных групп атомов.

Этот метод несколько более сложен, поэтому на практике применяется несколько реже, хотя на ИК-спектре можно найти почти любую группу атомов.

Суть метода состоит в регистрации детектором инфракрасного излучения, пропускаемого от источника через исследуемый образец. В зависимости от строения исследуемого вещества различные области диапазона излучения источника по-разному поглощаются образцом, что позволяет зарегистрировать с помощью детектора инфракрасный спектр поглощения исследуемого вещества. ИК спектр каждого вещества индивидуален, что позволяет провести идентификацию исследуемого вещества. Кроме того, при известной толщине исследуемого образца возможно провести количественные измерения концентрации вещества в матрице и, в ряде случаев определить концентрацию примесей в веществе.

К настоящему времени изучены и систематизированы инфракрасные спектры более чем 20 000 соединений, что существенно облегчает практическое проведение анализа. Для получения первых ориентировочных данных часто пользуются так называемой картой Колтупа, на которой указаны спектральные области многих характеристических частот. Для окончательных выводов обычно требуется более тщательный анализ спектра. Иногда задача качественного анализа может быть решена простым сопоставлением спектра известного соединения и анализируемого вещества.

Количественный анализ по инфракрасным спектрам основан на применении закона Бугера-Ламберта-Бера. Чаще всего здесь используют метод градуировочного графика.

В случае **атомно-абсорбционной** спектроскопии исследованию подвергают отдельные атомы, как правило, в виде атомного пара. Атомный пар, получаемый путём помещения исследуемого вещества в пламя, содержит атомы как в возбуждённом, так и в невозбуждённом состоянии. Если через него пропустить свет, длина волны которого будет соответствовать переходу из невозбуждённого в возбуждённое состояние, то будет наблюдаться поглощение света, описываемое экспоненциальной зависимостью, аналогичной закону Бугера-Ламберта-Бера [3]:

$$I = I_0 \cdot 10^{-KlC}, \quad (1.4.4)$$

где I – интенсивность света, прошедшего через образец;

I_0 – интенсивность света, направленного на образец;

K – коэффициент поглощения;

l – толщина слоя;

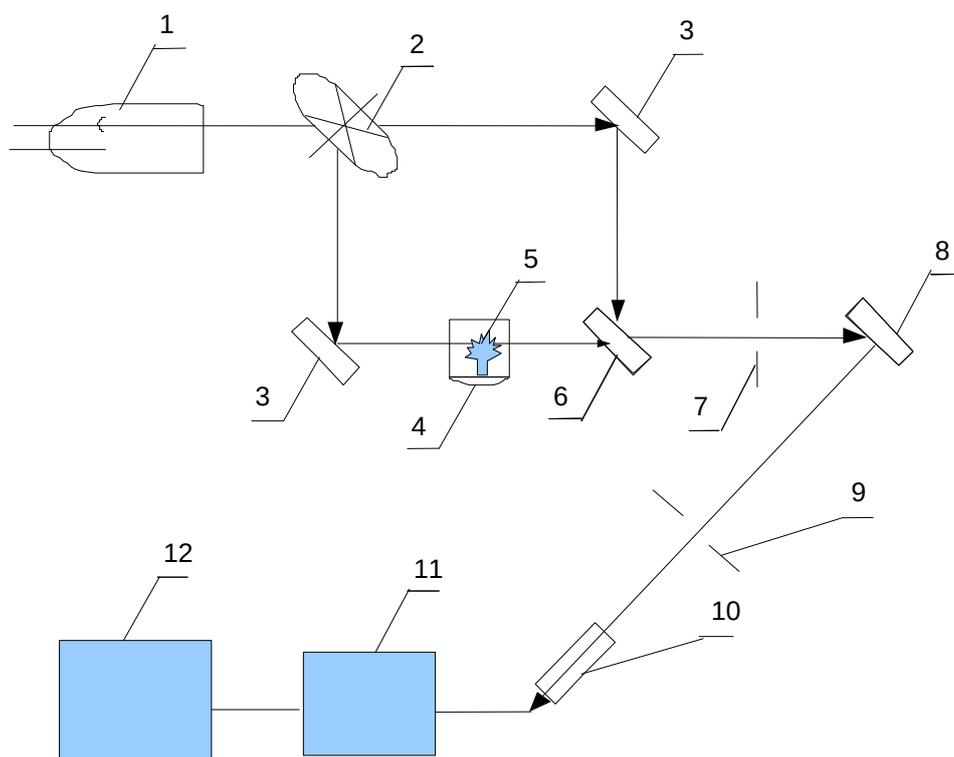
C – концентрация атомов в «атомном паре»

В логарифмической форме данный закон выглядит в виде

$$A = \lg I_0/I = KlC, \quad (1.4.5)$$

где A – адсорбция.

Прибором, позволяющим осуществить метод ААС, является атомно-абсорбционный спектрофотометр. Принципиальная схема атомно-абсорбционного спектрофотометра приведена на рисунке 1.4.4.



1 – лампа с полым катодом; 2 – модулятор; 3 – зеркало; 4 – щелевая горелка; 5 – пламя; 6 – тонкая пластинка, обеспечивающая наложение двух лучей; 7 – входная щель монохроматора; 8 – дифракционная решетка; 9 – выходная щель; 10 – фотоумножитель; 11 – усилитель; 12 – измерительный блок

Рисунок 1.4.4 – Принципиальная схема двухлучевого атомно-абсорбционного спектрофотометра (по [3])

Источник света испускает излучение 1 с длиной волны, поглощаемой (излучаемой) исследуемыми атомами. Одна часть монохроматического излучения элемента от лампы проходит через пламя 5 и фиксируется на входной щели 7 монохроматора. Раствор поступает в пламя через горелку 4. Другая часть светового потока минует пламя и затем оба световых потока совмещаются с помощью тонкой пластины 6. Этот поток фокусируется через абсорбционную ячейку и монохроматор 7, где выделяется характерная для исследуемого элемента область спектра. Затем поток направляется в

фотоумножитель 10 и преобразуется в электрический сигнал, величина которого зависит от интенсивности поступающего в фотоумножитель светового потока и регистрируется специальным устройством 12 [3].

Сравнивая результат измерений в исследуемой пробе с результатом измерений в стандартном растворе, определяют содержание элемента в пробе. Атомно-абсорбционная спектрометрия является одним из наиболее распространенных аналитических методов исследования элементного состава вещества. Благодаря ряду преимуществ, подтвержденных результатами применения метода в различных областях науки и отраслях хозяйства, успехов в усовершенствовании измерительного оборудования, достигнутых зарубежными и отечественными производителями в последние годы, метод атомно-абсорбционной спектрометрии находит все более широкое применение для количественного определения малых концентраций элементов, прежде всего металлов, при санитарно-гигиенических исследованиях воды, воздуха, пищевых продуктов.

Атомно-эмиссионная спектроскопия отличается тем, что в ней фиксируют не спектр поглощения, а спектр излучения, связанный с тем, что возврат из возбуждённого состояния атома в основное (или в другое возбуждённое с меньшей энергией) происходит испускание кванта света определённой длины волны; на изучении спектра излучения и основан этот метод. Спектр излучения для атомов каждого элемента строго индивидуален, а интенсивность излучения характеристической длины волны зависит от концентрации элемента. Это позволяет идентифицировать атомы, имея библиотеку спектров, а по интенсивности излучения и предварительно полученным (с помощью стандартных растворов) калибровочным зависимостям проводить количественное определение содержания элементов в пробе вещества.

В отличие от метода атомно-абсорбционной спектроскопии в методе атомно-эмиссионной спектроскопии обычно требуется нагрев при более высокой температуре 3500-8000 °С. Это связано с тем, что помимо энергии, необходимой для перевода вещества в атомарное состояние, в данном методе для перевода атомов в возбужденное (ионизированное) состояние требуется дополнительная энергия (энергия ионизации). Поэтому в качестве источников энергии для возбуждения атомов в данном методе используется, кроме высокотемпературного пламени, дуга, искра, высокочастотно-индуцированная плазма. Из-за недостаточной стабильности плазмы, дуги и искры подобные источники в настоящее время используются очень редко. Более стабильные источники плазмы можно получить, используя пламя, питающееся энергией химической реакции окисления горючего газа. В пламенном варианте атомно-эмиссионной спектроскопии достигается высокая чувствительность и экспрессность анализа, хорошая воспроизводимость результатов.

Методы **магнитного резонанса** основаны на том, что момент количества движения (спин) элементарных частиц в атоме принимает определённые значения. Согласно квантовой механике, спин частицы при наличии внешнего магнитного поля может быть ориентирован либо по полю, либо против поля (в классической механике вектор момента количества движения вращающейся частицы может быть и неколлинеарным силовым линиям магнитного поля, но в квантовой механике такие состояния для элементарных частиц невозможны) [2], [3]. Каждое из этих состояний характеризуется своим значением энергии, следовательно, переход между ними приводит к выделению или поглощению кванта электромагнитного излучения. Если происходит поглощение энергии, то, как и в методе атомно-абсорбционной спектроскопии, поглощается квант со строго определённой энергией, т.е. наблюдается резонанс. В методе **электронного парамагнитного резонанса** изучается взаимодействие спина

электронов с магнитным полем, а в методе **ядерного магнитного резонанса** – спина ядер атомов (спин ядра атома определяется спинами нуклонов, т.е. зависит от количества протонов и нейтронов в ядре).

В ранее рассмотренных спектральных методах энергия кванта света, поглощаемого или испускаемого атомом или молекулой, точно (или почти точно) соответствовала энергии перехода. В **молекулярно-люминесцентных** методах, и, в частности, в методе **флуориметрии**, это соотношение не выполняется.

Люминесценция – это свечение вещества, возникающее при переходе молекул из возбуждённого состояния [2]. В зависимости от того, каким образом было достигнуто возбуждение молекул (предварительным облучением электромагнитными волнами, воздействием электрического импульса, химической реакцией и т.д.), выделяют разновидности люминесценции. Если же возбуждение молекул осуществлялось под воздействием видимого или ультрафиолетового света, а свечение исчезает после исчезновения возбуждения, то такую люминесценцию называют **флуоресценцией** [2],[3].

При флуоресценции длина волны света, испускаемого возбуждёнными молекулами, всегда больше (т.е. частота и энергия всегда меньше) длины волны возбуждения. Это явление можно объяснить следующим образом. При возбуждении электроны в молекуле переходят на очень высокоэнергетическую молекулярную орбиталь, т.е. молекула оказывается в возбуждённом состоянии с высокой энергией (S_2). Если электрон сразу перейдёт в его основное состояние (S_0), то будет испускаться квант света с длиной волны, равной длине волны возбуждения. Но помимо такого перехода, возможен и переход электрона на более низкоэнергетическую орбиталь (S_1), но не в основное состояние, без излучения (за счёт межмолекулярных и внутримолекулярных

взаимодействий, т.е., за счёт увеличения энергии теплового движения). Из такого состояния электрон может перейти в своё основное состояние, испуская квант света. Очевидно, что разница в энергии между этими состояниями (S_1 и S_0) будет меньше, чем между состояниями S_2 и S_0 , то есть и энергия испускаемого кванта света будет меньше, чем энергия поглощённого [3].

Таким образом, облучая образец вещества светом с более низкой длиной волны, при наличии флуоресценции можно зафиксировать свет более высокой длиной волны. Например, при облучении невидимым для глаза ультрафиолетовым светом в ряде случаев наблюдают синюю флуоресценцию, т.е. это явление может быть обнаружено даже невооружённым глазом. Для исследования используют приборы, называемые флуориметрами, которые, в простейшем случае, включают в себя источник излучения, светофильтр, выделяющий свет с длиной волны возбуждения, кювету с образцом, светофильтр, выделяющий свет с длиной волны флуоресценции (чтобы выделить только излучение, полученное в результате флуоресценции), светочувствительный элемент, преобразователи и блок индикации. Для проведения эксперимента необходимо, в зависимости от исследуемого вещества, подобрать светофильтры с требуемыми длинами волн поглощения и излучения (флуоресценции). Интенсивность излучения флуоресценции I_ϕ прямо зависит от концентрации вещества:

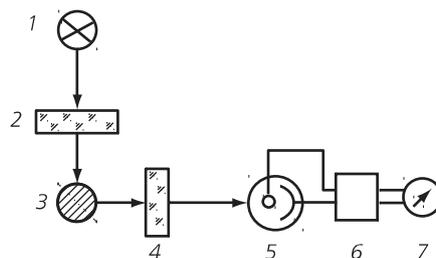
$$I_\phi = K \cdot C \quad (1.4.6)$$

При этом прямая пропорциональность наблюдается только при условии низкой концентрации исследуемого вещества. При более высокой концентрации наблюдается существенная нелинейность.

Следует отметить, что не все вещества обладают способностью к флуоресценции. Прежде всего, такие вещества встречаются среди ароматических соединений (особенно с конденсированными бензольными

кольцами) и порфиринов [3]. С одной стороны, это не позволяет применять прямую флуориметрию достаточно часто, а с другой – сводит к минимуму количество мешающих веществ. В ряде случаев способностью к флуоресценции обладает не само вещество, а его производные, для получения которых проводят химическую реакцию. Таким производным может быть либо какая-либо форма вещества (например, окисленная или восстановленная), либо же функциональная группа, способная к флуоресценции (люминофор), которую за счёт химической реакции вводят в состав исследуемого вещества [3].

Принципиальная схема типового флуориметра показана на рисунке 1.4.5. Излучение I_0 источника 1 (кварцевая лампа), выделенное первичным светофильтром 2, попадает на кювету с пробой 3. Возникающее излучение I_ϕ через вторичный светофильтр 4 попадает на фотоэлемент или фотоумножитель 5, где преобразуется в электрический сигнал, который усиливается электронным усилителем 6 и измеряется миллиамперметром 7.



1 – источник УФ-излучения; 2 – первичный светофильтр; 3 – кювета с пробой; 4 – вторичный светофильтр; 5 – фотоэлемент; 6 – электронный усилитель; 7 – миллиамперметр

Рисунок 1.4.5 – Принципиальная схема флуориметра (по [3]):

Метод используется для определения количества витаминов (B_1 , B_2 , C), жира в жидких продуктах, аминокислот, количества микроорганизмов в жидких средах, количества полициклических ароматических углеводородов в копчёных продуктах. Также этот метод зачастую используется как вспомогательный в рамках метода высокоэффективной жидкостной

хроматографии (ВЭЖХ), он проводится в детекторе флуоресценции.

Метод **масс-спектрометрии** основан на разделении ионов вещества по соотношению их массы заряду. Регистрируемая зависимость ионных токов от отношения массы отдельных фрагментов к их заряду называется, масс-спектром.

Для проведения исследования методом масс-спектрометрии необходимо сначала произвести ионизацию молекул вещества, что чаще всего достигают путём облучения образца электронами, летящими с высокой скоростью. В результате такого столкновения образуется, как правило, положительно заряженный ион и электрон, «выбитый» с внешних энергетических уровней молекулы. В результате такого облучения возможен также распад молекулы на отдельные фрагменты. Распад происходит до тех пор, пока не образуются относительно стабильные ионы с низкой внутренней энергией.

Ионизацию также можно производить с использованием гамма-лучей (фотоионизация), с помощью электрического поля высокой напряжённости и т.д.

Для разделения ионов применяют различные методы. Чаще всего для этого используют постоянное магнитное поле, в котором движущиеся с постоянной скоростью ионы будут отклоняться от прямолинейной траектории. Из курса физики известно, что на движущуюся заряженную частицу действует сила Лоренца

$$\vec{F}_L = q \cdot [\vec{v} \times \vec{B}], \quad (1.4.7)$$

где q – заряд частицы;

\vec{v} – скорость частицы (в векторной форме);

\vec{B} – вектор индукции магнитного поля.

В скалярной форме это выражение запишется в виде

$$F_L = q \cdot v \cdot B \cdot \sin \alpha, \quad (1.4.8)$$

где α – угол между векторами \vec{v} и \vec{B} .

Целесообразнее всего направить магнитное поле так, чтобы сила Лоренца была максимальной, что будет достигнуто, если векторы \vec{v} и \vec{B} будут перпендикулярны друг другу. При этом $\alpha = \frac{\pi}{2} (90^\circ)$, а $\sin \alpha = 1$. Тогда

$$F_L = q \cdot v \cdot B, \quad (1.4.9)$$

С другой стороны, под действием центростремительной силы частица будет двигаться по окружности. Так как центростремительное ускорение равно $\frac{v^2}{R}$, то сила, действующая на частицу, будет равна

$$F = \frac{m \cdot v^2}{R}, \quad (1.4.10)$$

где R – радиус траектории частицы.

Так как на частицу действует только одна сила – сила Лоренца, то можно приравнять выражения (1.2.6) и (1.2.7), получив

$$q \cdot v \cdot B = \frac{m \cdot v^2}{R}, \quad (1.4.11)$$

откуда

$$R = \frac{m \cdot v}{q \cdot B} = \frac{m}{q} \cdot \frac{v}{B} \quad (1.4.12)$$

или

$$\frac{m}{q} = \frac{R \cdot B}{v} \quad (1.4.13)$$

Таким образом, при постоянных скорости ионов и индукции магнитного поля радиус траектории прямо пропорционален соотношению массы и заряда частицы [2]. Между тем, на практике скорости всех частиц могут и не

совпадать, что несколько усложняет задачу.

Для применения этого метода необходимо предварительно разогнать ионы. Это достигается путём создания электрического поля. Как известно, кинетическая энергия E_k , сообщённая частице при её ускорении в электрическом поле напряжением V равна

$$E_k = V \cdot q \quad (1.4.14)$$

С другой стороны, кинетическая энергия равна

$$E_k = \frac{m \cdot v^2}{2} \quad (1.4.15)$$

Отсюда

$$V \cdot q = \frac{m \cdot v^2}{2} \quad (1.4.16)$$

Очевидно, что значение скорости частиц, на самом деле, зависит от их заряда и массы, следовательно, выражение (1.2.9) на практике использовать сложно. Выразим переменную величину – скорость движения частицы.

$$v = \frac{R \cdot B \cdot q}{m} \quad (1.4.17)$$

Подставив это выражение в уравнение (1.2.13), получим

$$V \cdot q = \frac{m \cdot \left(\frac{R \cdot B \cdot q}{m} \right)^2}{2} \quad \text{или} \quad V = \frac{q \cdot R^2 \cdot B^2}{2}, \quad \text{или}$$

$$\frac{m}{q} = \frac{R^2 \cdot B^2}{2 \cdot V} \quad (1.4.18)$$

Из выражения (1.2.15) видно, что, несмотря на различную скорость заряженных ионов, при постоянных условиях соотношение массы частицы и её заряда связано напрямую с радиусом её траектории, только эта зависимость будет не линейной, а квадратичной:

$$\frac{m}{q} = K \cdot R^2 \quad (1.4.19)$$

Так как

$$q = n \cdot e, \quad (1.4.20)$$

где n – заряд иона в единицах элементарного заряда e ,
то выражение (1.2.16) можно представить в виде

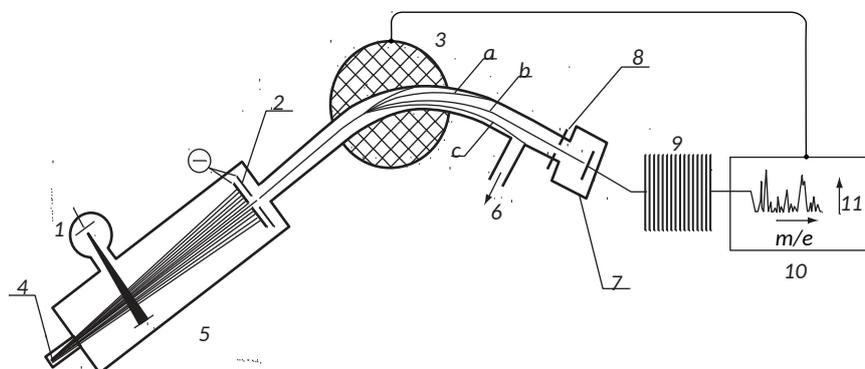
$$\frac{m}{n \cdot e} = K \cdot R^2 \text{ или } \frac{m}{n} = K \cdot R^2 \quad (1.4.21)$$

Таким образом, в этом методе необходимо зафиксировать степень отклонения траектории частицы от прямолинейной с помощью детектора ионов. Чем ближе траектория к прямолинейной, тем больше радиус, т.е. тем больше соотношение массы к заряду.

На практике большинство молекулярных ионов получают заряд $+1$, т.е. чем больше их масса, тем меньше отклонение траектории [2]. Следовательно, с помощью метода масс-спектрометрии можно не только оценить состав смеси, зная поведение индивидуальных веществ в масс-спектрометре, но и оценить молекулярную массу неизвестного вещества в смеси. К сожалению, некоторые вещества при ионизации могут разлагаться.

Существуют и другие типы масс-спектрометров, например, так называемый времяпролётный масс-спектрометр, основанный на измерении времени движения ионов, ускоренных в поле постоянного напряжения, через участок дрейфа длиной L [2]. Исходя из формулы (1.2.13), соотношение массы и заряда частицы будет обратно пропорционально квадрату скорости движения частицы. Так как скорость движения постоянна на всём участке дрейфа и равна отношению длины этого участка ко времени, то отношение массы и заряда прямо пропорционально квадрату времени движения. Таким образом, фактически измеряется та же самая характеристика.

Масс-спектр представляет собой спектр линий положительно заряженных ионов (ширина пиков на половине высоты в процессе записи остается постоянной). Этим масс-спектрометрия значительно отличается от других спектрометрических методов, для которых характерно перекрывание полос.



1 – источник электронов; 2 – ускоритель (пластины и щель); 3 – переменное магнитное поле; 4 – ввод образца; 5 – ионный источник для ионизации электронным ударом; 6 – патрубок для подключения масс-спектрометра к вакуумному насосу; 7 – ионный коллектор; 8 – щель; 9 – усилитель; 10 – масс-спектр; 11 – интенсивность ионного тока; a, b, c — пучки ионов с разными $m_a/e, m_b/e, m_c/e$ соответственно.

Рисунок 1.4.6 – Схема масс-спектрометра (по [3]):

Схема масс-спектрометра приведена на рис. 1.4.6. Исследуемый образец через устройство для ввода 4 подают в ионный источник 5, где происходит его ионизация под действием источника электронов 7. Образованные ионы через ускоритель (щель 2) попадают в магнитное поле 3, где разделяются на пучки ионов a, b, c с разными m/e ($m_a/e, m_b/e, m_c/e$). При этом пучок ионов b фокусируется на щель 8 и попадает в ионный коллектор 7. Сигнал усиливается через усилитель 9 и фиксируется в виде масс-спектра 10, где по оси абсцисс записывают отношение m/e , а по оси ординат — интенсивность ионного тока 11 [3].

Поскольку в масс-спектрометре используют поток газообразных ионов, дающих четкие траектории вследствие комбинаций электростатического и магнитного полей, то очень важно, чтобы все узлы прибора — от источника ионов до детектора — были вакуумированы. Остаточное давление не должно

обычно превышать 10^{-3} Па. Для этого масс-спектрометр с помощью патрубка б подключают к вакуумному насосу.

Метод масс-спектрометрии используется для количественного и качественного анализа различных веществ. В отличие от других спектральных методов, на масс-спектрах индивидуальным веществам соответствуют не максимумы, которые в случае сложных смесей могут перекрываться друг с другом, а линии, точно соответствующие конкретному соотношению массы и заряда.

В последнее время масс-спектрометрический метод часто используют в комбинации с газовой или жидкостной хроматографией, что позволяет после разделения веществ точно их идентифицировать.

1.4.2. Турбидиметрия и нефелометрия

В некоторых случаях имеется возможность получить стойкий неокрашенный коллоидный раствор. Такой раствор обладает способностью к опалесценции, т. е. частично он пропускает, а частично рассеивает световой поток. В лаборатории это явление может быть использовано для выявления наличия коллоидного раствора, который, в отличие от взвеси, не всегда можно сразу отличить от истинного раствора: пробирку с исследуемой смесью подставляют под световой поток таким образом, чтобы проходящий свет не попадал в глаз исследователю. Если в растворе будет заметно свечение (он рассеивает свет), то в системе имеется дисперсная фаза, т. е. мы имеем дело с коллоидным раствором.

Безусловно, визуальный метод не может претендовать на количественное определение содержания дисперсной фазы. Для таких исследований необходимы физико-химические методы: турбидиметрия и нефелометрия.

В *турбидиметрическом* методе определяют интенсивность проходящего света по сравнению с интенсивностью падающего потока, вернее, логарифм этого отношения, взятый с обратным знаком, т. е. оптическую плотность.

Такую же величину определяют и в обычном фотометрическом методе, поэтому турбидиметрический метод можно осуществлять на том же оборудовании, что и фотометрический метод, т. е. на фотоколориметре или спектрофотометре.

В методе турбидиметрии, в отличие от фотометрии, длина волны света играет несколько меньшую роль, т. к. здесь нет явного максимума поглощения. Между тем оптическая плотность коллоидного раствора обратно зависит от длины волны в четвертой степени; это объясняется следующим: световая волна способна огибать препятствия, соизмеримые с ее длиной, причем чем больше препятствие, тем тяжелее его обогнуть. Чем больше длина волны, тем больше вероятность того, что она обогнет частицу дисперсной фазы, не претерпев отражения или рассеяния.

С другой стороны, в ряде случаев (когда в системе могут присутствовать слабо окрашенные растворы) имеет смысл избегать определенных длин волн, совпадающих с максимумами поглощения растворенных веществ.

Как и в фотометрии, в турбидиметрии применяют растворы сравнения, в качестве которых следует использовать растворы, максимально близкие по составу к исследуемому, но не содержащие дисперсной фазы. Для турбидиметрического исследования строят калибровочный график, т. е. зависимость оптической плотности от концентрации. В этом методе вероятность нелинейностей еще выше, чем в фотометрии, т. к. при высоких концентрациях возможно увеличение размера частиц дисперсной фазы.

В нефелометрии, в отличие от турбидиметрии, измеряется интенсивность не проходящего, а рассеянного света. Интенсивность рассеянного света I_r , определенная с помощью детектора (на расстоянии R от исследуемой системы), находящимся под углом θ от пути луча света (рис. 1.4.7) при размере частиц менее одной десятой длины волны определяется уравнением Рэлея [4]:

$$I_p = I_0 \cdot \frac{F \cdot N \cdot V^2}{\lambda^4 \cdot R^2} \cdot (1 + \cos \theta) \quad (1.4.22)$$

где I_0 – интенсивность падающего света;
 F – коэффициент, зависящий от показателя преломления;
 N – число частиц дисперсной фазы в системе;
 V – объём каждой частицы;
 λ – длина волны падающего света;
 R – расстояние до детектора.

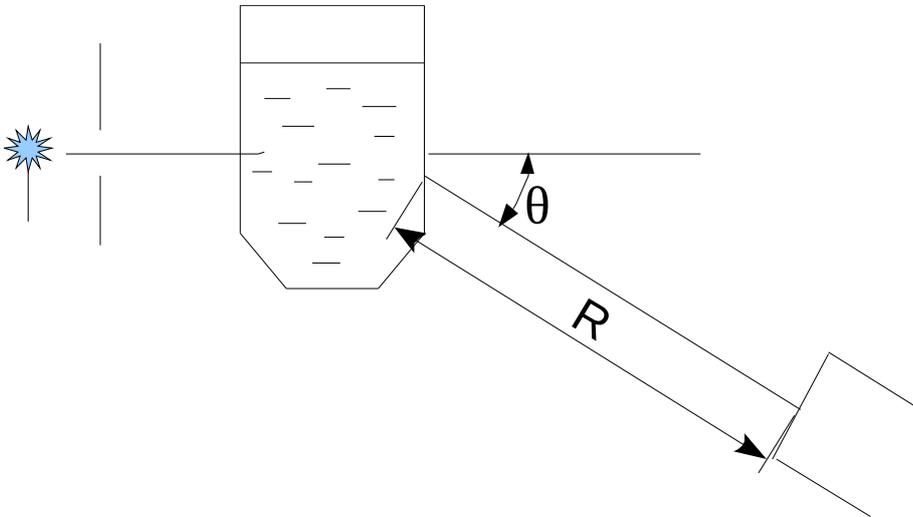


Рисунок 1.4.7 – Пояснение для уравнения Рэля.

На практике турбидиметрический метод можно использовать для определения содержания различных неорганических и органических веществ.

1.2.4. Рефрактометрия

Рефрактометрический метод основан на определении показателя преломления жидкости или раствора. Явление преломления наблюдается при переходе луча света из одной среды в другую. Определение показателя преломления основано на законе Снелля:

$$n_1 \cdot \sin \alpha = n_2 \cdot \sin \beta, \quad (1.4.23)$$

где α, β – соответственно угол падения и преломления;

n_1, n_2 – коэффициенты преломления первой и второй среды.

Если луч света падает перпендикулярно границе раздела фаз, то преломления не происходит ($\alpha = \beta = 0$). При переходе света из менее плотной среды в более плотную угол преломления будет меньше угла падения, т.е. ближе к перпендикуляру; при переходе из более плотной среды в менее плотную направление луча будет ближе к горизонтали. При определённом значении угла падения расчётное значение угла отражения может оказаться

равным 90° ($\frac{\pi}{2}$), т.е. $\alpha = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1} \cdot \sin \beta\right) = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1} \cdot \sin \frac{\pi}{2}\right) = \arcsin \frac{n_2}{n_1}$. На

самом деле, в этом случае (равно и при большем значении угла падения) преломления не наблюдается, а будет наблюдаться полное внутреннее отражение. Определение показателя преломления в рефрактометрах основано именно на определении угла полного внутреннего отражения. Рефрактометр состоит из двух призм: измерительной и осветительной. На одну из граней измерительной призмы наносится определяемое вещество, после чего меняют угол освещения, добиваясь начала эффекта полного внутреннего отражения. Так как коэффициент преломления измерительной призмы известен, то, зная угол полного внутреннего отражения, несложно определить показатель преломления исследуемой жидкости. На практике шкалу рефрактометра сразу градуируют в значениях показателя преломления или даже в шкале определяемого вещества.

Показатель преломления раствора зависит от его химического состава, таким образом, рефрактометрическим методом можно определять содержание тех или иных веществ в растворе. В частности, широко используется зависимость показателя преломления от содержания сухих веществ в водном растворе; от содержания жира в органическом растворителе (например, α -

бромнафталине) и т.д.

1.4.3. Поляриметрия

Поляриметрический метод исследования основан на измерении угла поворота плоскости поляризации света раствором, содержащим оптически активное вещество.

Как известно из курса органической химии, все вещества, имеющие асимметрический атом углерода (т.е. атом углерода, связанный с четырьмя **разными** радикалами), обладают так называемой оптической изомерией, т.е. для этого вещества существует как минимум один изомер, отличающийся лишь трёхмерным геометрическим строением. Изомеры, являющиеся зеркальным отражением друг друга (энантиомеры), очень близки по своим свойствам, из-за вращения плоскости поляризации. Если через раствор¹¹, в котором присутствует только один оптический изомер, пропустить плоскополяризованный свет, то плоскость поляризации повернётся на определённый угол, зависящий от природы изомера и от его концентрации в растворе. Следует отметить, что раствор энантиомера той же концентрации повернёт плоскость поляризации на такой же угол, но в другую сторону, а эквимольная смесь энантиомеров (рацемат) вообще не будет вращать плоскость поляризации. Для того, чтобы количественно охарактеризовать угол поворота смеси тем или иным веществом, существует формула [4]:

$$\alpha = \frac{C \cdot [\alpha] \cdot l}{100}, \quad (1.4.24)$$

$[\alpha]$ – удельное вращение анализируемого вещества, т.е. такой угол поворота плоскости поляризации, который вызывается раствором 100 г. вещества в 100

¹¹ ΔE В принципе, оптические изомеры способны вращать плоскость поляризации и в кристаллическом виде, но в данном методе применяются именно растворы веществ.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

см³ при толщине слоя 100 мм;

l – длина поляризационной трубки, мм;

C – концентрация исследуемого вещества в граммах на 100 см³ раствора.

Исходя из этого выражения, измеряя угол поворота плоскости поляризации исследуемого раствора, несложно определить концентрацию оптически активного вещества. Недостаток метода состоит в том, что в растворе должно присутствовать только одно оптически активное вещество¹². Чаще всего этот метод используется при анализе сахаров (прежде всего, сахарозы и лактозы). Так, удельное вращение сахарозы при 20 °С равно +66,5°, для безводной лактозы +52,5°, а для моногидрата лактозы +55,3° (знак «+» показывает, что плоскость поляризации вращается вправо).

Поляриметрический метод лежит в основе двух групп приборов: поляриметров и сахариметров. В поляриметрах положение плоскости поляризации измеряют путём измерения поворота анализатора, а в сахариметрах – изменением толщины слоя кварца, компенсирующего поворот плоскости поляризации оптически активным веществом. В сахариметрах пользуются специальной международной шкалой сахара, в которой 100° соответствует раствору, содержащему 26 г сахарозы в 100 см³ (измерения проводят при 20 °С).

1.4.4. Электрохимические методы исследования

Электрохимические методы исследования основаны на исследовании процессов в электролитической ячейке, представляющей собой систему из электродов и электролитов, контактирующих между собой [3]. При отсутствии

¹² ΔE Гипотетически можно определить концентрацию исследуемых веществ, если в растворе есть смесь разных оптически активных веществ с известным соотношением, если они не компенсируют друг друга. На практике этот набор условий соблюдается достаточно редко.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

электрического тока в замкнутой гальванической цепи на межфазной границе устанавливается равновесие, и потенциал достигает равновесного значения. Если через ячейку проходит электрический ток, на межфазной границе равновесие не достигается, и протекают химические реакции, приводящие к поглощению электронов (восстановление) или их выделению (окисление) с образованием или ионов, попадающих в электролит или с поглощением ионов из электролита [3].

В состав электролитической ячейки входят два или три электрода: индикаторный или рабочий, электрод сравнения и вспомогательный. Электрод, используемый как датчик и реагирующий на фактор возбуждения, но не меняющий состава раствора за время измерения, является индикаторным. Если под действием тока, протекающего через ячейку, значительно изменяется состав раствора, то электрод, на котором протекают данные реакции, называют рабочим. Электрод сравнения служит для создания измерительной цепи и для определения потенциала рабочего или индикаторного электрода. Вспомогательный электрод (противоэлектрод) вместе с рабочим электродом включен в электрическую цепь в трёхэлектродной ячейке [3].

Аналитическими сигналами могут служить электрические параметры (сила тока, напряжение, сопротивление), если они измерены с достаточной точностью. Возможно два варианта использования электрохимических методов: прямые методы, в которых используют взаимосвязь аналитического сигнала и химического состава, и титриметрические, в которых аналитический сигнал служит для определения точки эквивалентности. Последние целесообразно использовать в тех случаях, когда зависимость между аналитическим сигналом и составом носит сложный характер, изменяющийся в присутствии «мешающих» веществ. С помощью электрохимических методов можно определять концентрацию вещества в широком интервале ($1 - 10^{-9}$ моль/

л) с достаточной точностью и воспроизводимостью [3].

Электрохимические методы анализа включают методы **без** протекания электродной реакции, в которых строение двойного электрического слоя в расчет не принимается (кондуктометрия), и методы, основанные на электродных реакциях в отсутствие тока (потенциометрия) или под током (вольтамперометрия, полярография и др.) [3].

Кондуктометрический метод – это метод, в котором определяют электрическую проводимость или электросопротивление раствора. Он основан на том, что проводимость раствора электролита зависит от вида и концентрации ионов. Эта зависимость имеет достаточно сложный характер, т.к. ионы в растворе встречают сопротивление перемещению со стороны молекул растворителя, других ионов, что зависит как от самих ионов (их размеров, заряда, концентрации), так и от содержания других веществ.

Для получения математической функциональной зависимости от концентрации раствора используют следующие понятия [4]

Электропроводность – величина, обратная электросопротивлению, измеряемая в сименсах ($1 \text{ См} = 1 \text{ Ом}^{-1}$). И электросопротивление, и электропроводность зависят от геометрических размеров электрохимической ячейки. Для того, чтобы избавиться от этой зависимости, используют **удельное**

сопротивление ρ и **удельную электропроводность** $\gamma = \frac{1}{\rho}$.

$$\rho = \frac{R \cdot S}{l} \quad (1.2.22)$$

Между тем, удельная электропроводность удобна для измерения, но неудобна для выявления закономерностей. Поэтому часто используют **эквивалентную электропроводность** λ – проводимость раствора, содержащего 1 моль эквивалента¹³, находящегося между двумя параллельными электродами,

¹³ ΔE Ранее использовался термин «грамм-эквивалент» (г-эquiv.), который сохранился в некоторых

расстояние между которыми 1 см (или 1 м в системе СИ). Измеряется

эквивалентная электропроводность в $\frac{\text{См}\cdot\text{см}^2}{\text{моль (ЭКВ)}}$ или в $\frac{\text{См}\cdot\text{м}^2}{\text{моль}}$. Между удельной и эквивалентной электропроводностью существует взаимосвязь:

$$\lambda = \frac{1000 \cdot \gamma}{C}, \quad (1.2.22)$$

где C – молярная концентрация эквивалента (моль/дм³)

В общем случае, эквивалентная электропроводность нелинейно у с ростом концентрации раствора, что связано с тем, что одни ионы мешают движению других. Для малодиссоциирующих веществ такое же влияние оказывает снижение степени диссоциации в концентрированном растворе. В зоне низких концентраций зависимость эквивалентной электропроводности от концентрации выражена меньше, таким образом, при предельном разбавлении значение эквивалентной концентрации максимально и постоянно. Его называют предельной эквивалентной электропроводностью λ_0 . Предельная эквивалентная электропроводность зависит от природы электролита. При этом её можно измерять отдельно для катионов λ_{0+} и анионов λ_{0-} , причём их сумма будет равна предельной эквивалентной электропроводности самого электролита (закон независимого движения ионов). Наибольшую предельную эквивалентную электропроводность имеет катион водорода; заметно меньшей – гидроксид-анион, а все остальные ионы – ещё намного меньшей. Высокая электропроводность ионов H^+ и OH^- связана с тем, что они, образуя сначала

методиках и даже в некоторых нормативных документах. Сейчас вместо понятия «количество (число) грамм-эквивалентов» следует говорить «количество вещества эквивалента» и измерять его в молях эквивалента.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

водородные связи с молекулой воды, потом способны к перегруппировке (рисунок 1.4.8).

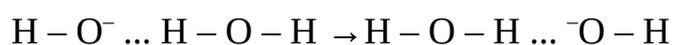
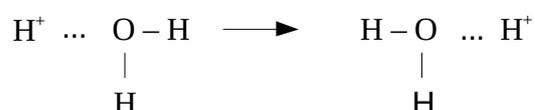


Рисунок 1.4.8 – Перемещение катиона водорода и гидроксид-аниона

При этом возможны и более сложные комбинации, включающие в себя цепочки из десятков молекул воды. Таким образом, ион, присоединившись к одному концу цепочки, без какого-либо физического перемещения может сразу освободиться на другом конце этой цепочки, что, конечно, намного быстрее настоящего перемещения, которое вынуждены совершать все остальные ионы. Гидроксид-ион способен к такой перегруппировке в меньшей степени, чем катион водорода.

На практике определение эквивалентной электропроводности не всегда является обязательным, т. к. не всегда удастся точно определить геометрические характеристики ячейки; кроме того, возможны некоторые погрешности, связанные с сопротивлением электродов ячейки, с дефектами этих электродов и т. д. Часто оказывается достаточным измерять проводимость (сопротивление) с помощью данного прибора и экспериментально искать зависимость этой величины с определяемой величиной.

При любых кондуктометрических исследованиях через ячейку пропускают слабый переменный ток; измеряя его силу и зная напряжение на электродах можно рассчитать сопротивление и электропроводность. На практике для достижения большей точности чаще всего применяют мост

Уитстона, использующий тот принцип, что в диагонали моста будет отсутствовать ток, если отношения сопротивлений в противоположных плечах моста будут равны [4]. Если через ячейку пропускать постоянный ток, то в ней пойдет процесс электролиза, как следствие, за достаточно короткое время изменится и химический состав раствора, и состояние электродов (возможно их разрушение, образование осадка на них и др.). Разумеется, эти явления не могут не отразиться на значении истинной и кажущейся электропроводности раствора, т. е. по мере измерения значение электропроводности будет меняться. При пропускании переменного тока, как правило, эти реакции не успевают протекать, а даже если они и начинаются, то изменение полярности электродов приводит к протеканию обратных реакций. Таким образом, измеряемое значение электропроводности будет практически постоянным¹⁴ (если, конечно, состав раствора не менялся за счет других факторов).

