

Министерство образования и науки Российской Федерации
Нижекамский химико-технологический институт (филиал)
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего профессионального образования
«Казанский национальный исследовательский технологический университет»

Г.Е. Башкеева, Н.У. Мухаметчина

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

**Нижекамск
2015**

УДК 664.6
Б 33

Печатается по решению редакционно-издательского совета НХТИ ФГБОУ ВПО «КНИТУ».

Рецензенты:

Минигалиев Т.Б., кандидат технических наук, доцент;
Гарайшина Э.Г., кандидат педагогических наук, доцент.

Башкеева, Г.Е.

Б 33 Физико-химические методы анализа продуктов питания : учебно-методическое пособие / Г.Е. Башкеева, Н.У. Мухаметчина. – Нижнекамск : НХТИ ФГБОУ ВПО «КНИТУ», 2015. – 102 с.

В данном учебно-методическом пособии изложены теоретические основы физико-химических методов анализа продуктов питания, к каждому разделу приведены лабораторные работы и контрольные вопросы.

Пособие предназначено для студентов очной, очно-заочной и заочной форм обучения, обучающихся по направлению 260100 «Технология продуктов питания из растительного сырья».

Подготовлено на кафедре «Техника и физика низких температур» НХТИ ФГБОУ ВПО «КНИТУ».

УДК 664.6

© Башкеева Г.Е., Мухаметчина Н.У., 2015
© НХТИ ФГБОУ ВПО «КНИТУ», 2015

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время качество пищевых продуктов правомерно отнесено к числу основных факторов, определяющих здоровье человека. Пища может быть источником большого числа опасных для человека веществ, поступающих из окружающей среды: антропогенных (химических) и биологических (природных). Современные пищевые продукты имеют в своем содержании ингредиенты, относящиеся к числу факторов риска (пестициды, гербициды, соли тяжелых металлов и др.). В настоящее время купить продукты несложно, важно выбрать то, что действительно вкусно, полезно и безопасно для здоровья.

В технологии изготовления пищевых продуктов качество и состав сырья, эффективность производственных процессов, экологическая безопасность, соответствие выпускаемой продукции установленным нормам, соблюдение санитарно-гигиенических требований имеют большое значение. Решение всех перечисленных вопросов требует знания физико-химических методов анализа пищевого сырья и готовых продуктов, освоение которых для инженеров-технологов очень важно.

Сегодня можно выделить следующие методы, нашедшие широкое применение в пищевой промышленности: хроматография, фотометрия, люминесценция, рефрактометрия, вольтамперометрия, потенциометрия и др. Теоретические основы этих методов и лабораторный практикум представлены в данном учебно-методическом пособии.

1. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

1.1. Общие положения

Спектроскопические методы анализа основаны на взаимодействии электромагнитного излучения с веществом. Это взаимодействие сопровождается явлениями, из которых наиболее важны испускание, поглощение и рассеяние излучения. Возникающие при этом сигналы несут качественную и количественную информацию о веществе. Частота сигнала отражает специфические свойства вещества, его природу, а интенсивность сигнала связана с количеством анализируемого соединения.

Совокупность всех частот (длин волн) электромагнитного излучения называют *электромагнитным спектром*. В зависимости от длины волны в электромагнитном спектре выделяют ряд областей. Спектральные диапазоны не имеют четко очерченных границ, т.е. деление спектра на диапазоны достаточно условно. Особо четкие границы можно установить для оптического диапазона. Его обычно подразделяют на ультрафиолетовую (УФ), видимую и инфракрасную (ИК) области.

В каждой области оптического диапазона используют свои, наиболее удобные для измерения единицы. В ИК-области пользуются волновыми числами, часто называя их частотами, имеющими размерность см^{-1} . В УФ и видимой областях используют единицы длин волн, практически всегда измеряя их в нанометрах.

Поток фотонов с одинаковой частотой называют монохроматическим, с разными частотами – полихроматическим. Обычный наблюдаемый поток излучения от раскаленных тел, в частности, солнечный свет, является полихроматическим.

1.1.1. Классификация методов спектроскопии

Для аналитических целей наибольшее значение имеют спектроскопические методы, использующие электромагнитное излучение оптического диапазона. Эти методы делят на *оптическую атомную* и *оптическую молекулярную спектроскопию*. В данном разделе речь пойдет о методе анализа, основанном на измерении поглощения света – *молекулярной абсорбционной спектроскопии*.

Метод молекулярной абсорбционной спектроскопии в УФ- и видимой областях спектра обычно называют *спектрофотометрией*. В зависимости от типа абсорбционных спектральных приборов различают *фотометрический* и *спектрофотометрический* методы. Их сравнительная характеристика приведена в таблице 1.

Оба метода объединяют в одну группу фотометрических методов анализа. Когда определение проводят в видимой части спектра, часто используют термин *фотоколориметрия* (от лат. *color* – цвет), поскольку имеют дело с окрашенными растворами.

