

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

Кафедра ТПП

**Инструментальные методы анализа сырья и
пищевой продукции**

Методические указания к выполнению лабораторных работ для
студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению
19.03.04 «Технология производства и организация общественного питания»
19.03.03 «Продукты питания животного происхождения»
19.03.01 «Биотехнология»

Мурманск

2020

Составитель: Василий Игоревич Волченко, канд. техн. наук, профессор кафедры технологий пищевых производств

Оглавление

Лабораторная работа № 1. Фотоколориметрия. Определение содержания редуцирующих сахаров и общего сахара в пищевых продуктах	4
Лабораторная работа № 2. Спектрофотометрия. Определение альдегидного числа жира.....	11
Лабораторная работа № 3. Поляриметрический метод: определение содержания сахарозы в шоколадных изделиях.....	15
Лабораторная работа № 4. Потенциометрический метод. Определение содержания нитратов и нитритов в колбасных изделиях	17
Лабораторная работа № 4. Определение жирнокислотного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.....	19
Расчётно-графическое задание (РГЗ) по дисциплине Ошибка! Закладка не определена.	
Рекомендуемая литература	23

Лабораторная работа № 1. Фотоколориметрия. Определение содержания редуцирующих сахаров и общего сахара в пищевых продуктах

1.1. Краткие теоретические сведения

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 [1, 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. 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 практически равна 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].

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:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon_{\lambda} \cdot l \cdot C}, \quad (1.1)$$

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 (1.1), [3]

$$D = \varepsilon_{\lambda} \cdot C \cdot l \quad (1.2)$$

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 графика.

Следует отметить, что закон Бугера-Ламберта-Бера не всегда выполняется очень точно, особенно в области высоких концентраций.

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 свет. 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, количество которого точно соответствует количеству исследуемого вещества (т.е. все реагенты добавляют в избытке).

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.

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.

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.

1.1 Оборудование, материалы, реактивы:

1 %-ный раствор железосинеродистого калия; раствор гидроксида натрия, 2,5 моль/дм³ (2,5 н), раствор метиленового голубого, 10 г/дм³ (1 %); раствор гексацианоферрата (II) калия (II), 150 г/дм³ (15 % железистосинеродистый калий), 30 %-ный раствора сернокислого цинка, 1 н раствор гидроксида натрия, соляная кислота плотностью 1190 кг/м³, 20 %-ный раствор гидроксида натрия, 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.

1.2 Приготовление стандартного раствора глюкозы

1,6 г безводной глюкозы взвешивают с точностью до 0,0002 г и растворяют в мерной колбе вместимостью 1000 см³. Предварительно глюкозу выдерживают в эксикаторе над свежеприготовленным хлоридом кальция в течение 3 суток. После растворения навески раствор в колбе доводят до метки. Если раствор готовят на месяц, необходимо внести в колбу 150 г хлорида натрия и хранить в холодильнике.

Стандартный раствор содержит 1,6 мг/см³ глюкозы.

1.3 Построение градуировочного графика

В 6 конических термостойких колб вместимостью 100 см³ вносят пипеткой по 25 см³ щелочного раствора гексацианоферрата (III) калия и (в каждую колбу соответственно) 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 11,0; 15,0 см³ стандартного раствора глюкозы. Дистиллированной водой из бюретки (или градуированной пипетки) доводят объем жидкости в каждой колбе до 41 см³. Содержимое колб доводят до кипения за 3 мин и кипятят в течение 1 мин, закрыв каждую часовым стеклом.

Содержимое каждой колбы охлаждают и количественно переносят с небольшим объёмом дистиллированной воды в мерные колбы вместимостью 50 см³ и доводят объём до метки.