Кондуктометрический метод используют в двух разновидностях: прямая кондуктометрия и кондуктометрическое титрование. В методе *прямой кондуктометрии* сначала ищут зависимость между электропроводностью и концентрацией исследуемого вещества в растворе. Недостаток метода состоит в том, что на электропроводность раствора в большей или меньшей степени влияют все ионы.

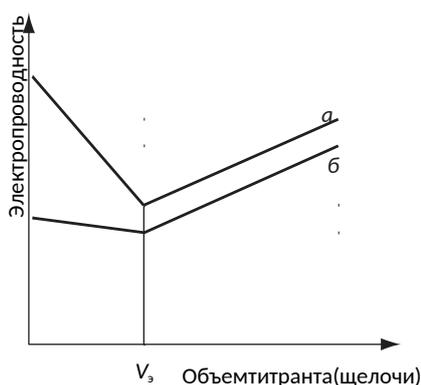
При проведении *кондуктометрического титрования* не требуется знать точную зависимость между электропроводностью и концентрацией раствора, достаточно лишь обращать внимание на общие тенденции. Проще всего проводить кислотно-основное титрование. Если сильную кислоту титруют сильным основанием, то сначала электропроводность резко уменьшается (т. к.

¹⁴ ΔE На самом деле, возможно некоторое изменение электропроводности за счет выделения тепла при пропускании электрического тока. При очень малой силе тока зачастую этим явлением можно пренебречь; кроме того, оно частично компенсируется потерей тепла в окружающую среду.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

уменьшается количество ионов водорода); в точке эквивалентности наблюдается минимум, а затем происходит возрастание электропроводности (правда, менее резкое, т. к. эквивалентная электропроводность гидроксид-аниона меньше, чем катиона водорода). Кривая такого титрования представлена на рис. 1.4.9.

Если титруют слабую кислоту сильным основанием, начало графика может выглядеть иначе: убывание может быть менее резким, т. к. в растворе слабой кислоты меньше ионов водорода, а в случае очень слабых кислот может наблюдаться даже незначительное возрастание (за счет добавления в систему дополнительных ионов — катионов, поступающих с основанием и анионов, оставшихся от кислоты). Но в любом случае в точке эквивалентности будет наблюдаться излом, после которого будет идти возрастание электропроводности за счет гидроксид-анионов.



а — титрование сильной кислоты сильным основанием; б — титрование слабой кислоты сильным основанием; $V_{э}$ — объём, соответствующий точке эквивалентности.

Рисунок 1.4.9 – Кривая кондуктометрического титрования

Аналогично при титровании слабого основания (или слабым основанием) точку эквивалентности определяют по излому. Если излом на кривой явно не виден, то близкие к прямолинейным участки вблизи изменения характера кривой продлевают, а точкой эквивалентности считают точку их пересечения.

При других видах титрования не всегда удастся получить столь явные графики, но в ряде случаев излом также может свидетельствовать о точке эквивалентности (например, в аргентометрическом, другом осадительном и комплексометрическом титровании в точке эквивалентности наблюдается минимум свободных ионов, что соответствует излому на кривой).

Достоинством кондуктометрического титрования по сравнению с индикаторным является большая объективность (разные лаборанты могут заметить начало изменения цвета раствора немного в различные моменты), возможность титрования мутных и окрашенных растворов (в которых заметить изменение цвета индикатора сложно или даже невозможно), меньшая зависимость от рН в точке эквивалентности.

Потенциометрический (потенциалометрический, ионометрический) метод – это метод, основанный на определении зависимости между электродным потенциалом и концентрацией (активностью) компонентов реакции [4].

В основу потенциометрических методов положено уравнение Нернста:

$$E = E^0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{\prod a_{\text{окисл.}i}}{\prod a_{\text{восст.}i}} \quad (1.2.23)$$

где E – электродный потенциал в данных условиях;

E^0 – стандартный электродный потенциал при температуре 298,15 К и активности (концентрации) всех веществ, входящих в уравнение полуреакции, равной 1 моль/дм³;

R – универсальная газовая постоянная (8,312 Дж/(моль·К));

F – постоянная Фарадея (96500 Кл/моль);

n – число электронов, принимающих участие в данной полуреакции;

$\prod a_{\text{окисл. } i}$ – произведение активностей¹⁵ всех веществ в системе, находящейся в окисленной форме (левая часть полуреакции);

$\prod a_{\text{восст. } i}$ – произведение активностей всех веществ в системе, находящейся в восстановленной форме (правая часть полуреакции).

Таким образом, электродный потенциал линейно зависит от логарифма активности (концентрации) того или иного вещества, входящего в реакцию. Между тем, чтобы измерить потенциал электрода, необходимо создать электрохимическую ячейку, в которой потенциал одного (*измерительного*) электрода будет зависеть от концентрации исследуемого вещества, а потенциал другого электрода (*электрода сравнения*) будет уже известен или легко определяем в ходе контрольного опыта (желательно, чтобы он был постоянным при данных условиях измерения). В этом случае ЭДС (разность потенциалов) тоже будет линейно зависеть от логарифма активности (концентрации) исследуемого вещества.

В качестве электрода сравнения используют каломельный и хлорсеребряный электроды. Хлорсеребряный электрод представляет собой тонкую серебряную проволоку, покрытую слоем хлорида серебра и погруженную в раствор хлорида калия. Если от этого электрода отвести электроны, то серебро перейдет в форму катиона, который сразу же прореагирует с ионами хлора, переходя в слой хлорида серебра (ионы калия будут участвовать в ионном обмене, обеспечивая положительный заряд электрода). Если же к нему подвести электроны, то серебро из хлорида серебра перейдет на проволоку, а хлорид-ионы освободятся (обеспечивая отрицательный заряд электрода). Потенциал такого электрода зависит от

¹⁵ ΔE При низкой ионной силе вместо активностей с достаточной точностью можно использовать молярную концентрацию

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

концентрации хлорида калия. Если ее поддерживать постоянной, то при постоянной температуре потенциал хлорсеребряного электрода будет постоянным.

Чаще всего в потенциометрии ставится задача определить концентрацию тех или иных ионов. Для этого в качестве индикаторных используют специальные электроды, потенциал которых зависит от концентрации этих ионов (ионоселективные электроды).

На практике очень часто необходимо оценить концентрацию ионов водорода (вернее, десятичный логарифм этой концентрации, взятый с обратным знаком — рН). Для этой цели в качестве индикаторного можно использовать либо водородный электрод, либо (чаще всего) стеклянный. В стеклянном электроде, как и в хлорсеребряном, имеется серебряная проволока, покрытая хлоридом серебра, однако она погружена в раствор 0,1 М соляной кислоты, а не в раствор хлорида калия. В ионном обмене, таким образом, будут участвовать ионы водорода. Между тем, этот электрод отделен от самой системы, в которой измеряют рН, специальной стеклянной мембраной, пропускающей только ионы водорода. Если $pH_{\text{раствора}}$ больше $pH_{\text{электрода}}$, то ионы водорода из электрода будут переходить в раствор, заряжая электролит внутри мембраны отрицательно, а вне мембраны — положительно. Избыток отрицательного заряда в электролите отразится на равновесии между серебром и хлоридом серебра (анионы хлора переходят в хлорид серебра, забирая часть серебра с проволоки и оставляя на ней избыточный отрицательный заряд). Аналогичный эффект наблюдается и в обратной ситуации. Таким образом, потенциал стеклянного электрода будет линейно зависеть от $pH_{\text{раствора}}$.

Другие ионоселективные электроды имеют мембрану, которая (в идеале) пропускает только ионы, для измерения концентрации которых предназначен электрод. На практике для некоторых ионоселективных электродов могут

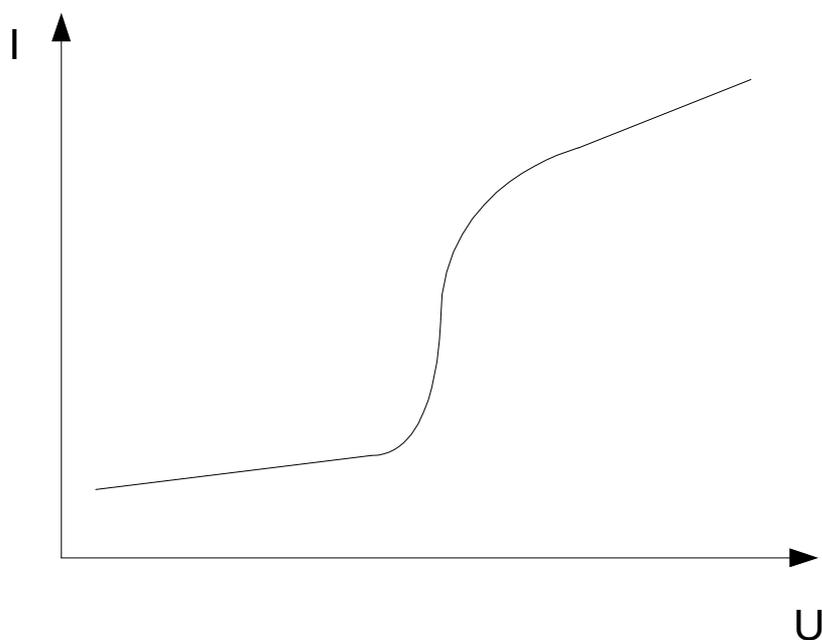
существовать так называемые «мешающие» ионы, способные частично принимать участие в полуреакции, что вносит большую погрешность. Поэтому для успешного проведения потенциометрического исследования необходимо сначала избавиться от мешающих ионов (например, осадить их).

В прямой потенциометрии, измеряя ЭДС ячейки, определяют линейно связанный с ней логарифм концентрации иона (часто по аналогии с рН вводят понятие рХ, например, рNa, рCl, рNO₃). Между тем, часто линейная зависимость немного нарушается, поэтому перед определением проводят градуировку прибора либо строят градуировочный график.

В потенциометрическом титровании не требуется устанавливать точную зависимость между концентрацией иона и ЭДС, достаточно лишь знать ее характер. Чаще всего осуществляют кислотно-основное титрование. Так как ЭДС ячейки, включающей в себя стеклянный электрод, линейно зависит от рН, то кривая такого титрования будет максимально приближена к классической (теоретической) кривой титрования, определение точки эквивалентности по которой хорошо известно. В случае сложности установления точки эквивалентности (например, при очень маленьком скачке титрования) строят дифференциальную кривую, на которой точку эквивалентности находят по максимуму. Потенциометрическое титрование имеет те же достоинства, что и кондуктометрическое: большую объективность метода и возможность титрования в мутных и окрашенных растворах. При выборе измерительного электрода потенциометрическое титрование можно проводить даже в таких системах, когда ни кондуктометрическое, ни индикаторное титрование невозможно.

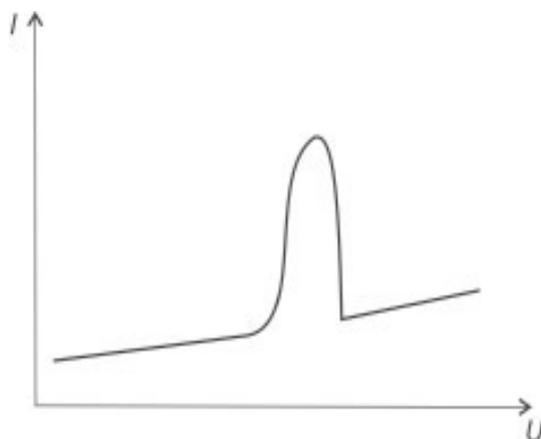
Вольтамперометрический (полярографический) метод основан на том, что электрический ток в электрохимической ячейке возникает только при такой разности потенциалов, при которой возможен разряд ионов в

электролите. Соответственно, если увеличивать разность потенциалов (меняя потенциал одного, рабочего, электрода) от нуля, то сначала ток будет возрастать линейно, его величина будет очень мала (связан с зарядом ДЭС и наличием примесей). При достижении разности потенциалов, достаточной для разряда, на полярограмме возникает скачок (возрастание силы тока) [3]. Положение этого скачка характеризует природу разряжаемого вещества (деполяризатора). Если содержание исследуемого вещества в растворе велико, то после скачка сила тока в ячейке будет значительно больше (рисунок 1.4.10). Такой скачок не даст информации о количестве деполяризатора, но даёт информацию о его природе. Для того, чтобы использовать полярографию как метод количественного анализа, необходимо исследовать только очень разбавленные растворы деполяризатора. Вместе с тем, для снижения сопротивления в систему вносится фоновый раствор – электролит с высокой концентрацией, деполяризуемый, как правило, значительно раньше исследуемого вещества. В такой системе поляризационная кривая будет иметь характерный пик, высота которого прямо пропорциональна концентрации деполяризатора (рисунок 1.4.11).



U– напряжение между электродами; I – сила тока в цепи

Рисунок 1.4.10 – Полярограмма при высокой концентрации депполяризатора.



U– напряжение между электродами; I – сила тока в цепи

Рисунок 1.4.11 – Полярограмма при низкой концентрации депполяризатора.

Для проведения вольтамперометрического исследования используют специальные электроды – рабочий (индикаторный) электрод и электрод

сравнения. Поверхность электрода сравнения достаточно большая, а его потенциал поддерживается постоянным (условно принимается за 0). В качестве рабочего всегда принимают электрод с малой поверхностью. На практике используют платиновый, графитовый и ртутный электроды. Отдельно следует выделить ртутно-капельный электрод, т.е. его рабочей поверхностью является ртутная капля, вытекающая из капилляра. Как следствие, поверхность рабочего электрода постоянно обновляется. В этом случае метод называют полярографией, а в остальных – вольтамперометрией.

1.4.5. Хроматографические методы исследования

Основы хроматографического анализа были сформулированы М. А. Цветом в 1903 г. для разделения компонентов растительных пигментов, близких по своему строению. В более поздних работах был обоснован открытый им метод теоретически. Бурное развитие хроматографии начинается с 1931 г. Тогда появились новые работы по теории адсорбции и ионного обмена (Р Кун, Е Ледерер, А. Винтерштейн), были синтезированы новые органические и неорганические сорбенты [3].

Хроматографические методы — методы разделения компонентов сложных смесей, основанные на использовании сорбционных процессов в динамических условиях [4]. При количественном анализе, как правило, собственно хроматография сопровождается применением других физических или физико-химических методов.

Группа хроматографических методов очень широка, поэтому их классифицируют по следующим признакам: по принципу разделения, по агрегатному состоянию подвижной фазы, по форме неподвижного слоя [3].

По принципу разделения выделяют распределительную, адсорбционную, осадочную, ионообменную и лигандообменную (афинную) хроматографию. Отдельно следует выделить гель-хроматографию (молекулярно-ситовую хроматографию).

В *распределительной хроматографии* разделение осуществляется за счет многократного перераспределения компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами (или между газом и жидкостью), одна из которых неподвижна (удерживается твердым носителем), а другая перемещается, увлекая с собой часть компонентов смеси. За счет того, что компоненты смеси могут перемещаться, находясь только в подвижной фазе, скорость их движения будет меньше, чем скорость движения подвижной фазы. Чем больше сродство компонента к неподвижной фазе, тем медленнее он будет двигаться, что и приводит в итоге к разделению смеси.

В *адсорбционной хроматографии* разделение осуществляется за счет многократной адсорбции и десорбции компонентов из подвижной фазы (газ или жидкость) в неподвижную (твердый адсорбент). Как и в случае распределительной хроматографии, чем лучше данный компонент будет адсорбироваться, тем медленнее он будет двигаться вместе с подвижной фазой.

В случае *осадочной хроматографии* неподвижной фазой является носитель и осадитель, а подвижной — исследуемый раствор, содержащий ионы, способные образовывать осадки с осадителем. При движении раствора вдоль неподвижной фазы сначала выпадают (и, следовательно, задерживаются на неподвижной фазе) осадки с меньшей растворимостью, а потом — с большей. Чаще всего осадитель подбирается таким образом, чтобы с исследуемыми ионами образовывалось окрашенное соединение, легко видимое невооруженным глазом. В этом случае осадки каждого из ионов будут видны в виде полос соответствующего цвета. Метод используется для количественного определения ионов металлов (меди, олова, свинца и др.) в растворах.

В *ионообменной хроматографии* неподвижной фазой является ионообменная смола (ионит), представляющая собой высокомолекулярное соединение, содержащее функциональные группы, способные поглощать из

раствора одни ионы и отдавать в раствор другие (чаще всего, используются карбоксильные и сульфгидрильные группы в катионитах¹⁶; первичные, вторичные, третичные и четвертичные аммониевые основания — в анионитах). Подвижной фазой является раствор, содержащий соответствующие ионы (в качестве ионов могут выступать аминокислоты и полипептиды, при определенном pH-содержащие ионные группы). При движении раствора вдоль ионита ионы, содержащиеся в растворе, замещаются на ионы, имевшиеся в ионите. В частности, если в растворе присутствовали катионы Na⁺ и анионы Cl⁻, а катионит имел свободные карбоксильные группы, то при движении по колонке с ионообменной смолой часть катионов натрия будет замещена на катионы водорода. Если длина слоя ионообменной смолы будет достаточна, то практически все катионы натрия будут замещены на ионы водорода, т. е. вместо раствора поваренной соли, поступившего на вход в колонку, из колонки выйдет раствор соляной кислоты. Если вымыть из колонки остатки соляной кислоты водой, то в итоге количество соляной кислоты (в молях) будет равно исходному количеству поваренной соли. Так как количество соляной кислоты в растворе можно определить с помощью титрования, то этот метод иногда используют для определения количества поваренной соли в растворе.

И наоборот, аниониты, содержащие свободные аммониевые основания, заместят все анионы на гидроксид-ион. Таким образом, если раствор пропустить сначала через катионит, а потом через анионит (или наоборот, или через смесь катионита и анионита), то все ионные вещества в растворе будут замещены на воду. В этом заключается суть процесса очистки воды — деионизации.

¹⁶ ΔE Катионит – ионит, способный обменивать катионы. Анионит – ионит, способный обменивать анионы.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

По мере замещения функциональных групп в ионите он начинает обменивать проходящие через него ионы на те ионы, которые в нем остались, что, как правило, делает его непригодным для дальнейшего использования. Чтобы регенерировать катионит, нужно через него пропустить в избытке раствор кислоты (заместив захваченные катионы на ионы водорода), а для регенерации анионита используют растворы щелочи. Значительно менее эффективна, но в ряде случаев может быть использована для регенерации дистиллированная вода.

При наличии в растворе нескольких анионов, они будут конкурировать друг с другом, за счет чего возможно их разделение. Наиболее часто это применяется при анализе смесей полипептидов и аминокислот. При разном рН полипептиды и аминокислоты ионизированы в разной степени и в разной степени взаимодействуют (задерживаются) на ионите. Чем более сильно данное вещество связано с ионитом, тем сложнее его вытеснить из системы конкурирующим ионом (как правило, вытеснение осуществляют путем пропускания через колонку раствора поваренной соли) и тем при большей ионной силе элюента¹⁷ полипептид или аминокислота выйдет из колонки [3].

В *афинной (лигандообменной) хроматографии* неподвижная фаза представляет собой матрицу, на которой иммобилизованы лиганды, способные захватывать из подвижной фазы вещества, образующие комплексное соединение с лигандами. После того как лиганды прочно захватят исследуемое вещество, колонку отмывают от примесей; затем через колонку пропускают элюент, который способен постепенно разрушать образовавшиеся комплексы и вымывать исследуемое вещество из колонки.

¹⁷ ΔE Элюирование (от лат. eluere вымывать) — извлечение вещества вымыванием его подходящим растворителем — элюентом.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

В *гель-хроматографии* молекулы разделяемой смеси обладают разной способностью проникать в поры геля, являющегося неподвижной фазой. На практике гранулами геля заполняют колонку, через которую пропускают исследуемый раствор, после чего его элюируют. Мелкие молекулы, способные проникать в поры геля, дольше задерживаются в колонке, чем крупные [3].

По форме неподвижного слоя выделяют бумажную, тонкослойную и колоночную хроматографию. По агрегатному состоянию подвижной фазы выделяют газовую и жидкостную хроматографию.

Жидкостная хроматография может быть адсорбционной и распределительной. Жидкостная распределительная хроматография чаще всего бывает бумажной или тонкослойной [3].

В бумажной хроматографии носителем является хроматографическая бумага, вдоль которой движется растворитель (подвижная фаза). В определенную точку бумаги наносят исследуемую смесь. Растворитель захватывает компоненты смеси, причем те вещества, которые обладают большим сродством к растворителю, будут перемещаться быстрее, и наоборот. Бумажная хроматография может быть восходящей или нисходящей. В случае восходящей хроматографии бумагу подвешивают так, чтобы нижний ее конец был погружен в кювету с растворителем. За счет сил поверхностного натяжения растворитель поднимается вверх по бумаге. Горизонтальная линия, на которой присутствует точка, в которую внесена исследуемая смесь, называется линией старта. Линия старта должна быть недалеко от кюветы с растворителем, но не погружена в нее. Только после того, как растворитель пройдет линию старта, начинается хроматографическое разделение. Хроматографию прекращают, когда фронт растворителя дойдет или до верхнего края бумаги, или до линии финиша, нанесенной чуть ниже¹⁸. После этого бумагу можно высушить и, при

¹⁸ *ΔE* Иногда линию финиша наносят «по факту», т. е. отмечают фактический фронт растворителя после окончания хроматографии.

необходимости, проявить, чтобы исследуемые компоненты пробы стали заметны в виде пятен либо невооруженным глазом, либо в ультрафиолетовом свете. Пятна идентифицируют по коэффициенту распределения R_f — отношению расстояния, пройденного компонентом пробы (от линии старта до центра пятна), к расстоянию, пройденному фронтом растворителя (от линии старта до линии финиша). Этот коэффициент является постоянным для данного компонента и данной системы растворителей. Количественное определение в методе бумажной хроматографии достаточно сложно. Ориентировочно оценить содержание того или иного компонента можно по площади пятен; также применяют гравиметрический метод (пятна вырезают, взвешивают и из этой массы вычитают массу хроматографической бумаги той же площади). Нисходящая хроматография отличается от восходящей тем, что растворитель подают сверху, и он движется вниз. Круговая хроматография предполагает внесение исследуемого вещества в центр бумаги, после чего в это же место по каплям вносят растворитель, который будет расходиться во все стороны (т. е. фронт растворителя будет представлять собой окружность, радиус которой постоянно возрастает). Чем большим сродством обладает исследуемый компонент, тем дальше он уйдет от центра.

В ряде случаев, когда ни восходящая, ни нисходящая хроматография не дают требуемого разделения, применяют двухмерный метод, представляющий собой комбинацию двух одномерных. Сначала хроматографию проводят в одном направлении одной системой растворителей, при этом все компоненты в итоге будут находиться вблизи одной линии. Потом бумагу сушат и проводят хроматографию в перпендикулярном направлении другой системой растворителей, позволяющей разделить до сих пор неразделенные пятна.

Тонкослойная хроматография принципиально не отличается от бумажной,

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

только в качестве носителя используют стеклянную пластинку с тонким слоем сорбента, покрытого жидкой фазой. Достоинством метода является быстрота разделения, большая чувствительность и устойчивость сорбента. В качестве сорбентов при тонкослойной хроматографии используют силикагель в смеси с гипсом и оксидом алюминия, оксид алюминия, кизельгур, крахмал и др.

В случае адсорбционной хроматографии жидкость, в которой растворена исследуемая проба, перемещается вдоль твердого сорбента. Чаще всего ее проводят в специальных колонках. Скорость движения каждого компонента зависит от его способности к адсорбции, т. е. связана с его природой и природой адсорбента. Полярные молекулы легче сорбируются (и, как следствие, медленнее проходят) на полярном сорбенте, и наоборот. Также играет роль и природа подвижной фазы: чем лучше в ней растворяется данный компонент, тем быстрее он десорбируется. Этот принцип иногда используют для вымывания из колонки примесей, оставшихся от предыдущих анализов: в колонку подают растворитель, наилучшим образом растворяющий эти примеси. Различают два варианта жидкостно-адсорбционной хроматографии: с нормальными фазами и с обращенной фазой. В первом случае сорбент является полярным соединением, легко поглощающим из раствора гидрофильные вещества, тогда как в состав элюента входит гидрофобный растворитель (разумеется, компоненты смеси должны быть растворимы в элюенте, поэтому состав элюента и в хроматографии с нормальными фазами, и в обращенно-фазовой хроматографии достаточно сложный). Данный вариант целесообразно применять для анализа ионных неорганических и (в меньшей степени) органических соединений.

Обращенно-фазовая жидкостная хроматография предполагает использование неполярных сорбентов и элюента, в состав которого входит полярный растворитель (очень часто используют смеси, содержащие воду,

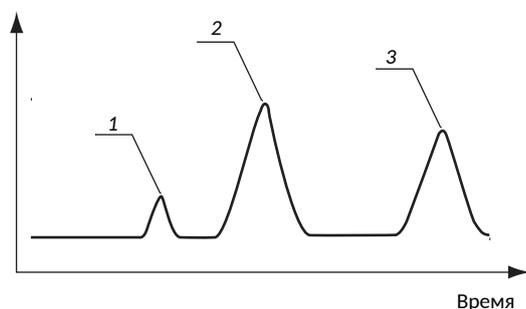
водные буферные растворы и метанол в качестве полярного растворителя, ацетонитрил в качестве дифильного растворителя; при необходимости добавляют еще менее полярные растворители — тетрагидрофуран, метил-*трет*-бутиловый эфир и т. д.). Этот метод широко применяют при анализе многих органических соединений (липидов, пестицидов, аминокислот, жирорастворимых витаминов, полициклических ароматических углеводов и т. д.).

В последнее время очень широкое распространение получил метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В этом методе используются мелкозернистые адсорбенты, которые помещены в специальные колонки небольшого диаметра; анализ проводят при постоянной регулируемой температуре; состав и скорость потока элюента также точно регулируется. Хроматограф для проведения ВЭЖХ, как правило, включает в себя блок дегазации растворителей, блок, где растворители смешиваются в требуемой пропорции, насос, нагнетающий растворители в колонку и создающий требуемый поток, устройство для ввода фиксированного количества исследуемой пробы в поток элюента, термостат колонок, поддерживающий требуемую температуру в колонке (колонках), куда подается элюент, детектор, позволяющий определить какойлибо физико-химический показатель смеси после колонки, зависящий от ее состава, и преобразующий этот показатель в электрический сигнал. Электрический сигнал можно подать на самописец и получить хроматограмму, но в настоящее время чаще всего этот сигнал преобразуется в цифровой вид и передается в компьютер, способный не только вывести хроматограмму на экран или на печать, но и провести анализ этой хроматограммы в автоматическом или полуавтоматическом режиме.

При проведении ВЭЖХ через колонку сначала пропускают элюент до того, как

сигнал из детектора не установится на постоянном уровне. После этого в поток элюента перед колонкой вводят исследуемую пробу, которая движется по колонке. Так как растворитель проходит через колонку не мгновенно, то за это время никакие вещества не выйдут из колонки, т. е. сигнал должен оставаться на постоянном уровне. После того как до детектора дойдет та порция растворителя, в которую ввели пробу сложного состава, часто наблюдают возрастание и последующее убывание аналитического сигнала, т. е. так называемый пик. Этот самый первый пик, как правило, относится к несорбируемому компоненту, свободно проходящему через колонку вместе с элюентом.

Через определенное время на хроматограмме наблюдают пики исследуемых веществ, по высоте или площади¹⁹ которых определяют их содержание (после предварительной калибровки). Время, соответствующее максимуму каждого пика, называется временем выхода компонента, и при постоянных условиях хроматографирования определяется только химической структурой компонента. Время выхода используют для идентификации каждого пика. Вид хроматограммы представлен на рис. 1.4.12.



1 – пик несорбируемого компонента; 2,3 – пики исследуемых веществ

Рисунок 1.4.12 - Хроматограмма.

¹⁹ ΔE В жидкостной хроматографии чаще всего используют площадь, а в газовой — высоту.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

В ряде случаев хроматография при постоянном составе элюента (так называемый изократический режим) либо не дает эффективного разделения пиков (чаще всего, в начале хроматограммы), либо приводит к очень большому времени хроматографии и «размыванию» последних пиков. В этом случае применяют градиентный режим: сначала подают элюент, по составу оптимальный для разделения первых пиков; а после того как эти пики выйдут (иногда можно и раньше, с учетом «мертвого объема») начинают менять состав растворителя по линейному закону так, чтобы наилучшим образом вышли последующие пики.

В детекторах для ВЭЖХ используют различные принципы. Чаще всего детекторы основаны на фотометрическом методе в той или иной модификации. Одним из лучших вариантов такого детектора является диодно-матричный детектор: в нем белый (или ультрафиолетовый, в широком диапазоне длин волн) пропускается через жидкость, выходящую из колонки, после чего этот поток света расщепляется в спектр (например, проходя через призму), который попадает на матрицу из фотодиодов. Таким образом, можно снимать не только один сигнал, по которому и следует строить хроматограмму, но и весь спектр поглощения, что является дополнительным параметром, по которому можно идентифицировать вещество в смеси (например, если наличие этого вещества изначально не предполагалось в пробе, но у исследователя имеется библиотека спектров, в которую входит спектр поглощения данного компонента). Другим распространенным видом детектора является флуориметрический детектор, позволяющий при заданной длине волны возбуждения фиксировать флуоресценцию заданной длиной волны. Этот детектор целесообразно использовать при анализе ПАУ, витаминов В₁, В₂, С. Также применяют рефрактометрический детектор, с помощью которого можно исследовать

вещества, не поглощающие свет в видимой и ультрафиолетовой части спектра²⁰, не способные к флуоресценции, но отличающиеся от элюента по коэффициенту преломления. Также используют масс-спектрометрический детектор, что позволяет совместить два высокоточных метода: хроматографию и масс-спектрометрию. К сожалению, этот метод используется пока недостаточно часто, поскольку стоимость масс-спектрометра в качестве детектора высока.

Если имеющиеся в наличии детекторы не позволяют определить исследуемое вещество в потоке растворителя, то есть возможность изменить химическую природу исследуемого вещества, придав ему свойства, позволяющие давать аналитический сигнал на детекторе. Этот метод заключается в получении производных исследуемого вещества и называется дериватизацией²⁰. Дериватизацию можно проводить до колонки и после колонки. В обоих случаях у этого метода есть достоинства и недостатки. Получение производных после колонки позволяет не менять свойства исследуемых веществ при разделении; более того, можно проводить цветную реакцию, в которой окрашенные вещества будут сильно отличаться от исходного. С другой стороны, такое действие потребует существенного изменения схемы хроматографии, т. е. между колонкой и детектором потребуется вставить дополнительный блок. Предколоночная дериватизация не требует дополнительного оборудования, она может быть осуществлена обычными лабораторными методами, но полученные производные должны хорошо разделяться на колонке.

Газовая хроматография делится на две разновидности: газоадсорбционную и газожидкостную. В газоадсорбционной хроматографии неподвижной фазой является твердый адсорбент, находящийся в U-образной

²⁰ ΔE Или поглощающие свет в той же области спектра, что и элюент. ²⁰ От англ. derive — производное.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

колонке, а в газожидкостной — жидкость, нанесенная на твердый носитель (как правило, силикагель) в колонке. В остальном оба эти метода очень похожи [4].

Газовый хроматограф включает в себя блок подготовки газов, испаритель, термостат колонок, детектор, самописец или компьютер. В хроматографии используется газ-носитель в качестве подвижной фазы, как правило, это инертный газ (гелий, аргон) или азот (который при обычных условиях практически не способен взаимодействовать с другими газами). Кроме того, при использовании пламенно-ионизационного детектора дополнительно требуются водород и кислород (вместо кислорода можно использовать воздух). Газы должны быть тщательно очищены от примесей; их расход должен поддерживаться на строго постоянном уровне. После этого газ-носитель может поступать в колонку, как правило, через испаритель. В определенный момент времени в колонку (в поток газа-носителя) вводят газовую пробу. Если используется жидкая проба, ее вводят через испаритель, где ее компоненты испаряются и уносятся в колонку газом-носителем. В колонке компоненты смеси разделяются (одни из них движутся быстрее, другие — медленнее), после чего газ из колонки поступает на детектор. В газовой хроматографии используют следующие виды детекторов: детектор по теплопроводности, пламенно-ионизационный детектор и масс-спектрометрический детектор. Для анализа неорганических газов необходимо использовать детектор по теплопроводности, а для органических веществ можно применять пламенно-ионизационный. Принцип действия пламенно-ионизационного детектора основан на измерении силы тока между двумя электродами, находящимися в пламени, получаемом при сгорании водорода в кислороде или воздухе. Если в пламя попадает органическое вещество, способное к горению, сила тока резко меняется. Далее анализ сигнала проводят аналогично анализу хроматограмм в ВЭЖХ.

Вопросы для самоконтроля.

1. Назовите метод, который можно отнести к спектральным, но нельзя – к оптическим.
2. Содержание каких веществ можно определить флуориметрическим методом?
3. Как можно применять фотометрические методы, если в составе исследуемого вещества нет хромофоров?
4. Какие детекторы используют в газовой хроматографии?
5. Что можно определить в рыбных продуктах вольтамперометрическим методом?

1.5. Физические методы исследования

1.5.1. Определение водоудерживающей способности рыбного фарша

Водоудерживающая способность (ВУС)²¹ – важная характеристика, обуславливающая технологические свойства фаршевых и формованных изделий. Она определяется отношением количества воды, удерживаемой навеской, к массе самой навески; как правило, ВУС выражают в процентах.

Метод основан на определении количества влаги, выделяющейся из продукта при легком надавливании на него.

Оборудование, материалы, реактивы

Весы аналитические, полиэтилен, фильтровальная бумага, миллиметровочная бумага, плексигласовые или стеклянные пластинки, гиря массой 1 кг, часы.

²¹ ΔE В рыбной и во многих других отраслях пищевой промышленности используют именно такой термин – ВУС, водоудерживающая способность. В мясной промышленности аналогичную величину называют водосвязывающей способностью (ВСС), тогда как ВУС там тоже используется, но обозначает количество воды, удержанной при термической обработке.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

Проведение испытания

Берут навеску фарша массой около 0,3 г на предварительно взвешенный полиэтиленовый кружок, точностью взвешивания 0,005 г. Переносят навеску на фильтровальную бумагу, размещенную на плексигласовой или стеклянной пластинке так, чтобы навеска фарша лежала на фильтровальной бумаге.

Для опытов используют фильтровальную бумагу средней плотности, предварительно выдержанную 3 суток в эксикаторе над насыщенным раствором хлористого кальция. Подготовленные фильтры хранят в полиэтиленовом пакете в холодильнике.

Сверху на полиэтиленовый кружок, закрывающий фарш, кладут плексигласовую или стеклянную пластинку, на которую ставят гирю массой 1 кг. Выдерживают фарш под прессом ровно 10 мин. После прессования фильтр аккуратно освобождают от навески, обводят карандашом контур пятна вокруг прессованного мяса (S_1). Площадь пятна, образовавшегося из навески фарша S_1 и площадь пятна, образовавшегося, из влаги фарша S_2 , определяют по границе распространения.

Площадь пятен S_1 и S_2 следует определить с помощью миллиметровой бумаги. Площадь влажного пятна находят как разность S_1 и S_2 .

Для расчета ВУС необходимо дополнительно определить содержание воды в исследуемом фарше высушиванием при 100 – 105 или 130 °С (см. п. 3.2).

Влагоудерживающая способность исследуемой пробы ВУС (%)

вычисляется по формуле:

$$\text{ВУС} = \frac{m_1 - 0,0084 S}{m} \cdot 100, \quad (1.5.1)$$

где m_1 - количество воды в навеске, г;

S - площадь влажного пятна, см²;

0,0084 - количество воды в 1 см влажного пятна, г;

m - масса навески, г.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 1 %. Опыт повторяется трижды. Среднее значение определяется как среднее арифметическое из трех параллельных измерений.

1.5.2. Определение плотности рыбы

Метод основан на определении объема рыбы известной массы.

Оборудование, материалы, реактивы

Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 1 кг, цилиндр мерный лабораторный на 100, 500, 1000 см³, термометр спиртовой стеклянный с пределом измерений от 0 до 200 °С.

Проведение испытания

Мороженую неразделанную рыбу предварительно размораживают, промывают водой и выдерживают 15 минут для стекания излишней влаги. По достижении рыбой температуры от 18 до 20 °С ее взвешивают на технических весах с точностью $\pm 0,1$ г.

В мерный цилиндр объемом от 100 до 1000 см³ наливают дистиллированную воду и выдерживают до достижения ею температуры от 18 до 20 °С. Отмечают объем воды в цилиндре V_1 . Точность измерения $\pm 0,25$ см³.

Как только температура рыбы достигнет от 18 до 20 °С ее помещают в цилиндр с водой до полного погружения в воду. Определяют объем воды и рыбы в цилиндре V_2 , точность измерения $\pm 0,25$ см³.

По разности объемов воды в цилиндре после погружения рыбы и объема воды до погружения рыбы, определяют объем рыбы V_p .

Плотность рыбы ρ в кг/м³ определяют по формуле

$$\rho = \frac{m}{V_p},$$

где m – масса рыбы, кг;

V_p – объем рыбы, м³.

Плотность мышечной ткани рыбы определяют следующим образом. Рыбу разделяют, из спинной части вырезают кусок без кости размером 5×2×1 см. После аккуратно снимают кожу и взвешивают кусочек с точностью до 0,1 г. В дальнейшем плотность мышечной ткани определяют по методике, изложенной в п. 3.1. При определении использовать цилиндр с ценой деления 0,5 см³.

1.5.3. Реологические методы исследования²²

Реология – это наука о течении и деформации реальных тел под воздействием механической нагрузки. Основные реологические свойства пищевых продуктов можно разделить на следующие группы: сдвиговые свойства (возникают под действием касательных напряжений), компрессионные свойства (под воздействием нормальных напряжений), поверхностные свойства [3].

К сдвиговым свойствам для жидкообразных пищевых продуктов относят, в частности, коэффициент динамической вязкости, а для твёрдообразных продуктов – предельное напряжение сдвига; к компрессионным свойствам относят, например, модуль упругости; а к поверхностным – коэффициент внешнего трения [3].

На практике изучение реологических характеристик пищевых продуктов бывает необходимо для получения объективных показателей, связанных с такими комплексными органолептическими показателями, как консистенция и текстура; иногда они могут охарактеризовать и «хрусткость».

Жидкие и жидкообразные тела отличаются от твердообразных тем, что

²² ΔE Более подробно данный вопрос раскрывается в рамках дисциплины «Инженерная реология»

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

они способны течь (образовывать необратимые деформации) уже при сколь угодно малых постоянных напряжениях сдвига, тогда как твёрдые тела до предела упругости образуют обратимые деформации. Жидкости делятся на две группы: ньютоновские и неньютоновские. В любых жидкостях напряжение сдвига приводит к течению с определённой скоростью, но в ньютоновских жидкостях эта скорость прямо пропорциональна этому напряжению (уравнение Ньютона); коэффициент пропорциональности между скоростью течения и напряжением сдвига называют коэффициентом динамической вязкости [3].

$$\theta = \eta \cdot \frac{\partial \gamma}{\partial \tau} \quad (1.5.2)$$

где θ – напряжение сдвига, Па;

η – коэффициент динамической вязкости, Па·с;

γ – деформация сдвига, отн. ед.

Для неньютоновских жидкостей эта зависимость не соблюдается, следовательно, в строгом смысле о их вязкости говорить нельзя. На практике, однако, измеряют эффективное значение коэффициента динамической вязкости, которое зависит от скорости течения.

Среди неньютоновских жидкостей выделяют дилатентные жидкости, у которых с ростом скорости течения требуется всё сильнее увеличивать напряжение сдвига (т. е. они труднее будут течь при больших скоростях), и псевдопластичные жидкости, когда с ростом скорости требуется всё меньше увеличивать напряжение сдвига (т. е. при больших скоростях они текут легче) [3].

На практике чистые жидкости, истинные растворы, а также дисперсные системы низкой концентрации близки к ньютоновским жидкостям; дисперсные системы высокой концентрации обладают свойствами дилатентных жидкостей, а некоторые гели и другие системы, имеющие внутреннюю структуру, обладают псевдопластичными свойствами [3].