Фотометрические методы анализа

| Метод | Тип прибора | Рабочая область спектра, нм | Способ монохроматизации | Регистрируемые сигналы |
|-------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------------|--|
| Фотометрия | Фотометр (фотоколориметр) | Видимая 400–750 | Светофильтр | Оптическая плотность (А) и пропускание (Т) в диапазоне длин волн, отвечающем полосе пропускания светофильтра |
| Спектрофотометрия | Спектрофотометр | УФ и видимая 100–750 | Монохроматор или полихроматор | Оптическая плотность (А) и пропускание (Т) при фиксированной длине волны |

1.1.2. Законы поглощения электромагнитного излучения

Основные положения и законы абсорбции излучения справедливы для всех областей спектра – от рентгеновского до радиоизлучения. Количественно поглощение излучения системой описывается *законами Бугера – Ламберта – Бера и аддитивности*.

Закон Бугера – Ламберта – Бера

При прохождении излучения через раствор светопоглощающего вещества поток излучения ослабляется. Понижение интенсивности зависит от концентрации поглощающего вещества и длины пути, проходимого потоком. Эта зависимость выражается законом Бугера – Ламберта – Бера. Чтобы учесть потери света, прошедшего через раствор, на отражение и рассеяние, сравнивают интенсивности света, прошедшего через исследуемый раствор и растворитель. При одинаковой толщине слоя в кюветах из одного материала, содержащих один и тот же растворитель, потери на отражение и рассеяние света будут примерно одинаковы у обоих пучков света, и уменьшение интенсивности будет зависеть от концентрации вещества.

Обозначим интенсивность падающего потока света как I_0 , I – интенсивность потока света, прошедшего через раствор. Величину I/I_0 называют пропусканием и обозначают T ($0 \leq T \leq 1$).

Взятый с обратным знаком логарифм T называют оптической плотностью A :

$$A = -\lg T = -\lg \frac{I}{I_0} = \lg \frac{I_0}{I}, \quad (1)$$

Для абсолютно прозрачного раствора $A = 0$, для абсолютно непрозрачного $A \rightarrow \infty$.

Уменьшение интенсивности излучения при прохождении его через раствор подчиняется закону Бугера – Ламберта – Бера:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon \ell C} \quad \text{или} \quad -\lg T = A = \varepsilon \ell C, \quad (2)$$

где ε – молярный коэффициент поглощения,

ℓ – толщина поглощающего слоя, см;

C – концентрация раствора, моль/л.

Физический смысл молярного коэффициента поглощения становится ясен, если принять $l = 1$ см, $C = 1$ моль/л, тогда $A = \varepsilon$. Следовательно, молярный коэффициент поглощения равен оптической плотности одномолярного раствора с толщиной слоя см. Молярный коэффициент поглощения – индивидуальная характеристика вещества, он зависит от природы вещества и длины волны и не зависит от концентрации и длины кюветы.

Условия применимости закона Бугера – Ламберта – Бера

С отклонениями от линейной зависимости между оптической плотностью и концентрацией приходится сталкиваться довольно часто. Основные причины этого явления состоят в следующем.

1. Закон Бера справедлив для разбавленных растворов. При высоких концентрациях ($> 0,01$ М) среднее расстояние между частицами поглощающего вещества уменьшается до такой степени, что каждая частица влияет на распределение заряда соседних частиц, что, в свою очередь, может изменить способность частиц поглощать излучение данной длины волны.

Коэффициент ε в уравнении (2) зависит от показателя преломления среды. Увеличение концентрации раствора приводит к значительному изменению показателя преломления n и отклонению от закона Бера (показатели преломления разбавленных растворов и растворителя отличаются несущественно).

2. Закон справедлив для монохроматического излучения. Строго говоря, уравнение (2) следует записывать в виде:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} l C, \quad (3)$$

Индекс λ указывает, что величины A и ε относятся к монохроматическому свету с длиной волны λ . Немонохроматичность светового потока связана с несовершенством оптических приборов. Отклонение от закона Бера менее заметно, если длина волны не приходится на часть спектра с резким изменением оптической плотности. На практике измерение A стремятся проводить в максимуме светопоглощения.

3. Температура при измерениях должна оставаться постоянной хотя бы в пределах нескольких градусов.

4. Пучок света должен быть параллельным.

5. Уравнение (3) соблюдается для систем, в которых поглощает только один тип частиц вещества, т.е. отсутствует химическое взаимодействие. Если при изменении концентрации будет меняться природа этих частиц, вследствие, например, кислотно-основного взаимодействия, полимеризации, диссоциации и т. д., то зависимость $A = f(C)$ не будет линейной, так как молярный коэффициент поглощения вновь образующихся и исходных частиц не будет одинаковым.

При выполнении закона Бера график зависимости оптической плотности от концентрации представляет собой прямую, проходящую через начало координат (рис. 1а), а функция $A_{\lambda} = f(\lambda)$ имеет один и тот же вид независимо от

толщины слоя и концентрации раствора, и положение максимума поглощения сохраняется (рис. 1б).