Затем измеряют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре со светофильтром, имеющим $\lambda_{эф} = 440$ нм (синий светофильтр). Раствором сравнения служит дистиллированная вода. Кювету подбирают такого размера, чтобы оптическая плотность была в пределах 0,3 - 0,6 для раствора, содержащего 9 см³ раствора глюкозы. В случае очень высокой чувствительности спектрофотометра, не позволяющей проводить измерения даже в случае кювет с минимальной доступной толщиной слоя, возможно незначительное изменение длины волны.

Оптическую плотность определяют в каждом растворе не менее 3 раз и из полученных данных берут среднее арифметическое значение. Строят график зависимости величины оптической плотности от концентрации глюкозы в растворе. Полученный график используют для определения содержания общего сахара, восстанавливающих сахаров и сахарозы.

1.4 Подготовка пробы

Навеску (от 7 до 30 г в зависимости от ожидаемого количества углеводов, или 20 см³ раствора), 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. 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.

1.5 Определение восстанавливающих сахаров

В коническую колбу вместимостью 100-150 см³ вносят 10 см³ раствора пробы, 6 см³ дистиллированной воды и затем 25 см³ щелочного раствора гексацианоферрата калия. Колбу нагревают до кипения за 3 мин, кипятят 1 мин и охлаждают. Содержимое колбы количественно переносят с небольшим объёмом дистиллированной воды в мерные колбы вместимостью 50 см³ и доводят объём до метки и измеряют оптическую плотность при длине волны, при которой был построен калибровочный график. Раствор сравнения –

дистиллированная вода. Кювету берут размером, аналогичным взятому для построения градуировочного графика. Если оптическая плотность раствора не попадает в интервал 0,2-0,8, необходимо взять меньшую пробы или поменять разведение. Результаты вычисляют, пользуясь градуировочным графиком и приведенной формулой.

Содержание редуцирующих сахаров ($X_{рс}$) в процентах, выраженное в глюкозе, вычисляют по формуле:

$$X_{рс} = \frac{M \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot m},$$

где M – количество глюкозы, найденное по градуировочному графику, мг;

V – объем исследуемого раствора, приготовленного из навески. м^3 ;

V_1 – объем раствора, взятый для реакции с гексацианоферратом калия, см^3 ;

m – масса навески объекта исследования, мг.

1.6. Определение общего сахара

Для определения общего сахара проводят гидролиз сахарозы. В реакционную коническую колбу вместимостью 100-150 см^3 отмеряют пипеткой 10 см^3 приготовленной вытяжки объекта и 4 см^3 1М раствора хлороводородной кислоты. Колбу ставят на плитку, жидкость доводят до кипения и кипятят 1 мин, охлаждают до комнатной температуры, затем в колбу вносят 2 см^3 2М раствора гидроксида натрия (или калия) для нейтрализации кислоты и 25 см^3 щелочного раствора гексацианоферрата (III) калия. Содержимое колбы доводят до кипения и кипятят 1 мин. После охлаждения содержимое колбы количественно переносят с небольшим объёмом дистиллированной воды в мерные колбы вместимостью 50 см^3 и доводят объём до метки.

Полученным раствором заполняют кювету и определяют оптическую плотность. Так как при значении оптической плотности в интервале 0,2-0,8 получаются более точные результаты, то при других значениях оптической плотности анализ повторяют, изменив объем вводимой водной вытяжки объекта исследования, добавив такое количество воды, чтобы общий объем составлял 10 см^3 .

Содержание общего сахара (X_{oc}) в процентах, выраженное в глюкозе, вычисляют по формуле, аналогичной п. 3.5:

$$X_{oc} = \frac{M \cdot V \cdot 100}{V_1 \cdot m}$$

Для определения содержания общего сахара, выраженного в сахарозе, результат полученный по формуле, умножают на 0,95.