Для измерения вязкости используют приборы, называемые вискозиметрами. Различные вискозиметры основаны на различных принципах. Так, капиллярные вискозиметры основаны на течении жидкости через капилляр под действием силы тяжести (например, вискозиметр Оствальда) или внешнего давления (вискозиметр Убеллоде). В таких вискозиметрах вязкость будет прямо пропорциональна продолжительности протекания данной жидкости и плотности (в первом случае) или разности давлений (в последнем случае). Коэффициент пропорциональности (константу вискозиметра) определяют по воде.

При исследовании твердообразных продуктов выделяют так называемые гуковские и негуковские тела. Гуковские тела подчиняются закону Гука

$$\theta = G \cdot \gamma, \quad (1.5.3)$$

где G – модуль сдвига.

В негуковских телах зависимость напряжения сдвига и деформации нелинейна. При определённых нагрузках негуковские тела обладают способностью к необратимой деформации и течению. В этих условиях они становятся подобны вязким жидкостям. Напряжение сдвига, при котором твердообразное тело становится способным к течению, называют **предельным напряжением сдвига** (ПНС). Для определения ПНС используют так называемые пенетрометры. В этих приборах рабочий орган (индентор), чаще всего имеющий форму конуса, погружают в продукт, прикладывая к нему постоянное усилие. В самом начале погружения площадь соприкосновения тела и индентора минимальна (теоретически равна нулю), т. е. напряжение сдвига максимально (теоретически стремится к бесконечности). Естественно, при таких огромных напряжениях большинство исследуемых твёрдых тел (теоретически – все) находятся, как минимум, в состоянии текучести. В этом состоянии индентор способен раздвигать слои тела, как если бы он погружался

в жидкость. По мере погружения индентора поверхность контакта возрастает, а напряжение сдвига падает. В какой-то момент оно оказывается равным предельному, при котором тело теряет способность к текучести, после чего индентор дальше погружаться не будет. Таким образом, ПНС можно рассчитать по глубине пенетрации. [3]

При исследовании негуковских тел также используют понятия «твёрдость», «мягкость» и др.

1.6. Математическая обработка результатов исследования

1.6.1. Общие понятия

При выполнении анализов наблюдается разброс результатов, обусловленный точностью применяемых приборов и оборудования, субъективным характером оценки и влиянием случайных факторов. Вследствие этого полученный результат является приближенным и отличается от истинного на некоторую величину, которая называется *погрешностью анализа*.

Погрешности, возникающие при проведении анализа, подразделяют на систематические, случайные и грубые.

Систематические погрешности — это постоянные ошибки или закономерно изменяющиеся при повторных определениях. Систематические погрешности появляются при неточной настройке приборов и калибровке оборудования, при использовании реактивов с неправильно установленным титром, субъективным восприятием зафиксированных значений. Причиной погрешности может оказаться неправильный отбор проб или неоднородность материала в отобранной пробе.

Систематические погрешности могут быть оценены до начала измерений и учтены путем введения поправочного коэффициента, оценки вероятности их границ и включением этого значения в общую погрешность результата измерений или принятия мер для полного или частичного исключения источника возможных погрешностей.

Случайные погрешности изменяются случайным образом (по знаку и значению) при повторных измерениях одной и той же величины и вызываются многими причинами, влияние которых учесть и устранить практически невозможно. Они приводят к тому, что результаты параллельных определений, выполненных при совершенно одинаковых условиях, никогда в точности не совпадают. Эти погрешности не могут быть точно определены, но с помощью математической статистики и теории вероятности можно определить пределы.

Грубые погрешности, или промах, являются следствием небрежного выполнения анализа. О наличии грубой ошибки свидетельствует появление в ряду повторных определений выпадающего результата, их отбраковываются путем расчета специальных критериев.

Погрешность определения выражается абсолютной и относительной ошибками.

Абсолютная ошибка – это разница в абсолютных цифрах между истинным или действительным значением определяемой величины и полученным результатом.

Относительная ошибка – это отношение абсолютной ошибки к истинному или наиболее достоверному значению определяемой величины, которая выражается в долях единицы или в процентах.

Точность анализа характеризуется правильностью, сходимостью (повторяемость, прецизионность) и воспроизводимостью.

Правильность аналитического определения выражается разностью между полученным результатом анализа и истинным содержанием определяемого вещества в исследуемом объекте.

Под *сходимостью* понимают близость друг к другу результатов измерений одной и той же величины, выполненных повторно одним и тем же СИ, одним и тем же методом в одних и тех же условиях с одинаковой

тщательностью.

Под *воспроизводимостью* понимают близость друг к другу результатов измерений одной и той же величины, полученных разными СИ, разными методами, в разных местах, разными операторами, в разное время. В настоящее время этот термин связан с межлабораторным разбросом результатов.

Точность анализа зависит от количества проведенных опытов. С увеличением числа повторностей увеличивается точность получаемого результата. Для оценки правильности и точности измерений необходимо проводить статистическую обработку измеряемых величин.

Окончательные данные лабораторных анализов получают не только в результате физико-химических операций и измерений, но и в результате математических расчетов. При неправильном выполнении эти расчеты могут исказить результаты анализа. Чтобы исключить искажение результатов анализа за счет вычислений, следует придерживаться следующих правил: все вычисления проводят на два знака больше, чем требуется по методике и проводят округление (нельзя проводить поэтапно округление).

Окончательный результат расчета должен иметь столько значащих цифр (в случае умножения и деления) или десятичных знаков (в случае сложения и вычитания десятичных дробей), сколько их содержит наименее точное число, участвующее в вычислении.

1.6.2. Определение средней ошибки измерений

Анализ проводят, как правило не менее двух раз. Увеличение числа измерений снижает погрешность результата анализа. Определение средней ошибки измерений производят в следующей последовательности.

Среднее арифметическое значение определяют по формуле:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (1.6.3)$$

где x_i – результат i -го наблюдения; n – число измерений.

Определяют среднеквадратичное (стандартное) отклонение единичного измерения σ :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1.6.4)$$

Стандартное отклонение среднего арифметического σ_0 определяется по формуле

$$\sigma_0 = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad (1.6.5)$$

Ширину доверительного интервала определяют по формуле:

$$\mu = \pm \sigma_0 t = \frac{\sigma \cdot t}{\sqrt{n}},$$

где t – критерий Стьюдента, определяется по таблице.

Таблица 1.6.1 – Значение коэффициента Стьюдента в зависимости от доверительной вероятности P_d и числа измерений

n	P_d			
	0,80	0,90	0,95	0,99
2	3,080	6,310	12,710	63,700
3	1,886	2,920	4,300	9,920
4	1,638	2,350	3,188	5,840
5	1,533	2,130	2,770	4,600
6	1,476	2,020	2,570	4,030
7	1,440	1,940	2,450	3,710
8	1,415	1,860	2,360	3,500
9	1,397	1,830	2,310	3,360
10	1,383	1,800	2,260	3,250

В общем случае интервальное значение измеряемой величины определяется выражением

$$\bar{x} - \frac{\sigma t}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + \frac{\sigma t}{\sqrt{n}} \quad (1.6.6)$$

Относительная погрешность (δ) в процентах определяют по формуле:

$$\delta = \pm \frac{\mu}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (1.6.7)$$

Для определения промаха все измерения располагают в порядке возрастания. Сомнительный результат, очевидно, будет занимать первое или последнее место в этом ряду. Затем вычисляет критерий K_d .

Если величина, которая вызывает сомнение – X_1 , то K_d определяют по формуле:

$$K_{d1} = \frac{X_2 - X_1}{X_n - X_1} \quad (1.6.8)$$

Если величина, которая вызывает сомнение – X_{n+1} , то K_d определяют по формуле:

$$K_{d2} = \frac{X_{n+1} - X_n}{X_{n+1} - X_1} \quad (1.6.9)$$

Если K_d больше табличного значения K_{dt} (таблица 1.6.2), которое определяется в зависимости от доверительной вероятности P и числа степеней свободы $(n-1)$, то результат, который вызывает сомнение в расчет не берут.

Например, при определении массой доли воды в продукте получены результаты 80,0; 80,1, 80,5; 80,6; 83,1 %. Определить наличие промаха.

Сомнение вызывает значение 83,1

$$K_d = \frac{X_n - X_{n-1}}{X_n - X_1} = \frac{83,1 - 80,6}{83,1 - 80,0} = 0,81 \quad (1.6.10)$$

При доверительной вероятности 0,95 и числе степеней свободы 4

$Z_p = 0,64$; $0,81 > 0,64$, значит 83,1 – промах.

Таблица 1.6.2

Число степеней свободы (n-1)	K_{dt} при P		
	0,90	0,95	0,99
3	0,58	0,75	0,89
4	0,56	0,64	0,78
5	0,48	0,56	0,70

6	0,35	0,41	0,53
---	------	------	------

В межлабораторных исследованиях часто возникает вопрос о достоверности данных, полученных при измерении физических величин. Эксперименты должны быть проверены на воспроизводимость результатов, т.е. на их повторяемость в определенных пределах измерений с заданной доверительной достоверностью. Суть такой проверки сводится к следующему. Имеется несколько параллельных опытов (серий) для каждой серии вычисляется среднее арифметическое значение

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}, \quad (1.6.11)$$

где n – число измерений в одной серии.

Далее вычисляется дисперсия Di и/или среднеквадратичное отклонение.

$$Di = \sigma^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1.6.12)$$

Чтобы оценить воспроизводимость, рассчитывается критерий Кохрена (расчетный):

$$k = \frac{\max D_i}{\sum_{i=1}^m D_i}, \quad (1.6.13)$$

где $\max D_i$ - максимальное значение дисперсий из числа рассматриваемых параллельных серий;

$\sum_{i=1}^m D_i$ - сумма дисперсий m серий;

m - число измерений в серии. Рекомендуется принимать $2 \leq m \leq 4$.

Опыты считают воспроизводимыми при $k \leq k_{кт}$, где $k_{кт}$ - табличное значение критерия Кохрена (табл.3.1), принимаемое в зависимости от доверительной

вероятности p_d и числа степеней свободы $q = n - 1$

Таблица 1.6.3-Критерий Кохрена при $p_d = 0,95$

m	q= n-1				
	1	2	3	4	5
2	0,99	0,97	0,93	0,90	0,87
3	0,97	0,93	0,79	0,74	0,70
4	0,90	0,76	0,68	0,62	0,59
5	0,84	0,68	0,60	0,54	0,50
6	0,78	0,61	0,53	0,48	0,44

Пример: Проведено три серии опытов (m) (табл. 3.2) В каждой серии выполнено по 5 измерений.

Таблица 3.2 – Результаты измерений и их обработка

Серии опытов (m)	Значения измеряемой величины и повторности					Вычисленные	
	1	2	3	4	5	\bar{X}	Di
1	7	9	6	8	4	6,8	2,96
2	9	7	8	6	5	7,0	2,00
3	8	8	7	9	8	8,0	0,40

Тогда по формуле (1.6.13)

$$K_{кр} = 2,96 / (2,96 + 2,0 + 0,4) = 0,55$$

Число степеней свободы $q = n-1 = 5-1 = 4$. Тогда по таблице Зкритерий Кохрена $k_{кт} = 0,74$. Так как $0,55 < 0,74$, то измерения в эксперименте следует считать воспроизводимыми.

Если бы оказалось наоборот, т.е. $k > k_{кт}$, то необходимо было бы увеличить серий m или число измерений n.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое доверительная вероятность? Какую доверительную вероятность используют чаще всего в инженерных расчётах?
2. Как изменится ширина доверительного интервала при увеличении доверительной вероятности?
3. Как определить промах в серии исследований?

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ОТБОРА ПРОБ И ПОДГОТОВКИ ПРОБ К ИССЛЕДОВАНИЮ

2.1. Отбор проб

В большинстве случаев при анализе пищевых продуктов используется выборочный разрушающий контроль. Это означает, что на анализ направляется только выборка. Более того, для химических и физико-химических методов часто требуется измельчение продукта.

Как правило, сырье поступает на предприятие в виде партии.

Партия — это определенное количество продукции одного наименования, способа обработки, сорта, изготовленное одним предприятием за определенный промежуток времени и оформляемое одним документом.

В соответствии с нормативным документом, от партии отбирают определенное количество единиц транспортной упаковки (если она имеется), а от этих единиц — выборки или точечные пробы.

Выборка — определенное количество продукции, отбираемое за один прием от одной единицы упаковки.

Если отбор проб осуществляется от нештучной продукции (сыпучей, жидкой, монолитной), то роль выборки играет точечная проба.

Точечная проба — это проба, взятая одновременно из определенной части нештучной продукции.

Исходный образец (объединенная проба) — это совокупность отдельных выборок (или точечных проб), отобранных из однородных партий.

Средний образец (средняя проба) — это часть исходного образца, отобранная для лабораторных испытаний.

Проба — это часть среднего образца, подготовленная определенным образом для испытаний.

Отбор проб строго стандартизирован. Порядок проведения отбора проб, как правило, следующий:

- от партии отбирают n единиц транспортной упаковки из разных мест. В частности, из партии консервов отбирают 2 % транспортных упаковок, если в партии их больше 500 шт. или 3 % (но не менее 5 шт.) — если их меньше 500 шт.;
- из каждой упаковки отбираются точечные пробы;
- из отобранных точечных проб составляется исходный образец; • для лабораторных испытаний берут средний образец;
- для испытаний выделяют пробу.

Для сыпучих продуктов (например, кормовой рыбной муки) для выделения средней пробы из исходного образца применяют квартование. В этом методе продукт рассыпают по плоской поверхности ровным тонким слоем, после чего делят двумя пересекающимися под прямым углом отрезками на четыре равные части. Две противоположные отбирают, а оставшиеся отбрасывают. При необходимости процедуру повторяют.

2.2. Подготовка проб к анализу

В зависимости от вида продукта, для подготовки к лабораторным испытаниям пробы могут подвергаться измельчению, растиранию.

При измельчении особое внимание уделяют однородности полученного фарша. В отдельных случаях пробу растирают с водой, безводными солями, песком и т. д.

Для определения содержания неорганических веществ пробы часто направляют на минерализацию (озоление). Различают сухую и мокрую минерализацию. Сухая минерализация осуществляется при температуре 450... 550 °С в течение 4...16 ч до полного удаления органических веществ. Мокрая

минерализация подразумевает использование смесей сильных кислот (серной, азотной и хлорной).

Глава 3. Органолептические методы исследования рыбы и рыбных продуктов

3.1. Теория сенсорной оценки

Термин «органолептический» происходит от двух греческих слов *organon* (орудие, инструмент) и *lēptikos* (склонный брать или принимать), то есть, в буквальном переводе, — «выявление с помощью органов чувств». Широкое распространение получил также термин «сенсорный», который происходит от латинского слова *sensus* (чувствующий). Таким образом, оценить *сенсорно* или *органолептически* означает «провести идентификацию и качественное исследование того или иного продукта питания при помощи органов чувств человека»²³.

Объективная органолептическая оценка позволяет выявить влияние сырья, полуфабрикатов, технологических параметров на качество готовых продуктов, дает важную информацию о потребительском предпочтении, оценке качества при разработке новых видов продукции.

Механизм органолептической оценки состоит в том, что человеческие органы чувств обладают не только высокой чувствительностью, но и способностью анализировать поступающую через внешние раздражители информацию, в связи с чем их называют *анализаторами*.

Анализаторы состоят из трех звеньев: *периферического*, в котором имеются рецепторы — нервные клетки, принимающие внешние сигналы раздражителей; *проводникового* — нервных путей; *центрального* — головного мозга. Внешний импульс передает сигнал, раздражает конкретный рецептор, который передает сигнал в головной мозг, осуществляющий анализ сигнала.

Общим свойством всех органов чувств является адаптация — приспособление к

²³ ΔE Между этими понятиями имеется незначительное различие [5]: *органолептический* анализ заключается в выявлении качественных отличий или определении общего или частичного качества с помощью органов чувств без учета личных вкусов оценщиков и их сенсорных особенностей; *сенсорный* анализ заключается в определении численных значений показателей качества продукции, осуществляемый на основе анализа восприятия органов чувств оценщиками, у которых органы чувств проверены.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

сильно меняющимся внешним условиям: если действие раздражителя достаточно длительное, то наступает частичная или полная потеря ощущения из-за снижения чувствительности рецепторов (через 1,5...2 ч). Особенно быстро идет адаптация рецепторов обоняния, осязания и вкуса.

Иногда наблюдают и противоположное явление — сенсбилизацию, т. е. усиление чувствительности. Если адаптация ограничивает применение органолептических методов и с ней необходимо бороться, то сенсбилизация позволяет достичь более высоких результатов при сенсорной оценке. Достижение сенсбилизации иногда можно путем периодических воздействий на рецептор стимулами, находящимися на очень низком или даже околопороговом уровне. Состояние сенсбилизации может сохраняться вплоть до нескольких суток [5].

Внешний вид и цвет пищевых продуктов. Внешний вид пищевых продуктов определяют при осмотре на основе зрительных ощущений. Раздражителем зрительного анализатора является световая энергия, а рецептором — глаз. На внутренней стороне глазного яблока (сетчатки) находятся светочувствительные нервные окончания — рецепторы, которые поглощают световой поток и преобразуют его в нервный импульс, попадающий по зрительному нерву в мозг.

Глаз человека воспринимает световые волны от 302 до 950 нм (свет в диапазоне до 470 нм человек воспринимает как фиолетовый и синий, от 480 до 510 — как сине-зеленый, от 510 до 550 — как зеленый, от 560 до 590 — как желто-оранжевый, а от 600 нм и более — как красный).

Лучи света проходят сквозь прозрачное вещество, не изменяя свой состав. Отдельные вещества способны поглощать свет определенной длины волны, а оставшаяся часть спектра (проходящий или, чаще, отраженный свет) формирует цвет продукта: если отражается 90 % спектра, то цвет воспринимается белым, а если большая часть спектра поглощается, то черным.

У человека есть черно-белое (сумеречное) и цветное зрение. Чернобелое осуществляется с помощью палочек, а цветное — колбочек. Не способность человека видеть в темноте называется «куриной слепотой».

С помощью цветного зрения человек способен воспринимать до 7 миллионов оттенков.

У человека есть три типа рецепторов, воспринимающих оранжевый (от 555 до 570 нм), зеленый (от 525 до 535 нм) и сине-фиолетовый (от 445 до 450 нм) цвет [5]. Если человек не способен воспринимать один

или более элементарных цветов, то говорят о зрительном дальтонизме. Наиболее часто человек не воспринимает зеленый цвет (до 2 % людей), реже — красный (1 %) и синий (0,05 %).

Как следствие, для получения другого цвета можно использовать один из двух способов: либо смешать в том или ином соотношении основные цвета, либо выделить монохроматический цвет, отличающийся от элементарного (и, как следствие, этот цвет будет в разной степени воздействовать на два разных типа рецепторов). Для получения белого цвета не обязательно перекрывать весь спектр, достаточно лишь наличия этих трех основных цветов.

В пищевой промышленности широко применяются красители, т. е. вещества, избирательно поглощающие различные части спектра.

Все цвета можно разделить на хроматические (окрашенные) и ахроматические (белый, черный, все оттенки серого). Цвет продукта определяется следующими характеристиками: цветовой тон, насыщенность, яркость. *Цветовой тон* определяется либо длиной волны монохроматического цвета, либо комбинацией длин волн. Другой характеристикой цвета продукта является *насыщенность*. Для характеристики насыщенности используют термины слабый/сильный, бледный, тусклый, насыщенный. Насыщенность определяется наличием ахроматической составляющей (т. е. когда основной

цвет смешан с белым или серым). Если она больше, то цвет выглядит более бледным [5].

Визуальная оценка продукта включает сведения не только о цвете пищевых продуктов, но и о форме, размерах и характере поверхности, фракционном составе. Например, внешний вид мороженой рыбы оценивается по форме блока, равномерности нанесения глазури, правильности укладки рыбы в блоке, цвету поверхности рыбы, наличию пожелтения поверхности, наличию механических повреждений блока и рыбы, правильности разделки.

Вкус пищевых продуктов. Под вкусом понимается общее впечатление, получаемое при проверке свойств продукта посредством вкусовой пробы. Вкус пищи стимулирует выделение слюны, определяет продолжительность пережевывания пищи и вид проглатывания, стимулирует увеличение потребления кислорода (что способствует ускорению переваривания), служит для распознавания различных веществ и защиты от попадания вредных веществ в организм.

При опробовании продукта возникает сложное ощущение как результат одновременного раздражения вкусовых, обонятельных и осязательных рецепторов. Ощущение вкуса возникает в результате действия растворов веществ на рецепторы вкусовых органов — вкусовые луковицы, расположенные на языке и слизистой оболочке рта.

Выделяют четыре основных вида вкуса: кислый, соленый, сладкий, горький; все остальные ощущения, связываемые со вкусом, — это либо привкусы (оттенки), получаемые комбинацией основных вкусов, выраженных в той или иной степени, либо ощущения другой природы (например, острый «вкус» — раздражение рецепторов, близкое к болевым ощущениям, охлаждающий «вкус» — следствие модификации действия рецепторов холода, при котором они посылают сигнал при более высокой температуре) [5, 6].

Иногда выделяют еще и пятый элементарный вкус — вкус глутамината натрия и подобных ему веществ. В русском языке нет слова, обозначающего этот вкус, при необходимости его называют японским словом «умами».

К кислому вкусу наиболее чувствителен край языка, к соленому — кончик и край, к сладкому — кончик, к горькому — основание. Поэтому сладкий вкус ощущается раньше, чем горький.

Горький вкус присущ различным органическим веществам: алкалоидам хинину, морфию, кофеину. Горьким вкусом обладают большинство нитросоединений, фенольные компоненты дыма. Многие соединения, имеющие интенсивный сладкий вкус и используемые как подслащивающие вещества (цикламаты, сахарин), становятся горькими при высокой концентрации. Молекула, придающая горький вкус, должна иметь гидрофобный и основной радикал (или два гидрофобных радикала) [6].

Горький вкус воспринимается хуже всех других элементарных вкусов; 17 % населения не воспринимают вкус соединений, имеющих группу атомов $-(\text{NH})\text{C}=\text{S}$, а остальные люди воспринимают такие вещества как горькие.

В природе горький вкус служит сигналом опасности, т. к. таким вкусом обладают многие яды. Этим вызвано неприятное отношение к горьким продуктам. Между тем, слабый горький вкус может стимулировать выделение слюны, вследствие чего его используют для повышения аппетита. Вкус алкалоидов хинина и кофеина после некоторого привыкания может вызывать приятные ощущения.

Соленым вкусом обладают кристаллические растворимые в воде соли, которые диссоциируют с образованием положительных и отрицательных ионов. Чистый соленый вкус имеет хлорид натрия, все остальные соли дают смешанное ощущение солености.

Качество соленого вкуса в основном определяется анионом, а

интенсивность вкуса — катионом. Качество и интенсивность вкуса солей зависят от их концентрации [6]. Если концентрация солей оказывается ниже пороговой, то они могут вызывать сладкий вкус.

Кислый вкус вызывают неорганические и органические кислоты и их соли; интенсивность кислот уменьшается в следующем порядке: соляная, молочная, яблочная, винная, уксусная, лимонная.

Этот вкус связан с присутствием ионов водорода в пище, которые подавляют диссоциацию карбоксильных групп, связанных с рецепторами, вследствие чего форма молекулы рецептора изменяется.

Сладким вкусом обладают многие природные и синтетические вещества. Сладкий вкус имеют многие углеводы, аминокислоты (все D-аминокислоты и некоторые L-аминокислоты) и другие вещества.

Обычно сладость смесей меньше, чем сладость их компонентов. На интенсивность сладкого вкуса влияет pH среды (фруктоза более сладкая в кислой среде, у глюкозы с повышением кислотности сладость понижается).

При оценке степени сладости за эталон была взята сахароза. Среди сахаров наименее сладкой является лактоза. Между тем, очень сильный сладкий вкус (в сотни и тысячи раз слаще сахарозы) может быть достигнут применением веществ неуглеводной природы — так называемых подсластителей.

Сахарин и цикламаты, обладающие сильным сладким вкусом, в последнее время используют редко из-за их потенциальной канцерогенной опасности (хотя в России они пока разрешены). Сейчас очень распространен подсластитель аспартам — дипептид (состоящий из аспарагиновой кислоты и фенилаланина); он слаще сахара примерно в 200 раз. Сладким вкусом также обладает белок туаматин, который в 3000 раз слаще сахара.

От природы вкусовых веществ зависит длительность вкусовых ощущений, самое короткое по продолжительности ощущение солености, затем с

нарастанием идет ощущение сладости, кислоты и горечи.

При оценке вкуса обычно оценивают: степень сохранения вкуса, свойственного данному виду продукта; степень проявления вкуса добавок; степень проявления вкуса окислившегося жира.

Запах. Под понятием запаха подразумевают любое ощущение, воспринимаемое органами обоняния. У человека обонятельные органы расположены на задней части носовой полости и на боковых стенках между костными выступами и частью носовой перегородки. Пары пахучих веществ, содержащиеся в воздухе, при дыхании входят в контакт с обонятельными рецепторами (главным образом при коротком вдохе, когда воздух проходит через верхнюю часть носовой полости).

Ароматические вещества имеет важную роль в характеристике пищевых продуктов, т. к. стимулируют деятельность слюнных желез, выделение желудочного сока. Несвойственные данному продукту запахи являются следствием нарушения технологии приготовления или порчи при хранении.

В последнее время изучением ароматов запаха занимается целое научное направление. Соединение физико-химического анализа и сенсорных методов исследования открывает перспективу перед технологами и биохимиками при решении проблемы формирования ароматов пищевых продуктов.

Современная технология позволяет с помощью методов хроматографии определить количество ароматических веществ и выделить их в чистом виде.

При оценке запаха продуктов оценивают: степень сохранности запаха, свойственного данному виду продукта; степень проявления запаха окислившегося жира; степень проявления запаха добавок.

Запах рыбы-сырца, охлажденной или мороженой (после размораживания) продукции оценивают чаще всего пробой на нож (или шпильку), которая состоит в том, что подогретое лезвие ножа вкалывают в различные части

продукта. В спорных случаях рекомендуют перед определением запаха проводить пробную варку продукта.

Консистенция. Термин «консистенция» используется для обозначения сложных свойств пищевых продуктов, впечатление о которых получают с помощью осязательных ощущений, возникающих в момент соприкосновения с продуктом. Под осязанием понимают ощущения разного характера, возникающие при прикосновении, надавливании, в результате тепла и холода. Рецепторы осязания находятся на кончиках пальцев и на кончике языка.

С помощью осязания оценивается агрегатное состояние, степень однородности, механические свойства и др. Так, кончиками пальцев определяют степень упругости, твердости, пластичности разнообразного сырья. В полости рта возникают такие осязательные ощущения, как сочность, рассыпчатость, крошливость, однородность, волокнистость, терпкость и др. Инструментально можно оценить консистенцию через определение структурно-механических свойств материала.

Требования к проведению дегустации. Прогресс в познании психофизических законов чувственного восприятия дает новый импульс исследованиям в области корреляции между химическими, физическими и микробиологическими свойствами продуктов, с одной стороны, и органолептическими свойствами, с другой. В последнее время с развитием инструментальных методов оценки цвета, консистенции, вкуса и запаха пищевых продуктов появилось больше достоверных результатов в такой оценке.

К достоинствам органолептического метода можно отнести простоту реализации, доступность, небольшие затраты времени и средств. Главный недостаток метода — его субъективность, так как на результаты сенсорной оценки влияют физическое и психическое состояние дегустаторов, методика

подачи и подготовки образцов, состояние помещения, в котором осуществляется дегустация, и организация рабочего процесса.

Объективность органолептической оценки качества пищевых продуктов во многом обусловлена индивидуальностью организма человека.

Важное значение имеют индивидуальная восприимчивость к определенным ощущениям, степень натренированности дегустатора, умение анализировать и запоминать свои ощущения. В связи с этим для определения качества пищевых продуктов должны быть отобраны лица, предварительно прошедшие проверку на сенсорную чувствительность, что повысит объективность и достоверность сенсорной оценки.

Привлекаемые к дегустации лица должны иметь высокий уровень профессиональной информированности, обладать хорошим зрением, обонянием, вкусом, высокой степенью наблюдательности, умением отключаться от всего постороннего и сосредотачиваться в нужный момент на определенных восприятиях.

При оценке дегустационных способностей человека определяют его умение распознавать вкус и запах, пороговую концентрацию вкусовых и пахучих веществ (определение порога чувствительности), выясняют способность различать разницу во вкусе и запахе (порог разницы вкуса), а также стабильность его органолептических оценок и уровень конформности.

На работу дегустатора могут повлиять следующие факторы: адаптация; усталость; монотонность работы; правильность подготовки пробы к исследованиям и условия проведения работ.

К лаборатории, в которой проводят органолептические исследования, предъявляется целый ряд требований. Лаборатория не может использоваться для других целей и должна включать в себя отдельные помещения для приготовления образцов и для проведения органолептических испытаний, где

работа может выполняться как индивидуальными исследователями в испытательных кабинах, так и группами испытателей. Помещение для подготовки должно находиться в непосредственной близости от дегустационного зала.

В лаборатории должны быть постоянными температура (от 18 до 20 °С) и относительная влажность воздуха (70...75 %), чтобы состояние окружающей среды воспринималось как комфортное и приятное. Необходимо однородное освещение лаборатории (30...50 лк); кроме естественного света (площадь окон должна быть не менее 35 % площади пола), рабочие места следует оборудовать местным освещением (лампами рассеянного света).

Цвет стен и деталей отделки следует соблюдать нейтральным, рекомендуемые цвета — матово-белый или нейтрально-серый. Вентиляция должна обеспечивать постоянный приток воздуха и быть бесшумной.

Лабораторию по возможности следует звукоизолировать и исключить в ней посторонние запахи (табака, косметики, приготовляемых образцов). Рабочие места должны быть удобны и изолированы друг от друга перегородками; ширина одного рабочего места около 1 м, а глубина — не менее 50 см, что обеспечит размещение в нем исследуемых образцов, посуды, средств для ополаскивания рта, бланков и письменных принадлежностей для составления отчета.

Посуда, используемая для оценки пищевых продуктов, не должна оказывать влияния на сенсорные характеристики образцов и искажать результаты дегустации.

Рекомендуется использовать исключительно посуду, изготовленную из нержавеющей стали, серебра, фарфора или стекла. Не годятся для сенсорных оценок посуда, ложки и вилки из стали, алюминия, латуни, олова. Деревянные ложки и лопатки также трудно уберечь от посторонних запахов и вкуса. То же

самое относится к картону и многим полимерным материалам.

Посуда, в которой подают пробы для сенсорной оценки, должна быть совершенно однородна по форме, цвету, изготовлению и внешнему виду, так как даже незначительные отклонения могут повлиять на внешний вид пробы. Емкость ложек — не менее 10 см³, чтобы обеспечить попадание в ротовую полость достаточного количества образца.

Любая посуда, используемая для сенсорной оценки, должна быть безупречно чистой. Для этого ее тщательно ополаскивают дистиллированной водой после основной промывки для обеспечения полного отсутствия каких-либо запахов.

Сушить посуду предпочтительнее потоком горячего воздуха, не содержащего частичек масла. После сушки посуда должна храниться в специальном шкафу.

При подготовке проб особое значение имеет соответствующая рекомендуемой для подачи конкретного продукта температура.

Число проб, подвергаемых проверке, должно быть небольшим, так как впечатлительность органов чувств быстро снижается и наблюдается адаптация (привыкание) к определенному раздражителю. Общая продолжительность дегустации должна составлять от одного часа до полутора, число образцов не должно превышать 20.

Следует соблюдать определенный порядок оценки проб, переходя от продукта со слабовыраженным вкусом к продукту с более выраженным вкусом.

Если определяют все органолептические показатели, то сначала проводят оценку внешнего вида, затем определяют запах, консистенцию, а затем свойства, которые оценивают в полости рта (вкус, сочность, крошливость, однородность и т. д.).

1 мин держать во рту, поворачивая языком и давая им возможность побывать в разных частях рта. Между пробами рот необходимо обязательно прополаскивать водой или чаем.

3.2. Методы органолептической оценки

Перед разработкой программы органолептических исследований необходимо определить: цель оценки; методику исследования или измерения; ключевые свойства продукта — характеристики качества данного продукта (например, эффект ароматизатора лучше виден при сравнении с неароматизированной основой). Классификация методов органолептической оценки приведена на рис. 3.1.1.

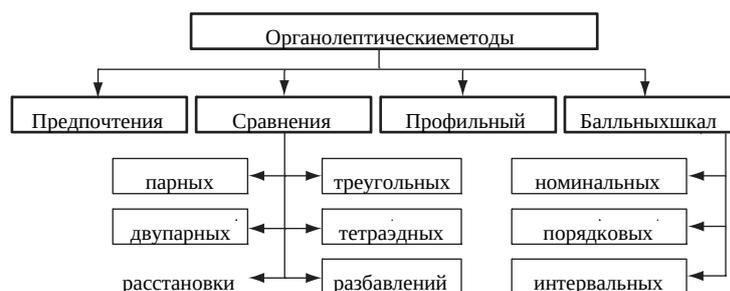


Рисунок 3.1.1 – Классификация органолептических методов [6].

Метод предпочтения. Его применяют при потребительской оценке продукта; он основан на интегрированном восприятии и обычно выражается в виде симпатии или антипатии. Лучше всего, если испытуемые являются регулярными покупателями или потребителями продуктов этого вида и знакомы с их сенсорными характеристиками и особенностями. Между тем всегда следует учитывать, что потребители не являются специалистами в области органолептического анализа, поэтому методы оценки должны быть

максимально упрощенными.

Для удобства анализа результатов потребительскую оценку необходимо унифицировать, для чего используют так называемые гедонические шкалы. Выделяют словесную гедоническую шкалу (очень желательный, весьма желательный, слегка желательный, нейтральный, слегка нежелательный, весьма нежелательный, очень нежелательный; «я буду употреблять этот продукт, как только смогу», ... «я буду употреблять этот продукт, если меня заставят это сделать») и гедоническую шкалу лиц (рис. 3.1.2) [5].

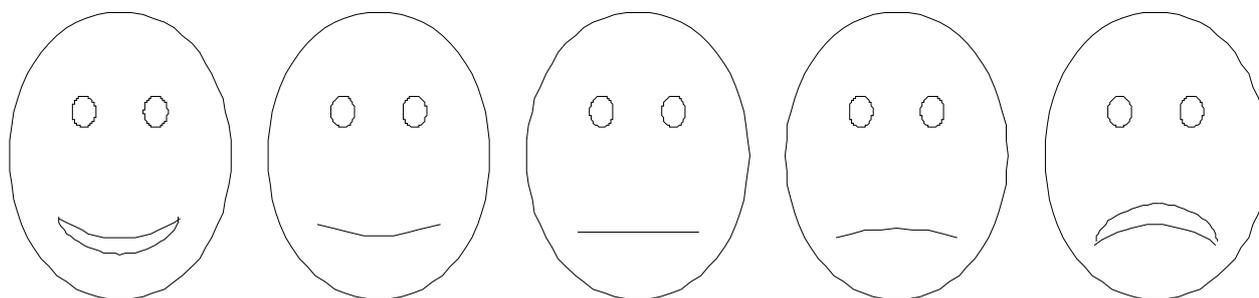


Рисунок 3.1.2 – Гедоническая шкала лиц.

Методы сравнения. Методы сравнения (по другой классификации они относятся к качественным различительным методам) позволяют определить различия между двумя или несколькими образцами, оценить их величину и направленность или, наоборот, установить идентичность этих образцов по органолептическим показателям (что немаловажно при производстве имитированных продуктов). Кроме того, эти методы позволяют оценивать сенсорные способности дегустаторов, если образцы являются стандартными. Метод сравнения может быть симметричным, когда на оценку поступают два образца, причем число единиц каждого образца одинаково, и асимметричным, когда количество единиц одного образца больше, чем другого.

Методы сравнений подразделяются на следующие:

- метод *парных сравнений*, который основан на сравнении двух подобных образцов со слабовыраженными различиями, представленными в паре. Этот метод применяют для определения различий или предпочтения между двумя образцами, или для выбора и обучения испытателей;
- метод *треугольных сравнений (треугольных проб)*, который основан на сравнении двух образцов, представленных в тройных блоках, два из которых идентичны, и выявлении слабовыраженных различий между образцами. Различия могут касаться одного какого-либо критерия или характеристик продукта в целом. Метод применяют для выявления слабовыраженного различия между образцами, при наличии небольшого числа дегустаторов или при отборе и тренировке дегустаторов. К недостаткам этого метода можно отнести неэкономичность при оценке большого числа образцов и повышенную сенсорную усталость дегустаторов;
- метод *двупарных сравнений («Дуо-трио»)*, который основан на сравнении двух образцов, представленных в паре, и обнаружении в них различий на основе определенных критериев (на основе контрольного образца). Суть его в том, что контрольная проба оценивается первой, а затем оцениваются два образца, один из которых отличается от контрольного. Этот метод хорошо применим для контроля качества на производстве, когда контрольный (эталонный) образец хорошо знаком дегустаторам, например, образец выпускаемого продукта;
- метод *расстановки*, при котором образцы расставляются в порядке возрастания или убывания какого-либо свойства продукта. Он применяется при оценке влияния на отдельный признак качества продукта изменяющихся параметров процесса;
- метод *разбавлений*, при котором жидкий продукт подвергают разбавлению до получения концентрации, не позволяющей

оценить органолептически данный признак. По количеству разбавлений оценивают интенсивность признака

Метод балльных шкал. Результаты органолептической оценки можно выразить количественно посредством безразмерных чисел — баллов. Совокупность численных значений, объединяющая оценки свойств продуктов в заданном диапазоне качества, образуют балльную шкалу[6].

Существуют различные виды балльных шкал, среди которых самое широкое применение получили номинальные, порядковые, интервальные и рациональные.

В *номинальных* шкалах цифры и символы служат в качестве условных обозначений для идентификации объектов и их свойств. В *порядковых* шкалах цифрами обозначаются последовательность объектов или свойств по степени их важности. В *интервальных* шкалах дают количественное выражение различий между объектами и их свойствами. Расстояние между обозначениями в этих шкалах принимают равномерное и устанавливают его производно. В *рациональных* шкалах отражают соотношение размеров объектов при наличии нулевой точки отсчета.

При органолептической оценке чаще используют интервальные балльные шкалы, различающиеся по количеству баллов, используемых для оценки, способам присвоения баллов, словесной характеристики каждого уровня качества, способам общей оценки, наличию коэффициентов значимости. Число баллов в шкале определяется задачами исследования, точностью и надежностью результатов и числом различимых дегустаторами уровней качества.

Самая большая сложность при исследовании органолептических показателей методом балльных шкал состоит в том, что чаще всего необходимо получить

обобщенную оценку, тогда как единичные показатели не равнозначны. Существуют два подхода к решению этой проблемы: использование для каждого показателя балльной шкалы с различным количеством баллов (чем более значим показатель, тем больше баллов в шкале) и использование унифицированных балльных шкал [5].

Принято, что наиболее полно современным требованиям отвечает пятибалльная шкала с градацией по пяти уровням качества с коэффициентами значимости (весомости); именно такие шкалы используют в унифицированном методе.

Коэффициент значимости отражает значение, предписываемое отдельным показателям при оценке общего качества продукта. Абсолютное значение максимального коэффициента значимости не принципиально, его выбирают либо равным 1,0, либо подбирают так, чтобы сумма максимальных баллов с учетом коэффициента значимости составляла круглое число (чаще всего, 20; 25; 50 или 100). В последнем случае характеристикой качества продукции будет сумма баллов, выставленных дегустатором (или средних между всеми дегустаторами), умноженная на соответствующие коэффициенты значимости.

В методе унифицированных шкал вводят понятие уровня качества, и для каждого показателя выбирают так называемый коэффициент весомости (значимости), тем больший, чем более важен этот показатель для общей органолептической оценки. Уровень качества (q) можно определить по формуле

$$q = \frac{\sum_{i=1}^n (B_i - B_{\min}) \cdot K_i}{(B_{\max} - B_{\min}) \cdot \sum_{i=1}^n K_i}, \quad (3.1.1)$$

где B_i – балл органолептической оценки по i -му показателю;

B_{\min}, B_{\max} – минимально и максимально возможный балл соответственно;

K_i – коэффициент значимости для i -го показателя.

В ряде случаев для удобства расчётов и оценки уровня качества на этапе проектирования шкалы проводят нормирование: подбирают коэффициенты значимости так, чтобы их сумма была равна 1. Если при этом одновременно установить минимальный балл равным 0, то можно существенно упростить формулу (3.1.1):

$$q = \frac{\sum_{i=1}^n B_i \cdot K_i}{B_{max}} \cdot 100 \quad (3.1.2)$$

Между тем, нужно всегда понимать, что термин «уровень качества» в данном контексте относится исключительно к органолептическим показателям, поэтому в общем случае на этом следует акцентировать внимание, чтобы не путать его, например, с «комплексным показателем качества».