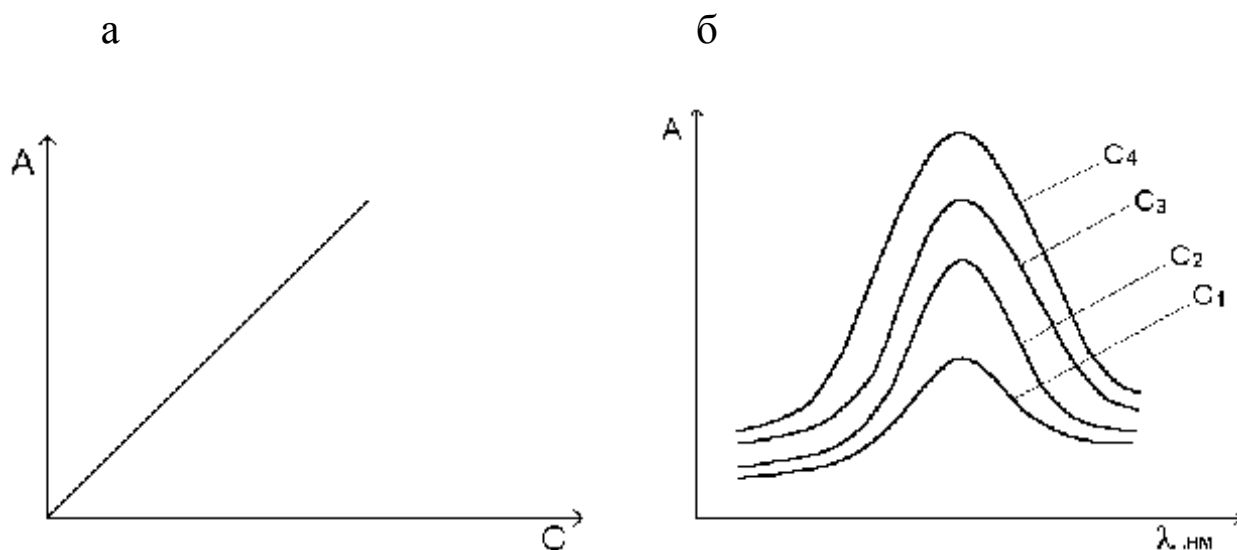


Рис. 1. (а) Зависимость оптической плотности от концентрации раствора, (б) Максимумы поглощения света при различных концентрациях раствора

Закон аддитивности

Оптическая плотность – экстенсивное свойство вещества. Поглощение света каким-либо веществом не зависит от присутствия в растворе других веществ, и оптическая плотность смеси веществ равна сумме оптических плотностей каждого из них. Это справедливо при условии подчинения каждого вещества закону Бугера – Ламберта – Бера и в отсутствие химического взаимодействия между ними. Итак, для смеси m веществ при одной и той же длине волны имеем:

$$A = A_1 + A_2 + \dots + A_m, \quad (4)$$

или:

$$A_\lambda = \ell(\varepsilon_{\lambda,1}C_1 + \varepsilon_{\lambda,2}C_2 + \dots + \varepsilon_{\lambda,m}C_m), \quad (5)$$

Принцип аддитивности (суммирования) оптических плотностей широко используют в аналитической химии.

1.2. Аппаратура в абсорбционной спектроскопии

Для определения оптической плотности применяют фотоэлектроколориметры и спектрофотометры.

Фотоколориметры – приборы для измерения величин поглощения и пропускания фотоэлектрическим способом. Принцип работы заключается в том, что поток электромагнитного излучения, прошедшего через кювету с раствором, попадает на фотоэлемент, который превращает энергию излучения в электрическую.

Чаще всего применяют фотоэлектроколориметры марок КФК-2 и КФК-3, предназначенные для измерения поглощения в диапазоне длин волн 315-

980 нм, выделяемых 11 светофильтрами, коэффициентов пропускания и оптической плотности растворов.

Принципиальная оптическая схема фотоколориметра представлена на рисунке 2. Свет от накаливаемой нити лампы (1) проходит через систему линз, теплозащитный (2), нейтральный (3) и выбранный цветной (4) светофильтры, кювету (5) с раствором сравнения или исследуемым раствором, попадает на пластину (6), которая делит световой поток на два: 90% света направляется на фотоэлемент (7) (при измерениях в области спектра 315-540 нм) и 10% - на фотодиод (8) (при измерениях в области спектра 590-980 нм). Регистрирующим прибором, снимающим показания с фотоэлемента и фотодиода, служит микроамперметр.

Наиболее точные результаты получаются при оптической плотности порядка 0,4. Если оптическая плотность больше 0,75, то берут кювету с меньшей рабочей длиной, если оптическая плотность меньше 0,15, то используют кювету с большей рабочей длиной. При исследовании растворов различной концентрации кювету выбирают по раствору средней концентрации.