1.7 Определение сахарозы

Массовую долю сахарозы X_c в процентах рассчитывают по разности между количеством общего сахаров после гидролиза дисахаридов (сахарозы) X_2 и редуцирующих сахаров до гидролиза дисахаридов X_1 , 1 по формуле:

$$X_c = (X_{pc} - X_{oc}) \cdot 0,95,$$

где 0,95 – коэффициент пересчета инвертного сахара на сахарозу; остальные обозначения аналогичны пп. 3.4 и 3.5.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. Какие методы относятся к спектральным?
2. Что такое оптическая плотность?
3. Какие формы записи закона Бугера-Ламберта-Бера Вы знаете?
4. В чём отличие фотоколориметра и спектрофотометра? На каком принципе основана работа фотоколориметра?
5. Что такое редуцирующие сахара? При каких условиях дисахарид является редуцирующим?
6. Какой сахар не относится к редуцирующим? В чём особенность его структуры?

Лабораторная работа № 2. Спектрофотометрия. Определение альдегидного числа жира

Содержание альдегидов (альдегидное число) характеризует степень окисления липидов. Т.к. альдегиды — это вторичные продукты окисления, то, как правило, их содержание по мере хранения монотонно возрастает. Тем

не менее, в отдельных случаях возможно убывание альдегидного числа за счёт дальнейшего окисления альдегидной группы до карбоксильной.

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

Оборудование, материалы, реактивы: спектрофотометр; пробирки вместимостью 11 см³; колбы конические вместимостью 25 см³ с притертыми пробками; пипетки, вместимостью 10 см³; мерные колбы вместимостью 10 см³; 96 %-ный раствор этилового спирта, хлороформ; 0,5%-ный раствора бензидина свежеприготовленного; ледяная уксусная кислота.

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 (или примерно 10-15 см³ мисцеллы) 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 спектрофотометра с рабочей длиной 10 мм или спектрофотометра 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 колбочки 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.

Колбочки 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.

Оптическую плотность, обусловленную содержанием альдегидов, определяют по формуле:

$$D = (1,1D_2 - D_1) \quad (2.1)$$

По найденному значению D по калибровочному графику определяют содержание альдегидов в 1 см^3 мисцеллы.

Содержание альдегидов, реагирующих с бензидином АЧ (мг коричневого альдегида на 100 г жира, или мг/100 г), вычисляют по формуле

$$АЧ = \frac{m_1 \cdot V \cdot 100}{m} \quad \text{или} \quad АЧ = \frac{m_1 \cdot V \cdot 100}{C_M \cdot V_a}$$

где m_1 – содержание коричневого альдегида в 1 см^3 спирто-хлороформенного раствора жира, найденное по градуировочному графику, мг;

m - масса исследуемого жира, г;

V - объем приготовленного спирто-хлороформенного раствора жира, см^3 ;

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 объема при добавлении к 10 см^3 используемого раствора 1 см^3 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 мерную колбу. Ввиду большой летучести коричневого альдегида бюкса и колба 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 объем 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 5 сухих, предварительно пронумерованных пробирок с притертыми пробками, вносят последовательно от 1 до 10 см³ стандартного раствора коричневого альдегида. 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 и в одну с чистым растворителем – смесь 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.

Вопросы для защиты лабораторной работы:

1. Какие показатели характеризуют окислительную порчу жира?
2. Что такое кислотное альдегидное число? Что оно характеризует? На чём основаны методы его определения? Изменяется ли данный показатель при хранении жиросодержащих продуктов? Если да, то как и почему.
3. В чём отличие фотоколориметра и спектрофотометра? На каком принципе основана работа спектрофотометра?

Лабораторная работа № 3. Поляриметрический метод: определение содержания сахарозы в шоколадных изделиях

Метод основан на способности оптически активных веществ поворачивать плоскость поляризации света, причём угол поворота плоскости поляризации пропорционален концентрации вещества и толщине слоя.