Оценка уровня качества в соответствии с пятибалльной шкалой приведена в таблице 3.1.1 [6].

Таблица 3.1.1 - Оценка уровня качества продукции

Балл	Процент качества	Уровень качества
5	от 80 до 100	Отличное
4	более 60 до 80	Хорошее
3	более 40 до 60	Удовлетворительное
2	более 20 до 40	Плохое (едва приемлем)
1	от 0 до 20	Очень плохое (неприемлемо)

При разработке балльных шкал для каждой группы продуктов проводят следующие этапы.

1-й этап. Установление номенклатуры единичных показателей, характеризующих органолептические свойства конкретного продукта.

Показатели качества бывают комплексные и единичные. *Комплексные* показатели характеризуют несколько свойств продукции. Номенклатура *единичных* органолептических показателей состоит из влияющих на качество продукции показателей, которые нельзя разложить на более простые.

Например, для оценки качества консервов в томатном соусе к комплексным показателям относятся внешний вид, запах, вкус, консистенция твердой части, консистенция жидкой части. К единичным показателям внешнего вида относят размер кусков, укладку, целостность кусков, целостность кожного покрова, разделку, цвет мяса, цвет томатного соуса, однородность томатного соуса.

Для определения комплексных и единичных показателей качества для каждого продукта проводят экспертизу нормативного документа, регламентирующего свойства данного продукта.

2-й этап. Составление таблиц, содержащих словесную характеристику каждого единичного показателя по всем балловым уровням шкалы, установление градации качества и присвоения ему баллов. Значение максимального и минимального уровня качества единичных показателей качества устанавливают в зависимости от целей органолептической оценки.

Пример составления балльной шкалы представлен в Приложении 1.

3-й этап. Установление коэффициентов значимости показателей. При разработке коэффициентов значимости применяют экспертный метод с групповым опросом или коэффициенты устанавливаются на усмотрение лиц, ответственных за контроль качества.

Например, при оценке мороженого филе вводятся следующие коэффициенты значимости: форма и вид блока — 0,6; цвет — 0,7; наличие кровоподтеков — 0,7; состояние кожи — 0,5; запах — 1,8.

4-й этап. Обсуждение элементов балльной шкалы. На этом этапе

коллектив экспертов-дегустаторов решает вопрос об исключении единичных показателей качества из общей номенклатуры, корректирует таблицы градаций по качественным уровням и коэффициентам значимости.

5-й этап. Апробация балльной шкалы и оформление результатов. Коллектив дегустаторов проводит оценку единичных показателей качества продукта. Каждый дегустатор заполняет отдельный бланк, где проставляет оценки по всем показателям в баллах.

Заполненные дегустационные листы (табл. 3.1.2) обрабатываются: в них определяют среднее арифметическое значение каждого единичного показателя качества с учетом коэффициента значимости, суммарный балл и делается заключение о качестве.

Таблица 3.1.2 – Пример обработки дегустационного листа

Показатель качества	K _{зн}	Оценки дегустаторов, балл						Средний балл	Средний балл с учетом K _{зн}
		1	2	3	4	5	6		
Вкус	1	4	4	4	3	4	4	3,8	3,8
Запах	0,8	4	3	4	3	3	4	3,5	2,8
Консистенция	0,7	3	3	4	3	3	4	3,3	2,3
Цвет	0,5	4	3	4	3	4	4	3,7	1,9
Итого									Σ 10,8

Максимальный балл продукции с учетом коэффициента значимости 15 баллов. Уровень качества: $10,8/15 \cdot 100 = 72\%$ - качество хорошее

Контрольные вопросы.

1. Какие показатели относят к органолептическим?
2. В чем состоит принцип органолептической оценки?
3. В чем преимущества и недостатки органолептического метода?

4. Как осуществляется отбор дегустаторов? Какие требования предъявляют к дегустаторам?
5. Какие требования предъявляются к помещениям, где проводятся дегустации?
6. Какие основные виды вкусов Вы знаете?
7. Объясните понятия «адаптация» и «сенсбилизация»
8. Какие существуют методы органолептической оценки качества?
9. В чем сущность органолептической оценки с применением балльных шкал?
10. Что понимают под комплексным показателем качества?
11. Для чего вводится коэффициент значимости и как он определяется?
12. Как определяется уровень качества продукции?

4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА РЫБЫ И РЫБНЫХ ПРОДУКТОВ

4.1. Методы определения массовой доли воды и сухих веществ

Одним из наиболее распространённых показателей качества, характеризующих химический состав продукта, является массовая доля воды. С этим показателем непосредственно связана массовая доля сухих веществ: так как сухими веществами называются все вещества в продукте, кроме воды, то сумма массовой доли воды и сухих веществ всегда составляет сто процентов. Массовая доля воды может характеризовать стабильность пищевого продукта, поэтому этот показатель чаще всего регламентируют для муки, круп, сушёных, копчёных и других продуктов, повышение влажности в которых приведёт к преждевременной порче. Содержание сухих веществ в консервах, соусах и некоторых других продуктах, при приготовлении которых добавляют воду или бульон, подтверждает (или опровергает) полноту вложения компонентов.

Методы определения воды и сухих веществ условно можно разделить на три группы. В первую группу входят методы, основанные на высушивании продукта и определении массы оставшихся сухих веществ. Во второй группе воду отгоняют из продукта, конденсируют, после чего определяют её массу или объём (например, метод Дина и Старка). К третьей группе условно можно отнести все косвенные методы, основанные на использовании зависимостей между массовой долей воды или сухих веществ и значением того или иного физического показателя (чаще всего показателя преломления или плотности).

4.1.1. Метод определения массовой доли воды высушиванием при 100 - 105 °С

Оборудование, материалы и реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерений от 0 до 200 г; шкаф сушильный лабораторный; эксикатор; термометр ртутный стеклянный лабораторный с пределами измерений от 0 до

200 °С; стаканчики для взвешивания (бюксы) стеклянные или металлические; песок силикатный речной или морской очищенный и прокаленный.

Проведение испытаний. Навеску анализируемой пробы от 1,5 до 3 г, взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,001 г, помещают в чистую и тарированную бюксу со стеклянной палочкой, при помощи которой распределяют навеску продукта в бюксе ровным тонким слоем. Навеска исследуемого продукта может быть увеличена до 5 г при использовании ее после высушивания для определения содержания жира. Для продуктов, способных при высушивании спекаться в плотную массу, в бюксу предварительно вносят 5-10 г песка и навеску продукта тщательно перемешивают. Бюксу закрывают притертой крышкой, взвешивают на аналитических весах и высушивают в сушильном шкафу при 100-105 °С до постоянной массы.

Навески продуктов с массовой долей жира не более 20 % необходимо первые 2 часа сушить при температуре 60-65 °С. Первое взвешивание проводят через 2 часа после начала сушки, последующие - через 30-40 минут. Постоянная масса считается достигнутой, если разница между двумя взвешиваниями не превышает 0,001 г.

Перед каждым взвешиванием бюксу с пробой закрывают крышкой и охлаждают 30 минут в эксикаторе.

Массовую долю воды (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m}, \quad (4.1.1)$$

где m_1 – масса бюксы с навеской и песком до высушивания, г;

m_2 – масса бюксы с навеской и песком после высушивания, г;

m – масса бюксы с песком, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,5 %.

4.1.2. Определение массовой доли воды высушиванием при 130 °С

Использование более высоких температур высушивания позволяет существенно сократить продолжительность процесса, однако точность метода несколько снижается. Причиной этому может стать, например, образование на поверхности слоя высушиваемого материала полностью высохшей водонепроницаемой корки (причём она будет тем менее водопроницаема, чем больше в продукте жира), тогда как в центре слоя влага ещё останется. Кроме того, при высоких температурах могут начаться процессы термоллиза, сопровождающиеся декарбоксилированием и дезаминированием (как в свободных аминокислотах, так и в белках и полипептидах, остатки аминокислот в которых имеют боковые карбоксильные или аминогруппы), а также отщеплением сульфгидрильных групп. Во всех этих случаях из продукта выделяются газы, не имеющие отношения к воде, т.е. масса сухих веществ уменьшается. И, наконец, с повышением температуры ускоряется процесс окисления липидов, который, в общем случае, приводит к повышению массы липидной фракции за счёт поглощения кислорода.

Проведение испытания. Навеску анализируемой пробы подсушивают в течение 30 минут при 60-80 °С, затем окончательно высушивают в течение 1 часа при температуре 130 °С. Навеску жирных продуктов берут с песком.

По истечении указанного времени бюксу вынимают, охлаждают 30 минут в эксикаторе и взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,001 г. Массовую долю воды рассчитывают по формуле 4.1.1.

4.1.3. Определение массовой доли воды отгонкой (метод Дина-Старка)

Метод основан на выделении воды из продукта отгонкой с парами растворителя жира и определении её объема.

Оборудование, материалы и реактивы. Аппарат количественного определения воды АКОВ (типа Дина-Старка) рис. 4.1.1; штатив с кольцом и зажимом; цилиндр вместимостью 100 см³ с делениями 1 см³; баня песочная; стеклянная палочка диаметром 3-4 мм с резиновым наконечником или медная проволочка, согнутая полукольцом; весы аналитические класса 2 с пределами измерений от 0 до 200 г; толуол или ксилол каменноугольный, или бензин.

Проведение испытаний. В стеклянную колбу 1 аппарата отвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,1 г 10-15 г измельченного продукта или от 50 до 200 г жира (в зависимости от предполагаемого содержания воды) с таким расчетом, чтобы отогнанная вода составляла не более 10 см³, то есть не более вместимости приемника-ловушки 2, приливают от 80 до 100 см³ одного из перечисленных растворителей и тщательно перемешивают содержимое колбы. В колбу помещают несколько кусочков неглазурованного фаянса, пемзы или фарфора и с помощью шлифа присоединяют ее к отгонной трубке приемника, соединенного с холодильником 3.

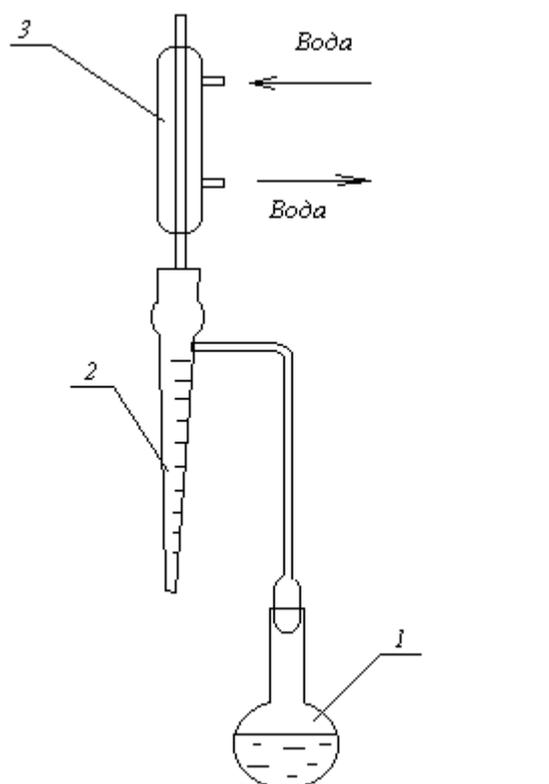


Рисунок 4.1.1 – Аппарат количественного определения воды отгонкой (типа Дина-Старка): 1 – отгонная колба; 2 – приемник; 3- холодильник.

Колбу нагревают, доводят содержимое до интенсивного кипения, и поддерживают его до окончания анализа.

Если на стенках холодильника или приемника остаются капли воды, их осторожно сталкивают со стенки в нижнюю часть приемника стеклянной палочкой с резиновым наконечником.

Отгонку прекращают, когда объем воды в приемнике перестает увеличиваться и верхний слой растворителя в ловушке-приемнике станет совершенно прозрачным.

Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и проводят отсчет объема воды в приемнике.

Массовую долю воды (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m}, \quad (4.1.2)$$

где m_1 – масса воды в приемнике, г (1 см³ воды принимают равным 1 г);

m – масса пробы, г.

4.1.4. Метод определения массовой доли воды высушиванием на приборе ВЧМ (прибор Чижовой), УВО.

Метод основан на выделении воды из продукта при нагревании инфракрасными лучами и определении изменения его массы взвешиванием.

Оборудование, материалы и реактивы: прибор Чижовой ВЧМ (УВО); автотрансформатор (типа ЛАТР-1); эксикатор; термометр ртутный стеклянный лабораторный с пределами измерений от 0 до 200 °С; весы аналитические класса 2 с пределами измерений от 0 до 200 г; бумага фильтровальная лабораторная.

Проведение испытаний. Прибор Чижовой нагревают до температуры обезвоживания исследуемого образца (125 – 180 °С) в соответствии с установленным режимом.

Для изготовления бумажных пакетов лист фильтровальной бумаги размером 15 × 15 см складывают по диагонали пополам и края загибают в одну сторону на 1 см. При определении воды в жирных пробах в бумажный пакет помещают дополнительно лист фильтровальной бумаги.

Заготовленные пакеты просушивают 1-3,5 минуты между нагретыми плитами прибора при температуре, при которой будет высушиваться навеска, и переносят на 5 минут в эксикатор для охлаждения. После этого пакеты взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,01 г.

Навеску анализируемой пробы 2-3 г, взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,01 г в пакете, равномерно распределяя содержимое по всему пакету. Пакет с навеской складывают, помещают в прибор между

плитами и выдерживают 1-3,5 минуты в соответствии с режимом обезвоживания, указанным в таблице 4.1.1.

Таблица 4.1.1 – Режим обезвоживания пробы исследуемого продукта

Масса анализируемой пробы, г	Температура высушивания, °С	Продолжительность высушивания, мин
1	2	3
2	135	3,0
3	145	3,5
3	155	3,0
3	180	1,0

Массовую долю воды (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 100}{m_1 - m}, \quad (4.1.3)$$

где m – масса пакета, г;

m_1 – масса пакета с навеской до обезвоживания, г;

m_2 – масса пакета с навеской после обезвоживания, г.

Допускаемые расхождения между двумя параллельными определениями не должны превышать 0,5 %.

4.1.5. Метод определения массовой доли воды высушиванием инфракрасными лучами на влагомере Kett

Метод основан на выделении воды из продуктов при нагревании инфракрасными лучами и определении изменения его массы взвешиванием.

Оборудование, материалы и реактивы: влагомер Kett (Япония) с комплектом разновесов от 1 до 5 г; фарфоровая ступка с пестиком.

Проведение испытаний. Влагомер Kett представляет собой прибор

непосредственного измерения массовой доли воды, в состав которого входят весы и лампа инфракрасного излучения. Весы перед началом анализа должны быть приведены в состояние равновесия, о чем свидетельствует нулевое положение стрелки индикатора баланса. На левую чашку весов прибора устанавливают груз массой 5 г. На правую чашку, которая расположена под лампой инфракрасного излучения, помещают 5 г анализируемого продукта и равномерно распределяют его по всей поверхности чашки. Весы при этом должны оставаться в состоянии равновесия.

После включения лампы инфракрасного излучения и начала сушки продукта периодически следят за показаниями индикатора баланса весов. Возникающее в результате испарения воды из продукта нарушение равновесия прибора восстанавливают с помощью балансирующего механизма в виде скользящего груза. Если его перемещение не обеспечивает восстановление равновесия, то с левой чашки весов убирают 1 г груза. Процесс высушивания ведут до тех пор, пока баланс весов не перестанет нарушаться.

Массовую долю воды (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = 20 \cdot (m - m_1) + A, \quad (4.1.4)$$

где m – первоначальная масса груза на левой чашке весов, г;

m_1 – масса груза на левой чашке весов после высушивания навески, г;

20 – коэффициент пересчета, %/ г;

A – показания шкалы прибора после высушивания навески, %.

Вопросы для самоконтроля

1. От чего зависит выбор температуры высушивания при определении массовой доли воды?
2. С какой целью добавляют в бюксу при высушивании песок?
3. В каких продуктах определяют массовую долю воды методом

отгонки?

4. В чем преимущества и недостатки определения массовой доли воды на приборе Чижовой?
5. Как определить содержание сухих веществ в пищевых продуктах?
6. Какие методы определения массовой доли воды являются прямыми, а какие – косвенными?

4.2. Методы определения содержания, состава и свойств липидов

Липиды – природные органические соединения, нерастворимые в воде и растворимые в органических растворителях. В организме человека липиды являются не только источником энергии, но и поставщиком пластического материала, а также участвуют в построении клеточных мембран.

Существует два признака классификации липидов: по элементному составу их делят на **простые** и **сложные**, а по способности к омылению – на омыляемые и неомыляемые.

Простые липиды – это липиды, в состав которых входят только углерод, водород и кислород. Они, в основном, представлены двухкомпонентными веществами – сложными эфирами высших жирных кислот с глицерином, высшими или полициклическими спиртами. К простым липидам относятся: жиры (триглицериды), воски, стериды, а также содержащиеся в меньших количествах моно- и диглицериды, свободные жирные кислоты и некоторые другие вещества.

Сложные липиды – это липиды, в состав которых, помимо углерода, водорода и кислорода, входят также другие элементы (как правило, азот и/или фосфор). Они представлены многокомпонентными молекулами, состоящими из

эфиров, в состав которых могут входить азотистые основания, радикалы фосфорной кислоты. К ним относятся фосфолипиды, гликолипиды, липопротеиды и др.

Неомыляемая фракция липидов – соединения, не подверженные щелочному гидролизу, к ним относятся стеринны, простые эфиры, жирорастворимые витамины и другие соединения²⁴.

Липиды большинства гидробионтов представлены в основном триглицеридами и фосфолипидами. Триглицериды преобладают в запасных липидах (жир подкожной клетчатки, печени), а фосфатиды в липидах мышц, в мозговой и костной тканях. В липидах морских рыб преобладают ненасыщенные жирные кислоты

Методы количественного определения суммарного состава жиров разнообразны и отличаются способами анализа, методами экстракции, применяемыми экстрагентами, подготовкой пробы к анализу и т.д.

По способу анализа методы делятся на две группы:

- методы определения массовой доли жира непосредственно в объекте (безэкстракционные). К ним относятся методы ЯМР, инфракрасной спектроскопии, турбидиметрии, ультразвуковые;
- методы, связанные с предварительным извлечением липидов из продукта органическим растворителем с последующим определением их количества гравиметрическим или другим способом.

Полное извлечение жира из тканей представляет собой трудную задачу, т.к. он относится к гетерогенной группе соединений. Для экстракции жира применяют растворители с низкой температурой кипения, удаление которых из

²⁴ ΔE Формально к неомыляемой фракции следует отнести и свободные жирные кислоты, однако ни методика, ни цели, с которыми используют этот показатель, не предполагают их определения вместе с остальными неомыляемыми веществами.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

жира не представляет затруднений. Чаще всего используют петролейный, этиловый, диэтиловый другие эфиры, а также хлороформ, дихлорэтан. Петролейный эфир имеет преимущества перед другими растворителями, так как он извлекает меньше веществ, сопутствующих жирам. С другой стороны, он извлекает не все продукты окисления липидов, таким образом, он удобен для исследования содержания, но не степени окисления липидов.

Для извлечения сложных жиров, удерживаемых в комплексах водородными связями, применяют более полярные растворители (метанол, этанол) в смеси со слабополярными. Чаще используют смесь хлороформа и метанола (1:1) или этанола и диэтилового эфира.

Прочносвязанные жиры, удерживаемые ковалентными связями, выделяют после гидролиза комплекса слабыми растворами кислот или щелочей в органическом растворителе.

При определении липидов экстракционным методом сначала производят обезвоживание навески, так как вода препятствует диффузии жира из материала в растворитель. Наряду с высушиванием при повышенных температурах, материал можно обезвоживать с помощью нейтральных водоотнимающих веществ. Для этого навеску продукта настаивают и кипятят со спиртом или растворяют с безводный сульфат натрия или гипсом.

В связи с необходимостью сбалансированного питания исследования липидов не ограничивается определением их массовой доли, определяют жирнокислотный и фракционный состава жиров и др. показателей.

4.2.1. Определение массовой доли липидов

Большинство методов определения массовой доли липидов основано на экстракции жира органическим растворителем (или их смесью). Полученная

мисцелла²⁵ может быть использована как для определения непосредственно массовой доли липидов, так и для исследования их качества. Определение концентрации мисцеллы, как правило, осуществляют путём упаривания её части (или всей мисцеллы), реже – рефрактометрическим методом.

Альтернативой упариванию растворителя может быть метод определения жира по обезжиренному остатку, предполагающий взвешивание образца до и после экстракции.

4.2.1.1. Определение липидов экстракционным методом в аппарате Сокслета

Метод основан на извлечении жира из продукта растворителем, последующем удалении растворителя, высушивании и взвешивании извлеченного жира.

Материалы оборудование и реактивы: весы лабораторные общего назначения 2 класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г, шкаф сушильный лабораторный, экстракционный аппарат Сокслета, баня водяная, холодильник стеклянный лабораторный, ступка фарфоровая бумага фильтровальная, эфир этиловый, натрий сернокислый безводный

Проведение испытания. Навеску средней пробы исследуемого продукта массой от 5 до 10 г (в зависимости от вида продукта), взвешенную с погрешностью не более 0,0001 г, помещают в фарфоровую ступку. Туда же добавляют двойное по весу количество безводного сернокислого (или фосфорнокислого) натрия и смесь хорошо растирают пестиком. Если массовая доля воды в продукте не более 20 %, безводный сернокислый натрий не

²⁵ ΔE Мисцелла – это раствор жира в органическом растворителе.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

добавляют. Обезвоженный продукт количественно переносят в пакет или патрон из фильтровальной бумаги, ступку протирают ватой, смоченной эфиром, которую помещают в пакет с навеской. Пакет помещают в экстрактор аппарата Сокслета. К экстрактору присоединяют предварительно высушенную при $(105 \pm 5)^\circ\text{C}$ и взвешенную колбу, в которую предварительно наливают эфир с таким расчетом, чтобы количество его в 1,5 раза превышало объем экстрактора. Экстрактор с помощью пришлифованной пробки соединяют с холодильником. Воду пропускают в холодильник аппарата и слабо нагревают колбу на водяной бане.

Экстрагирование жира проводят в течение 10 – 12 ч. Интенсивность нагрева должна быть такой, чтобы в течение 1 ч было не менее 8 – 10 сливаний эфира. Полноту извлечения жира проверяют нанесением капли стекающего из экстрактора растворителя на часовое стекло или фильтровальную бумагу (после испарения растворителя на стекле не должно оставаться жирного пятна). Для ускорения экстракции жира при перерыве в работе следует в экстракторе оставлять эфир в таком количестве, чтобы патрон с навеской был погружен в него, и извлечение жира из навески продолжалось настаиванием в течение времени перерыва. После окончания экстрагирования жира эфир из колбы отгоняют, а колбу с жиром помещают в сушильный шкаф, где высушивают при $(102 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Сушку колбы с жиром лучше производить в атмосфере углекислоты.

Содержание жира (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{M_1 - M_2}{M} \cdot 100 ,$$

(4.2.1)

где M – масса навески продукта, в г;

M_1 – масса колбы с жиром, в г;

M_2 – масса пустой колбы, в г.

Вычисления проводят до второго десятичного знака с последующим округлением результата до первого десятичного знака. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

4.2.1.2 Определение массовой доли липидов по обезжиренному остатку в аппарате Сокслета.

Метод основанна экстракции жира из сухой навески исследуемого продукта серным эфиром в экстракционном аппарате Сокслета и весовом определении количества жира по разности между навеской исследуемого вещества до экстракции и после нее.

Проведение испытаний. Высушенную навеску (п. 4.1.1) количественно переносят на заранее высушенную фильтровальную бумагу размером 8×9 см. Бюксу протирают небольшим кусочком ваты, смоченной эфиром, вату присоединяют к навеске на фильтровальной бумаге. Затем фильтровальную бумагу с навеской заворачивают в виде пакета и для предотвращения потерь помещают в другой пакет фильтровальной бумаги размером 9×10 см. Пакет подписывают графическим карандашом, высушивают в сушильном шкафу при температуре (100 ± 2) °С в течение 10–15 минут, затем охлаждают в эксикаторе и взвешивают с точностью 0,001 г. Подготовленные таким образом пакеты помещают в экстрактор аппарата Сокслета и подвергают экстрагированию этиловым эфиром в течение 10—12 ч.

После полного извлечения жира пакеты вынимают из экстрактора, выдерживают сначала в течение 20—30 мин в вытяжном шкафу для удаления эфира, высушивают в сушильном шкафу при температуре (102 ± 2) °С до постоянной массы, затем охлаждают в эксикаторе и взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,001 г.

Массовую долю жира (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 - m_2}{m} \cdot 100, \quad (4.2.2)$$

где m – масса сырой навески, взятой для высушивания, г;

m_1 – масса пакета с высушенной навеской до экстракции, г;

m_2 – масса пакета с высушенной навеской послеэкстракции, г.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

4.2.1.3 Определение массовой доли липидов методом капельной экстракции (ускоренный)

Метод основан на весовом определении жира после извлечения его растворителем из сухой навески.

Материалы оборудование и реактивы: стеклянная трубка диаметром 0,014 м и длиной 0,25 м; стакан стеклянный, вместимостью 100 см³, весы технические, фарфоровая ступка с пестиком, серный эфир, натрий серноокислый безводный.

Проведение испытания. В трубку вкладывают плотный ватный тампон и два кружочка фильтровальной бумаги, диаметр которых несколько больше диаметра трубки, затем еще один ватный тампон. Общая толщина фильтрующей прокладки – 2 см. Налитый в трубку эфир, должен вытекать из нее со скоростью 40 – 100 капель в минуту.

5 – 7 г исследуемого продукта взвешивают с погрешностью не более 0,01 г и переносят в фарфоровую ступку, туда же добавляют двойное количество безводного сульфата натрия. Приготовленную смесь растирают, переносят в экстракционную трубку и уплотняют, осторожно постукивая последнюю нижним концом о ладонь. При анализе сухих продуктов (массовая доля воды до 20 %) растирание их с безводным сульфатом натрия не требуется. Трубку устанавливают в штатив над взвешенным сухим чистым стаканчиком. Чашки из-под навески и пестик трижды обрабатывают небольшими порциями эфира,

сливая его в трубку. После того как эфир профильтруется, в трубку последовательно доливают еще 2 – 3 порции эфира по 5 – 10 мл. Экстракция считается законченной, если на фильтровальной бумаге не остается жирного пятна, в противном случае в трубку доливают еще одну порцию эфира. Каждая порция эфира проходит через трубку обычно за 15 – 20 мин, а процесс извлечения жира длится в среднем 1 – 2 часа.

После полного извлечения жира эфир из стаканчика выпаривают до удаления запаха и без предварительного высушивания взвешивают.

Содержание жира (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{M_1 - M_2}{M} \cdot 100 ,$$

(4.2.3)

где M_1 – масса стаканчика с жиром после экстракции, в г;

M_2 – масса пустого стаканчика, в г;

M – навеска продукта, в г.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

4.2.1.4 Рефрактометрический метод определения массовой доли липидов

Метод основан на извлечении жира из навески продукта α -бромнафталином. Массовую долю жира определяют по разности коэффициента преломления растворителя и раствора жира в растворителе.

При растворении жира коэффициент преломления растворителя понижается пропорционально количеству присутствующего жира.

Оборудование, материалы и реактивы: рефрактометр РЛУ; ступка фарфоровая диаметром не более 7 см или фарфоровая чашка; стаканы стеклянные вместимостью 25-50 см³; воронки стеклянные диаметром не более 3 см; микропипетка вместимостью 2 см³; пикнометр стеклянный вместимостью 25-50

см³; бумага фильтровальная; вата обезжиренная гигроскопическая; беззольные фильтры, α -бромнафталин с коэффициентом преломления около 1,66 или α -хлорнафталин с коэффициентом преломления около 1,63.

Проведение испытания. В фарфоровую ступку взвешивают навеску от 0,5 до 5 г (таблица 2.1) с погрешностью не более 0,001 г

Таблица 4.2.1

Массовая доля жира в пробе, %	Масса навески, г
Более 30	0,50
От 20 до 30	0,75
От 10 до 20	1,00
От 5 до 10	1,50
Менее 2г	От 2 до 5

Если в навеске более 5 % воды, то в ступку добавляют безводный сернокислый натрий (1:1), или пробу подсушивают 5 – 10 мин при температуре 110 °С.

Подсушенную навеску тщательно растирают, приливают растворитель (2 см³ на 1 г навески), который набирают калиброванной пипеткой с помощью маленькой груши. Навеску с растворителем тщательно растирают в течение 3 мин. Работу с растворителем проводят под тягой. Смесь из ступки переносят на маленький складчатый фильтр. Первые 2-3 капли фильтрата отбрасывают, а последующие 2-3 капли помещают на призму рефрактометра, которую предварительно протирают спиртом, и снимают показания.

Определение коэффициента преломления проводят при температуре (20 \pm 0,2) °С или при любой комнатной температуре. В последнем случае показатель преломления раствора приводят к температуре 20 °С путем внесения поправок в соответствии с Приложением 4.

Отсчет показаний преломления можно производить без введения

поправок на температуру при условии одновременного определения показателя преломления растворителя при той же температуре.

По показателю преломления раствора жира в α -монобромнафталине рассчитывают массовую долю жира X (%) по формуле:

$$X = \frac{10^4 \cdot \alpha \cdot m_1}{m} \cdot (n_0 - n) \quad (4.2.5)$$

где m — масса исследуемого образца, г;

m_1 — масса растворителя, г;

n — показатель преломления мисцеллы;

n_0 — показатель преломления чистого растворителя;

α — показатель отношения массовой доли жира в растворителе к разности между показателями преломления растворителя и мисцеллы (определяют экспериментально).

Так как m, m_1, α являются постоянными величинами для растворителя, с

которыми проводятся работы, выражение $\frac{10^4 \cdot \alpha \cdot m_1}{m}$ в формуле (4.2.5) можно заменить обозначением P_B (постоянная величина). Тогда расчет количества жира в анализируемом продукте сводится к умножению постоянной величины P_B на разность показателей преломления чистого растворителя и мисцеллы.

$$X = P_B \cdot \Delta n \quad (4)$$

Значения коэффициента α и постоянной величины P_B при применении вышеуказанных растворителей приведены в табл. 4.2.2

Таблица 4.2.2

Растворитель	α	P_B
а-бромнафталин	0,0407	1514
а-хлорнафталин	0,0612	1840
Трикрезилортофосфат	0,1212	3514

За окончательный результат принимают среднее арифметическое двух параллельных определений. Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

4.2.1.5. Определение массовой доли липидов экстракцией бинарной смесью

Метод основан на растворении липидов в продуктах бинарной смесью органических растворителей, отделении (отгонке) их и весовом определении массовой доли липидов.

В продуктах с содержанием массовой доли воды более 20 % применяют метод Блайя- Дайера, при содержании жира 20 % и менее применяют метод Фолча.

Экстракционный метод Блайя – Дайера

Оборудование, материалы и реактивы: делительная воронка; колбы конические вместимостью 250 см³, 100 см³; мерные колбы вместимостью 100 см³; стеклянные воронки; фильтровальная бумага; этиловый спирт; хлороформ; ацетата цинка, раствор 200г/дм³ (20%-ный); натрий сернокислый безводный.

Проведение испытания. Продукт тщательно измельчают и определяют его влажность. 5-10 г навески²⁶, отвешенных с погрешностью не более 0,001 г, помещают в колбу с притертой пробкой и встряхивают со смесью этанол : хлороформ : вода (около 40 см³) в соотношении 2:1:0,8 (с учетом воды, находящейся в ткани). По истечении 10 мин добавляют хлороформ до соотношения названных компонентов 2:2:0,8. После непрерывного перемешивания в течение 5 мин вводят 20 см³ водного раствора ацетата цинка до соотношения компонентов 2:2:1,8 и перемешивают в течение 30 с (ацетат

²⁶ ΔE При выборе массы навески следует учитывать жирность сырья

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

цинка обеспечивает лучшее разделение водно-спиртового и хлороформного слоев, особенно для термически обработанных продуктов).

Раствор отфильтровывают в делительную воронку через бумажный складчатый фильтр.

Плотную часть, оставшуюся на фильтре, промывают 4 – 5 раз в 20 см³ хлороформа, каждый раз отделяя жидкую часть в делительную воронку.

После полного разделения смеси (отсутствие мелких пузырьков в межфазовой пленке) нижний хлороформенный слой отделяют от водно-спиртового слоя. Хлороформный фильтрат сливают в мерную колбу и доводят до метки.

Часть хлороформного экстракта (25-50 см³) отбирают в предварительно высушенную и взвешенную до постоянной массы колбу сошлифом. Хлороформ удаляют испарением. Остаток с жиром высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при температуре 90—95°C, охлаждают в эксикаторе и взвешивают.

Массовую долю липидов (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100 \cdot V}{m \cdot V_1}, \quad (4.2.8)$$

где m – масса исследуемого образца, г;

m₁ – масса жира в экстракте, взятом для анализа, г;

V – общий объем экстракта, см³;

V₁ – объем экстракта, взятый для анализа (25-50 см³).

Допустимое расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

Оставшаяся часть мисцеллы может быть использована для определения качественных характеристик липидов.

Экстракция липидов методом Фолча

10 г тщательно измельченного продукта (с содержанием воды не более 20 %) экстрагируют 3 раза смесью хлороформ-этанол в соотношении 2:1 (50 см³). Первую экстракцию проводят при встряхивании на аппарате в течение 2 ч, две последующие - по 1 ч.

Раствор отфильтровывают в делительную воронку через бумажный фильтр. Остаток на фильтре промывают смесью хлороформ-этанол (4 раза по 10 см³). В делительную воронку добавляют воду (20% от объема экстракта, интенсивно встряхивают и оставляют на ночь до полного разделения хлороформного и водно-спиртового слоев.

Хлороформный фильтрат отделяют от водно-спиртового, переносят в мерную колбу и доводят до метки. Далее определение проводят аналогично методу Блайя-Дайера.

Определение массовой доли липидов весовым методом с экстракцией в микроизмельчителе.

Метод основан на извлечении жира растворителем из измельченной в микроизмельчителе навески.

Материалы, оборудование и реактивы: микроизмельчитель тканей РТ-2, пипетка на 10 см³, стекло часовое, мерная колба, вместимостью 50 см³, электроплитка, эксикатор, натрий серноокислый безводный, хлороформ, серный эфир.

Проведение испытания. 5 г исследуемого продукта взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,01 г и переносят в фарфоровую ступку, туда же добавляют двойное количество безводного сульфата натрия. Приготовленную смесь растирают. При анализе сухих продуктов (массовая доля воды до 20 %) растирание их с безводным сульфатом натрия не требуется. В стакан микроизмельчителя переносят подготовленную навеску, добавляют 30

см³ смеси хлороформа и этилового спирта (1:2), затем помещают стакан в микроизмельчитель.

Измельчение продукта и экстракцию жира производят в течение 4 мин при 5000 об/мин. Затем стакан со смесью закрывают часовым стеклом и оставляют на 10 мин для осаждения взвешенных частиц.

Раствор жира фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 50 см³, остатки навески в стакане промывают 2-3 см³ растворителя, которые фильтруют в ту же мерную колбу. Содержание колбы доводят растворителем до метки. Все работы проводят под вытяжным шкафом.

Из мерной колбы пипеткой отбирают по 10 см³ растворителя в две предварительно высушенные до постоянной массы и взвешенные бюксы, Растворитель выпаривают, а оставшийся жир подсушивают в сушильном шкафу при температуре (102 ± 2)°С до постоянной массы. Бюксы охлаждают в эксикаторе и взвешивают. Массовую долю жира (X) в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{a \cdot 50}{0,95 \cdot \left(10 - \frac{a}{0,92}\right) \cdot m} \cdot 100, \quad (4.2.4)$$

где a – масса жира в бюксе после высушивания, г;

50 – объем экстракта жира, см³;

m – масса навески продукта, г;

0,92 – плотность жира, г/см³;

10 – объем раствора жира, взятый для определения, см³;

0,95 – коэффициент, учитывающий полноту экстракции.

Расхождение между двумя параллельными определениями не должно превышать 0,5%.

4.2.2. Определение показателей, характеризующих качество жиров

4.2.2.1. Определение кислотного числа

Под кислотным числом понимают количество миллиграмм едкого калия (КОН), необходимое для нейтрализации свободных жирных кислот, содержащихся в 1 г жира.

Метод основан на растворении жира в смеси растворителей с последующим титрованием свободных жирных кислот раствором гидроокиси калия или натрия.

Оборудование, материалы, реактивы: весы аналитические; колбы конические с притертой пробкой; пипетки, вместимостью 10 см³; калия гидроксид, раствор 0,1 моль/дм³ (0,1 н) или натрия гидроксид, раствор 0,1 моль/дм³ (0,1 н); фенолфталеин, спиртовой раствор 10 г/дм³ (1 %-ный); эфир медицинский; спирт этиловый.

Проведение испытания. В коническую колбу вместимостью 250 см³ взвешивают 2 – 10 г жира с погрешностью не более 0,01 г, приливают 30-50 см³ предварительно нейтрализованной (по фенолфталеину) смеси спирта с этиловым эфиром (1:2) и взбалтывают. Если при этом жир не растворяется, содержимое колбы слегка нагревают на водяной бане с обратным холодильником, а затем охлаждают до температуры 15-20 °С. Для анализа можно использовать мисцеллу, полученную при экстракции жира из навески продукта (например, методом Блайя и Дайера). В этом случае следует выбрать такое количество мисцеллы, чтобы в ней содержалось около 2 г жира.

В полученный раствор прибавляют 1 см³ 1 %-ного спиртового раствора фенолфталеина и при постоянном взбалтывании быстро титруют раствором гидроксида натрия или калия 0,1 моль/дм³, до появления слабо-розовой окраски, устойчивой в течение 30 с.

Кислотное число исследуемого жира (X) в мг КОН на 1 г жира определяют по формуле

$$X = \frac{5,61 \cdot V \cdot k}{m} \quad (4.2.10)$$

где 5,61 – количество гидроксида калия, содержащееся в 1 см³ раствора 0,1 моль/дм³, мг;

V – объем раствора гидроксида калия или натрия 0,1 моль/дм³, израсходованный на титрование, см³;

m – масса исследуемого продукта, г;

k -коэффициент пересчета на точный раствор 0,1 моль/дм³ щелочи.

При использовании мисцеллы формула будет выглядеть следующим образом:

$$K = \frac{5,61 \cdot V \cdot k}{C \cdot V_1} \quad (4.2.10a)$$

C – концентрация мисцеллы, г/см³;

V_1 – объём мисцеллы, взятой для анализа.

Допускаемые расхождения между параллельными определениями не должны превышать 0,1 см³ КОН/г жира.

4.2.2.2. Определение йодного числа

Йодное число определяют методом титрования с использованием солякислого раствора хлористого йода. Метод основан на взаимодействии хлористого йода с непредельными жирными кислотами жира.

Йодное число – это количество граммов йода, вступивших в химическое соединение со 100 г жира (характеризует степень непредельности жира и жирных кислот)²⁷.

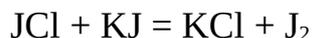
²⁷ ΔE Это – достаточно упрощённое определение, т.к. йод очень плохо присоединяется по месту двойных связей. Следует понимать, что при определении йодного числа определяют количество йода, эквивалентное галогену или интергалогенному соединению, присоединённому по месту двойных углерод-углеродных связей.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

Взаимодействие водного солянокислого раствора JCl жира осуществляется по уравнению



При прибавлении KJ проходит реакция с избытком JCl по уравнению



Выделившийся йод титруют раствором тиосульфата натрия.

Оборудование, материалы реактивы: весы аналитические; колбы с притертой пробкой, вместимостью 250 см^3 ; цилиндры мерные, вместимостью 100 см^3 ; хлороформ; кислота соляная; эфир медицинский; калий йодистый, (не содержащий йодноватокислой соли), водный раствор 100 г/дм^3 (10 %-ный); натрий серноватисто-кислый (тиосульфат), водный раствор $0,1 \text{ моль/дм}^3$, крахмал, раствор 10 г/дм^3 (1 %-ный).

Приготовление раствора хлористого йода. В склянку с притертой пробкой вносят $11,1 \text{ г}$ йодистого калия, 7 г йодноватокислого калия, 50 см^3 воды, 50 см^3 концентрированной соляной кислоты и взбалтывают до полного растворения йода. Приливают 20 см^3 хлороформа и добиваются фиолетовой окраски слоя хлороформа добавлением по каплям 1 %-ного водного раствора йодноватокислого калия при энергичном взбалтывании.