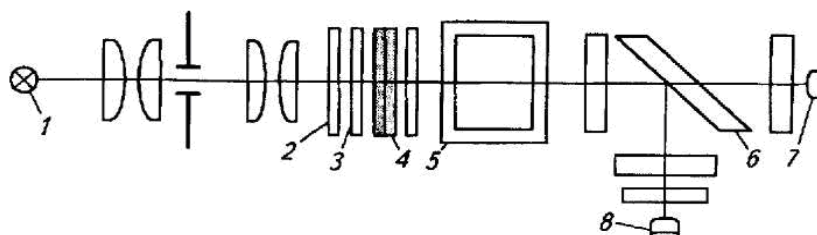


Рис. 2. Принципиальная оптическая схема фотоколориметра

Спектрофотометр отличается от фотоколориметра тем, что в нем через раствор образца можно пропускать световой поток любой нужной длины волны. Существует много различных типов спектрофотометров. Однолучевые спектрофотометры (СФ-16, СФ-26 и СФ-46) предназначены для измерения коэффициентов пропускания и оптической плотности растворов и твердых веществ как в ультрафиолетовой (200-400 нм), так и в видимой (400-800 нм) и инфракрасной (800-1100 нм) областях спектра. Источниками излучения служат дейтериевая лампа (в области длин волн 186-350 нм) и лампа накаливания (320-1100 нм).

Принципиальная оптическая схема прибора представлена на рисунке 3. Свет от источника (1) попадает на зеркальный конденсор (2), затем на плоское зеркало (3), которое отклоняет поток лучей на 90° и направляет его во входную щель (5), защищенную пластинкой (4). Прошедший через щель свет попадает на диспергирующую кварцевую призму (6), разлагающую его в спектр. Диспергированный поток направляется на зеркальный объектив (7), который фокусирует лучи в выходную щель (8). Призма соединена с помощью специального механизма со шкалой длин волн. Поворачивая призму вращением соответствующей рукоятки на выходе монохроматора, получают монохроматический поток света заданной длины волны, который после

прохождения щели (8), кварцевой линзы (9), светофильтра (10), поглощающего рассеянный свет, кюветы с исследуемым раствором или раствором сравнения (11), защитной пластины (12) попадает на фотоэлемент (13).

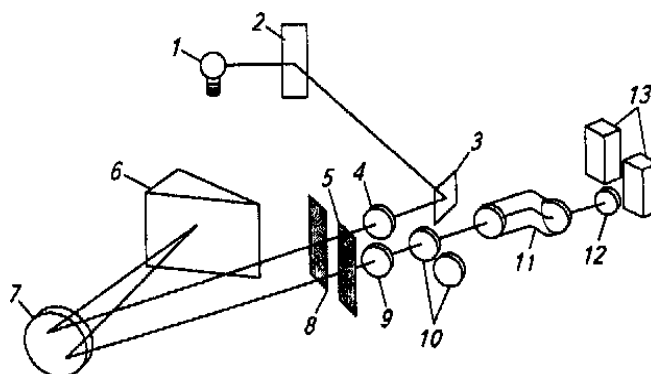


Рис. 3. Оптическая схема однолучевого спектрофотометра

1.3. Применение спектрофотометрии в анализе

1.3.1. Качественный анализ по спектрам поглощения

Абсорбционная спектроскопия может служить одним из методов качественного анализа. Электронные спектры поглощения для целей качественного анализа используются значительно реже, чем колебательные, так как полосы поглощения имеют тенденцию к уширению, что скрывает их тонкую структуру. Спектры в ультрафиолетовой и видимой областях характерны для более или менее больших структурных элементов в молекуле. Спектры больших, сходных по структуре молекул различаются очень незначительно. Обычно они представлены отдельными широкими полосами поглощения, которые часто накладываются одна на другую и перекрываются. Характерными полосами поглощения обладают соединения, содержащие хромофорные группы. Спектральные исследования в этой области часто дают полезную качественную информацию о наличии или отсутствии некоторых функциональных групп, таких как карбонил, ароматическое кольцо, нитрогруппа или сопряженная двойная связь. Следует иметь в виду, что идентификация надежна, если хромофоры в молекуле изолированы. В присутствии ауксохромов и цепей сопряжения идентификация затрудняется.

1.3.2. Количественный анализ методами фотометрии

В фотометрическом анализе количество вещества определяется по интенсивности окраски или светопоглощению окрашенных соединений. Раствор или предмет кажутся окрашенными, если он по-разному пропускает или поглощает видимый свет различных длин волн. В видимой области цвет раствора обусловлен длиной волны излучения, не поглощенного этим раствором. Например, раствор, поглощающий излучение в синей части спектра (≈ 475 нм), окрашен в желтый цвет, т. е. синий цвет является дополнительным к окраске раствора. В таблице 2 приводятся такие данные для всей области видимого излучения.