Главным условием применения метода является присутствие в растворе только одного оптически активного вещества. Из этого правила есть два исключения: если соотношение оптически активных веществ известно либо если угол поворота плоскости поляризации света мешающими веществами учтён каким либо образом (например, если исследуемое вещество получается в результате некоторой реакции, до и после которой измеряется угол поворота)

Оборудование, материалы, реактивы: Универсальный сахариметр СУ-4 с набором кювет, баня водяная, бумага фильтровальная, весы лабораторные, колбы конические вместимостью 100 и 250 см³, колбы мерные вместимостью 100 см³, гидроксид натрия или калия, ч.д.а., раствор гексацианоферрата (II) калия (II), 150 г/дм³ (15 % железистосинеродистый калий), 30 %-ный раствора сернокислого цинка.

Навеску массой 6,3 г в случае исследования изделий без добавления молока и 6,5 г в случае исследования изделий с молоком, взвешенную в стеклянном стакане с погрешностью не более 0,01,

количественно переносят с помощью 70 см³ горячей дистиллированной воды в мерную колбу вместимостью 100 см³. Колбу помещают в водяную баню с температурой 60-70 °С и выдерживают при этой температуре до полного растворения навески. Содержимое колбы охлаждают до комнатной температуры. Далее в навеске осаждают несахара, приливая 3 см³ 15 %-ого раствора железистосинеродистого калия и 3 см³ 30 %-ого раствора серноокислого цинка, тщательно перемешивают, доводят до метки, дают осадку осесть и фильтруют жидкость в сухую колбу.

Полученный фильтрат подвергают поляриметрическому анализу в трубке длиной 2 дм не менее 3 раз, после чего рассчитывают среднеарифметическое значение.

Массовую долю общего сахара X_{oc} в изделиях без добавления молока рассчитывают по формуле:

$$X_{oc} = 4 a K,$$

где a – среднее значение показаний поляриметра по сахарной шкале;
 K – коэффициент, учитывающий объём нерастворимой части (0,97 при массовой доле общего сахара до 65 %, в противном случае 0,99)

Массовую долю общего сахара в изделиях с добавлением молока рассчитывают по формуле

$$X_{oc} = 4 a - K_1,$$

где K_1 – поправка на содержание лактозы (по ГОСТ 5309).

Вопросы к защите лабораторной работы

1. На чём основан поляриметрический метод определения сахаров?
2. При каком условии вещество будет оптически активным?
3. При каких условиях можно определять сахара этим методом?
4. В чём заключается принцип действия поляриметра (сахариметра)?

Лабораторная работа № 4. Потенциометрический метод. Определение содержания нитратов и нитритов в колбасных изделиях

Материалы, реактивы и оборудование. Ионметр И-130 или нитратомер; ионоселективный электрод на NO_3 -ионы; электрод сравнения – хлорсеребряный; весы технические и аналитические; конические колбы вместимостью 250 см^3 ; химические стаканы вместимостью 50 см^3 ; мерный цилиндр вместимостью 100 см^3 ; мерная колба вместимостью 1 дм^3 ; пипетки вместимостью 5 и 10 см^3 ; нитрат калия, ч.д. а.; водный раствор сульфата цинка массовой долей 0,45 %; водный раствор сульфата калия концентрацией $(1/2 \text{ K}_2\text{SO}_4)$ 1 моль/ дм^3 ; водный раствор гидроксида натрия NaOH (0,1 моль/ дм^3); водный раствор персульфата аммония $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ массовой долей 8 %.

С целью определения рабочего диапазона концентраций нитрат-ионов предварительно строят калибровочный график.

Построение калибровочного графика. Навеску нитрата калия (KNO_3) массой 10,1 г растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе вместимостью 1 дм^3 , доводят содержимое колбы водой до метки. Получают раствор нитрата калия молярной концентрацией 10^{-1} моль/ дм^3 ($p\text{NO}_3 = 1$). Методом последовательного разбавления из полученного раствора готовят серию стандартных растворов нитрата калия концентрацией 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} моль/ дм^3 ($p\text{NO}_3$ равны соответственно 2, 3, 4 и 5) [4].