После отстаивания водный слой сливают в мерную колбу и доводят объем водой до 1 дм^3 . Реактив хранят в склянке из темного стекла.

Проведения испытания. В чистую коническую колбу с притертой пробкой отвешивают абсолютной погрешностью не более $0,0001 \text{ г}$ $0,08-0,12 \text{ г}$ профильтрованного жира. Для растворения жира в колбу приливают 3 см^3 этилового эфира, свободного от перекисей, и добавляют из бюретки 25 см^3 солянокислого раствора хлористого йода $0,2 \text{ моль/дм}^3$. Вместо жира можно использовать мисцеллу, полученную при экстракции.

Колбу закрывают пробкой, перемешивают и выдерживают в темном месте

5-15 мин. После этого в колбу прибавляют 10 см³ раствора йодистого калия 100 г/дм³, 50 см³ дистиллированной воды, и выделившийся йод оттитровывают раствором тиосульфата натрия 0,1 моль/дм³ до светло-желтой окраски. Затем прибавляют в колбу 1 см³ свежеприготовленного раствора крахмала 10 г/дм³, 2-3 см³ хлороформа, свободного от перекисей, и продолжают титровать жидкость до полного исчезновения синего окрашивания.

Одновременно проводят контрольное титрование без навески жира.

Йодное число жира (X) в г йода на 100 г жира вычисляют по формуле

$$X = \frac{0,01269 \cdot k \cdot (V - V_1) \cdot 100}{m}, \quad (4.2.11)$$

где 0,01269 – количество йода соответствующее 1 см³ раствора тиосульфата натрия 0,1 моль/дм³, г;

k – коэффициент пересчета на точный раствор тиосульфата натрия 0,1 моль/дм³;

V – объем раствора тиосульфата натрия 0,1 моль/дм³, израсходованный в контрольном анализе, см³;

V₁ – объем раствора тиосульфата натрия 0,1 моль/дм³, израсходованный в рабочем анализе, см³;

m – навеска жира, г (аналогично предыдущему опыту, в случае использования мисцеллы следует брать произведение её концентрации на объём взятой мисцеллы).

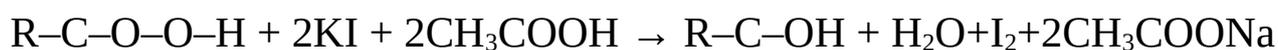
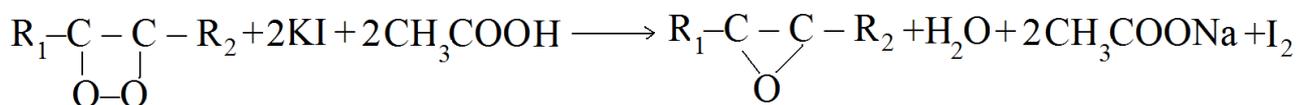
Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 3 г.

4.2.2.3. Определение пероксидного (перекисного) числа

Метод основан на взаимодействии пероксидов и гидропероксидов, содержащихся в жире, с йодистым калием в присутствии ледяной уксусной кислоты с выделением йода, который оттитровывают раствором тиосульфата натрия.

Пероксидное (перекисное) число – это число граммов йода, вытесняемого

из йодида калия всеми пероксидами и гидропероксидами, содержащимися в 100 граммах жира. Измеряется пероксидное число в процентах йода²⁸.



Оборудование, материалы, реактив: весы аналитические; колбы конические с притертой пробкой; пипетки, вместимостью 10 см³; хлороформ; кислота соляная; эфир медицинский; кислота уксусная ледяная; калий йодистый, насыщенный раствор, натрий серноватистокислый (тиосульфат натрия), раствор 0,01 моль/дм³; крахмал, раствор 10 г/дм³ (1 %-ный).

Проведение испытания. В коническую колбу с притертой пробкой вносят взятую с абсолютной погрешностью не более ±0,0001 г навеску тщательно перемешанного и профильтрованного жира массой 1 г.

Навеску в колбе растворяют в 30 см³ смеси, состоящей из 12 см³ хлороформа и 18 см³ ледяной уксусной кислоты (при использовании хлороформенного экстракта, полученного по методу Блайя и Дайера или по методу Фолча следует учесть объём хлороформа в экстракте). К раствору приливают 1 см³ насыщенного на холоде раствора йодистого калия, и смесь равномерно взбалтывают 2 мин.

В колбу добавляют 100 см³ свежеприготовленной дистиллированной воды, 1 см³ раствора крахмала 10 г/дм³ и немедленно титруют в присутствии крахмала выделившийся йод раствором тиосульфата натрия 0,01 моль/дм³ до исчезновения синего окрашивания. Одновременно проводят контрольный опыт без навески.

²⁸ ΔE Иногда пероксидное число измеряют в ммоль активного кислорода на килограмм жира.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

Пероксидное число жира в процентах йода вычисляют по формуле

$$X = \frac{0,001269 \cdot k \cdot (V_1 - V) \cdot 100}{m}, \quad (4.2.12)$$

0,001269 – количество йода соответствующее 1 см³ раствора тиосульфата натрия 0,01 моль/дм³, г;

k – коэффициент пересчета на точный раствор тиосульфата;

V – объем раствора тиосульфата натрия в контрольном анализе, см³;

V₁ – объем раствора тиосульфата натрия 0,01 моль/дм³ в рабочем анализе, см³;

m – навеска жира, г.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,02%. Для пересчёта пероксидного числа в ммоль активного кислорода на килограмм (ммоль/кг ½ O) достаточно умножить пероксидное число, выраженное в процентах йода²⁹ на 78.

4.2.2.4. Определение альдегидного числа

Метод основан на измерении интенсивности окраски соединений, образующихся при реакции альдегидов с бензидином.

Альдегидное число – это число миллиграммов коричневого альдегида, эквивалентного всем альдегидам, содержащимся в 1 грамме жира.

Оборудование, материалы, реактивы: фотоэлектроколориметр; пробирки вместимостью 2, 5 см³; колбы конические вместимостью 25 см³ с притертыми пробками; пипетки, вместимостью 10 см³; мерные колбы вместимостью 10 см³; этилового спирта, раствор 960 г/дм³ (96%-ный), хлороформ; бензидина свежеприготовленного, раствор 50 г/дм³ (0,5%-ный); ледяная уксусная кислота.

²⁹ ΔE Можно сразу использовать формулу

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

Проведение испытания. В две сухие чистые мерные колбы с притертой пробкой вместимостью 25 см³ взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,002 г по 0,5 – 1,2 г исследуемого жира и доводят объем до метки смесью 96 %-ого этилового спирта с хлороформом (1:1). Полученный спирто-хлороформенный раствор жира (мисцеллу) хорошо перемешивают, и часть его помещают в кювету фотоэлектроколориметра или спектрофотометра с рабочей длиной 10 мм, и определяют оптическую плотность раствора при длине волны 350 нм (для спектрофотометра) или 360 нм (для фотоэлектроколориметра) по отношению к чистому растворителю, т. е. к смеси равных объемов хлороформа и этилового спирта.

Полученное значение оптической плотности (D_1) характеризует собственную окраску жира.

Затем в две колбы вместимостью 25 см³ с притертыми пробками вносят при помощи пипетки по 10 см³ приготовленного спирто-хлороформенного раствора жира (мисцеллы), а в третью — 10 см³ чистого растворителя (смесь равных объемов хлороформа и этилового спирта). В каждую колбу добавляют по 1 см³ 0,5%-ного свежеприготовленного раствора бензидина в смеси этилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 1:1.

Колбы закрывают пробками, хорошо перемешивают, выдерживают 15 мин и после окрашивания измеряют оптическую плотность в кюветах с рабочей длиной 10 мм. Найденное значение оптической плотности (D_2) является суммарным и включает оптическую плотность, обусловленную цветностью самого жира, а также окраской, развивающейся в результате взаимодействия альдегидов с бензидином. Кюветы после каждого определения трижды промывают чистым растворителем (смесь спирта и хлороформа 1:1) и протирают марлевым тампоном.

Содержание альдегидов, реагирующих с бензидином (X) в мг коричневого

альдегида на 100 г жира, или мг/100 г, вычисляют по формуле

$$X = \frac{(1,1 D_2 - D_1) \cdot m_1 \cdot V \cdot 100}{m} \quad (4.2.13)$$

где m_1 – содержание коричневого альдегида в 1 см³ спирто-хлороформенного раствора жира, найденное по градуировочному графику, мг;

m – масса исследуемого жира, г (аналогично предыдущим опытам, в случае использования мисцеллы следует брать произведение её концентрации на объём взятой мисцеллы);

V – объём приготовленного спирто-хлороформенного раствора жира, см³;

D_1 – оптическая плотность спирто-хлороформенного раствора жира до обработки бензидином;

D_2 – оптическая плотность спирто-хлороформенного раствора жира после обработки бензидином;

1,1 – коэффициент, учитывающий изменение объёма при добавлении к 10 см³ используемого раствора 1 см³ раствора бензидина.

Для приготовления стандартного раствора коричневого альдегида (0,01 мг/л) в бюксе наливают коричневый альдегид, вкладывают в нее небольшую пипетку, закрывают крышкой и взвешивают с погрешностью не более 0,0002 г. Пользуясь пипеткой, быстро отбирают навеску альдегида массой 0,1 г в другую бюксу. Ввиду большой летучести коричневого альдегида обе бюксы как во время взвешивания, так и до взвешивания должны быть плотно закрыты крышками.

Взятую навеску альдегида при помощи этилового спирта с хлороформом (1:1) количественно переносят из бюксы в мерную колбу на 100 см³, той же смесью доводят до метки и тщательно перемешивают. Отбирают пипеткой 1 см³ приготовленного раствора, помещают в другую мерную колбу на 100 см³, доводят объём до метки добавлением спирто-хлороформенной смеси (1:1) и хорошо перемешивают. Полученный раствор является стандартным (в 1 см³ раствора содержится 0,01 мг коричневого альдегида).

Для приготовления рабочих растворов в 10 сухих, предварительно пронумерованных пробирок с притертыми пробками, вносят последовательно от 0,4 до 4,0 см³ стандартного раствора коричневого альдегида (с интервалами 0,4 см³). После этого в пробирки добавляют спирто-хлороформенную смесь (1:1) с таким расчетом, чтобы объем полученного раствора в каждой пробирке был равен 10 см³, и хорошо перемешивают содержание пробирок.

Затем в каждые 4 пробирки (в три со стандартом, а в одну – с чистым растворителем – смесью спирта с хлороформом) добавляют по 1 см³ свежеприготовленного раствора бензидина в смеси с этиловым спиртом и ледяной уксусной кислотой (1:1). Пробирки закрывают пробками, хорошо перемешивают их содержимое и выдерживают 15 мин до полного развития окраски. После этого определяют оптическую плотность раствора, содержащих коричневый альдегид, по отношению к чистому растворителю с бензидином фотоэлектроколориметром при длине волны 360 нм, пользуясь кюветой с шириной 10 мм.

При построении градуировочного графика на оси ординат откладывают найденное значение оптической плотности, а по оси абсцисс – процентное содержание коричневого альдегида.

4.2.2.5. Определение числа омыления

Метод основан на взаимодействии свободных и связанных жирных кислот со щелочью и определении числа омыления, обратным титрованием.

Число омыления – это количество миллиграммов едкого кали (гидроксида калия), вступающего во взаимодействие со всеми свободными и связанными кислотами, находящимися в 1 грамме жира.

Число омыления характеризует природу жира.

Оборудование, материалы, реактив: весы аналитические; баня водяная; холодильник стеклянный (обратный); колбы с притертой пробкой,

вместимостью 250 см³; цилиндр мерный, вместимостью 100 см³; калия гидроксид, спиртовой раствор 0,5 моль/дм³, кислота соляная, раствор 0,5 моль/дм³;эфир медицинский; спирт этиловый; фенолфталеин, спиртовой раствор 10г/дм³ (1%-ный).

Проведение испытания. В коническую колбу на 250—300 см³ отвешивают сабсолютной погрешностью не более 0,001 г 1,5 – 2 г тщательно перемешанного и профильтрованного жира и приливают из бюретки 25 см³спиртового раствора гидроокиси калия 0,5 моль/дм³. Колбусоединяют с обратным холодильником, опускают в кипящую водяную баню и кипятят 1 ч,периодически взбалтывая до полного омыления жира. Об окончании реакции омыления судят по отсутствию помутнения пробы от нескольких капель воды.

К полученному горячепрозрачному мыльному раствору прибавляют 0,5 см³ раствора фенолфталеина 10 г/дм³, а при анализе темноокрашенных жиров – 2 см³ раствора алкалиблау 50 г/дм³ и сразу титруютраствором соляной кислоты 0,5 моль/дм³ до нейтральной реакции. Одновременно проводят контрольный анализ без навески жира.

Число омыления исследуемого жира (X) в мг КОН на 1 г жира вычисляют по формуле

$$X = \frac{28,055 \cdot k \cdot (V - V_1)}{m}, \quad (4.2.14)$$

где 28,055 – количество гидроокиси калия, соответствующее 1 см³ раствора соляной кислоты 0,5 моль/дм³, мг;

k – коэффициент пересчета на точный раствор соляной кислоты 0,5 моль/дм³;

V – объем раствора соляной кислоты 0,5 моль/дм³, израсходованный на титрование раствора в контрольном анализе, мл;

V₁ - объем раствора соляной кислоты 0,5 моль/дм³, израсходованный на титрование раствора в рабочем анализе, мл; m – навеска жира, г.

4.2.2.6. Определение массовой доли неомыляемых веществ

Метод основан на омыления триглицеридов раствором щелочи, экстракции неомыляемой части этиловым спиртом, обезвоживании и определении их количества взвешиванием.

Оборудование, материалы, реактив: весы аналитические; баня песочная; холодильник стеклянный (обратный); делительная воронка; колбы с притертой пробкой, вместимостью 250 см³; цилиндр мерный, вместимостью 100 см³; калия гидроксид, спиртовой раствор 2 моль/дм³; эфир медицинский; натрий безводный серноокислый; спирт этиловый; фенолфталеин спиртовой раствор 10 г/дм³ (1%-ный).

Проведение испытания. В коническую колбу на 250—300 см³ отвешивают 2 – 3 г тщательно перемешанного и профильтрованного жира абсолютной погрешностью не более 0,001 г. К навеске жира приливают 20 см³ свежеприготовленного спиртового раствора гидроксида калия 2 моль/дм³ и, отметив уровень раствора, омыляют при кипячении. Нагревание проводят на песочной бане с обратным холодильником в течение 2 ч (для рыбьих жиров - 1 ч). Уровень раствора доводят этиловым спиртом до первоначального и прибавляют 80 см³ дистиллированной воды. После этого содержимое колбы нагревают еще 30 мин. Полученный раствор должен быть прозрачным.

После охлаждения раствор количественно переносят в делительную воронку и неомыляемые вещества экстрагируют этиловым эфиром. При образовании эмульсии к эфирному раствору добавляют очень небольшое количество спирта. Экстракцию проводят в три приема (три раза), расходуя при первой экстракции 50 см³ эфира, а при последующих по 25 см³. Эфирные вытяжки в делительной воронке промывают водой до полного удаления раствора мыла, о чем свидетельствует исчезновение окраски промывных вод при реакции с фенолфталеином.

Эфирные вытяжки количественно переносят через воронку с фильтром и безводным серноокислым натрием в предварительно высушенную и взвешенную колбу.

Эфир отгоняют на водяной бане с холодильником, остатки эфира удаляют на водяной бане без холодильника. Колбу с неомыляемыми веществами высушивают при температуре 100-105 °С до постоянной массы.

Массовую долю неомыляемых веществ (X) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{m}, \quad (4.2.15)$$

где m – масса исследуемого жира, г;

m_1 – масса пустой колбы, г;

m_2 – масса колбы с неомыляемыми веществами, г.

Расхождение между параллельными определениями не должно превышать 0,2 %.

4.2.3. Определение жирнокислотного состава

Для полной оценки биологической ценности липидов необходимо знать не только йодное число, характеризующее лишь число двойных связей, но и содержание в липидной фракции всех жирных кислот. В жирнокислотный состав (ЖКС) входят как свободные, так и связанные жирные кислоты, поэтому в ходе пробоподготовки в любом методе определения ЖКС необходимо провести гидролиз (омыление) триглицеридов тем или иным способом.

4.2.3.1. Определение жирнокислотного состава методом газожидкостной хроматографии

Определение жирнокислотного состава газовой хроматографией требует перевода триглицеридов и жирных кислот в метиловые эфиры жирных кислот, что можно осуществить с помощью метилата натрия. При этом операция

омыления совмещается с метилированием [7].

Проба, содержащая метиловые эфиры жирных кислот, вводится в испаритель газового хроматографа и в газообразном состоянии поступает в колонку, где в токе газа-носителя (например, аргона) движется по колонке, задерживаясь на неподвижной жидкой фазе. Выход метилового эфира чаще всего определяют с помощью пламенно-ионизационного детектора. Сигнал от детектора поступает на регистрирующее устройство, которым может быть либо самописец, либо ЭВМ с аналогово-цифровым преобразователем.

Пики жирных кислот идентифицируются по времени выхода. Калибровка осуществляется по площади или (чаще) по высоте пика.

4.2.3.2. Определение жирнокислотного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Анализ состава триглицеридов, жирнокислотного состава липидов можно проводить и с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с обращённой фазой. Метод ВЭЖХ основан на введении пробы (в жидком или растворённом виде) в ток растворителя (подвижной фазы) и прохождении её компонентов через хроматографическую колонку, наполненную неподвижной фазой (адсорбентом). При обращённо-фазовой ВЭЖХ твёрдая фаза содержит гидрофобные группы. Индивидуальные химические вещества, входящие в состав пробы, адсорбируются на неподвижной фазе, но в токе растворителя происходит и обратный процесс – десорбция. Поэтому компоненты пробы движутся по колонке, каждый со своей скоростью, зависящей от химического состава компонента пробы, состава подвижной и неподвижной фазы, скорости потока растворителя по колонке, геометрии колонки. При прочих постоянных условиях скорость движения

отдельного вещества по колонке будет определяться только его химическим составом. Поэтому время выхода различных компонентов пробы будет различным. Для того чтобы зафиксировать выход отдельного компонента, а также оценить его концентрацию в пробе, необходим детектор. Некоторые детекторы (например, диодно-матричный) позволяют идентифицировать вышедший компонент (по спектру), хотя в большинстве случаев для точной идентификации необходимо знать время выхода этого компонента из колонки.

Метод ВЭЖХ для определения ЖКС имеет ряд преимуществ по сравнению с методом газожидкостной хроматографии. В частности, процесс происходит при более низких температурах в жидкой фазе, что препятствует разрушению, окислению и полимеризации ненасыщенных жирных кислот. Кроме того, используемые в методе ВЭЖХ детекторы позволяют снимать спектр выходящих веществ, что даёт возможность отличить жирные кислоты от примесей. Более того, совместно с жирными кислотами можно определить содержание жирорастворимых витаминов.

При анализе триглицеридов, жирных кислот, аминокислот и многих других веществ обычно используют диодно-матричный детектор (для анализа жирнокислотного состава применяют также детектор, определяющий коэффициент преломления). Принцип работы диодно-матричного детектора основан на том, что свет, испускаемый лампой видимого света и/или ультрафиолетовой лампой, расщепляется в спектр, пропускается через раствор, выходящий из колонки и попадает на матрицу из фотодиодов. В итоге получается спектр поглощения раствора для данного момента времени. Можно регистрировать весь спектр (и сравнивать его со спектрами поглощения образцов), а можно зафиксировать лишь интересующие исследователя частоты поглощения. Если в данной области спектра растворитель практически не поглощает или слабо поглощает свет, а интересующие компоненты

пробы поглощают его интенсивно, то сигнал детектора на этой частоте может служить для хроматографического определения данной пробы. Если же растворитель достаточно сильно поглощает свет в данной области спектра, то такое определение будет затруднено, а чувствительность этого метода будет очень низкой [8].

Хотя насыщенные триглицериды и жирные кислоты слабо поглощают свет в ультрафиолетовом спектре, ненасыщенные жирные кислоты, особенно кислоты с сопряжёнными двойными связями, можно определять на диодно-матричном детекторе. Однако использование такого детектора (или любого другого детектора, определяющего интенсивность поглощения в ультрафиолетовом спектре) для определения липидных компонентов создаёт определённые трудности, т. к. в данном случае многие вещества, хорошо растворяющие липиды (ацетон, диэтиловый эфир, хлороформ), сложно использовать в качестве подвижной фазы, поскольку они интенсивно поглощают в ультрафиолетовой области спектра [10]. Следует отметить, что ненасыщенные жирные кислоты имеют максимум поглощения при длине волны около 215 нм. Поэтому, как правило, используют смеси растворителей, включающие ацетонитрил, метил-трет. бутиловый эфир или очищенный тетрагидрофуран, раствор уксусной кислоты.

Для определения как ненасыщенных, так и насыщенных жирных кислот, как правило, используется метод получения производных жирных кислот при действии на них бромфенацилбромида (и, в ряде случаев, 18-краун-эфира) [9].

Если не требуется определять все жирные кислоты, а достаточно лишь оценить содержание ПНЖК, то можно использовать следующую методику.

Оборудование, материалы, реактивы: хроматограф жидкостной «Agilent1100» (или аналогичный) с диодно-матричным (или другим фотометрическим) детектором; колонка Hypersil ODS; калия гидроксид,

раствор в метаноле 2 моль/дм³, шприцы на 100 мкл и на 5 мл; ацетонитрил, х.ч., тетрагидрофуран, х.ч., метил-трет.бутиловый эфир, х.ч., уксусная кислота, водный раствор 1г/дм³ (0,1%-ный), баня водяная с термостатом, виалы на 2 см³; фильтры 0,45 мкм.

Проведение испытания.

Пробу мисцеллы с известным содержанием жира³⁰ (или стандартную смесь жирных кислот) объёмом 0,2 см³ помещают в виалу и подвергают омылению (в случае смеси жирных кислот эта операция, безусловно, не приводит собственно к омылению, но выполняется с целью максимального приближения условий контрольного опыта к рабочему). Для этого добавляют 0,4 см³ раствора КОН в метаноле 2моль/дм³ и термостатировали смесь при 80 °С в течение 40 минут. Далее к смеси добавляют 1 см³ смеси ацетонитрила и тетрагидрофурана (1:1), 0,4 см³ уксусной кислоты, добиваясь полного растворения смеси, после чего проводят фильтрацию образца через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. После этого производили хроматографирование на жидкостном хроматографе³¹. Условия хроматографирования: колонка НуперсилОДС, температура 35 °С, растворители: А – смесь ацетонитрила и метил-трет.бутилового эфира (15:85), В – 0,1 % раствор уксусной кислоты. Режим изократический, А – 70 %, В – 30 %. Детектор – диодно-матричный, длина волны обнаружения жирных кислот – 202 нм, пероксидов – 240 нм, продуктов с сопряжёнными двойными связями – 280 нм [8]. Калибровка осуществляется по площади пика.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

³⁰ ΔE
метилтрет.бутиловом эфире

Для приготовления мисцеллы навеску жира растворяли в

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

³¹ ΔE
составлять от 400 до 2500.

Общее разведение жира для хроматографирования должно

Помимо жирных кислот подобным методом можно анализировать и триглицериды. Существует метод с использованием диодно-матричного детектора, позволяющий не только определить триглицериды количественно, но и оценить их качество, т.к. пероксиды дают характерный отклик при длине волны 240 нм [11]. Кроме того, этот метод позволяет определить наличие сопряжённых двойных связей, дающих отклик при 280 нм.

Вопросы для контроля

1. Какой метод определения массовой доли жира относится к арбитражному?
2. В чем различие определения массовой доли жира экстракционным методом в аппарате Сокслета и методом по обезжиренному остатку?
3. Почему при определении массовой доли липидов удаляют воду из навески и как это делают?
4. Какие растворители используют для экстракции жира из продукта?
5. В чем сущность определения жира рефрактометрическим методом?
6. В чем преимущество методов определения липидов бинарной смесью? В каких случаях эти методы используются?
7. Какие показатели качества характеризуют степень окисления липидов?
8. Что характеризует йодное число? Как оно изменяется при хранении?
9. В чём разница между определением жирнокислотного состава с помощью ГЖХ и ВЭЖХ? Назовите достоинства и недостатки каждого из методов.

4.3. Определение массовой доли азотсодержащих веществ в сырье и продуктах питания

В рыбных продуктах определяют следующие показатели, характеризующие количество и состав азотистых веществ:

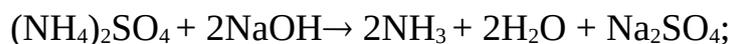
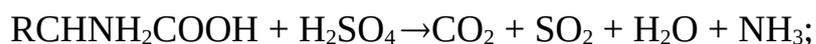
- 1) содержание общего азота и сырого протеина (белковые вещества);
- 2) содержание белкового, небелкового азота и истинного протеина;
- 3) азот свободных аминокислот (аминный и аминно-аммиачный азот);
- 4) азот летучих оснований и триметиламин;
- 5) активность протеолитических ферментов;
- 6) содержание гистамина (вопрос будет рассмотрен при рассмотрении показателей безопасности);
- 7) степень перевариваемости белка;
- 8) фракционный состав белков;
- 9) аминокислотный состав белков.

4.3.1. Определение массовой доли белковых веществ

4.3.1.1. Определение массовой доли белковых веществ (общего азота) макрометодом

Метод заключается в определении азота по Кьельдалю с последующим пересчетом на белок. Сущность метода состоит в разложении органического вещества пробы кипящей концентрированной серной кислотой с образованием солей аммония, переведении аммония в аммиак, отгонки его в раствор кислоты, количественном учете аммиака титрометрическим методом и расчете содержания азота в исследуемом материале.

Реакции протекают по уравнениям:





Белковые вещества (сырой протеин³²) определяют, умножая количество общего азота на коэффициент пересчета азота на белок, равный 6,25 (5,3 для белков соединительной ткани):

$$\text{СП} = \text{ОА} \cdot \text{К}_Б, \quad (4.3.1)$$

где ОА – массовая доля общего азота в продукте, %;

К_Б – коэффициент пересчёта азота на белок;

СП – массовая доля сырого протеина, %.

Оборудование и реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерения от 0 до 200 г; электроплитка бытовая или газовые горелки; холодильник шариковый; воронка капельная; бюретка вместимостью 50 см³ с делениями на 0,1 см³; каплеуловитель; колбы для сжигания, вместимостью 100 см³; колбы плоскодонные или круглодонные вместимостью от 500 до 700 см³; колбы плоскодонные вместимостью от 250 до 300 см³; капельница; вода дистиллированная; кислота серная концентрированная и раствор 0,05 моль/ дм³ (0,1 н); натрия гидроксид, раствор 330 г/ дм³ (33 %-ный) прокипяченный и раствор 0,1 моль/ дм³ (0,1 н); медь сернокислая 5-водная; калий сернокислый; метиловый красный, раствор 0,2 г/ дм³ (0,02 %-ный); растворяют 0,02 г метилового красного в 100 см³ спирта 600 г/ дм³ (60 %-ного); индикатор смешанный (Таширо).

Проведение испытаний. Навеску исследуемого продукта массой от 0,2 до 0,6 г, взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,0005 г в закрытую с одной стороны трубочку из фильтровальной бумаги, помещают в колбу для

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

³² ΔE

Сырой протеин включает в себя белок и небелковые азотистые вещества, пересчитанные на белок. Для определения только белка (что может быть актуальным в случае продуктов с большим содержанием небелковых веществ) следует рассчитывать значение истинного протеина.

сжигания (колбу Кьельдаля) вместимостью 100 см³, добавляют несколько кристаллов медного купороса (от 0,2 до 0,3 г) и приливают от 10 до 20 см³ концентрированной серной кислоты плотностью 1840 кг/ м³.

Затем колбу с содержимым осторожно нагревают в вытяжном шкафу, не допуская разбрызгивания жидкости, до тех пор, пока жидкость в колбе не станет прозрачной, зеленовато-голубой окраски без бурого оттенка. Внутренние стенки колбы должны быть совершенно чистыми.

По окончании сжигания содержимое колбы охлаждают и осторожно количественно переносят в отгонную колбу вместимостью от 500 до 700 см³ (рис.2.1). Колбу для сжигания тщательно ополаскивают, проверяя полноту смывания добавлением 1-2 капель раствора метилового красного.

Общий объем колбы должен быть не более 250 до 300 см³.

Приемником служит коническая колба вместимостью от 250 до 300 см³, в которую из бюретки налито 25-30 см³ раствора 0, 1н серной кислоты. Конец трубки холодильника должен быть погружен в раствор серной кислоты.

В отгонную колбу осторожно, по стенкам, избегая смешивания жидкостей, приливают от 50 до 70 см³ 33 %-ого раствора гидроксида натрия, бросают кусочек лакмусовой бумаги и быстро закрывают ее пробкой, соединенной посредством каплеуловителя с холодильником, осторожно перемешивают содержимое и нагревают. Реакция жидкости в колбе должна быть резко щелочной.

После закипания жидкости в отгонной колбе приемник опускают так, чтобы конец трубки холодильника находился на некотором расстоянии от поверхности раствора, и продолжают отгонку до тех пор, пока не отгонится не менее 2/ 3 жидкости.

Конец отгонки определяют по лакмусовой бумаге. Если отгонка закончена, капля дистиллята не должна вызывать посинения красной

лакмусовой бумаги. При появлении в конце отгонки при кипении толчков отгонку прекращают.

По окончании отгонки конец трубки холодильника обмывают водой в приемную колбу и содержащейся в ней избыток серной кислоты оттитровывают раствором гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³ в присутствии метилового красного или двойного индикатора.

Одновременно проводят контрольный анализ без навески, исследуемой пробы.

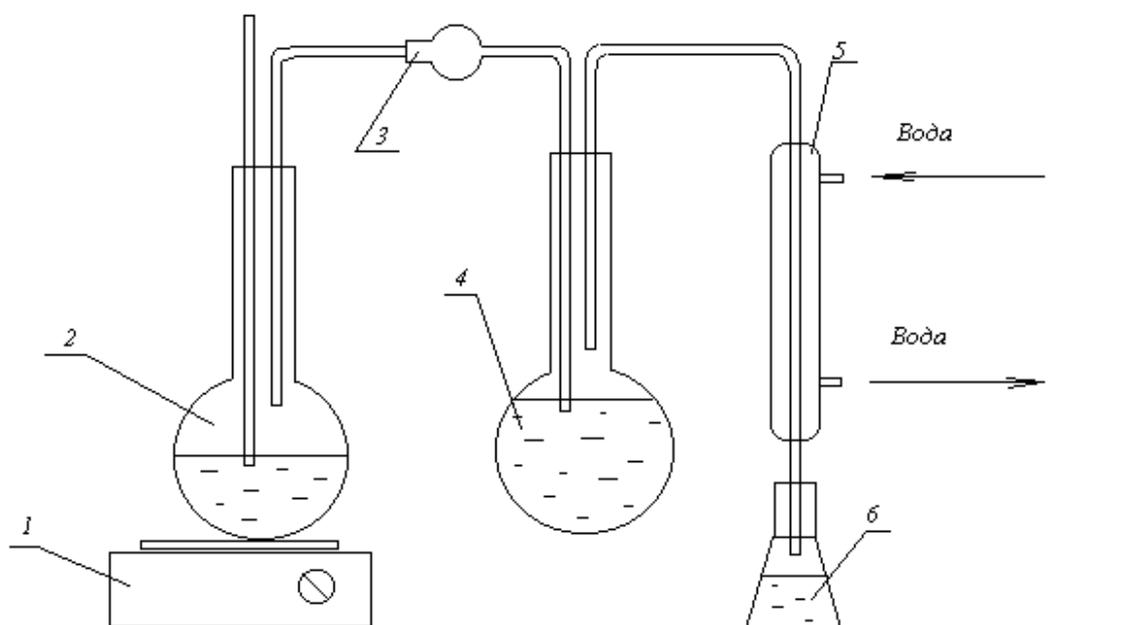


Рисунок 4.3.1. Схема отгонной установки: 1 – электроплитка бытовая; 2 – колба-парообразователь; 3 – каплеуловитель; 4 – колба отгонная; 5 – холодильник; 6 – колба-приемник.

Массовую долю общего азота ($X_{OА}$) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_{OA} = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 0,0014 \cdot 100}{m}, \quad (4.3.2)$$

де V - объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, пошедший на титрование серной кислоты в контрольном анализе, см³;

V_1 - объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, пошедший на титрование серной кислоты в рабочем анализе, см³;

K - коэффициент пересчета на точный раствор гидроксида натрия, 0,1 моль/дм³, г;

0,0014 - количество азота эквивалентное 1 см³ гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, г;

m - навеска исследуемой пробы, г.

Вычисление проводят до второго десятичного знака.

4.3.1.2. Определение массовой доли водорастворимых белковых веществ фотоколориметрическим методом Лоури

Метод основан на биуретовой реакции и на цветной реакции тирозиновых остатков белковой молекулы с реактивом Фолина (окисление тирозина фосфорномолибденовольфрамовокислым натрием).

Фотоколориметрирование сине-зеленых комплексов проводят при длине волны 750 нм и рабочей длине кюветы 0,5 см. Углеводы и фенолы также взаимодействуют с реактивом Фолина. Метод Лоури применяют для определения водо-, соле- и щелочерастворимых белков при фракционировании мышечных белков. Метод характеризуется высокой чувствительностью (от 10 до 100мкг белка в пробе).

Оборудование и реактивы: фотоколориметр; кюветы; пробирки; пипетки; реактив А – 2 %-ный раствор карбоната натрия в 0,1 моль/дм³ растворе гидроксида натрия; реактив В – 0,5 %-ный раствор сернокислой меди в 1 %-ном растворе виннокислого натрия (Na₂C₄H₄O₆) или калия в 25 см³ дистиллированной воды, растворы смешивают; реактив С – перед анализом

смешивают 49 см³ реактива А и 1 см³ реактива В, реактив годен в течение 1 дня; реактив Фолина-Чокальтеу (фенольного реактива): в круглодонную колбу емкостью от 1,5 до 2 дм³ вносят 100 г вольфрамата натрия $\text{NaWO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 25 г молибдата натрия $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют все в 700 см³ дистиллированной воды, к раствору добавляют 50 см³ 80 %-ного раствора ортофосфорной кислоты H_3PO_4 и 100 см³ концентрированной соляной кислоты HCl . К колбе присоединяют обратный холодильник и кипятят в течение 10 часов. Добавляют 150 г сульфата лития Li_2SO_4 , 50 см³ воды, 3-4 капли брома и кипятят без холодильника 15 минут под тягой для удаления избытка брома. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, доводят его объем до 1 дм³ водой, фильтруют. Полученный раствор должен быть ярко-желтого цвета. Реактив следует хранить в темной склянке, перед употреблением разбавлять дистиллированной водой 1 : 1. Определяют кислотность полученного реактива: разводят в 10 раз и титруют 0,1 моль/дм³ раствором щелочи в присутствии фенолфталеина. Полученный реактив должен быть 0,1 н.

Проведение анализа:

Помещают в пробирку 0,4 см³ раствора белка (водная вытяжка или раствор неизвестной концентрации), добавляют 2 см³ реактива С. Через 10 минут добавляют 0,2 см³ реактива Фолина-Чокальтеу. Смесь тщательно перемешивают и выдерживают при комнатной температуре в течение 30 минут. Параллельно готовят контрольную пробу для сравнения (0,4 см³ дистиллированной воды). Фотоколориметрирование проводят при длине волны 750 нм. По калибровочному графику определяют содержание белка.

4.3.1.3. Определение массовой доли белковых веществ макрометодом с перекисью водорода без отгонки

Метод основан на сжигании исследуемого образца в серной кислоте в присутствии перекиси водорода и определении общего азота кипячением

минерализованной пробы с 20 см^3 раствора гидроксида натрия $0,1 \text{ моль/ дм}^3$.

Оборудование и реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерения от 0 до 200 г; электроплитка бытовая или газовые горелки; колбы мерные вместимостью 500 и 200 см^3 ; бюретки вместимостью 25 и 50 см^3 с делениями на 0,1 см^3 ; капельницы; часы механические; цилиндры мерные вместимостью 100 и 50 см^3 ; колбы конические, вместимостью 250 и 500 см^3 ; колбы круглодонные длинногорлые (Кьельдаля) вместимостью от 100 до 250 см^3 ; вода дистиллированная; кислота серная концентрированная плотностью 1840 кг/ м^3 и раствор $0,05 \text{ моль/ дм}^3$ (0,1 н); натрия гидроксид, раствор 150 г/ дм^3 (15 %-ный); индикатор смешанный (Таширо) смешивают равные объемы спиртовых растворов метилового красного 2,0 г/ дм^3 (0,2 %-ного) и метиленового синего 1,0 г/ дм^3 (0,1 %-ного).

Проведение испытаний. Предварительно определяют количество гидроксида натрия в 20 см^3 раствора $0,1 \text{ моль/ дм}^3$ после кипячения по отношению к серной кислоте $0,05 \text{ моль/ дм}^3$ и к добавляемым реактивам. Это количество условно называют «рабочим титром щелочи» и обозначают T .

Установка «рабочего титра» $20 \text{ см}^3 0,1 \text{ моль/ дм}^3$ раствора гидроксида натрия и проверка реактивов. В коническую колбу вместимостью 500 см^3 наливают 100 см^3 дистиллированной воды, добавляют 1,5 см^3 концентрированной серной кислоты и 5 капель смешанного индикатора. Содержимое колбы осторожно нейтрализуют раствором гидроксида натрия 150 г/ дм^3 до переходной окраски и подкисляют несколькими см^3 раствора серной кислоты $0,05 \text{ моль/ дм}^3$, затем вновь нейтрализуют раствором гидроксида натрия $0,1 \text{ моль/ дм}^3$.

В колбу приливают из бюретки 20 см^3 раствора гидроксида натрия $0,1 \text{ моль/ дм}^3$, ставят на горящую плитку и кипятят 15 минут, считая с момента закипания, быстро охлаждают под краном или погружают в холодную воду.

Содержимое колбы нейтрализуют раствором серной кислоты 0,05 моль/ дм³ и добавляют избыток ее от 2 до 3 см³ для растворения карбонатов. Отмечают объем добавленного раствора серной кислоты.

Затем добавляют 2-3 капли смешанного индикатора и проводят обратное титрование раствором гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³ до появления такой же окраски, какая была перед кипячением. «Рабочий титр» (T) 20 см³ раствора гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³ по отношению к раствору серной кислоты 0,05 моль/ дм³ вычисляют по формуле:

$$T = V_1 \cdot K_1 - V_2 \cdot K_2, \quad (4.3.3)$$

где V_1 - объем раствора серной кислоты 0,05 моль/ дм³, прилитый в колбу после кипячения, см³;

K_1 - поправочный коэффициент на точный раствор 0,05 моль/ дм³ серной кислоты;

V_2 - объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³, израсходованный на обратное титрование, см³;

K_2 - поправочный коэффициент на точный раствор 0,1 моль/ дм³ гидроксида натрия.

От 0,8 до 1,4 г исследуемой пробы (для продуктов с высоким содержанием воды навеска составляет от 1,8 до 2,0 г), отвешенных с абсолютной погрешностью не более 0,0005 г, помещают в колбу для сжигания вместимостью от 100 до 250 см³, добавляют соответственно 20 или от 10 до 12 см³ серной кислоты плотностью 1840 кг/ м³ и 5 см³ перекиси водорода. Происходит саморазогревание смеси и выделение газов.

По окончании выделения газов колбу нагревают в колбонагревателе до закипания серной кислоты, немного охлаждают, осторожно, по стенке колбы, добавляют 2-3 см³ перекиси водорода и продолжают нагревание. Добавление

перекиси водорода с последующим нагреванием проводят несколько раз, постепенно уменьшая ее количество. Процесс минерализации продолжается от 35 до 45 минут.

По окончании минерализации (жидкость в колбе должна быть полностью обесцвечена) и охлаждения колбы содержимое ее количественно переносят в мерную колбу вместимостью 500 см³ при исследовании продуктов с низким содержанием воды и 200 см³ при исследовании продуктов с высоким содержанием воды. Объем жидкости в колбе доводят до метки дистиллированной водой и тщательно перемешивают содержимое.