Прежде чем приступить к выполнению фотометрического определения необходимо выбрать условия анализа. Можно рекомендовать следующую схему:

- перевод анализируемого образца в раствор и отделение, в случае необходимости, мешающих компонентов;
- выбор фотометрической формы вещества и проведение химических реакций для получения окрашенного соединения (если определяемое вещество не обладает интенсивным собственным поглощением);
- установление области концентраций, в которой выполняется основной закон светопоглощения;
- измерение оптической плотности исследуемого раствора;
- расчет содержания вещества в анализируемой пробе.

Таблица 2

Цвета видимого излучения

| Наблюдаемый цвет, (цвет раствора) | Область максимального поглощения, нм | Дополнительный цвет, (поглощаемое излучение) |
|-----------------------------------|--------------------------------------|--|
| Зелено-желтый | 380–420 | Фиолетовый |
| Желтый | 420–440 | Синий |
| Оранжевый | 440–470 | Голубой |
| Красный | 470–500 | Голубовато-зеленый |
| Пурпурный | 500–520 | Зеленый |
| Фиолетовый | 520–550 | Желто-зеленый |
| Синий | 550–580 | Желтый |
| Голубой | 580–620 | Оранжевый |
| Голубовато-зеленый | 620–680 | Красный |
| Зеленый | 680–780 | Пурпурный |

Анализ однокомпонентных систем фотометрическим методом проводят следующими методами.

1. Метод сравнения оптических плотностей стандартного и исследуемого соединений

Для анализа вещества этим способом готовят раствор исследуемого вещества и два-три стандартных раствора, затем измеряют оптические плотности этих растворов в одинаковых условиях (длина волны, толщина поглощающего слоя). Погрешность определения будет меньше, если оптические плотности исследуемого и стандартного растворов будут иметь близкие значения. Для этого вначале фотометрируют исследуемый раствор, а затем подбирают нужную концентрацию стандартного раствора. Согласно закону Бера, оптические плотности исследуемого и стандартного растворов равны:

$$A_x = \varepsilon_\lambda \ell C_x, \quad (6)$$

$$A_{ст} = \varepsilon_\lambda \ell C_{ст}, \quad (7)$$

Разделив уравнение (6) на (7) и учитывая, что оптические плотности измеряют в одних и тех же условиях ($\lambda = \text{const}$, $l = \text{const}$) и в растворе одни и те же светопоглощающие частицы ($\varepsilon_\lambda = \text{const}$), получим:

$$\frac{A_x}{A_{\text{ст}}} = \frac{C_x}{C_{\text{ст}}}, \quad (8)$$

откуда:

$$C_x = C_{\text{ст}} \frac{A_x}{A_{\text{ст}}}, \quad (9)$$

2. Метод градуировочного графика

В соответствии с законом Бугера – Ламберта – Бера график зависимости оптической плотности от концентрации должен быть линейным и проходить через начало координат.

Готовят серию стандартных растворов различной концентрации и измеряют оптическую плотность в одинаковых условиях. Для повышения точности определения число точек на графике должно быть не меньше трех-четырех. Затем определяют оптическую плотность исследуемого раствора A_x и по графику находят соответствующее ей значение концентрации C_x (рис.4).

Интервал концентраций стандартных растворов подбирают таким образом, чтобы концентрация исследуемого раствора соответствовала примерно середине этого интервала.

Метод является наиболее распространенным в фотометрии. Основные ограничения метода связаны с трудоемким процессом приготовления эталонных растворов и необходимостью учитывать влияние посторонних компонентов в исследуемом растворе. Чаще всего метод применяется для проведения серийных анализов.

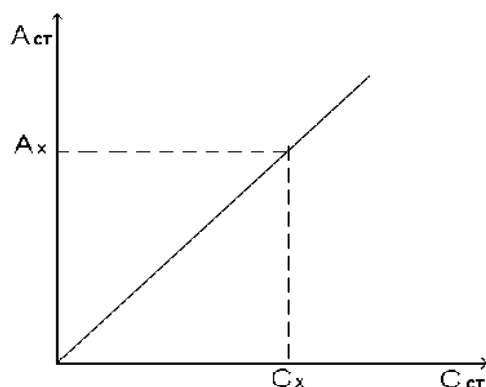


Рис. 4. Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации

3. Метод добавок

Этот метод применяют для анализа сложных растворов, так как он позволяет автоматически учитывать влияние посторонних компонентов анализируемого образца. Сначала измеряют оптическую плотность исследуемого раствора с неизвестной концентрацией:

$$A_x = \varepsilon l C_x, \quad (10)$$

затем в анализируемый раствор добавляют известное количество стандартного раствора определяемого компонента ($C_{ст}$) и измеряют оптическую плотность $A_{x+ст}$:

$$A_{x+ст} = \varepsilon \ell (C_x + C_{ст}), \quad (11)$$

откуда:

$$C_x = C_{ст} \frac{A_x}{A_{x+ст} - A_x}, \quad (12)$$

Для повышения точности добавку стандартного раствора определяемого компонента делают дважды и полученный результат усредняют.