В пять химических стаканов отбирают по 50 см^3 стандартных растворов нитрата калия, в каждый стакан добавляют по 1 см^3 раствора сульфата калия. Погрузив электроды в стаканы, в каждом растворе регистрируют ЭДС элемента, составленного из нитратселективного и хлорсеребряного электродов. Перед началом измерений электроды промывают несколько раз дистиллированной водой. Измерения выполняют, переходя от разбавленных растворов к концентрированным. По полученным измерениям строят

калибровочный график в координатах $E=f(p\text{NO}_3)$, откладывая по оси ординат значения $E(\text{мВ})$, по оси абсцисс — соответствующие значения $p\text{NO}_3$.

Порядок проведения анализа. Для определения нитрат-ионов в коническую колбу вместимостью 250 см^3 помещают навеску продукта массой $10\text{—}20 \text{ г}$, взятую с точностью $0,01 \text{ г}$, добавляют 100 см^3 дистиллированной воды (подогретой до $50\text{—}60 \text{ }^\circ\text{C}$) и экстрагируют в течение 30 мин при непрерывном перемешивании. Содержимое колбы охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр в коническую колбу. В полученном мутном растворе осаждают белки. Для этого добавляют к фильтрату $2,5 \text{ см}^3$ раствора гидроксида натрия молярной концентрацией $0,1 \text{ моль/дм}^3$ и 10 см^3 раствора сульфата цинка массовой долей $0,45 \%$, нагревают 5 мин на водяной бане при температуре кипения, охлаждают колбу и полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр. Фильтрат и промывные воды после промывания осадка белков на фильтре собирают в мерную колбу вместимостью 100 см^3 и доводят объем до метки раствором сульфата калия молярной концентрацией 1 моль/дм^3 . В прозрачном фильтрате измеряют ЭДС, по величине которой на калибровочном графике находят начальное содержание нитрат-ионов в растворе.

Для определения нитрит-ионов их окисляют персульфатом аммония до нитратов. К 25 см^3 фильтрата добавляют $0,5 \text{ см}^3$ раствора персульфата аммония массовой долей 8% , энергично перемешивают и через 5 мин измеряют ЭДС, по величине которой находят концентрацию нитрат-ионов после окисления нитрит-ионов, используя калибровочный график. Разность между найденным суммарным содержанием нитрат-ионов и начальной концентрацией нитрат-ионов равна концентрации нитрит-ионов, содержащихся в исследуемом растворе.

Содержание нитрат-ионов ($\text{мг } \%$) в мясе и мясных продуктах находят по формуле

$$X_1 = \frac{62c \cdot 100}{m} \cdot 100,$$

где 62 — молярная масса эквивалента нитрат-ионов, г/моль; c — концентрация нитрат-ионов до окисления, найденная по калибровочному графику, моль/дм³; 100 — объем фильтрата, см³; m — навеска измельченного мяса, г.

Содержание нитрит-ионов (мг %) в мясе и мясных продуктах находят по формуле

$$X_2 = \frac{46(c_1 - c) \cdot 100}{m} \cdot 100,$$

где 46 — молярная масса эквивалента нитрит-ионов, г/моль; c — концентрация нитрат-ионов после окисления, найденная по калибровочному графику, моль/дм³; 100 — объем фильтрата, см³.

Вопросы к защите лабораторной работы

1. На чём основан потенциометрический метод?
2. Какой характер носит зависимость между потенциалом концентрацией (активностью) исследуемого вещества и измерительного электрода?
3. Что такое электрод сравнения? Зачем он нужен?
4. Зачем в методе использовали персульфат аммония?

Лабораторная работа № 4. 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 растворенном 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.

Чаще всего в методе ВЭЖХ используют детекторы фотометрической группы. Главные условия использования такого детектора заключаются в том, что длина волны максимального поглощения света исследуемого вещества должна существенно отличаться от максимума поглощения элюентов. Насыщенные триглицериды и жирные кислоты слабо поглощают свет в ультрафиолетовом спектре, но ненасыщенные жирные кислоты, особенно кислоты с сопряжёнными двойными связями, можно определять на детекторах этой группы. Таким образом, анализ насыщенных глицеридов необходимо проводить после предварительной дериватизации (получения производных жирных кислот) при действии на

них, например, бромфенацилбромида. Ненасыщенные жирные кислоты можно исследовать без дериватизации, но мононенасыщенные кислоты дают достаточно слабый сигнал.