Пипеткой отбирают 50 см³ приготовленного раствора, переносят в коническую колбу вместимостью 500 см³, добавляют 50 см³ дистиллированной воды, 5 капель смешанного индикатора.

Содержимое колбы осторожно нейтрализуют раствором гидроксида натрия 150 г/ дм³ до переходной окраски, подкисляют несколькими см³ раствора серной кислоты 0,05 моль/ дм³, а затем вновь точно нейтрализуют раствором гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³.

После этого в колбу приливают из бюретки 20 см³ раствора гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³ и ставят на горячую плитку. Содержимое колбы интенсивно кипятят точно 15 минут, считая с момента закипания, быстро охлаждают (под краном или погружают в холодную воду), нейтрализуют раствором серной кислоты 0,05 моль/ дм³ и добавляют избыток ее 2-3 см³ для растворения карбонатов, отмечая количество добавленного раствора серной кислоты.

Добавляют 2-3 капли смешанного индикатора и проводят обратное титрование раствором гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³ до появления такой же окраски, какая была перед кипячением.

Массовую долю белковых веществ (X) в процентах вычисляют по

формуле:

$$X = \frac{(T + V_2 \cdot K_2 - V_1 \cdot K_1) \cdot 0,0014 \cdot 6,25 \cdot 100 \cdot V}{m \cdot V_3}, \quad (4.3.4)$$

где T - рабочий титр 20 см³ раствора гидроксида натрия 0,1 моль/дм³ (0,1 н);

V - объем, в котором растворена минерализованная навеска, см³;

V_1 - объем раствора серной кислоты 0,05 моль/ дм³, прилитый для нейтрализации и подкисления жидкости после ее кипячения, см³;

V_2 - объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³, израсходованный на обратное титрование избытка серной кислоты, см³;

K_1 - коэффициент пересчета на точный 0,05 моль/ дм³ раствор серной кислоты;

K_2 - коэффициент пересчета на точный раствор 0,1 моль/ дм³ гидроксида натрия;

0,0014- количество азота эквивалентное 1 см³ раствора гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³, г;

6,25 - коэффициент пересчета азота на белковые вещества; m - навеска исследуемого продукта, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не должны превышать 0,5 %.

4.3.1.4. Определение массовой доли белковых веществ полумикрометодом

Метод основан на окислении органического вещества при сжигании его в концентрированной серной кислоте в присутствии катализатора, отгонке образующегося аммиака паром, улавливании его раствором серной кислоты и определении содержания азота методом обратного титрования.

Белковые вещества определяют, умножая количество общего азота на коэффициент 6,25.

Оборудование и реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерения от 0 до 200 г; электроплитка бытовая или газовые горелки; холодильник шариковый; воронка капельная; бюретка вместимостью 50 см³ с делениями на 0,1 см³; каплеуловитель; колбы для сжигания, вместимостью 100 см³; колба мерная вместимостью 100 см³; колбы плоскодонные или круглодонные вместимостью от 500 до 700 см³; колбы плоскодонные вместимостью от 250 до 300 см³; капельница; вода дистиллированная; кислота серная концентрированная и раствор 0,01 моль/ дм³ (0,02 н); натрия гидроксид, раствор 330 г/ дм³ (33 %-ный) прокипяченный и раствор 0,02 моль/ дм³ (0,02 н); медь серноокислая 5-водная; калий серноокислый; метиловый красный, раствор 0,2 г/ дм³ (0,02 %-ный); растворяют 0,02 г метилового красного в 100 см³ спирта 600 г/ дм³ (60 %-ного); индикатор смешанный (Таширо).

Проведение анализа. Навеску исследуемого продукта массой от 0,2-0,3 г (при исследовании продуктов с повышенным содержанием воды навеску увеличивают до 3 г, жидкой навески берут 5 г) взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,0005 г в закрытую с одной стороны трубочку из фильтровальной бумаги, помещают в колбу для сжигания (колбу Кьельдаля) вместимостью 100 см³, добавляют несколько кристаллов медного купороса и приливают от 10 до 20 см³ концентрированной серной кислоты плотностью 1840 кг/м³.

Затем колбу с содержимым осторожно нагревают в вытяжном шкафу, не допуская разбрызгивания жидкости. Когда содержимое колбы станет однородным, прекращают нагревание, дают остыть, после чего добавляют 0,5 г серноокислого калия и продолжают нагревание до тех пор, пока жидкость в колбе не станет прозрачной, зеленовато-голубой окраски без бурого оттенка.

Внутренние стенки колбы должны быть совершенно чистыми. Это достигается осторожным взбалтыванием содержимого колбы для смывания со стенок темных обугленных частиц пробы.

По окончании сжигания содержимое колбы охлаждают и осторожно количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 . Из полученного раствора отбирают пипеткой 10 см^3 жидкости и через воронку вносят в колбу прибора для отгонки аммиака, смывая остаток с воронки дистиллированной водой.

Отгонку аммиака водяным паром ведут в приборе, приведенном на рис. 2.2.

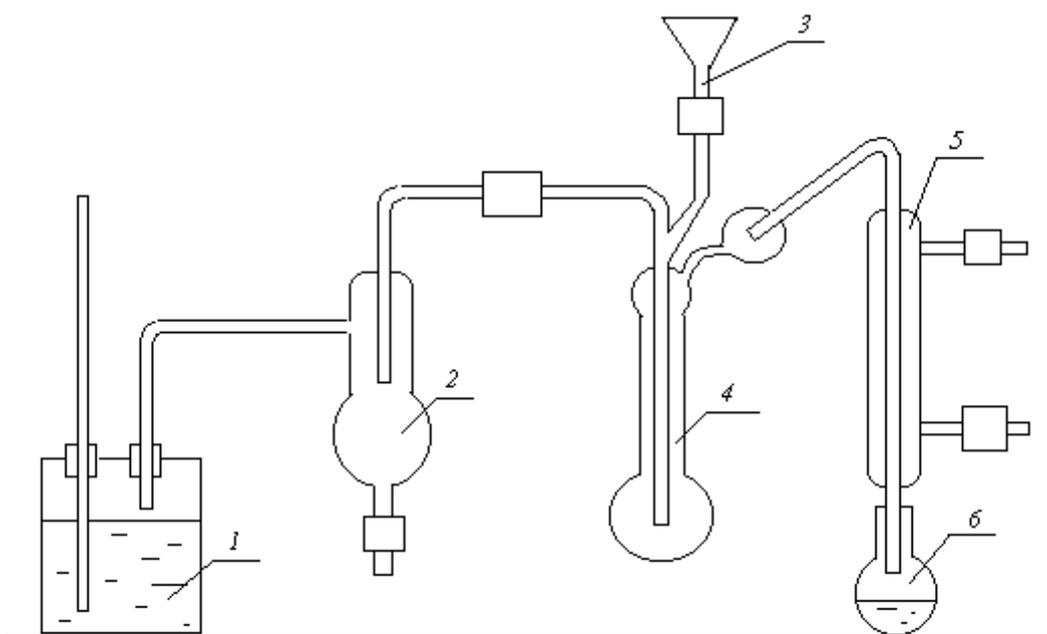


Рисунок 4.3.2. Прибор для отгонки: 1- паробразователь; 2 - предохранительный клапан; 3 – воронка; 4 – колба-смеситель; 5 – холодильник; 6 – колба-приемник.

Приемником служит коническая колба 6, в которую наливают из бюретки

25-30 см³ раствора серной кислоты 0,01 моль/ дм³ и опускают в нее конец трубки холодильника 5. Затем закрывают нижнее отверстие предохранительного сосуда 2. Через воронку 3 наливают в колбу-смеситель 4 5-6 см³ раствора гидроксида натрия 330 г/ дм³; воронку 3 заменяют стеклянной палочкой или применяют зажим Мора и затем пускают пар.

Отгонку с водяным паром продолжают до тех пор, пока в приемную колбу не отгонится от 50 до 60 см³ жидкости. По окончании отгонки конец холодильника обмывают дистиллированной водой, собирают воду в приемник и титруют избыток серной кислоты раствором 0,02 моль/ дм³ гидроксида натрия в присутствии индикатора.

Массовую долю общего азота (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 0,00028 \cdot 6,25 \cdot 100 \cdot V_2}{m \cdot V_3}, \quad (4.3.5)$$

где V - объем раствора гидроксида натрия 0,02 моль/ дм³, пошедший на титрование серной кислоты в контрольном анализе, см³;

V_1 - объем раствора гидроксида натрия 0,02 моль/ дм³, пошедший на титрование серной кислоты в рабочем анализе, см³;

K - коэффициент пересчета на точный раствор гидроксида натрия, 0,02 моль/ дм³, г;

0,00028 - количество азота эквивалентное 1 см³ гидроксида натрия 0,02 моль/ дм³, г;

m - навеска исследуемой пробы, г;

6,25 – коэффициент пересчета азота на белковые вещества;

V_2 – объем, в котором растворена сожженная навеска, см³;

V_3 – объем раствора, взятый для отгонки, см³.

Вычисление проводят до второго десятичного знака.

4.3.1.5. Определение массовой доли общего азота ускоренным методом Джаромилло [12]

Оборудование и реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами

измерения от 0 до 200 г; электроплитка бытовая или газовые горелки; бюретка вместимостью 50 см³ с делениями на 0,1 см³; гильза металлическая; трубка газоотводная стеклянная; кислота серная 0,05 моль/дм³ (0,1 н); натрий гидроксид 0,1 моль/дм³; индикатор смешанный (Таширо).

В отличие от метода Кьельдаля, сжигание проводится в металлической гильзе. Помимо навески продукта (0,1 г), в гильзу помещают 3 г ацетата натрия и 1,5 г кристаллического гидроксида натрия. Гильзу соединяют с газоотводной трубкой, другой конец которой помещают в приёмник (химический стакан с 15 см³ 0,05 моль/дм³ (0,1 н) серной кислоты и несколькими каплями смешанного индикатора). После этого проводится сухая минерализация, для чего гильзу помещают на электроплитку. Выделяющийся газ улавливается серной кислотой. Процесс минерализации прекращают, когда в приёмном стакане перестанут появляться пузырьки газа. Трубку промывают водой, а промывные воды сливают в приёмник. Содержание общего азота, как и в методе Кьельдаля, определяется обратным титрованием: содержимое приёмника титруют 0,1 моль/дм³ NaOH до перехода окраски от фиолетовой до зелёной [12]. Содержание общего азота определяют по формуле:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot 0,0014 \cdot 100}{m}, \quad (4.3.6)$$

где V_1 – объём 0,05 моль/дм³ серной кислоты в приёмнике, см³;

V_2 – объём 0,1 моль/дм³ щёлочи, пошедшей на нейтрализацию избытка серной кислоты, см³;

m – масса навески продукта, г.

0,0014 – масса азота, эквивалентная 1 см³ 0,05 моль/дм³ раствора серной кислоты или 1 см³ 0,1 моль/дм³ гидроксида натрия.

4.3.2. Определение массовой доли белковых, небелковых веществ и истинного протеина

4.3.2.1. Определение массовой доли небелкового азота

Метод основан на отделении небелковых азотистых веществ от белковых путем осаждения последних трихлоруксусной кислотой и определении небелкового азота в фильтрате, полученном после осаждения окислением органического вещества, содержащегося в фильтрате при сжигании его в концентрированной серной кислоте в присутствии катализатора, отгонке образующегося аммиака паром, улавливании его раствором серной кислоты и определении содержания азота методом обратного титрования.

Метод можно использовать для определения истинного протеина:

$$\text{ИП} = (\text{ОА} - \text{НБА}) \cdot \text{К}_Б, \quad (4.3.7)$$

где НБА – массовая доля небелкового азота, %;

ОА – массовая доля общего азота, %;

$\text{К}_Б$ – коэффициент пересчёта азота на белок;

ИП – массовая доля истинного протеина, %.

Оборудование и реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерения от 0 до 200 г; электроплитка бытовая или газовые горелки; баня водяная; холодильник шариковый; воронка капельная; бюретка вместимостью 50 см³ с делениями на 0,1 см³; каплеуловитель; марля медицинская; бумага фильтровальная; колбы для сжигания, вместимостью 100 см³; колбы плоскодонные или круглодонные вместимостью от 500 до 700 см³; колбы плоскодонные вместимостью от 250 до 300 см³; колбы мерные вместимостью 200 или 250 см³; капельница; пипетка вместимостью 10 см³; ступка фарфоровая с пестиком вместимостью 250 см³; вода дистиллированная; кислота трихлоруксусная 200 г/дм³ (20 %-ная); кислота серная концентрированная и раствор 0,05 моль/дм³ (0,1 н); натрия гидроксид, раствор 330 г/дм³ (33 %-ный) прокипяченный и раствор 0,1 моль/дм³ (0,1 н); медь сернокислая 5-водная; калий сернокислый; метиловый красный, раствор 0,2 г/дм³ (0,02 %-ный);

растворяют 0,02 г метилового красного в 100 см³ спирта 600 г/ дм³ (60 %-ного); индикатор смешанный (Таширо).

Проведение анализа:

Навеску исследуемого продукта 50 г, взвешенную с погрешностью не более 0,01 г, растирают в ступке со 100 г дистиллированной воды, переносят количественно в мерную колбу вместимостью 250 см³, настаивают 0,5 часа при периодическом взбалтывании, после чего доводят объем жидкости в колбе до метки дистиллированной водой и фильтруют через четыре слоя марли.

В коническую колбу отбирают 100 см³ полученного фильтрата и небольшими порциями при взбалтывании жидкости приливают к ней 25 см³ 20 %-ного раствора трихлоруксусной кислоты. Для интенсификации осаждения пробу осторожно подогревают на водяной бане. После 30-минутного отстаивания жидкость отфильтровывают через сухой складчатый фильтр.

В колбу для сжигания (колбу Кьельдаля) вместимостью 100 см³ отбирают пипеткой 10 см³ фильтрата и ведут минерализацию. С этой целью добавляют в колбу Кьельдаля несколько кристаллов медного купороса (от 0,2 до 0,3 г) и приливают от 10 до 20 см³ концентрированной серной кислоты плотностью 1840 кг/ м³.

Затем колбу с содержимым осторожно нагревают в вытяжном шкафу, не допуская разбрызгивания жидкости. Когда содержимое колбы станет однородным, прекращают нагревание, дают остыть, после чего добавляют 0,5 г сернокислого калия и продолжают нагревание до тех пор, пока жидкость в колбе не станет прозрачной, зеленовато-голубой окраски без бурого оттенка. Внутренние стенки колбы должны быть совершенно чистыми. Это достигается осторожным взбалтыванием содержимого колбы для смывания со стенок темных обугленных частиц пробы.

По окончании сжигания содержимое колбы охлаждают и

осторожноколичественно переносят в отгонную колбу вместимостью от 500 до 700 см³ (рис.2.1). Колбу для сжигания тщательно ополаскивают, проверяя полноту смывания добавлением 1-2 капель раствора метилового красного.

Общий объем колбы должен быть не более 250 до 300 см³.

Приемником служит коническая колба вместимостью от 250 до 300 см³, в которую из бюретки налито 25-30 см³ раствора серной кислоты 0,05 моль/ дм³ (0,1 н). Конец трубки холодильника должен быть погружен в раствор серной кислоты.

В отгонную колбу осторожно, по стенкам, избегая смешивания жидкостей, приливают от 50 до 70 см³ раствора гидроксида натрия 330 г/ дм³, бросают кусочек лакмусовой бумаги и быстро закрывают ее пробкой, соединенной посредством каплеуловителя с холодильником, осторожно перемешивают содержимое и нагревают. Реакция жидкости в колбе должна быть резко щелочной.

После закипания жидкости в отгонной колбе приемник опускают так, чтобы конец трубки холодильника находился на некотором расстоянии от поверхности раствора, и продолжают отгонку до тех пор, пока не отгонится не менее 2/3 жидкости.

Конец отгонки определяют по лакмусовой бумаге. Если отгонка закончена, капля дистиллята не должна вызывать посинения красной лакмусовой бумаги. При появлении в конце отгонки при кипении толчков отгонку прекращают.

По окончании отгонки конец трубки холодильника обмывают водой в приемную колбу и содержащейся в ней избыток серной кислоты оттитровывают раствором гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³ в присутствии метилового красного.

Одновременно проводят контрольный анализ без навески исследуемой

пробы.

Массовую долю небелкового азота ($X_{НБА}$) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_{НБА} = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot 0,0014 \cdot V_3 \cdot V_5 \cdot 100}{m \cdot V_4 \cdot V_6}, \quad (4.3.8)$$

где V_1 - объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, пошедший на титрование серной кислоты в контрольном анализе, см³;

V_2 - объем раствора гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, пошедший на титрование серной кислоты в рабочем анализе, см³;

V_3 - объем водной вытяжки в мерной колбе, см³;

V_4 - объем водной вытяжки, взятый для осаждения белков, см³;

V_5 - объем водной вытяжки, взятый для осаждения белков с учетом объема трихлоруксусной кислоты, см³;

V_6 - объем фильтрата, взятый для минерализации, см³;

K - коэффициент пересчета на точный раствор гидроксида натрия, 0,1 моль/дм³, г;

0,0014 - количество азота эквивалентное 1 см³ гидроксида натрия 0,1 моль/дм³, г;

m - навеска исследуемой пробы, г.

Вычисление проводят до второго десятичного знака.

4.3.2.2. Метод определения аминного азота методом формольного титрования

Метод основан на связывании аминокрупп с формалином и косвенном определении их количества по результатам титрования карбоксильных групп.

Оборудование, реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерений от 0 до 200 г; потенциометр постоянного тока измерительный с пределами измерений значений рН от 0 до 14; стаканы стеклянные лабораторные вместимостью 500 и 100 см³; пипетки вместимостью 2, 10, 20 см³; цилиндр мерный вместимостью 10 см³; колба мерная вместимостью 100, 250 см³; бюретка вместимостью 25 см³; мешалка магнитная; марля

медицинская; бумага фильтровальная; ступка фарфоровая с пестиком вместимостью 250 см³; кислота трихлоруксусная 200 г/ дм³ (20 %-ная); вода дистиллированная; хлорид бария; натрия гидроксид, раствор 0,1 моль/ дм³ (0,1 н), 0,02 моль/ дм³ (0,02 н) и 2 моль/дм³ (2 н); кислота соляная 0,5 моль/дм³ раствор; кислота розоловая; формалин, раствор 400 г/дм³ (40 %-ный) нейтрализованный – формалин нейтрализуется в день анализа раствором 0,1 моль/дм³ (0,1 н) гидроксида натрия до рН = 7; кислота серная, раствор 0,05 моль/дм³ (0,1 н); спирт этиловый ректификованный; индикатор смешанный (Таширо) - схема приготовления см. п.2.1.3; бумага лакмусовая, фенолфталеинспиртовой раствор 10 г/дм³ (1 %-ный).

Проведение анализа:

для жидкой навески исследуемого продукта:

Сначала проводят контрольное титрование. В стеклянный стакан наливают 20 см³ дистиллированной воды, помещают магнит. В стакан помещают электроды, приливают 10 см³ нейтрализованного формалина, включают мешалку и титруют жидкость раствором 0,02 моль/дм³ гидроксида натрия до рН = 9.

При проведении рабочего анализа в стакан вместимостью 50 см³ помещают 0,2-0,3 г исследуемого продукта, взвешенного с абсолютной погрешностью не более 0,001 г, и доводят объем дистиллированной водой до 20 см³. В стакан опускают магнит, электроды.

Раствор нейтрализуют 0,1 моль/ дм³ гидроксида натрия до рН = 6,8-7,0.

При работе с очень кислыми продуктами (рН = 1,0) начинать нейтрализацию удобно раствором 1 моль/дм³ (1 н) гидроксида натрия, постепенно переходя к концентрации 0,1 моль/ дм³ и 0,02 моль/ дм³.

По окончании нейтрализации в раствор добавляют 10 см³ формалина (рН от 4,5 до 5,5) и титруют раствором 0,02 моль/ дм³ (0,02 н) гидроксида натрия до

pH = 9.

Массовую долю аминного азота (X_{AA}) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_{AA} = \frac{(V - V_1) \cdot K \cdot 0,28 \cdot 100}{m \cdot 1000}, \quad (4.3.9)$$

где V - объем раствора гидроксида натрия 0,02 моль/ дм³, израсходованный на титрование исследуемого образца, см³;

V_1 - объем раствора гидроксида натрия 0,02 моль/ дм³, израсходованный на титрование контрольного образца, см³;

K - коэффициент пересчета на точный раствор 0,02 моль/ дм³ гидроксида натрия;

0,28 – количество мг аминного азота, соответствующее 1 см³ раствора 0,02 моль/ дм³ гидроксида натрия, мг;

1000 - коэффициент пересчета в мг в г;

m - навеска исследуемого образца, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,2 %.

Вычисление проводят до третьего десятичного знака.

для всех остальных продуктов:

Делают водную вытяжку из 50 г тщательно измельченного (растертого с дистиллированной водой) в фарфоровой ступке исследуемого продукта и осаждают в ней белки трихлоруксусной кислотой, как описано в п. 4.3.2.1.

Отфильтровав осадок, отбирают 100 см³ фильтрата и прибавляют к нему для осаждения фосфатов и углекислых солей 2 г сухого хлорида бария и 2 моль/ дм³ раствор гидроксида натрия до сильнощелочной реакции на лакмус. После 15-минутного отстаивания жидкость фильтруют через сухой бумажный фильтр

в колбу.

Отбирают по 25 см³ фильтрата в три колбы с притертыми пробками. В одну из них вносят 10 капель розоловой кислоты и производят нейтрализацию раствора сначала 0,5 моль/дм³ раствором соляной кислоты, а затем 0,1 моль/дм³ раствором гидроксида натрия. Две другие колбы служат для определения аминного азота формольным титрованием. Для этого в них вносят израсходованное количество 0,5 моль/дм³ раствора соляной кислоты и 0,1 моль/дм³ раствора гидроксида натрия, затем приливают по 15 см³ формалина, предварительно нейтрализованного щелочью, и оттитровывают 0,1 моль/дм³ раствором гидроксида натрия в присутствии фенолфталеина до яркого розового окрашивания.

Массовую долю аминного азота (X_{AA}) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_{AA} = \frac{V_1 \cdot K \cdot 0,0014 \cdot V_2 \cdot V_4 \cdot 100}{m \cdot V_3 \cdot V_5}, \quad (4.3.10)$$

где V_1 - объем 0,1 моль/дм³ раствора гидроксида натрия, израсходованного на титрование, см³;

V_2 - объем водной вытяжки в мерной колбе, см³;

V_3 - объем водной вытяжки, взятый для осаждения белков, см³;

V_4 - объем водной вытяжки, взятый для осаждения белков с учетом объема трихлоруксусной кислоты, см³;

V_5 - объем фильтрата, взятого для титрования, см³;

K - коэффициент пересчета на точный 0,1 моль/дм³ раствор гидроксида натрия;

0,0014 - количество азота эквивалентное 1 см³ 0,1 моль/дм³ раствора гидроксида натрия;

m - масса навески исследуемого продукта, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое

значение результатов двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми не должны превышать 0,2 %.

Вычисление проводят до третьего десятичного знака.

4.3.2.3. Метод определения массовой доли азота летучих оснований

Метод основан на отгонке свободных и связанных летучих оснований с паром и последующем взаимодействии образующегося аммиака с серной кислотой, избыток которой оттитровывается щелочью.

Оборудование и реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерения от 0 до 200 г; вода дистиллированная; часы механические; аппарат для отгонки вместимостью от 700 до 1000 см³; колба коническая или плоскодонная вместимостью 500 см³; бюретка вместимостью 25 или 50 см³ с делениями на 0,1 см³; электроплитка бытовая; капельница; кислота серная концентрированная и раствор 0,05 моль/ дм³ (0,1 н); натрия гидроксид, раствор 0,1 моль/ дм³ (0,1 н); магния оксид; парафин; метиловый красный, раствор 0,2 г/ дм³ (0,02 %-ный); растворяют 0,02 г метилового красного в 100 см³ спирта 600 г/ дм³ (60 %-ного).

Проведение анализа. Собирают аппарат (рис. 4.3.1). Навеску исследуемого продукта массой от 9 до 10 г, взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,01 г, количественно переносят 250 см³, дистиллированной воды в отгонную колбу 4, туда же добавляют 1 г окиси магния и, во избежание вспенивания, кусочек чистого парафина. Колбу закрывают пробкой с каплеуловителем 3, соединяют с холодильником 5 и парообразователем 2.

Подогревают колбу на слабом огне, пропускают в нее пар и проводят отгонку в течение 30 минут, считая с момента появления капли дистиллята в холодильнике. Дистиллят собирают в приемник 6, в который предварительно

внесено 15-25 см³ 0,05 моль/ дм³ раствора серной кислоты. Конец трубки холодильника должен быть в серную кислоту.

За 5-7 минут до окончания отгонки конец холодильника вынимают из раствора. По окончании отгонки конец трубки холодильника обмывают водой в приемную колбу и избыток кислоты в ней оттитровывают раствором гидроксида натрия 0,1 моль/ дм³ в присутствии 5 капель метилового красного до перехода окраски от розовой до бледно-желтой.

Параллельно с рабочим проводят контрольный анализ без навески исследуемого продукта.

Массовую долю азота летучих оснований (X) в процентах вычисляют по формуле:

$$X_{\text{АЛО}} = \frac{(V - V_1) \cdot 0,0014 \cdot K \cdot 100}{m}, \quad (4.3.11)$$

где V - объем раствора 0,1 моль/ дм³ гидроксида натрия, израсходованный на титрование серной кислоты в контрольном анализе, см³;

V_1 - объем раствора 0,1 моль/ дм³ гидроксида натрия, израсходованный на титрование серной кислоты в рабочем анализе, см³;

0,0014 - количество азота, эквивалентное 1 см³ раствора 0,1 моль/дм³ гидроксида натрия, г;

K - коэффициент пересчета на точный раствор 0,1 моль/дм³ гидроксида натрия;

m - масса исследуемого образца продукта, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не должны превышать 0,001 %.

4.3.3. Определение аминокислотного состава белков

Аминокислотный состав белков можно определить различными хроматографическими методами (используют методы бумажной,

тонкослойной, ионообменной и высокоэффективной жидкостной хроматографии).

В любом методе операции разделения должен предшествовать гидролиз белковых веществ. Существует три способа гидролиза белков: кислотный, щелочной и ферментативный. В лаборатории чаще всего используют лишь кислотный и щелочной способы, причём в обоих случаях происходит частичное разрушение отдельных аминокислот (например, при кислотном гидролизе разрушается триптофан)³³. Для компенсации систематической ошибки, которая может появиться в результате потери аминокислот при гидролизе, чаще всего тем же процессам подвергают либо стандартную смесь аминокислот, либо белок с известным составом, которые и используют при калибровке.

В случае кислотного гидролиза измельчённую пробу помещают в ампулу с 25 см³ 6 М соляной кислоты. Ампулу запаивают и термостатируют при температуре около 115 °С в течение суток [13]. После этого из экстракта испаряют соляную кислоту, а аминокислоты растворяют.

Метод ионообменной хроматографии часто используют в автоматических аминокислотных анализаторах. Разделение производится на колонке, наполненной катионитом. Элюирование проводят несколькими буферными растворами; элюат поступает в камеру для проведения цветной реакции (например, нингидриновой).

В методе ВЭЖХ подвижной фазой является система растворителей, обязательно включающая буферные растворы (например, ацетатный буфер) и органические растворители (тетрагидрофуран, ацетонитрил, триэтиламин). При движении по колонке происходит разделение аминокислот; условия

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m} \Delta E$$

³³ В настоящее время предлагается также ферментативный гидролиз, достоинством которого является полное сохранение всех аминокислот [14]

хроматографирования подбирают так, чтобы, с одной стороны, разделение было как можно более полным, а с другой – последние пики должны оставаться выраженными. Для детектирования аминокислот чаще всего оказывается необходимым получать производные аминокислот либо проводить цветную реакцию. Это можно проводить до введения анализируемой смеси в колонку (например, с меркаптопропионовым альдегидом) и направлять в колонку уже эти производные (предколоночная дериватизация). Для достижения хорошего разделения аминокислот, как правило, используют градиентный режим с изменяющимся значением рН. В градиентном режиме, в отличие от изократического, состав подвижной фазы меняется по мере хроматографирования [14].

4.3.4. Определение перевариваемости белков

Степень переваривания белков определяется как отношение массы переваренной части белка к общей массе белка:

$$СПБ = \frac{B_{перев}}{B_{общ}} \cdot 100, \quad (4.3.12)$$

где $B_{перев}$ - массовая доля переваренного белка в навеске

$B_{перев}$ - массовая доля всего белка в навеске.

Если пренебречь содержанием небелковых азотистых веществ в исходном продукте (или в знаменатель подставить белковый азот), то это же выражение можно записать в следующем виде

$$СПБ = \frac{N_{перев}}{N_{общ}} \cdot 100 = \frac{N_{общ} - N_{ост}}{N_{общ}} \cdot 100, \quad (4.3.13)$$

$$\left(\text{более правильно } СПБ = \frac{N_B - N_{ост}}{N_B} \cdot 100 \right)$$

где $N_{перев}$ – количество переваренного азота в продукте, %;

$N_{\text{ост}}$ – количество оставшегося (непереваренного) азота в продукте, %;

$N_{\text{общ}}$ – количество общего азота в продукте, %;

Содержание общего азота можно определить по Кьельдалю или Джаромилло. При этом, как правило, к навеске (0,1 г) добавляют 45 мг пепсина и 15 мг трипсина для того, чтобы учесть содержание азота и в них.

Определение оставшегося (непереваренного) азота проводят следующим образом. К 0,1 г навески гомогенизированного продукта в пробирке добавляют 7,5 см³ 0,1 моль/дм³ соляной кислоты и 45 мг кристаллического пепсина; пробирку термостатируют 1 ч при температуре 37 °С при постоянном лёгком встряхивании. К содержимому добавляют 7,5 см³ трихлоруксусной кислоты 200 г/дм³, центрифугируют, жидкую фракцию сливают, а к осадку добавляют 5 см³ фосфатного буфера (рН=8), 15 мг кристаллического трипсина, термостатируют при тех же условиях 6 часов. Непереваренные белки осаждают трихлоруксусной кислотой 200 г/дм³, взятой в том же объёме, что и объём жидкости в пробирке. Содержимое пробирки центрифугируют; в осадке определяют содержание общего азота.

Альтернативным подходом является определение переваренного азота в растворе по небелковому или аминному азоту (из него следует вычесть исходное содержание небелкового или аминного азота).

4.3.5. *Определение буферности рыбных продуктов.*

Буферность (буферная ёмкость) – это способность раствора незначительно изменять свой рН при добавлении небольших количеств кислоты или щёлочи.

Буферная ёмкость водной вытяжки из рыбных продуктов может быть обусловлена, преимущественно, наличием продуктов гидролиза белков, прежде всего, аминокислотами. Метод определения буферной ёмкости основан на титровании водной вытяжки щёлочью с двумя индикаторами, изменяющими свой цвет при разном рН.

Оборудование, материалы, реактивы: колба мерная вместимостью 100 см³; ступка фарфоровая; колбы конические 100 см³; баня водяная электрическая; фенолфталеин, спиртовой раствор 10 г/дм³ (1 %-ный); тимолфталеин, спиртовой раствор 10 г/дм³ (1 %-ный); натрия гидроксид, раствор 0,1 моль/дм³; бюретка для титрования вместимостью 25 см³.

Проведение анализа. Навеску продукта массой 10 г растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством дистиллированной воды; количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 см³, доводят горячей дистиллированной водой до $\frac{3}{4}$ объёма и помещают в кипящую водяную баню на 5 минут. Содержимое колбы охлаждают и доводят до метки дистиллированной водой, после чего фильтруют через сухой складчатый фильтр. В две колбы для титрования отбирают по 10 см³ фильтрата, в одну из них добавляют несколько капель раствора фенолфталеина, а в другую – тимолфталеина. Содержимое обеих колб титруют соответственно до бледно-розовой и до интенсивно-синей окраски раствором гидроксида натрия 0,1 моль/дм³. Буферность определяют по формуле:

$$X = K \cdot (V_2 - V_1) \cdot 100 \quad (4.3.14)$$

где K – коэффициент пересчёта на точный раствор NaOH 0,1 моль/дм³

V_1 – объём NaOH, пошедшего на титрование с фенолфталеином, см³;

V_2 – объём NaOH, пошедшего на титрование с тимолфталеином, см³.

За результат принимают среднее значение двух параллельных опытов.

Вопросы для самоконтроля

1. Что означают термины «сырой протеин» и «истинный протеин»? На чем основано их определение?
2. Как определяют переводной коэффициент общего азота на общий белок?
3. В каких продуктах из гидробионтов определяют аминный азот? На чем основан метод его определения?

4. В мороженой треске азот летучих оснований составляет 45 мг %. Дайте заключение о степени свежести.

5. На чём основан метод определения степени перевариваемости белка?

6. Зачем в методе определения азота летучих оснований в отгонную колбу вносят оксид магния?

4.4. Определение содержания углеводов в рыбных продуктах

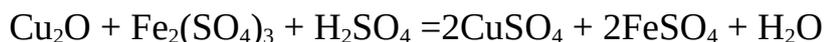
Рыба не является основным источником углеводов. В свежей рыбе (как правило, до наступления посмертного окоченения) в небольших количествах присутствует гликоген; в ещё меньших количествах в ней можно обнаружить в свободном и связанном виде глюкозу, рибозу, дезоксирибозу и некоторые другие сахара. В связи с этим, вопрос об определении содержания углеводов в рыбных продуктах встаёт достаточно редко. Между тем, в настоящее время становятся актуальным производство комбинированных и структурированных продуктов на основе рыбного фарша, в рецептуру которых входит углеводная составляющая (чаще всего, крахмал). Кроме того, углеводы являются одним из основных компонентов ракообразных и морских растений (водорослей и морских трав).

4.4.1. Определение редуцирующих сахаров

Химические методы определения углеводов, имеющих свободную карбонильную группу (редуцирующих сахаров), основаны на относительно легкой окисляемости сахаров в щелочной среде различными окислителями (солями меди, ртути, железа, йода).

4.4.1.1. Определение редуцирующих сахаров перманганатным методом (методом Бертрана)

Метод основан на способности редуцирующих сахаров (лактозы, глюкозы, фруктозы) восстанавливать в щелочной среде жидкость Фелинга в закись меди. Осадок оксида меди окисляют железомойными квасцами до сернокислой меди:



При этом трехвалентное железо восстанавливается до двухвалентного:



количество которого определяют по титрованию перманганатом калия

По объему марганцовокислого калия рассчитывают количество восстановленной меди, а затем, пользуясь специальными таблицами, находят количество сахара.

Метод можно использовать при концентрации сахаров в растворе не менее 0,1 % и не более 2%.

Реактивы: Фелинг № 1 (чистую кристаллическую соль $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 40 г растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды); Фелинг № 2: щелочной раствор калия-натрия винно-кислого – сегнетовой соли (растворяют в воде отдельно 200 г калия-натрия винно-кислого и 150 г гидрата окиси натрия или 210 г гидрата окиси калия, растворы сливают в мерную колбу и доводят объем водой до 1 дм³; раствор железоаммонийных квасцов (растворяют в воде 86 г квасцов, осторожно добавляют 200 г (180 см³) концентрированной серной кислоты и разводят водой до 1 дм³); серная кислота плотностью 1830-1840 кг/м³; калий марганцовокислый, раствор 0,02 моль/дм³; цинка сернокислый, водный раствор 200 г/дм³ (20%-ный), натрия гидроксид, раствор 2,5 моль/дм³, кислота соляная, водный раствор 200 г/дм³ (20%-ный).

Титр раствора устанавливают по щавелевокислоте натрию. Взвешивают $0,14 \pm 0,0003$ г щавелевокислого натрия, освобожденного от гигроскопической влаги высушиванием при температуре 120 °С, количественно переносят 100 см³ воды в коническую колбу и растворяют при перемешивании. К раствору добавляют 2 см³ серной кислоты, нагревают смесь до (80 ± 2) °С и титруют раствором марганцовокислого калия до появления розового окрашивания.

Титр раствора марганцовокислого калия в мг меди ($T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}}$) рассчитывают по

формуле:

$$T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}} = \frac{m \cdot K}{V}, \quad (4.4.1)$$

где m – масса навески щавелевокислого натрия, г;

K – коэффициент пересчета щавелевокислого натрия на медь, равный 0,9488;

V – объем раствора марганцовокислого калия, использованный на титрование навески щавелевокислого натрия, см³.

Титр раствора марганцовокислого калия можно установить по щавелевокислоте аммония ($K = 0,8591$) или свежеперекристаллизованной щавелевой кислоте ($K = 1,0086$).

Оборудование, материалы: стеклянный или пластмассовый насос водоструйный лабораторный; фильтр стеклянный с пластиной № 4 из пористого стекла; термометр ртутный стеклянный лабораторный до 100 °С; бюретка вместимостью 25 см³; колбы для фильтрования под вакуумом вместимостью до 500 см³; конические колбы вместимостью 100, 200 и 250 см³; пипетки на 20 и 25 см³; цилиндр вместимостью 50 см³; фарфоровые чашки вместимостью 100 см³.

Подготовка пробы

Навеску (от 7 до 30 г в зависимости от ожидаемого количества углеводов), взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,01 г, растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством воды и переносят в мерную колбу на 250 см³. Туда же добавляют 3 - 4 см³ раствора сернокислого цинка 200 г/дм³ и 1,5 - 2 см³ 2,5 моль/дм³ раствора гидроокиси натрия. Раствор сернокислого цинка и гидроокиси натрия должны добавляться в эквивалентных количествах. Эквивалентные соотношения устанавливают предварительным титрованием в присутствии фенолфталеина.

Содержимое колбы энергично встряхивают, затем доводят дистиллированной

водой до метки, перемешивают и оставляют на 15 мин. Жидкость фильтруют через складчатый фильтр в сухую колбу.

Количественное определение редуцирующих сахаров

В коническую колбу вместимостью 250 см³ вносят пипеткой 20 см³ приготовленного для исследования сахарного раствора (в 20 см³ раствора должно содержаться не более 100 и не менее 10 мг редуцирующих сахаров), приливают из мерного цилиндра по 20 см³ раствора №1 и №2. Смесь осторожно перемешивают, нагревают и кипятят ровно 3 мин с момента образования пузырьков. Кипение должно быть слабым. При бурном кипении в результате испарения жидкости увеличивается концентрация раствора, что влияет на результаты определения. Колбу ставят в фарфоровую чашечку в наклонном положении и дают осадку меди осесть в течение 1...2 мин. Жидкость над осадком должна быть синей.

Обесцвечивание жидкости указывает на избыточное количество сахара в растворе. Для уменьшения концентрации сахара раствор следует разбавить. Отсутствие осадка закиси меди свидетельствует о недостаточном количестве сахара в растворе. В этом случае для приготовления вытяжки следует увеличить массу навески.

Жидкость фильтруют через стеклянный фильтр, вставленный в колбу для фильтрования под вакуумом, избегая переноса осадка на фильтр. Колбу через предохранительную склянку соединяют с водоструйным насосом и проводят фильтрование с отсасыванием. Для предохранения закиси меди от окисления нужно следить за тем, чтобы осадок на дне колбы был покрыт жидкостью, поэтому колбу держат в наклонном положении.

Осадок в колбе и на фильтре несколько раз промывают горячей прокипяченной дистиллированной водой (5 – 10 см³) до исчезновения голубого оттенка в промывных водах (кипятят воду для удаления кислорода).

Закончив промывание, стеклянный фильтр помещают на чистую колбу для фильтрования под вакуумом. Осадок закиси меди растворяют, добавив в коническую колбу 20 см³ железоаммонийных квасцов. Раствор сливают на стеклянный фильтр и оставляют на несколько минут для растворения осадка. Колбу при растворении осадка не присоединяют к водоструйному насосу; последующую фильтрацию производят с отсасыванием. Коническую колбу и фильтр несколько раз промывают водой, собирая промывные воды в колбу для фильтрования под вакуумом.

Сняв стеклянный фильтр, колбу отсоединяют от водоструйного насоса и титруют содержащийся в ней фильтрат 0,01 моль/дм³ раствором марганцовокислого калия до появления слабо-розового окрашивания, не исчезающего в течение 1 мин.

Израсходованное на титрование количество миллилитров марганцовокислого калия умножают на его титр по меди ($T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}}$) (4.4.1)

$$m_{\text{Cu}} = V \cdot T_{\text{KMnO}_4/\text{Cu}}$$

По найденному количеству мг меди находят соответствующее ему количество сахарозы или инвертного сахара (см. Приложение 5).