Концентрацию анализируемого вещества в методе добавок можно найти графическим путем (рис. 5).

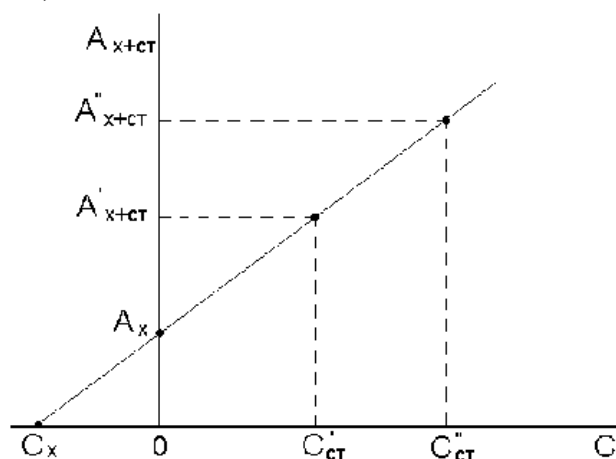


Рис. 5. Градуировочный график для определения концентрации вещества по методу добавок

Уравнение (11) показывает, что если строить график $A_{x+ст}$ как функции $C_{ст}$, то получится прямая, экстраполяция которой до пересечения с осью абсцисс дает отрезок, равный $-C_x$. Действительно, при $A_{x+ст} = 0$ из уравнения (12) следует, что $-C_{ст} = C_x$.

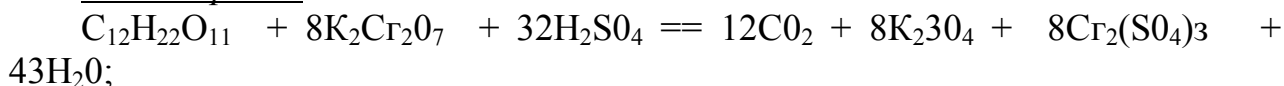
Лабораторная работа №1

Определение массовой доли общего сахара ускоренным фотоэлектроколориметрическим методом с раствором бихромата калия

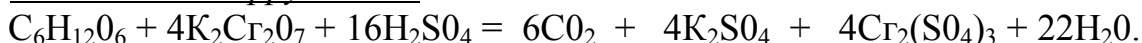
Метод основан на окислении сахаров бихроматом калия в сильно кислой среде. В результате такой реакции все сахара окисляются до диоксида углерода и воды, а шестивалентный хром в ионе $Cr_2O_7^{2-}$ восстанавливается в трехвалентный ион Cr^{3+} . Количество образовавшегося сине-зеленого иона эквивалентно количеству сахаров, вступивших в реакцию, что позволяет по изменению оптической плотности определить количество редуцирующих веществ, прореагировавших с дихроматом калия.

Реакция может быть представлена в следующем виде:

для сахарозы:



для глюкозы и фруктозы:



После приготовления водной вытяжки из навески объекта исследования проводят осаждение мешающих нес сахаров, которые также могут окисляться и искажать результат анализа. Гидролиз сахарозы при определении общего сахара не проводят. Метод не применим для объектов, содержащих алкоголь.

Декстрины, содержащиеся во многих объектах кондитерского производства, не осаждаются при обработке сульфатом цинка. В связи с этим данный метод применяют преимущественно для объектов, в рецептуру которых не входит патока (шоколад, пралине, жировые вафельные начинки, мучные изделия, приготовленные без патоки, и т.п.).

Для объектов, содержащих патоку, результат анализа корректируют введением поправочного коэффициента, учитывающего окисление декстринов. Коэффициент зависит от соотношения патоки и общего сахара в объекте исследования (табл. 3). Это соотношение рассчитывают ориентировочно по рецептуре.

Таблица 3

Определение поправочного коэффициента по соотношению патоки и общего сахара в объекте исследования

| Отношение массовых долей патоки и общего сахара, % | Поправочный коэффициент К |
|--|---------------------------|
| 2-5 | 0,96 |
| 6-10 | 0,94 |
| 11-15 | 0,92 |
| 16-20 | 0,90 |
| 21-30 | 0,88 |

Реактивы:

- сернокислый раствор бихромата калия;
- стандартный раствор сахарозы 4 мг/см³;
- сульфат цинка, раствор с(1/2 ZnSO₄) = 1 моль/дм³;
- гидроксид натрия, раствор с(NaOH) = 1 моль/дм³;
- фенолфталеин.

Приготовление сернокислого раствора бихромата калия: 49 г растворяют в 300 см³ дистиллированной воды (1 раствор); отдельно к 300 см³ дистиллированной воды осторожно небольшими порциями при перемешивании приливают 300 см³ концентрированной серной кислоты и охлаждают (2 раствор). Сначала первый, а затем второй раствор осторожно переливают в мерную колбу вместимостью 1000 см³, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем дистиллированной воды до метки.