3.1. Определение содержания полиненасыщенных жирных кислот без дериватизации.

Оборудование, материалы, реактивы: хроматограф жидкостной «Agilent 1100» (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 1 г/дм³ (0,1%-ный), х.ч., баня водяная с термостатом, виалы на 2 см³; фильтры 0,45 мкм, раствор КОН в метаноле или этаноле 2 моль/дм³ (2 н).

Проведение испытания.

Пробу мисцеллы с известным содержанием жира¹ (или стандартную смесь жирных кислот) объемом 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 2 н спиртового раствора КОН и термостатируют 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 смесь разводят растворителем до заданной концентрации² и производят хроматографирование на жидкостном хроматографе. Условия

1 Для приготовления мисцеллы навеску жира растворяли в метилтрет.бутиловом эфире

2 Общее разведение жира для хроматографирования должно составлять от 400 до 2500.

хроматографии: колонка Hypersil ODS, 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 (или аналогичный), длина волны обнаружения жирных кислот – 202 нм, пероксидов – 240 нм, продуктов с сопряжёнными двойными связями – 280 нм [8]. Калибровка осуществляется по площади пика.

Расчёт концентрации жирных осуществляется либо автоматически (программным обеспечением для хроматографа), либо по формуле:

$$C_{i,p} = \frac{C_{i,k} \cdot F_p}{F_k} \cdot P,$$

где $C_{i,p}$ - концентрация i -й жирной кислоты в рабочем опыте;

$C_{i,k}$ - концентрация i -й жирной кислоты при калибровке;

F_k - площадь пика данной кислоты при калибровке;

F_p - площадь пика данной кислоты в рабочем опыте;

P – фактор разведения.

Вопросы к защите лабораторной работы.

1. Что такое хроматография?
2. Как классифицируют хроматографические методы по принципу действия?
3. Как классифицируют хроматографические методы по агрегатному состоянию подвижной фазы?
4. Как классифицируются хроматографические методы по форме неподвижного слоя?
5. На чём основан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии?
6. Какие детекторы используют в методе ВЭЖХ?
7. При использовании какого детектора и в каких случаях используют дериватизацию? Что это такое?

8. Что такое изократический, а что такое — градиентный режим хроматографии? Когда следует использовать последний?
9. Что представляет собой хроматограмма в газовой и жидкостной хроматографии? Какие параметры на ней определяют? Чему, как правило, соответствует первый пик?
10. Как по хроматограмме определить содержание исследуемого компонента?
11. Какие сложности возникают при определении жирнокислотного состава методом ВЭЖХ?
12. В чём достоинства и недостатки определения жирнокислотного состава методом ВЭЖХ по сравнению с методом ГЖХ?

Рекомендуемая литература

1. Николаенко, О. А. Методы исследования рыбы и рыбных продуктов : учеб. пособие для вузов. - СПб. : Гиорд, 2011. - 173, [1] с. : ил.
2. Пентин, Ю.А. Физические методы исследования в химии / Ю.А. Пентин, Л.В. Вилков. – М.: Мир, 2003. - 683 с., ил.
3. Крусъ, Г. Н. Методы исследования молока и молочных продуктов / Г. Н. Крусъ, А. М. Шалдыгина, З. В. Волокитина (Под общ. редакцией А. М. Шалдыгиной). – М.: КолосС, 2002. – 368 с.
4. Антипова, Л. В. Методы исследования мяса и мясопродуктов / Л. В. Антипова, И. А. Глотова, И. А. Рогов. – М.: КолосС, 2004. – 571 с.