Массовую долю сахаров (X_3) в процентах рассчитывают по формуле

$$X_3 = \frac{a_1 \cdot V \cdot 100}{20 \cdot m \cdot 1000}, \quad (4.4.2)$$

где a_1 – количество редуцирующих сахаров (табл. 4.4.1), мг;

V – объем мерной колбы, в которую перенесена навеска, см³;

20 – объем испытуемого раствора для определения сахаров, см³;

m – масса навески исследуемого продукта, г.

Медь.	Инвер	Саха	Медь.	Инверт	Саха-	Медь.	Инве	
	тный	роза		ный	роза		ртны	
	сахар.			сахар			й	

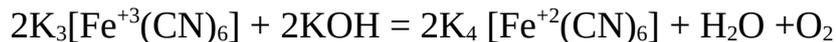
	МГ						сaxap	
20,6	10	9,50	79,5	41	38,95	130,8	71	67,45
22,6	11	10,45	81,2	42	39,90	132,4	72	68,40
24,6	12	11,40	83,0	43	40,85	134,0	73	60,35
26,5	13	12,35	84,8	44	41,80	135,6	74	70,30
28,5	14	13,30	86,5	45	42,75	137,2	75	71,25
30,5	15	14,25	88,3	46	43,70	138,9	76	72,30
32,5	16	15,20	90,1	47	44,60	140,5	77	73,15
34,5	17	16,15	91,9	48	45,60	142,1	78	74,10
36,4	18	17,10	93,6	49	46,55	143,7	79	75,06
38,4	19	18,05	95,4	50	47,50	145,3	80	76,00
40,4	20	19,00	97,1	51	48,45	146,9	81	76,95
42,3	21	19,95	98,9	52	49,40	148,5	82	77,90
44,2	22	20,90	100,6	53	50,35	150,0	83	78,85
46,1	23	21,85	102,3	54	51,30	151,6	84	79,80
48,0	24	22,80	104,0	55	52,25	153,6	85	80,75
49,8	25	23,75	105,7	56	53,20	154,8	86	81,70
51,7	26	24,70	107,4	57	54,15	156,4	87	82,65
53,6	27	25,60	109,2	58	55,10	157,9	88	83,60
55,5	28	26,60	110,9	59	56,05	159,5	89	84,65
57,4	29	27,55	112,6	60	57,00	161,1	90	85,50
59,3	30	28,50	114,3	61	57,59	162,6	91	86,45
61,1	31	29,45	115,2	62	58,90	164,2	92	87,40
63,0	32	30,40	117,6	63	59,85	165,7	93	88,35
64,8	33	31,35	119,3	64	60,80	167,3	94	89,30
66,7	34	32,30	120,9	65	61,75	168,8	95	90,25
68,5	35	33,25	122,6	66	62,70	170,3	96	91,20
70,3	36	34,20	124,2	67	63,65	171,9	97	92,15
72,3	37	35,15	125,9	68	64,60	173,4	98	93,10
74,0	38	36,10	127,5	69	65,55	175,0	99	94,05

75,9	39	37,05	129,2	70	66,50	170,5	100	95,00
77,7	40	38,00						

4.4.1.2. Определение редуцирующих сахаров феррицианидным методом (цианидный метод)

Метод основан на способности редуцирующих сахаров окисляться и восстанавливать в щелочной среде гексацианоферрат (III) $K_3[Fe^{+3}(CN)_6]$ калия (железосинеродистого калия или красной кровяной соли) в гексацианоферрат (II) калия $K_4[Fe^{+2}(CN)_6]$ (железистосинеродистого калия или желтой кровяной соли).

Раствор железосинеродистого калия титруют приготовленной вытяжкой, содержащей сахара. При этом происходит окисление сахара и выделение кислорода, который и восстанавливает железосинеродистый калий



Окончание процесса окисления редуцирующих сахаров железосинеродистым калием определяют по индикатору, в качестве которого используют метиленовый голубой.

Метод используется при концентрации сахаров от 0,2% и не более 2 %

Реактивы: калий железосинеродистый, водный раствор 10 г/дм³ (1 %-ный); натрийгидроксид, растворы 2,5 моль/дм³, 1 моль/дм³; натрийгидроксид, раствор 200 г/дм³ (20%-ный); метиленовый голубой, раствор 10 г/дм³ (1%-ный); калийжелезистосинеродистый, раствор 150 г/дм³ (15%-ный); цинк сернокислый, раствор 300г/дм³, (30%-ный); метиленовый голубой, раствор 1 г/дм³ (0,1%-ный); соляная кислота плотностью 1190 кг/м³.

Материалы, оборудование: электрическая водяная баня; термометр ртутный стеклянный с пределом измерения 150 °С; бюретка для горячего титрования, штатив с кольцом; мерные колбы вместимостью на 100 и 250 см³; фарфоровая ступка с пестиком; пипетка вместимостью 5, 10, 50 см³, коническая колба

вместимостью 100 см³; мерный цилиндр вместимостью 10 см³.

Приготовление исследуемого раствора для определения редуцирующих сахаров.

Образец измельченного исследуемого изделия взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,01 г из такого расчета, чтобы в 100 см³ полученного раствора содержалось 0,3-0,4 г редуцирующих веществ. Массу навески М в граммах рассчитывают по формуле:

$$M = \frac{C \cdot V}{P} \quad (4.4.3)$$

где V – вместимость мерной колбы, см³;

P – предполагаемая массовая доля редуцирующих веществ в исследуемом изделии, %;

C – оптимальное содержание редуцирующих веществ в 100 см³ раствора навески, г.

Навеску переносят в мерную колбу вместимостью 250 см³, смывая нерастворимые частицы в колбу дистиллированной водой, примерно до половины объема колбы. Мерным цилиндром приливают 3 см³ 15 %-ого раствора железистосинеродистого калия и 3 см³ 30 %-ого раствора сернокислого цинка, тщательно перемешивают, доводят до метки, дают осадку осесть и фильтруют жидкость в сухую колбу. В фильтрате определяют редуцирующие сахара

Ориентировочное титрование. Бюретку для горячего титрования заполняют испытуемым раствором. В коническую колбу вместимостью 100 см³ приливают 10 см³ 1 %-ного раствора железосинеродистого калия, 2,5 см³ 2,5 моль/дм³ гидроокиси натрия, одну каплю раствора метиленового голубого и доводят до кипения. В кипящий раствор из бюретки по каплям добавляют испытуемый раствор до изменения зеленой окраски (через фиолетовую) в светло-желтую.

При охлаждении оттитрованный раствор приобретает фиолетовую окраску.

Контрольное титрование. К щелочному раствору железосинеродистого калия, приготовленному как указано выше, прибавляют 1 каплю метиленового голубого и испытуемый раствор на 0,5 см³ меньше, чем пошло на ориентировочное титрование. Смесь в течение 1-1,5 мин нагревают до кипения и кипятят 1 мин при слабом нагреве, затем кипящую жидкость дотитровывают из бюретки испытуемым раствором до появления желтой окраски. Продолжительность кипения не должна превышать 3 мин.

Массовую долю редуцирующих сахаров (X_1) в процентах определяют по формуле:

$$X_1 = \frac{K(10,06 + 0,0175 \cdot V_1) \cdot V \cdot 100}{m \cdot V_1 \cdot 1000} \quad (4.4.4)$$

где 10,06 и 0,0175 – эмпирические коэффициенты,

V_1 – объем израсходованного раствора сахара, см³;

V – объем колбы, в которую перенесена навеска, см³;

m – масса навески, г;

K – поправочный коэффициент на 1% раствор железосинеродистого калия;

1000 коэффициент перевода мг в г.

4.4.2. Определение крахмала

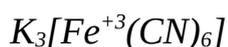
4.4.2.1. Качественный метод

Метод основан на появлении синей или черно-синей окраски при воздействии раствора Люголя на поверхность свежего среза продукта.

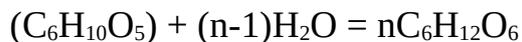
Появление указывает на присутствие крахмала.

4.4.2.2 Количественное определение крахмала цианидным методом

Метод основан на окислении альдегидных групп моносахаридов, образующихся при гидролизе крахмала в кислой среде, гексацианоферрат (III)



Гидролиз идет по уравнению:



Реактивы: Кислота соляная, водный раствор 100 г/дм³ (10%-ный); гидроксид калия или натрия, водный раствор 150 г/дм³ (15%-ный), калий железистосинеродистый (II), водный раствор 150 г/дм³ (15%-ный), калий железосинеродистый, раствор 2,5 моль/дм³, цинк серноокислый, водный раствор 300 г/дм³ (30%-ный); метиловый красный, спиртовой раствор 1 г/дм³ (0,1%-ный) или универсального индикатора, раствор 10 г/дм³ (1%-ный), метиленовый голубой, раствор 10 г/дм³ (1%-ный).

Оборудование, материалы: электрическая водяная баня, холодильник стеклянный лабораторный, термометр ртутный стеклянный с пределом измерения 150 °С, бюретка для горячего титрования, штатив с кольцом, мерные колбы вместимостью на 100 и 250 см³, фарфоровая ступка с пестиком, пипетка вместимостью 5, 10, 50 см³, коническая колба вместимостью 100 и 250 см³, мерный цилиндр вместимостью 10 см³ и 50 см³, воронки стеклянные.

Проведение испытания. В фарфоровую чашку помещают 5 г подготовленной пробы, взвешенной с погрешностью не более 0,01 г, добавляют 10 г дистиллированной воды и тщательно размешивают стеклянной палочкой до однородной массы. Содержимое переносят в коническую колбу на 250 см³. Остатки пробы в чашке смывают дистиллированной (не более 30 см³) водой в ту же колбу. После этого в колбу приливают 30 см³ 10 % соляной кислоты, колбу присоединяют к холодильнику и нагревают до закипания, затем нагрев ослабляют во избежание разбрызгивания навески по стенкам колбы. Жидкость кипятят в течение 10 мин.

После этого колбу снимают с плитки и охлаждают до комнатной

температуры. Полученный гидролизат нейтрализуют 15 %-ным раствором щелочи до слабокислойреакции, используя в качестве индикатора каплю 0,1 %-ного раствора метилового красного или универсального индикатора. Целесообразно предварительным титрованием устанавливать, какое количество 15 % огощелочи потребуется для нейтрализации кислоты, используемой при гидролизе.

Содержимое колбы после гидролиза количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 см³. Для осаждения несхаридов к гидролизату добавляют пипеткой 3 см 15 %-ого раствора железистосинеродистого калия и 3 см 30 %-ого раствора сернокислого цинка. Содержимое колбы доводят до метки дистиллированной водой, перемешивают, дают осадку осесть и фильтруют жидкость через складчатый фильтр в сухую колбу.

В полученном растворе определяют массовую долю редуцирующих сахаров цианидным методом (4.4.1.2). Параллельно определяют количество редуцирующих сахаров до гидролиза X_1 (4.4.1.2)

Массовую долю редуцирующих сахаров после гидролиза (X_2) в процентах определяют по формуле:

$$X_2 = \frac{K(10,06 + 0,0175 \cdot V) \cdot a \cdot 100}{m \cdot V \cdot 1000} \quad (4.4.5)$$

где 10,06 и 0,0175 – эмпирические коэффициенты;

V – объем израсходованного раствора сахара, см³;

a – фактор разведения;

m – масса навески;

K – поправочный коэффициент на 1% раствор железосинеродистого калия, г;

1000 коэффициент перевода мг в г.

За результат измерения принимают среднее арифметическое значение

двух параллельных определений (X_3) и выражают целым числом с одним десятичным знаком.

Количество крахмала определяют по формуле:

$$Y = (X_3 - X_1) \cdot 0,9 \quad (4.4.6)$$

где 0,9 коэффициент пересчета глюкозы на крахмал

4.5. Определение содержания минеральных веществ

4.5.1. Определение массовой доли минеральных веществ (золы) в сырье и продуктах питания

Метод основан на удалении органических веществ из навески продукта сжиганием и определении золы взвешиванием.

Оборудование, реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерений от 0 до 200 г; электропечь сопротивления лабораторная; тигли фарфоровые; эксикатор; шкаф сушильный; электроплитка бытовая.

Проведение анализа: Навеску сухой массы от 1,5 до 2 г (сырой массы около 4 г), взвешенную с абсолютной погрешностью не более 0,001 г, помещают в предварительно прокаленный, доведенный до постоянной массы, фарфоровый тигель, осторожно обугливают на плитке до прекращения выделения дыма, а затем озоляют в муфельной печи при температуре 500 °С. После взвешивания остывшего в эксикаторе тигля с золой его повторно прокаливают в течение 1 часа до постоянной массы, охлаждают и взвешивают с абсолютной погрешностью не более 0,001 г.

Цвет золы может быть белым, желтым, серым, оранжевым и другим, но зола не должна содержать черных вкраплений.

Массовую долю золы (X) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100}{m}, \quad (4.6.1)$$

где m_1 - масса пустого тигля, г;

m_2 - масса тигля с золой, г;

m - навеска исследуемого образца, г.

За окончательный результат принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, расхождение между которыми не должны превышать 0,01 %.

Вычисление проводят до второго десятичного знака.

4.5.2. Определение массовой доли поваренной соли в продуктах из гидробионтов

Несмотря на то, что содержание хлорида натрия в сырье минимально, в состав многих продуктов из гидробионтов входит соль. Внесение соли в одних случаях необходимо исключительно для придания вкуса (стерилизованные консервы; большинство видов кулинарной продукции), а в других – служит также консервирующим фактором (солёная и вяленая рыба; рыба холодного копчения; пресервы). С другой стороны, избыточное количество соли в рационе человека крайне нежелательно, а в ряде случаев и опасно для жизни, поэтому превышение норм содержания поваренной соли тоже недопустимо. Исходя из вышеизложенного, в продуктах, в рецептуру которых входит соль, необходимо контролировать её содержание (в том числе и на промежуточных стадиях – во время и/или после посола).

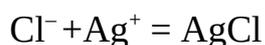
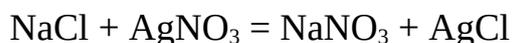
Существует два основных метода определения массовой доли поваренной соли в рыбных продуктах: аргентометрический и меркуриметрический методы, основанные на образовании нерастворимых хлоридов серебра и ртути соответственно. Более удобным и безопасным в производственной лаборатории

является аргентометрический метод.

Метод основан на образовании нерастворимого осадка хлорида серебра при титровании водной вытяжки из продукта раствором нитрата серебра. В большинстве случаев в качестве индикатора используют хромат калия, в нейтральной среде образующий с нитратом серебра осадок хромата серебра, окрашенный в кирпично-красный цвет.

Так, произведение растворимости хлорида серебра равно $1,56 \cdot 10^{-10}$, а хромата серебра – $1,1 \cdot 10^{-12}$. Между тем, в формулу хромата серебра входит два атома серебра, а в формулу хлорида серебра – только один.

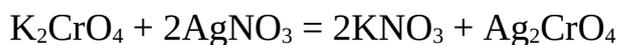
Если записать уравнения реакции



$$PP = [\text{Ag}^+] \cdot [\text{Cl}^-] = 1,56 \cdot 10^{-10}$$

В предположении, что число ионов серебра и хлора одинаково (на самом деле, это не соответствует действительности, но содержание хлорид-ионов

меняется), то $[\text{Ag}^+] = \sqrt{1,56 \cdot 10^{-10}} = 1,25 \cdot 10^{-5} \frac{\text{моль}}{\text{дм}^3}$.



$$PP = [\text{Ag}^+]^2 \cdot [\text{CrO}_4^{2-}] = 1,1 \cdot 10^{-12}$$

В предположении, что ионов серебра в растворе в два раза больше, чем

хромат-ионов (исходя из уравнения реакции),

$$PP = [Ag^+]^2 \cdot \frac{[Ag^+]}{2} = \frac{[Ag^+]^3}{2} = 1,1 \cdot 10^{-12}$$

$$[Ag^+] = \sqrt[3]{2 \cdot 1,1 \cdot 10^{-12}} = 1,3 \cdot 10^{-4} \frac{\text{МОЛЬ}}{\text{ДМ}^3}$$

Таким образом, несмотря на то, что произведение растворимости хромата серебра меньше, чем хлорида серебра, растворимость хромата заметно больше. Это означает, что пока концентрация ионов серебра в растворе не достигнет $1,3 \cdot 10^{-4}$, хромат серебра в осадок выпадать не будет³⁴.

Оборудование, реактивы: весы аналитические класса 2 с пределами измерений от 0 до 200 г; бюретки вместимостью 10, 25, 50 см³, колбы мерные вместимостью 200, 250 см³; палочки стеклянные; электропечь сопротивления лабораторная; фильтры бумажные; пипетки вместимостью 10, 25, 50 см³; воронка стеклянная; тигли фарфоровые; натрия гидроксид, раствор 0,1 н; серебра нитрат (серебро азотнокислое), раствор 0,1 н; калия хромат (калий хромовокислый), раствор 100 г/дм³ (10 %-ный).

Навеску продукта массой 2 – 5 г (для продуктов с низким содержанием соли – до 10 г), взвешенную с погрешностью не более 0,01 г, помещают в мерную колбу вместимостью 200 – 250 см³. Если для анализа используют особо жирные продукты, а также продукты, в которых соль прочно связана с другими веществами (например, кормовая рыбная мука), т.е. может быть не полностью извлечена при экстракции, навеску сначала подсушивают, а затем обугливают в

$$34 \quad \Delta E \quad X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m}$$

Вообще, это утверждение не совсем верно, т.к. концентрация хромат-ионов в растворе несколько больше, и она определяется количеством добавленного индикатора (т.е. не следует добавлять избыток индикатора). Но, во-первых, концентрация хромат-ионов входит в формулу в первой степени, а, во-вторых, она невелика. Если предположить, что она равна $5 \cdot 10^{-3}$ моль/дм³ (на практике она немного меньше), то даже тогда предельной концентрацией, при которой выпадает осадок хромата серебра, будет $1,48 \cdot 10^{-5}$ моль/дм³, что всё ещё больше концентрации, достаточной для выпадения осадка хлорида серебра, даже рассчитанной без учёта избытка хлорид-ионов.

тигле до прекращения дымообразования; уголь измельчают и помещают в указанную мерную колбу.

Содержимое колбы заливают на $\frac{3}{4}$ объёма дистиллированной водой, нагретой до 60 °С; настаивают, периодически перемешивая, в течение 15 – 20 минут (в случае использования воды комнатной температуры – 25 – 30 минут). Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до метки (в случае предварительного обугливания длительной экстракции не требуется, поэтому содержимое колбы сразу доводят до метки после помещения туда угля).

Содержимое колбы фильтруют через бумажный складчатый фильтр, вату или двойной слой марли; первые 20 – 30 см³ фильтрата отбрасывают. При фильтровании воронку следует накрывать часовым стеклом во избежание испарения жидкости и концентрирования раствора.

В две колбы вместимостью 100 см³ отбирают по 10 – 50 см³ фильтрата (в зависимости от предполагаемого количества соли в образце). Если раствор имеет кислую или щелочную реакцию среды, то его нейтрализуют соответственно 0,01 моль/дм³ растворами гидрокарбоната или гидроксида натрия и уксусной кислоты. Нейтрализацию допускается вести по фенолфталеину или паранитрофенолу.

К содержимому колб добавляют по 3 – 4 капли 10 %-го раствора хромата калия и титруют 0,1 моль/дм³ раствором нитрата серебра до красновато-бурой окраски. Содержание поваренной соли в продукте определяют по формуле:

$$X = \frac{V \cdot 0,00585 \cdot K \cdot V_1 \cdot 100}{m \cdot V_2}, \quad (4.6.2)$$

где V – объём 0,1 моль/дм³ раствора нитрата серебра, пошедшего на титрование, см³;

K – коэффициент пересчёта на точный 0,1 раствор нитрата серебра;

V_1 – объём мерной колбы, см³;

V_2 – объём водной вытяжки, взятой для титрования, см³;

Вопросы для самоконтроля

1. На чём основан метод определения суммарного количества минеральных веществ? Какие элементы преимущественно остаются в золе, а какие – удаляются?
2. На чём основан метод Мора (аргентометрический метод определения поваренной соли)?
3. В чём принцип действия хромата калия как индикатора аргентометрического титрования?

ГЛАВА 5. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ БЕЗОПАСНОСТИ

К показателям безопасности, регламентируемым в пищевых продуктах, относят:

1. Содержание токсичных элементов (ртуть, кадмий, свинец, мышьяк и др.)
2. Содержание пестицидов и их метаболитов
3. Содержание радионуклидов
4. Содержание проканцерогенных и канцерогенных веществ
5. Содержание гистамина
6. Наличие и количество паразитов

Также к показателям безопасности следует относить микробиологические показатели, определение которых обязательно при выпуске пищевой рыбной продукции, однако методы определения этих показателей подробно рассматриваются в рамках курса «Микробиология».

Более подробно вопросы, связанные с классификацией показателей

безопасности, природой соответствующих веществ и путями их проникновения в рыбные продукты, рассматривают в рамках дисциплины «Биологическая безопасность продовольственного сырья и продуктов питания»

5.1. Методы определения содержания токсичных элементов

Термин «токсичные элементы» используют вместо более распространённого «тяжёлые металлы». В большинстве случаев эти понятия совпадают; исключением является, прежде всего, мышьяк, являющийся неметаллом.

В настоящее время существуют различные подходы к определению токсичных элементов. Все эти подходы можно разделить на следующие группы:

- 1) фотоколиметрические и спектрофотометрические (реже турбидиметрические и нефелометрические) методы на основе цветных реакций;
- 2) атомно-абсорбционная и атомно-эмиссионная спектроскопия;
- 3) вольтамперометрические и полярографические методы;
- 4) ионометрические методы;
- 5) хроматографические методы.

Первая группа является одной из самых распространённых; эти методы традиционны и используют химические реакции для получения окрашенных соединений (реже – стабильных дисперсных систем). Недостатком этого подхода является то, что для каждого токсичного элемента надо подбирать свою цветную реакцию и свои условия фотометрирования.

Вторая группа методов намного более универсальна, но требует достаточно дорогого оборудования. Данные методы являются достаточно точными.

Третья группа тоже достаточно универсальна, особенно для тяжёлых металлов.

Возможность применения ионометрических методов определяется, во-первых, наличием соответствующего ионоселективного электрода, а во-вторых, присутствием или отсутствием мешающих ионов в системе. Разумеется, для каждого иона необходим свой ионоселективный электрод, но техника ионометрического определения разных токсичных элементов схожа.

Хроматографические методы позволяют в рамках одного запуска определить практически все интересующие токсичные элементы. Имеет смысл применение прямофазовой ВЭЖХ и ионообменной хроматографии.

5.1.1 Определения содержания массовой доли свинца, кадмия, меди, цинка методом атомно-абсорбционной спектрометрии

Подготовка проб

Способ сухой минерализации

Оборудование, материалы, реактивы. Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200 г, шкаф сушильный лабораторный, электропечь сопротивления камерная лабораторная, лампа инфракрасная мощностью 250 или 500 Вт, чаши или тигли кварцевые вместимостью 50, 100, 150 см³, пипетки, стакан вместимостью 10000 см³, стекла часовые щипцы тигельные, электроплитка бытовая, баня водяная, вода дистиллированная, вода бидистиллированная, растворы азотной (1:1), соляной (1:1), серной (1:1) и уксусной кислот (1:19) по объему, этанол ректификационный.

Подготовка посуды. Лабораторную посуду моют раствором моющего средства, затем промывают водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой.

Непосредственно перед использованием посуду дополнительно обрабатывают горячим раствором азотной кислоты (1:1), ополаскивают 3-4 раза дистиллированной водой и 1-2 раза бидистиллированной водой, а затем сушат.

Порядок проведения анализа. В чашку (тигель) берут навеску продукта из

подготовленной к испытанию пробы (для определения свинца – 10г; кадмия – 5 г; меди, цинка – 2 г).

Чашку с навеской помещают на водяную баню при температуре кипения, или в сушильный шкаф (доводя его температуру до 150°C), или электроплитку и удаляют влагу. Затем осторожно обугливают содержимое чашки на электроплитке до прекращения выделения дыма, не допуская сильного воспламенения и выбросов. Чашку помещают в электропечь, нагретую до 250 °С.

После окончания обугливания минерализацию пробы проводят в электропечи, постепенно повышая температуру до 450°C. Минерализацию продолжают при этой температуре до получения серой золы.

Чашку с золой вынимают из электропечи через 10-15 ч озоления, охлаждают до комнатной температуры и смачивают содержимое чашки по каплям минимальным объемом раствора азотной кислоты.

Кислоту выпаривают досуха на водяной бане с последующим выдерживанием в сушильном шкафу при температуре 140°C, либо под инфракрасной лампой. После охлаждения чашку с навеской снова помещают в охлажденную электропечь, постепенно доводят температуру до 300°C и выдерживают в течение 0,5ч. Указанный цикл повторяют несколько раз. Минерализацию считают законченной, если зола станет белого или слегка окрашенного цвета, без обугленных частиц. Параллельно в двух чашках проводят минерализацию добавляемых реактивов для контроля их частоты.

Способ мокрой минерализации. Оборудование, материалы, реактивы.
Весы лабораторные общего назначения с наибольшим пределом взвешивания 200г, шкаф сушильный лабораторный, электропечь сопротивления камерная лабораторная, лампа инфрокрасная мощностью 250 или 500 Вт, электроплитка бытовая, баня водяная, колбы Кьельдаля или плоскодонные вместимостью

250 см³, цилиндры вместимостью 5-50 см³, воронки, пипетки, колбы мерные вместимостью 50 и 100 см³, колбы конические, фильтры беззольные, стакан вместимостью 50 см³, стекла часовые щипцы тигельные, вода дистиллированная, кислота азотная, х.ч., концентрированная и ее раствор (1:5 по объема) кислота серная концентрированная, кислота соляная х.ч. и ее раствор концентрацией 10 г/дм³, кислота хлорная концентрированная и ее раствор концентрацией 570 г/дм³, пероксид водорода, сульфат гидрозина.

Проведения анализа. Навеску подготовленной к выполнению анализа пробы (см. выше) берут на обеззоленный фильтр, заворачивают в него и помещают в колбу Кьельдаля или плоскодонную колбу. Затем в колбу вносят азотную кислоту из расчета 10 см³ на каждые 5 г продукта и выдерживают не менее 15 мин. Затем в колбу вносят 2-3 стеклянных шарика для равномерности кипения, закрывают грушевидной стеклянной пробкой и начинают нагревать на электроплитке, постепенно увеличивая нагрев и упаривают содержимое колбы до объема 3-5 см³.

Колбу охлаждают, затем в нее добавляют 10 см³ азотной кислоты, содержимое упаривают до объема 5 см³, после чего снова охлаждают. Процедуру повторяют 2-4 раза.

В колбу вносят 10 см³ азотной кислоты, 5 см³ серной кислоты, 4 см³ хлорной кислоты из расчета на каждые 5 г пробы. Содержимое колбы упаривают до объема около 5 см³, не допуская окрашивания жидкости в коричневый цвет. При появлении коричневого цвета нагревание прекращают.

Колбу охлаждают до комнатной температуры, добавляют 5 см³ азотной кислоты и 2 см³ хлорной кислоты и снова нагревают до появления белых паров серного ангидрида. Если при этом раствор не обесцветится, процедуру повторяют. Минерализация считается законченной, если раствор после охлаждения остается бесцветным

Для удаления остатка кислотв охлажденную колбу добавляют 10 см³дистиллированной воды и кипятят 10 мин с момента выделения белых паров, затем охлаждают. Если при этом образуется осадок, в колбу вносят 20 см³дистиллированной воды, 2 см³ серной кислоты и 5 см³ соляной кислоты. Полученную смесь кипятят до растворения осадка, постоянно пополняя испарившуюся воду. Минерализат после охлаждения используют для анализа без разбавленияили количественно переносят дистиллированной водой в мерную колбу вместимостью 50 см³.

Определение содержания токсичных элементов методом калибровочного графика.

Оборудование, материалы, реактивы. Атомно-абсорбционный спектрофотометр, водяная баня,концентрированная соляная кислота, раствор (1:1) по объему и раствор молярной концентрацией 1 моль/дм³, растворы азотной кислоты молярной концентрацией 5 моль/дм³ и массовой долей 40 %, основные и рабочие стандартные растворы цинка, меди, свинца, кадмия.

Приготовление основных и рабочих стандартных растворов. Основные стандартные рабочие растворы готовят из чистых металлов (более 99,9%) или чистых (х.ч., ос.ч) устойчивых соединений элементов.

Концентрация металла в основном стандартном растворе составляет 1 г/дм (1000 миг/см³). Срок хранения растворов не должен превышать 2-3 года при условии хранения в герметичной посуде из стекла. Разбавленные растворы концентрацией около 100 мкг/см³ обычно хранят 1 мес, концентрацией 10 мкг/см³– в течение 2-3 суток.

Схема приготовления основных стандартных растворов приведена в таблице 5.1.1.

Таблица 5.1.1. Реактивы и порядок приготовления основных стандартных

растворов, концентрация металла 1000мкг/см³

Элемент	Масса навески исходного реактива, г	Схема приготовления основного стандартного раствора объемом 1000см ³	Концентрация кислоты в основном стандартном растворе
Цинк	Zn (1,000 г) ZnO (1,245 г)	HCl (1:1) + H ₂ O HNO ₃ (массовая доля 40%) + H ₂ O	1 моль/дм ³ HCl 0,1 моль/дм ³ HNO ₃
Медь	Cu (1, 000 г)	50 см ³ HNO ₃ , молярной конц. 5 моль/дм ³ (упарить досуха на водяной бане) + 5 см ³ конц. HClупарить досуха)разбавленная HCl + H ₂ O	1 моль/дм ³ HCl
Свинец	Pb (1, 000г) Pb(NO ₃) ₂ высушенный при температуре 110 °C (1, 599 г)	Минимальный объем HNO ₃ молярной конц. 6 моль/дм ³ + H ₂ O + концентрированная HCl Разбавленная HNO ₃ (1:100)	1 моль/дм ³ HCl 1% HNO ₃
Кадмий	Cd (1,142 г) CdO(1,142 г)	Разбавленная HNO ₃ (упарить досуха и выдерживать при температуре 80-90 °C на водяной бане) + 5 см ³ HClмолярной концентрацией 1 моль/дм ³ (упарить досуха) + разбавленная HCl + H ₂ O 20 см ³ HCl молярной концентрацией 5 моль/дм ³ + H ₂ O + концентрированная HCl	1 моль/дм ³ HCl 1 моль/дм ³ HCl

Рабочие стандартные растворы готовят путем разбавления основных стандартных растворов до концентрации, соответствующей рабочему диапазону концентраций и близкой к концентрации элемента анализируемом растворе. Для разбавления используют раствор, применяемый для приготовления анализируемых растворов проб.

Порядок проведения анализа. Проводят настройку прибора в соответствии с технической инструкцией фирмы изготовителя. Настройку монохроматора проводят по максимуму излучения источника при минимальной щели.

Рекомендуемые условия измерения приведены в таблице 5.1.2.

Таблица 5.1.2. Условия атомно-абсорбционной спектрометрии в воздушно-ацетиленовом пламени

Элемент	Длина волны, нм	Щель, нм	Пламя	Высота горелки, мм	Оптимальный диапазон рабочих концентраций, мкг/см ³	Предел определения, мкг/см ³
Цинк	213,9	1,5	Окислительное	6-7	1-10	0,002
Медь	324,8	1,5	Стехиометрическое	7-8	0,005-5	0,003
Свинец	283,3	2,0	Стехиометрическое	7	0,1-2	0,02
	217,0	2,0	Стехиометрическое	7	0,1-2	0,01
Кадмий	228,8	1,0	Окислительное	6-7	0,02-1	0,001

Измерения проводят в соответствии с технической инструкцией, прилагаемой к прибору.

Измерения проводят по следующей схеме: первая градуировка – первая серия замеров абсорбции (5-10 анализируемых растворов), вторая градуировка – вторая серия замеров абсорбции тех же растворов в обратном порядке; третья

градуировка – третья серия замеров. По результатам, полученным в двух сериях, находят среднее значение.

По концентрации элемента в растворе находят его содержание в продукте (мг/кг):

$$X = \frac{cVK - c_k V_k}{m} \quad (5.1.1)$$

где c – концентрация химического элемента в растворе пробы, найденная по калибровочному графику, мкг/см³;

V – объем исходного раствора пробы, см³, K – коэффициент разбавления исходного раствора пробы;

c_k – концентрация химического элемента в контрольном опыте, мкг/см³;

V_k – объем раствора в контрольном опыте, см³,

m – масса навески пробы, г.

Построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика в области рабочих концентраций достаточно 3-5 рабочих стандартных растворов, при работе в линейной области – 2 раствора. При большой и особенно знакопеременной кривизне графика необходимо увеличить число рабочих растворов или ограничить область рабочей концентрации более узким диапазоном.

Поочередно фотометрируют стандартные растворы не менее трех раз каждый, начиная с наименьшей концентрации. После каждого стандартного раствора устанавливают нулевое поглощение прибора по дистиллированной воде. По результат измерений строят калибровочный график в координатах: абсорбция- концентрация определенного элемента (мкг/см³)

5.2. Определение содержания пестицидов

Пестициды – это, как правило, синтетические вещества, применяемые для борьбы с вредителями: насекомыми (инсектициды), сорняками (гербициды) и т.д..

Несмотря на узкую направленность токсического воздействия того или иного пестицида, в больших количествах эти вещества негативно воздействуют и на другие биологические виды, в том числе и на человека. Между тем, многие пестициды (особенно те, которые широко применялись в середине XX века) и/или продукты их метаболизма обладают способностью накапливаться в биологических объектах, концентрируясь в различных органах (чаще всего, в печени), вследствие чего они особенно опасны для верхнего звена пищевой цепи, а именно таковым часто является и сам человек.

С точки зрения химической природы, выделяют хлорорганические, фосфорорганические и ртутьорганические пестициды (некоторые вещества могут относиться и к другим группам).

К хлорорганическим пестицидам относят, прежде всего, ДДТ, который, хотя и запрещён в настоящее время, обладает сильными кумулятивными свойствами. Также в эту группу входят 2,4-Д и другие метаболиты.

Хлорорганические пестициды хорошо растворимы в органических растворителях, поэтому при исследовании они выделяются вместе с липидной фракцией.

Для определения хлорорганических пестицидов можно использовать методы тонкослойной, газовой или высокоэффективной жидкостной хроматографии.

При использовании ТСХ навеску продукта массой 20 г измельчают, смешивают с безводным сульфатом натрия, после чего экстрагируют смесью гексана и ацетона в соотношении 1:1. Экстракт фильтруют, растворитель отгоняют; оставшуюся липидную фракцию растворяют в 20 см³ гексана. Для увеличения концентрации ХОП мисцеллу вносят в хроматографическую колонку, наполненную силикагелем. Пестициды элюируют из сорбента порциями смеси бензола с гексаном (3:8) по 25-30 см³ (общий объём элюента –

110 см³). Сорбент отжимают, после чего из элюата отгоняют растворитель до объема 0,1 см³.

Тонкослойную хроматографию проводят на специально подготовленных пластинках «Силуфол». На пластинке наносят стартовую линию на расстоянии 1,5 см от края, а на расстоянии 10 см от линии старта – линию финиша для фронта растворителей.

Для их анализа производят их извлечение из продукта, очистку экстракта, качественное и количественное определение физико-химическими методами, прежде всего, фотометрическими, тонкослойной, газожидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии. На линию старта наносят каплю элюата в одну точку, справа и слева помешают капли стандартных растворов. Пластинку помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами растворителя (смесь гексана с ацетоном или серным эфиром; соотношение выбирают в зависимости от вида пластинки). На дне камеры налит растворитель, в него погружают нижний край пластинки на полсантиметра. По мере хроматографирования фронт растворителя движется вверх по пластине. По достижении растворителем линии финиша хроматографирование прекращают, пластинку вынимают и сушат. Пластинку проявляют раствором, содержащим нитрат серебра. Пятна пестицидов идентифицируют по величине R_f , а содержание пестицидов – по площади пятен [13].

Более перспективным является использование методов газовой или жидкостной хроматографии.

В одном из вариантов методов газовой хроматографии предлагается использовать хроматограф с кварцевой колонкой с SE-30 и электрозахватным детектором. Предварительно производится экстракция хлорорганических пестицидов из смеси фарша с ацетоном дихлорметаном (2 аликвоты по 10 см³);

экстракт очищают на стеклянной колонке с силикагелем и угольным порошком; элюирование проводят смесью дихлорметан:хлороформ:ацетон. Мисцеллу выпаривают досуха, после чего разводят гексаном и направляют на хроматографию [14].

Фосфорорганические пестициды определяют энзимохроматографическим методом. Для этого липидную фракцию экстрагируют из измельченной навески ацетоном, экстракт фильтруют в делительную воронку, после чего в воронку вносят 150 см³ дистиллированной воды и из полученной смеси экстрагируют фосфорорганические пестициды дважды хлористым метиленом (CH₂Cl₂). Полученные экстракты объединяют, фильтруют через фильтр с безводным сульфатом натрия, удаляют растворитель, а сухой остаток растворяют в ацетоне. На стартовую линию хроматографической пластинки наносят капли пробы и стандартных растворов. Растворителем служит смесь гексана и ацетона или смесь бензола и ацетона в зависимости от определяемого пестицида. После этого проводят окисление пестицидов («активирование»), которое может осуществляться парами или раствором брома, УФ-облучением. Для некоторых соединений (например, хлорофоса) активируют пластинки аммиачным раствором. Активированные пластинки высушивают, после чего их опрыскивают ферментным раствором, полученным из печени крупного рогатого скота, и выдерживают от 40 до 60 минут при 38 °С в термостате, насыщенном парами воды. После этого пластинки проявляют и снова помещают в термостат. Пестициды определяются в виде белых пятен на голубом фоне [13].

5.3. Методы определения содержания консервантов

Консерванты относятся к группе пищевых добавок; их вносят для увеличения срока хранения пищевых продуктов. Между тем, большие количества консервантов могут оказаться небезопасны для здоровья потребителей; именно с этой целью регламентируют верхний порог их

содержания. Поэтому содержание этих веществ в пищевых продуктах можно условно отнести к показателям безопасности.

5.3.1. Определение массовой доли бензойнокислого натрия (бензойной кислоты)

Бензойнокислый натрий используют при производстве рыбных пресервов, реже – солёной рыбы и некоторых других групп рыбных продуктов. Продукт должен иметь кислую среду, так как антимикробную активность бензойная кислота проявляет в большей степени, чем её соли. Между тем, бензойнокислый натрий (бензоат натрия) легче растворяется в воде.

Метод основан на титровании бензойной кислоты, экстрагированной хлороформом или этиловым эфиром из безбелковой водной вытяжки, щелочью в присутствии фенолфталеина.

Аппаратура, реактивы, материалы: Весы лабораторные; колбы мерные вместимостью 500 см³; цилиндры мерные вместимостью 25, 50 и 100 см³; воронки стеклянные; пипетки вместимостью 2, 5, 10 см³; цинк сернокислый раствор 300 г/дм³ (30 %-ный); калий железосинеродистый, раствор 150 г/дм³ (15 %-ный); кислота серная, раствор 1:1; гидроксид натрия раствор 100 г/дм³ (10 %-ный); гидроксид натрия, раствор 0,05 моль/дм³; фенолфталеин, спиртовой раствор 10 г/дм³ (1 %-ный); хлороформ или эфир этиловый; ч.д.а.; спирт этиловый ректификованный.

Проведение испытания. Взвешивают 100 г образца и количественно переносят дистиллированной водой в мерную колбу вместимостью 500 см³, доводя объем в колбе до 250 - 300 см³.

Содержимое колбы подщелачивают до pH 7,5 - 8,0 (по лакмусу или универсальной индикаторной бумаге) 10 %-ным раствором гидроксида натрия, нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин, затем охлаждают до комнатной температуры. В щелочной среде вся бензойная кислота переходит в бензоат натрия, который легко экстрагируется водой.

В колбу приливают 20 см³ 15 %-ного водного раствора железистосинеродистого калия и 20 см³ 30 %-ного водного раствора сернокислого цинка для осаждения белковых веществ, осторожно перемешивая содержимое после прибавления каждого реактива и оставляют на 30 мин. Объем в колбе доводят дистиллированной водой до метки, хорошо перемешивают, и фильтруют в сухую колбу сначала через двойной слой марли, а затем через бумажный складчатый фильтр. Фильтрат должен быть прозрачным. 100 см³ полученного фильтрата количественно переносят в делительную воронку, нейтрализуют (по лакмусу или универсальной индикаторной бумаге) раствором серной кислоты и добавляют еще 2 см³ указанного раствора серной кислоты при экстракции эфиром. При экстракции хлороформом допускается подкисление соляной кислотой. Добавление кислоты переводит бензойнокислый натрий в бензойную кислоту, которую можно экстрагировать органическим растворителем.