Ход работы

Построение калибровочного графика. В пять мерных колб на 100 см³ мерным цилиндром осторожно отмеривают по 25 см³ сернокислого раствора бихромата калия и пипеткой по 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 см³ стандартного раствора

сахарозы. Затем в колбы мерным цилиндром вносят по 23; 21; 19; 17 и 15 см³ дистиллированной воды, чтобы объем жидкости в каждой из них был равен 50 см³. Колбы с содержимым помещают в кипящую водяную баню на 10 мин, после чего охлаждают, доводят объем дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают. Раствор переливают в кювету с толщиной слоя 30 мм и определяют оптическую плотность на фотоэлектроколориметре со светофильтром, имеющим максимум пропускания $\lambda = 630\text{—}670$ нм.

По результатам определения строят калибровочный график (рис.6). На оси ординат откладывают значения оптической плотности, а на оси абсцисс — соответствующую массу сахарозы (мкг). Масса сахарозы равна произведению объема стандартного раствора на его концентрацию (4 мг/см³). Поэтому количество кубических сантиметров стандартного раствора, введенного в колбу, умножают на 4.

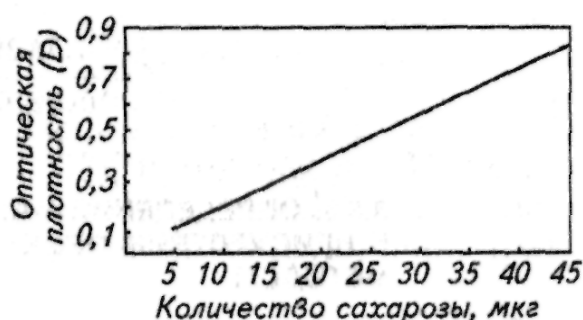


Рис. 6. Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от концентрации сахарозы

Проведение анализа. В мерную колбу на 100 см³ отмеривают мерным цилиндром 25 см³ реактива (сернокислого раствора бихромата калия), 10,0 см³ фильтрата раствора навески (пипеткой) и 15 см³ дистиллированной воды. Колбу с содержимым помещают в кипящую баню на 10 мин и охлаждают. Доводят объем дистиллированной водой до метки, тщательно перемешивают и определяют оптическую плотность так, как при построении калибровочного графика.

По величине оптической плотности на калибровочном графике находят соответствующее количество общего сахара a , условно выраженное в сахарозе.

Массовую долю общего сахара (%), условно выраженную в сахарозе, вычисляют по формуле:

$$Y = \frac{a V_1 K}{V_2 m 1000} 100, \quad (13)$$

где a — масса сахарозы, найденная по калибровочному графику, мг;

V_1 — объем мерной колбы, взятой для приготовления водной вытяжки из навески объекта исследования, см³;

K — поправочный коэффициент, учитывающий окисление декстринов;

100 — коэффициент перевода массовой доли в проценты;

V_2 — объем раствора навески, введенный в реакцию колбу, см³;

m — масса навески объекта исследования, г;

1000 — коэффициент пересчета миллиграммов в граммы.

За окончательный результат анализа принимают среднее арифметическое значение двух параллельных определений, допускаемые расхождения между которыми в одной лаборатории не должны превышать по абсолютному значению 0,5 %, а выполненные в разных лабораториях 1,0 %. Результат вычисления округляют до первого десятичного знака.

Массовую долю сахарозы в присутствии других сахаров данным методом определить нельзя. Если же в объекте содержится только сахароза, то результат анализа по общему сахару соответствует ее количеству. Если необходимо выразить массовую долю общего сахара в инвертном сахаре, то результат, полученный по сахарозе, нужно разделить на 0,95.

Лабораторная работа №2

Определение содержания железа в молоке и молочных продуктах

Метод основан на предварительной минерализации пробы исследуемого продукта (или плазмы для сливок и сливочного масла) смесью азотной и серной кислот, последующем восстановлении ионов железа (III) батофенантролином с образованием окрашенных комплексов железа (II) и их экстракции изоамиловым спиртом. Оптическую плотность полученного раствора определяют на спектрометре при длине волны 533 нм, используя кюветы длиной 10 мм. Массовую долю железа определяют по градуировочному графику.

Для минерализации анализируемых проб используют колбы вместимостью примерно 70 см³ с притертыми стеклянными пробками.

Реактивы. Все используемые реактивы должны быть чистыми для анализа и кроме стандартных растворов железа не содержать железа.

Реактив 1 (этанол). Концентрация раствора этанола должна составлять примерно 96 об. %. При необходимости проводят перегонку в не содержащей железо перегонной установке.

Реактив 2 (диэтиловый эфир). При необходимости проводят перегонку в не содержащей железо перегонной установке.

Реактив 3 (петролейный эфир). Пределы кипения 40 – 60 °С. При необходимости проводят перегонку в не содержащей железо перегонной установки.