При использовании этилового эфира экстракцию бензойной кислоты проводят последовательно 40, 30 и 30 см³ эфира осторожными вращательными движениями делительной воронки в течение 5 мин (эфирный слой находится сверху, поэтому каждый раз необходимо сначала сливать из делительной воронки нижний водный слой, потом сливать эфирный экстракт, а потом возвращать водный слой для последующей экстракции).

Объединенные в делительной воронке эфирные вытяжки промывают дистиллированной водой три раза по 15 см³, удаляя каждый раз нижний водный слой после отстаивания. Водная фаза последней промывки должна иметь нейтральную реакцию по лакмусу или универсальной индикаторной бумаге.

Эфир из делительной воронки сливают в колбу и отгоняют или выпаривают досуха при температуре водяной бани не выше 40 °С.

При использовании хлороформа экстракцию проводят четыре раза,

последовательно 35; 25; 20 и 15 см³ хлороформа (хлороформный слой находится снизу, поэтому необходимо слить его, после чего в той же воронке можно к водному слою добавить следующую порцию хлороформа).

Каждую экстракцию проводят в течение 5 мин осторожными вращательными движениями делительной воронки. После разделения слоев хлороформ сливают в сухую перегонную колбу, не захватывая водного слоя.

При попадании водного слоя в хлороформную вытяжку ее переносят из колбы в чистую делительную воронку и промывают 15 см³ дистиллированной воды.

Хлороформный слой из делительной воронки сливают в сухую перегонную колбу и отгоняют $\frac{3}{4}$ объема хлороформа на водяной бане при температуре 65-70 °С, остаток выпаривают досуха при температуре (55±5) °С.

К сухому остатку в колбе после удаления эфира или хлороформа добавляют 30-50 см³ этилового спирта, нейтрального по фенолфталеину, 7-10 см³ дистиллированной воды, 2 капли фенолфталеина и титруют раствором гидроксида натрия 0,05 моль/дм³.

Массовую долю бензоата натрия (X) в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{V \cdot K \cdot 0,0071 \cdot V_1 \cdot 100 \cdot K_1}{V_2 \cdot m}, \quad (5.3.1)$$

где V - объем 0,05 моль/дм³ раствора NaOH, израсходованный на титрование, см³;

K – коэффициент пересчета на точно 0,05 моль/дм³ раствор гидроксида натрия;

K_1 – коэффициент, учитывающий полноту экстракции, для этилового эфира – 1,25, для хлороформа – 1,43;

0,0071 - количество бензоата натрия, соответствующее 1 см³ точно 0,05 моль/дм³ раствора NaOH, г;

V_1 – объем, до которого доведена навеска, см³;

V_2 – объем фильтрата, взятый для экстракции, см³;

m – масса исследуемого продукта, г.

Если количество бензоата натрия необходимо выразить в пересчете на бензойную кислоту, то коэффициент 0,0071 заменяют на 0,0061.

5.3.2. Определение массовой доли уротропина (гексаметилентетрамина) методом титрования

Уротропин ранее использовался в качестве консерванта в икорных продуктах, однако в настоящее время использование его в России запрещено. Тем не менее, не исключено нарушение такого запрета, а также возможно присутствие уротропина в продукции, импортируемой из стран, в которых такой запрет отсутствует.

Метод основан на разложении уротропина в кислой среде до формальдегида, окислении его йодом в муравьиную кислоту в щелочной среде с последующим титрованием избытка йода тиосульфатом натрия.

Аппаратура, материалы, реактивы: весы аналитические, электроплитка бытовая; колба плоскодонная вместимостью 2000 см³; холодильник стеклянный лабораторный; колба Кьельдаля вместимостью 500 см³; колба мерная вместимостью 250 см³; кислота соляная концентрированная; кислота ортофосфорная, раствор 250 г/дм³ (25 %-ный); кислота серная, раствор 5 моль/дм³; йода в йодистом калии, раствор 1 моль/дм³; тиосульфат натрия, раствор 0,1 моль/дм³; гидроксид натрия, раствор 1 моль/дм³; крахмал, раствор 10 г/дм³ (1 %-ный).

Приготовление раствора фуксинсернистой кислоты. 0,2 г фуксина (основного) растворяют при нагревании в 120 см³ горячей воды. После охлаждения прибавляют в раствор 2 г безводного сернокислого натрия в 20 см³ воды, 2 см³ концентрированной серной кислоты и доводят объем до 200 см³. Реактив выдерживают в течение суток в темном месте.

Проведение испытания. Перед определением доводят до интенсивного кипения воду в колбе парообразователя отгонного аппарата. К холодильнику отгонного аппарата присоединяют приемную коническую колбу со шлифом, в которую предварительно наливают 5 см³ дистиллированной воды. В колбу Кьельдаля помещают 5—6 г тщательно измельченного продукта, взвешенного с абсолютной погрешностью не более 0,01 г, добавляют 200 см³ дистиллированной воды и энергично перемешивают. Через 30 мин в колбу с навеской прибавляют 10 см³ раствора 250 г/дм³ ортофосфорной кислоты, перемешивают содержимое и немедленно закрывают тщательно пригнанной пробкой, соединяющей колбу с парообразователем с одной стороны, с другой — холодильником через каплеуловитель (во избежание переброса кислоты).

Образовавшийся в кислой среде формальдегид отгоняют с водяным паром через холодильник и собирают в приемной колбе со шлифом. Отгонку проводят до получения 100 - 200 см³ дистиллята.

После получения 100 см³ дистиллята проводят пробу на полноту отгонки формальдегида. Для этого 5 см³ дистиллята смешивают с 1 см³ концентрированной серной кислоты и прибавляют 5 см³ раствора фуксинсернистой кислоты. В присутствии формальдегида жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

Отгонку прекращают после получения отрицательной реакции на формальдегид.

К дистилляту в приемной колбе прибавляют 20 см³ раствора йода в йодистом калии 0,1 моль/дм³, 10 см³ 1 моль/дм³ раствора гидроксида натрия; колбу, плотно закрыв пробкой, взбалтывают и оставляют на 15 мин.

По истечении указанного времени содержимое колбы подкисляют 11 см³ 1 моль/дм³ раствора серной кислоты, избыток йода оттитровывают 0,1 моль/дм³ раствором тиосульфата натрия в присутствии 1 %-ного раствора крахмала.

Параллельно проводят контрольный анализ со свежеперегнанной дистиллированной водой.

Массовую долю уротропина X в процентах вычисляют по формуле

$$X = \frac{(V - V_1) \cdot k \cdot 0,00117 \cdot 100}{m}, \quad (5.3.2)$$

где V – объем 0,1 моль/дм³ раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование йода в контрольном анализе, см³;

V_1 – объем 0,1 моль/дм³ раствора тиосульфата натрия, израсходованный на титрование йода, в рабочем анализе, см³;

K – коэффициент пересчета на точный 0,1 моль/дм³ раствор тиосульфата натрия;

0,00117 – количество уротропина, эквивалентное 1 см³ точного 0,1 моль/дм³ раствора серноватистокислого натрия, г;

m – навеска продукта, г.

Расхождения между параллельными определениями не должно превышать 0,01 %.

5.3.3. Определение сорбиновой кислоты колориметрическим методом

Чаще всего сорбиновую кислоту определяют фотоколориметрическим методом.

Метод основан на окислении сорбиновой кислоты в кислой среде дихроматом калия до малонового альдегида, образующего окрашенный комплекс с тиобарбитуровой кислотой.

Оборудование, материалы, реактивы: фотоколориметр КФК-2 (или аналогичный) или спектрофотометр; магния сульфат кристаллический; серная кислота, 1 н раствор (0,5 моль/дм³) и 0,3 н (0,15 моль/дм³); колба отгонная вместимостью 500 см³; ступка фарфоровая; колба мерная вместимостью 250 см³; пробирка вместимостью 10 см³; кислота тиобарбитуровая, 0,5 % или 0,02 М раствор; кислота уксусная, 90 % раствор; стакан химический вместимостью 150

см³; кислота трихлоруксусная, раствор 200 г/л.

Проведение анализа: для определения содержания сорбиновой кислоты навеску продукта растирают в ступке, помещают в отгонную колбу, в неё вносят 10 г сульфата магния и 10 см³ 1 н. серной кислоты для гарантированного перевода всех нелетучих сорбатов в сорбиновую кислоту. Колбу помещают в установку для перегонки с паром; в качестве приёмника используют пустую мерную колбу. Отгонная колба может дополнительно подогреваться на кипящей бане с 20 % раствором хлорида кальция. За 15 – 20 минут отгоняют примерно 200 см³ дистиллята. Объём дистиллята доводят до метки, после чего из мерной колбы отбирают 2 см³ раствора в пробирку. В пробирку добавляют 1 см³ 0,3 н. серной кислоты и 1 см³ 0,01 н. дихромата калия, кипятят в течение 5 минут, добавляют 5 см³ 0,5 % раствора тиобарбитуровой кислоты. Смесь нагревают 10 минут на водяной бане, после чего фотоколориметрируют при зелёном светофильтре (532 нм). Параллельно строят калибровочный график [16], [14].

В ряде случаев (например, в случае икорных продуктов) определение сорбиновой кислоты можно проводить без отгонки (по ГОСТ 7636-85). При этом навеску массой 1 г тщательно растирают в химическом стакане с 25 см³ дистиллированной воды; смесь выдерживают 25 минут, периодически перемешивая. После этого к содержимому добавляют 10 см³ трихлоруксусной кислоты для осаждения белков. Смесь кипятят 10 минут при непрерывном перемешивании. Содержимое стакана фильтруют в мерную колбу вместимостью 500 см³; стакан и осадок промывают дистиллированной водой, фильтруя её в ту же колбу. Фильтрат не должен мутнеть при добавлении капли трихлоруксусной кислоты. Далее в той же колбе проводят реакцию окисления, добавляя 10 см³ 0,02 М дихромата калия, 15 см³ 0,02 М тиобарбитуровой кислоты и выдерживают 30 минут в кипящей водяной бане. После этого

содержимое колбы охлаждают, доводят до метки дистиллированной водой и перемешивают. После этого проводят фотоколориметрирование при длине волны 532 нм. Параллельно проводят контрольный опыт без вытяжки.

Для построения калибровочного графика готовят стандартный раствор сорбиновой кислоты, растворяя 0,1 г свежеприготовленной (путём возгонки или перекристаллизации) сорбиновой кислоты в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1 л (сначала её заполняют на $\frac{3}{4}$ объёма, добиваясь полного растворения путём перемешивания, а потом доводят до метки). В мерные колбы вместимостью 500 см³ вносят по 0, 5, 10, 15, 20, 25 см³ стандартного раствора (содержание сорбиновой кислоты соответственно 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 мг). Содержимое колбы доводят до $\frac{1}{2}$ объёма дистиллированной водой, а далее проводят цветную реакцию и фотоколориметрирование аналогично рабочему опыту. Опыт повторяют три раза, включая приготовление стандартного раствора сорбиновой кислоты. Калибровочный график строят, откладывая по оси ординат значение оптической плотности, а по оси абсцисс – содержание сорбиновой кислоты в мерной колбе в мг.

Содержание сорбиновой кислоты в рабочем опыте определяют по калибровочному графику. Для пересчёта на массовую долю используют формулу

$$X = \frac{m_1 \cdot 100}{m \cdot 1000} , \quad (5.3.3)$$

где m – масса навески, г;

m_1 – содержание сорбиновой кислоты по калибровочному графику, мг;

1000 – коэффициент перевода мг в г;

100 – пересчёт из долей единицы в проценты.

5.3.4. Совместное определение сорбиновой и бензойной кислот методом ВЭЖХ [14]

Оборудование, материалы, реактивы: высокоэффективный жидкостной хроматограф с колонкой Hypersil ODS (60x4,6 мм) и с диодно-матричным детектором; ацетат аммония, 5 ммоль/дм³ (рН=3,8); ацетонитрил х.ч. (для хроматографии); фильтр мембранный; баня ультразвуковая; кислота уксусная.

Проведение анализа: при использовании продуктов с низкой жирностью проводят экстракцию консервантов из продукта в ультразвуковой бане при добавлении раствора ацетата аммония, уксусной кислоты и метанола. После этого смесь фильтруют (в случае мутных растворов – с использованием мембранного фильтра).

При использовании продуктов сложного состава с высокой жирностью следует проводить отгонку консервантов с паром при предварительном подкислении.

Полученный фильтрат подвергают хроматографированию при комнатной температуре; поток 4 см³/мин. В качестве подвижной фазы используется 5мМ раствор ацетата аммония с рН 3,8 (А) и ацетонитрил (В); создают градиент: в 0 минут – 10 % В, в 3 минуты – 60 % В; в 5 минут – 90 % В. Сигнал регистрируют при длинах волн 260 и 235 нм.

5.4. Методы определения содержания канцерогенных веществ

Среди канцерогенных и проканцерогенных веществ, содержащихся в пищевых (в т.ч. рыбных) продуктах выделяют N-нитрозамины и полициклические ароматические углеводороды (ПАУ).

Содержание ПАУ особенно характерно для копчёных продуктов, так как эта группа веществ входит в состав коптильного дыма, если он был получен при высоких температурах пиролиза древесины.

Особенностью ПАУ является их способность к флуоресценции, поэтому целесообразно определять их флуориметрическим методом или методом ВЭЖХ с использованием флуориметрического детектора (существует также метод

ГЖХ). Между тем, содержание ПАУ в пищевых продуктах настолько низко (даже на предельно допустимом уровне и выше³⁵), что методы прямой флуориметрии и даже ВЭЖХ всей липидной фракции (в которой растворены ПАУ) не позволят определить их содержание с достаточной точностью. Поэтому пробоподготовка при определении содержания ПАУ включает в себя концентрирование этих веществ. Один из вариантов пробоподготовки приведён далее (по [13]).

Оборудование, материалы, реактивы.

Спирт этиловый; калия гидроксид (кристаллический); эфир серный; мясорубка; колбы конические термостойкие (2 дм³); натрия сульфат безводный; воронки делительные; колонка с оксидом алюминия.

Продукт тщательно измельчают на мясорубке, отбирают навеску массой 1 кг, добавляют 1 дм³ этанола и 150-250 г кристаллического гидроксида калия [13], после чего проводят омыление путём кипячения в течение 1,5 – 2 ч. После этого к системе добавляют 3-5 кратный объём воды, и проводят экстракцию неомыляемой фракции серным эфиром 4 – 5 раз (порции эфира должны быть в 5 – 15 раз больше объёма обрабатываемого раствора).

Эфирный экстракт промывают сначала слабокислым раствором, а потом – несколько раз водой; обезвоживают над безводным сульфатом натрия. Эфир отгоняют; остаток растворяют в бензоле пропускают через колонку с оксидом алюминия. ПАУ элюируют из колонки бензолом до исчезновения у очередной порции элюата синей флуоресценции. Полученная смесь ПАУ может быть в дальнейшем разделена путём фракционирования методом колоночной или тонкослойной хроматографии [13]. В настоящее время более перспективным является использование метода ВЭЖХ.

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m} \Delta E$$

35

накапливаться в организме человека

Что и не удивительно, т.к. эти канцерогенные вещества способны

Другим вариантом пробоподготовки является тройная экстракция ПАУ хлористым метиленом и последующее концентрирование на колонке с силикагелем [14].

При использовании метода ВЭЖХ, как правило, проводят градиентное элюирование ПАУ на различных колонках (RP ODSSil-X 2,6 мм; LC-PAH 4,6 мм и др.). Подвижной фазой, как правило, является смесь воды и ацетонитрила. Хроматографию ведут градиентным методом с переходом от 60 % ацетонитрила к 90-100 % ацетонитрила в конце элюирования [14]. При использовании детектора фотометрического типа (например, диодно-матричного) определение проводят при длине волны поглощения 270 нм.

5.5. Методы определения содержания фенолов

Фенолы присутствуют в копчёных рыбных продуктах как один из компонентов коптильного дыма. С одной стороны, фенолы обуславливают технологические эффекты копчения (вкус, аромат, в какой-то степени они стабилизируют окраску, обладают консервирующим действием). С другой стороны, в больших количествах фенолы могут оказывать токсический и (по некоторым данным) даже канцерогенный эффект. Таким образом, содержание фенолов в копчёных рыбных продуктах может рассматриваться как показатель безопасности.

Наиболее распространённым методом определения содержания фенолов является метод, основанный на окислении фенолов в щелочной среде гексацианоферратом (III) калия и взаимодействии хинонов с 4-аминоантипирином с образованием окрашенных соединений [7].

Существует несколько разновидностей этого метода, отличающихся

пробоподготовкой.

Один из вариантов предполагает дистилляцию фенолов из раствора хлорида лития.

Оборудование, материалы, реактивы: фотоколориметр КФК-2 (или аналогичный) или спектрофотометр, раствор хлорида лития 30 %, гомогенизатор; раствор 4-аминоантипирина 2 %, раствор тетрабората натрия 0,5 %, раствор гексацианоферрата (III) калия 8 %.

Навеску продукта массой 10 г, взвешенную с точностью до 0,01 г гомогенизируют с дистиллированной водой в соотношении 1:4 в течение 5 – 6 минут с частотой 8 об/с. После гомогенизации смесь количественно переносят дистиллированной водой (объёмом 10 см³) в отгонную колбу (в упрощённом варианте, используемом, в частности, для консервов «Шпроты в масле», достаточно перекручивания фарша через мясорубку без гомогенизации). К содержимому колбы добавляют 100 см³ 30 % раствора хлорида лития (для повышения температуры кипения раствора до 120-170 °С) и проводят отгонку фенолов до получения 100 см³ дистиллята [7].

Далее к 5 см³ дистиллята или фильтрата добавляют 0,5 см³ 2 % раствора 4-аминоантипирина, 20 см³ 0,5 % раствора тетрабората натрия (рН 10,5) и 0,25 см³ 8 % раствора гексацианоферрата (III) калия. Через 10 минут определяют оптическую плотность раствора при длине волны 500-510 нм.

Альтернативным методом подготовки проб³⁶ является гомогенизация навески продукта с четырёхкратным объёмом 50 % раствора ацетона в течение 5 минут, с последующим фильтрованием [13]. Содержание фенолов в

$$X = \frac{0,01 \cdot K \cdot (V_1 - V) \cdot 1000}{m} \Delta E$$

³⁶

В оригинале метод был предназначен для колбасных продуктов, но эксперименты, проведённые на кафедре ТПП Мурманского государственного технического университета, показали возможность его применения и для рыбных продуктов (точность метода понижается)

фильтрате определяют аналогично.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Биологические методы анализа* / Шеховцова Т. Н. // СОЖ. — 2000. — № 11. — С. 17...21.
2. *Пентин Ю. А. Физические методы исследования в химии* / Ю. А. Пентин, Л. В. Вилков. — М. : Мир, 2003. — 683 с.
3. *Крусь Г. Н. Методы исследования молока и молочных продуктов* / Г. Н. Крусь, А. М. Шалдыгина, З. В. Волокитина ; под общ. редакцией А. М. Шалдыгиной. — М. : КолосС, 2002. — 368 с.
4. *Иванова М. А. Аналитическая химия и физико-химические методы анализа: учеб. пособие* / М. А. Иванова, М. В. Белоглазкина, И. В. Богомолова [и др.]. — М. : Издательство РИОР, 2006. — 289 с.
5. *Родина Т. Г. Сенсорный анализ продовольственных товаров* / Т. Г. Родина. — М. : Академия, 2004. — 208 с.
6. *Сафронова Т. М. Справочник дегустатора рыбной продукции.* — М. : ВНИРО, 1998. — 244 с.
7. *Головина А. Н. Контроль продукции из водного сырья* / А. Н. Головин. — М. : Колос, 1992. — 255 с.
8. *Волченко В. И. Совершенствование технологии консервов из печени гидробионтов : Дисс. ... канд. техн. наук (05.18.04)* / В. И. Волченко. — Мурманск, 2004. — 163 с.
9. *Angelika Gratzfeld-Huesgen. Analysis of hydrolyzed fatty acids in dietary fat using HPLC.* — Agilent technologies, 1997. Publication number 5966-0635E. — 2 с.
10. *HPLC in food analysis* / Ed. by R. Macrae. — 2d ed. — London etc. : Acad. Press, 1988. — XIV, 502 с.

11. *RainerSchuster*. Analysis of unsaturated triglycerides using HPLC. — Agilent technologies, 1997. Publicationnumber 5966-0744E. — 2 с.
12. *Чиркина Т. Ф.* Методические указания к выполнению лабораторного практикума по курсу «Пищевая химия» для студентов пищевых специальностей / Т. Ф. Чиркина, Э. Б. Битуева. — Улан-Удэ, 2000. — 40 с.
13. *Антипова Л. В.* Методы исследования мяса и мясопродуктов / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, И. А. Рогов. — М. : КолосС, 2004. — 571 с.
14. *Анализ пищевых продуктов.* — http://www.anchem.ru/chromos/an_food.pdf (июнь-июль 2007).
15. *Шибанов В. Н.* Практикум по физико-химическим методам анализа : учеб. пособие / В. Н. Шибанов, В. Г. Тараненко. — Мурманск, 1996. — 206 с.
16. *Лурье И. С.* Технохимический и микробиологический контроль в кондитерском производстве. Справочник / И. С. Лурье, Л. Е. Скокан, А. П. Цитович. — М. : КолосС, 2003. — 416 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1.

Балльная шкала для оценки органолептических показателей филе рыбного мороженого [6]

Комплексные показатели	Единичные показатели	Словесная характеристика баллов	Баллы
Внешний вид	Форма блока	Правильная, поверхность блока ровная, чистая	5
		Правильная, с незначительными впадинами	4
		Правильная, незначительные разрыхления мяса на кромке блока	3
		Поверхность блока неровная, разрыхление мяса на кромке блока значительное	2
		Значительное отклонение от правильной формы блока	1

Механические повреждения глазури	При легком постукивании глазурь не отстает от блока	5	
	При легком постукивании отстает от блока	3	
	незначительное количество глазури		
	При легком постукивании отстает	1	
Равномерность нанесения глазури	значительное количество глазури		
	Толщина слоя глазури одинаковая	5	
	Толщина слоя глазури местами отличается	3	
Целостность блоков	Толщина слоя глазури неодинакова по всей поверхности блока	1	
	Без нарушений целостности	5	
Разделка	С незначительными нарушениями	3	
	Со значительными нарушениями	1	
	Правильная	5	
Цвет мяса	Малозаметные отклонения от правильной	4	
	Небольшие отклонения от правильной	3	
	Заметные отклонения от правильной	2	
	Значительные отклонения от правильной	1	
	Свойственный данному виду филе	5	
Запах	Светло-серый	3	
	Серый	1	
	Свойственный свежему филе	5	
	Умеренно интенсивный	4	
	Слабо выражен	3	
	Едва уловим	2	
Консистенция	Отсутствует	1	
	Плотность	Плотная, присущая данному виду рыбы	5
		Плотная, с едва заметным расслоением по септам	4
	Сочность	Плотная с незначительным продольным расслоением по септам	3
		Расслаивается по септам	2
		Крошащаяся	1
	Сочность	Очень сочная	5
		Сочная	4
		Суховатая	3
		Сухая	2

ПРИЛОЖЕНИЕ 2.

Методика определения сенсорной чувствительности

Оборудование, материалы реактивы: набор посуды, столовые приборы, сахароза, хлористый натрий, винная кислота, кофеин.

Для приготовления вкусовых растворов используют хлористый натрий, сахарозу, винную кислоту, солянокислый хинин (или кофеин). Растворы готовят на дистиллированной воде. Все вещества должны быть марки ХЧ или ЧДА. Для приготовления растворов пахучих веществ используют коптильный препарат укропное масло, уксусную кислоту и этиловый спирт. Предварительно готовят основные растворы, таблица 3.1.4.

Таблица П2.4 – Основные растворы

Вещество	Концентрация, %	Вещество	Концентрация, %
Сахароза	10,0	Коптильная жидкость	$1 \cdot 10^{-3}$
Хлористый натрий	1,0	Укропное масло	$1 \cdot 10^{-5}$
Винная кислота	1,0	Уксусная кислота	1,0
Солянокислый хинин	0,1	Этиловый спирт	5,0

Кофеин 0,1

Приготовленные растворы можно хранить в холодильнике в течение 7 – 10 дней. Рабочие растворы готовят из основных путем соответствующего разбавления.

Таблица П2.5 – Рабочие растворы для распознавания дегустатором основных видов вкуса

Вкус	Вещество	Концентрация рабочего раствора, г / 100см ³
Сладкий	Сахароза	0,08
Соленый	Хлористый натрий	0,25
Кислый	Винная кислота	0,02
Горький	Кофеин	0,001

Растворы для определения вкуса разливают в колбы емкостью по 100 см³, при этом растворы сахарозы, хлористого натрия и винной кислоты разливают в две колбы, а кофеина в три. Колбы шифруют и предлагают для дегустации.

Растворы для определения обонятельного разливают в девять пробирок, к при этом растворы уксусной кислоты, копильной жидкости и укропного масла разливают каждый в две пробирки, а этилового спирта в три. Пробирки шифруют и предлагают для определения запаха.

Проведение испытания на вкусовой дальтонизм

Испытуемое лицо должно определить вкус проб, вводя поочередно по 5-10 см³ каждого из 9 растворов в полость рта с помощью ложки из нержавеющей стали. Раствор должен омывать всю ротовую полость, так как различные области языка различают вкус по разному.

Между пробами раствора соблюдают паузу в 1-2 мин. Для нейтрализации вкусовых ощущений ротовую полость и гортань прополаскивают чаем (3-4 ложки сахара на 1 л кипятка).

Результаты испытаний записывают в бланк протокола 1, в котором знаком "+" обозначают соответствие вкуса.

Протокол №1

Определение способности распознавать основные виды вкуса

Ф.И.О. _____

Дата _____

	Номера пробы								
Вкус	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Сладкий									
Соленый									
Кислый									
Горький									

При правильном распознавании всех девяти вкусов или распознавании их не более чем с двумя ошибками считают, что испытуемое лицо способно различать основные виды вкуса.

Проведение испытания на обонятельный дальтонизм

Для определения запаха 9 приготовленных проб растворов поочередно подносят на расстояние 2-3 см от кончика носа на время примерно 0,5 с, а затем задерживают дыхание на такое же время. Для снятия утомления органов обоняния соблюдают паузы между определением запаха отдельных проб в

течение 1-2 мин.

Результаты испытаний обонятельных ощущений заносят в протокол 2

ПРОТОКОЛ № 2

Определение способности распознавать основные виды запаха

Ф,И.О. _____

Дата _____

Запах	Номера пробы								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Уксусной									
кислоты									
Коптильной									
жидкости									
Укропного									
масла									
Спирта									

При правильном распознавании всех девяти запахов или распознавании их не более чем с двумя ошибками считают, что испытуемое лицо способно различать запахи.

Определение пороговой концентрации распознавания вкусовых веществ

Для определения пороговой концентрации распознавания вкусовых веществ готовят растворы четырех видов вкусовых веществ различных концентраций, разливают их в 20 колб, при этом в 4 колбы наливают дистиллированную воду. Все колбы нумеруют. Концентрация веществ и порог чувствительности приведены в таблице 3.1.6.

Определяют порог вкусовой чувствительности методом единичного стимула,

т.е. дегустатор получает единичные образцы, содержащие растворы вкусовых веществ различной концентрации, начиная с раствора, содержащего наименьшее количество вкусового вещества. Результаты испытаний заносят в протокол 3. Таблица 3.1.6 – Концентрация растворов вкусовых веществ при определении

порога чувствительности по вкусу

Вкус	Вещество	Концентрация %	Порог чувствительности
Сладкий	Сахароза	0,2	Высокий
		0,4	Значительный
		0,6	Средний
		0,8	Низкий
Соленый	Хлористый натрий	0,05	Высокий
		0,10	Значительный
		0,13	Средний
		0,15	Низкий
Кислый	Винная кислота	0,003	Высокий
		0,005	Значительный
		0,008	Средний
Горький	Солянокислый хинин	0,015	Низкий
		$5 \cdot 10^{-6}$	Высокий
		$10 \cdot 10^{-6}$	Значительный
		$15 \cdot 10^{-6}$	Средний
		$20 \cdot 10^{-6}$	Низкий

ПРОТОКОЛ №3

Определения индивидуальной пороговой концентрации распознавания вкусовых веществ

Ф,И,О. _____

Дата _____

Вкус	Номер пробы																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Сладкий	2																			
Соленый																				
Кислый																				
Горький																				

Лица, имеющие низкий порог чувствительности хотя бы по одному из четырех типов вкуса, к дегустационным испытаниям не допускаются.

Определение порога чувствительности по запаху

Для определения порога чувствительности по запаху готовят растворы четырех пахучих веществ различной концентрации. Концентрация веществ и порог чувствительности приведены в таблице 3.1.7. Пробы разливают в 20 колб, при этом в 4 колбы наливают дистиллированную воду. Все колбы нумеруют и предлагают для испытаний. Результаты испытаний заносят в протокол 4.

Таблица 3.1.7 - Концентрация растворов пахучих веществ при определении порога чувствительности по запаху

Вещество	Концентрация, %	Порог чувствительности
Уксусная кислота	0,10	Высокий
	0,15	Значительный
	0,20	Средний
	0,25	Низкий
Коптильная жидкость	$1 \cdot 10^{-5}$	Высокий
	$5 \cdot 10^{-5}$	Значительный
	$1 \cdot 10^{-4}$	Средний

	$15 \cdot 10^{-4}$	Низкий
Укропное масло	$1 \cdot 10^{-8}$	Высокий
	$5 \cdot 10^{-9}$	Значительный
	$15 \cdot 10^{-9}$	Средний
	$2 \cdot 10^{-8}$	Низкий
Этиловый спирт	0,15	Высокий
	0,25	Значительный
	0,50	Средний
	0,75	Низкий

ПРОТОКОЛ №4

**Определения индивидуальной пороговой концентрации
распознавания запаха**

Ф,И.О. _____

Дата _____

Запах	Номер пробы																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Уксусной кислоты																				
Коптильной жидкости																				
Укропного масла																				
Спирт																				

Лица, имеющие низкий порог чувствительности хотя бы по одному из четырех типов вкуса, к дегустационным испытаниям не допускаются.

Определение способности различать разницу во вкусе

Для определения способности различать разницу во вкусе готовят растворы хлористого натрия в концентрациях, указанных в табл. 3.1.8.

Таблица 3.1.8- Концентрации растворов при определении порога разницы вкуса

Количество параллельных проб	Концентрация растворов	Порог разницы вкуса
3	0,20 - 0,05	Низкий
3	0,15 - 0,05	Средний
3	0,13 - 0,05	Значительный
3	0,10 - 0,05	Низкий

Определение порога разницы вкуса и запаха проводят методом парных сравнений. Сущность метода состоит в том, что испытуемым дают две пробы и им нужно ответить на вопрос: можно ли распознать различие между двумя пробами и какая имеет более интенсивный вкус. Результаты проверки заносят в протоколы 5.

ПРОТОКОЛ № 5

Определения способности различать разницу во вкусе

Ф,И.О. _____

Дата _____

Вкус	Номер пары							
	1		2		3		4	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Соленый								
	9	10	11	12	13	14	15	16
	17	18	19	20	21	22	23	24

Определение способности различать разницу во вкусе

Для определения способности различать разницу в запахе готовят растворы уксусной кислоты, концентрацией, указанной в таблице 3.1.9.

Таблица 3.1.9 - Концентрации растворов при определении порога разницы запаха

Количество параллельных проб	Концентрация растворов уксусной кислоты, %	Порог разницы вкуса
2	0,30 - 0,10	Низкий
2	0,25 - 0,10	Средний
2	0,20 - 0,10	Значительный
2	0,30 - 0,10	Низкий

Способность распознать запах проводят методом параллельных сравнений. Результаты проверки заносят в протокол 6

Протокол № 6

Определения способности различать разницу в запахе

Ф,И.О. _____

Дата _____

Запах	Номер пары							
	1		2		3		4	
	1	2	3	4	5	6	7	8
Уксусная кислота								

Испытуемый должен правильно различать не менее двух параллельных проб с одинаковой разницей концентрации растворов. Лиц, имеющих низкий порог разницы запаха, к работе в качестве дегустаторов не допускают.

ПРИЛОЖЕНИЕ 3

Методика органолептической оценки рыбных продуктов с применением балльных шкал

Цель работы: приобрести практический навык органолептической оценки рыбных продуктов и применением балльных шкал

Оборудование, материалы: Набор посуды, столовые приборы.

Проведение испытаний. После получения задания группа студентов знакомится с требованиями нормативной документации к качеству оцениваемой продукции и разрабатывает пятибалльную балльную шкалу для органолептической оценки качества продукта.

Для этого необходимо в соответствии со стандартом, регламентирующим показатели качества продукции, определить комплексные и единичные показатели качества, их коэффициенты значимости, разработать словесную характеристику каждого уровня качества с присвоением соответствующего балла. Балльная шкала оформляется в виде таблицы.

Таблица 3.1.9 – Балльная шкала для оценки органолептических показателей

Комплексные и единичные показатели	Коэффициент значимости	Словесная характеристика качества	Балл

Образцы готовятся к дегустации в соответствии с требованиями нормативной документации. Перед проведением дегустации преподаватель (или дегустатор) дает краткую информацию о представленном образце продукции.

Для каждого образца продукции готовятся дегустационные листы (табл.). проводится их дегустация. Студенты-дегустаторы (5- 6 человек) проставляют в дегустационные листы баллы по каждому показателю качества в соответствии с

балльной шкалой.

Сначала оценивается целый (неразрезанный продукт), а затем разрезанный. При оценке целого продукта визуально путем осмотра определяют внешний вид, цвет, состояние поверхности, определяют запах на поверхности продукта. При необходимости определяют запах внутри продукта путем введения ножа или специальной иглы в толщу продукта. Консистенцию определяют путем надавливания пальцем или шпателем.

После оценки продукта в неразрезанном виде его разрезают на кусочки или ломтики и оценивают: цвет мяса на разрезе; запах, аромат, вкус и консистенцию опробованием кусочков мяса.

После заполнения дегустационных листов производится их обработка, при которой определяется суммарный балл качества и устанавливается уровень качества продукта. Делается вывод о качестве продукта.

Дегустационный лист №

Вид продукции _____

Показатель качества	К _{зн}	Оценки дегустаторов, балл						Сред	Средний
		1	2	3	4	5	6		

Дегустаторы:

1. Ф.И.О. _____ (подпись)

2. _____

3. _____

4. _____

5. _____

6. _____

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Поправки к показателю преломления в зависимости от температуры

Таблица

Т, °С	Поправка	Т, °С	Поправка	Т, °С	Поправка	Т, °С	Поправка	Т, °С	Поправка
Отнять от показания преломления									
15,0	0,0022	15,0	0,0018	15,0	0,0013	15,0	0,0009	15,0	0,0004
,1	0,0022	,1	0,0017	,1	0,0013	,1	0,0008	,1	0,0004
,2	0,0021	,2	0,0017	,2	0,0012	,2	0,0008	,2	0,0004
,3	0,0021	,3	0,0016	,3	0,0012	,3	0,0007	,3	0,0003
,4	0,0020	,4	0,0016	,4	0,0011	,4	0,0007	,4	0,0003
,5	0,0020	,5	0,0016	,5	0,0011	,5	0,0007	,5	0,0002
,6	0,0019	,6	0,0015	,6	0,0011	,6	0,0006	,6	0,0002
,7	0,0019	,7	0,0015	,7	0,0010	,7	0,0006	,7	0,0001
,8	0,0018	,8	0,0014	,8	0,0010	,8	0,0005	,8	0,0001
,9	0,0018	,9	0,0014	,9	0,0009	,9	0,0005	,9	0,0000
Прибавить к показанию преломления									
20,0	0,0000	22,0	0,0009	24,0	0,0018	26,0	0,0026	28,0	0,0035
,1	0,0000	,1	0,0009	,1	0,0018	,1	0,0027	,1	0,0036
,2	0,0001	,2	0,0010	,2	0,0018	,2	0,0027	,2	0,0036
,3	0,0001	,3	0,0010	,3	0,0019	,3	0,0028	,3	0,0037
,4	0,0002	,4	0,0011	,4	0,0019	,4	0,0028	,4	0,0037
,5	0,0002	,5	0,0011	,5	0,0020	,5	0,0029	,5	0,0037
,6	0,0003	,6	0,0011	,6	0,0020	,6	0,0029	,6	0,0038
,7	0,0001	,7	0,0012	,7	0,0021	,7	0,0029	,7	0,0038
,8	0,0003	,8	0,0012	,8	0,0021	,8	0,0030	,8	0,0039
,9	0,0004	,9	0,0013	,9	0,0022	,9	0,0030	,9	0,0039
21,0	0,0004	23,0	0,0013	25,0	0,0022	27,0	0,0031	29,0	0,0040
,1	0,0004	,1	0,0014	,1	0,0022	,1	0,0031	,1	0,0040
,2	0,0005	,2	0,0014	,2	0,0023	,2	0,0032	,2	0,0040
,3	0,0006	,3	0,0015	,3	0,0023	,3	0,0032	,3	0,0041
,4	0,0006	,4	0,0015	,4	0,0024	,4	0,0033	,4	0,0041
,5	0,0007	,5	0,0015	,5	0,0024	,5	0,0033	,5	0,0042
,6	0,0007	,6	0,0016	,6	0,0025	,6	0,0033	,6	0,0042
,7	0,0007	,7	0,0016	,7	0,0025	,7	0,0034	,7	0,0043
,8	0,0008	,8	0,0017	,8	0,0026	,8	0,0034	,8	0,0043
,9	0,0008	,9	0,0017	,9	0,0026	,9	0,0035	,9	0,0044

ПРИЛОЖЕНИЕ 5
Пересчёт количества меди на сахар

Таблица

Медь.	Инверт ный сахар. мг	Саха роза	Медь.	Инверт ный сахар	Саха- роза	Медь.	Инвер тный сахар	
-------	-------------------------------	--------------	-------	------------------------	---------------	-------	------------------------	--

20,6	10	9,50	79,5	41	38,95	130,8	71	67,45
22,6	11	10,45	81,2	42	39,90	132,4	72	68,40
24,6	12	11,40	83,0	43	40,85	134,0	73	60,35
26,5	13	12,35	84,8	44	41,80	135,6	74	70,30
28,5	14	13,30	86,5	45	42,75	137,2	75	71,25
30,5	15	14,25	88,3	46	43,70	138,9	76	72,30
32,5	16	15,20	90,1	47	44,60	140,5	77	73,15
34,5	17	16,15	91,9	48	45,60	142,1	78	74,10
36,4	18	17,10	93,6	49	46,55	143,7	79	75,06
38,4	19	18,05	95,4	50	47,50	145,3	80	76,00
40,4	20	19,00	97,1	51	48,45	146,9	81	76,95
42,3	21	19,95	98,9	52	49,40	148,5	82	77,90
44,2	22	20,90	100,6	53	50,35	150,0	83	78,85
46,1	23	21,85	102,3	54	51,30	151,6	84	79,80
48,0	24	22,80	104,0	55	52,25	153,6	85	80,75
49,8	25	23,75	105,7	56	53,20	154,8	86	81,70
51,7	26	24,70	107,4	57	54,15	156,4	87	82,65
53,6	27	25,60	109,2	58	55,10	157,9	88	83,60
55,5	28	26,60	110,9	59	56,05	159,5	89	84,65
57,4	29	27,55	112,6	60	57,00	161,1	90	85,50
59,3	30	28,50	114,3	61	57,59	162,6	91	86,45
61,1	31	29,45	115,2	62	58,90	164,2	92	87,40
63,0	32	30,40	117,6	63	59,85	165,7	93	88,35
64,8	33	31,35	119,3	64	60,80	167,3	94	89,30
66,7	34	32,30	120,9	65	61,75	168,8	95	90,25
68,5	35	33,25	122,6	66	62,70	170,3	96	91,20
70,3	36	34,20	124,2	67	63,65	171,9	97	92,15
72,3	37	35,15	125,9	68	64,60	173,4	98	93,10
74,0	38	36,10	127,5	69	65,55	175,0	99	94,05
75,9	39	37,05	129,2	70	66,50	170,5	100	95,00
77,7	40	38,00						