Реактив 4 (азотная кислота, концентрированная, плотностью 1,42 г/см³). Проводят перегонку в не содержащей железо перегонной установке. Первые 50 см³ дистиллята сливают. Не допускается хранение азотной кислоты в банке из темного стекла.

Реактив 5 (серная кислота концентрированная, плотностью 1,84 г/см³).

Реактив 6 (раствор сульфата калия в серной кислоте). Растворяют 25 г сульфата калия (K₂SO₄) в серной кислоте (реактив 5) и доливают до 100 см³ той же серной кислотой. Раствор фильтруют через стеклянный фильтр (диаметр пор 40 – 100 мкм).

Если имеющийся сульфат калия содержит железо, его очищают следующим образом. Растворяют 40 г сульфата калия в 500 см³ воды и добавляют 3 см³

раствора хлорида гидроксиламмония (реактив 9). Экстрагируют раствор 10 см³ раствора батофенантролина (реактив 11). Верхний слой сливают. Повторяют эти две операции, пока верхний слой станет бесцветным. Выпаривают воду в чистой печи.

Реактив 7 (раствор пероксида водорода плотностью 1,099 – 1,103 г/см³). Раствор хранят в холодильнике.

Реактив 8 (насыщенный раствор ацетата натрия). Растворяют 232,5 г безводного ацетата натрия (CH₃COONa) в 500 см³ воды.

Если имеющийся ацетат натрия содержит железо, его очищают следующим образом. Растворяют 232,5 г ацетата натрия в 500 см³ воды. Фильтруют через фильтровальную бумагу. Добавляют 3 см³ раствора хлорида гидроксиламмония (реактив 9). Экстрагируют раствор 10 см³ раствора батофенантролина (реактив 11). Верхний слой сливают. Повторяют эти две операции, пока верхний слой станет прозрачным.

Реактив 9 (раствор хлорида гидроксиламмония). Растворяют 20 г хлорида гидроксиламмония (HONH₂Cl) в воде и доливают до 100 см³. Фильтруют через фильтровальную бумагу. Экстрагируют раствор 5 см³ раствора батофенантролина (реактив 11), выдерживают до нужного разделения слоев. Верхний слой сливают. Повторяют эти две операции, пока верхний слой станет бесцветным. Обычно достаточно 5 - кратного экстрагирования. При приготовлении более чем за 24 ч до использования рекомендуется повторить экстрагирование батофенантролином.

Вместо раствора хлорида гидроксиламмония в качестве восстановителя можно использовать раствор аскорбиновой кислоты свежей перегонки. Раствор аскорбиновой кислоты получают путем растворения аскорбиновой кислоты в 100 см³ воды. Раствор экстрагируют раствором батофенантролина так же, как было описано выше для раствора хлорида гидроксиламмония. Раствор должен храниться в холодильнике. При приготовлении реактивов 6 и 8 вместо 3 см³ раствора хлорида гидроксиламмония можно использовать 3 см³ такого раствора аскорбиновой кислоты.

Реактив 10 (изоамиловый спирт). При необходимости перегоняют на не содержащей железо перегонной установке.

Реактив 11 (раствор батофенантролина). Растворяют 83,1 мг батофенантролина (4,7 дифенил – 1,10 фенантролина (C₂₄H₁₆N₂)) в 100 см³ изоамилового спирта (реактив 10).

Реактив 12 (раствор перманганата калия). Растворяют 100 мг перманганата калия (KMnO₄) в 50 см³ воды.

Реактив 13 (стандартный раствор железа, соответствующий содержанию 1000 мг железа в 1000 см³). Растворяют 7,022 г гексагидрата двойной соли сульфата аммония и сульфата железа в 250 см³ воды. Добавляют 8 см³ серной кислоты (реактив 5) и охлаждают до комнатной температуры. Доливают водой до 1000 см³. В 1 см³ такого стандартного раствора содержится 1 мг железа.

Реактив 14 (стандартный раствор железа, содержащий 1 мг железа на 1000 см³). В день использования пипеткой переносят 1 см³ стандартного раствора

железа (реактив 13) в 250 см^3 воды. Добавляют 1 см^3 серной кислоты (реактив 5) и доливают до 1000 см^3 водой. В 1 см^3 такого стандартного раствора содержится 1 мкг железа.

Ход работы

Подготовка проб. При отборе и подготовке проб загрязнение железом не допускается.

Молоко, обезжиренное молоко и сыворотка. Пробу нагревают до $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ и тщательно размешивают. Пробу молока, в которой жир распределен неравномерно, медленно нагревают до $40 \text{ }^\circ\text{C}$, осторожно перемешивают, переворачивая пробирку, и быстро охлаждают до $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Кефир жирный и обезжиренный. Пробу нагревают до $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ и тщательно размешивают. При отделении сыворотки энергично размешивают непосредственно перед взвешиванием пробы для анализа.

В колбу для минерализации отвешивают 10 г молока, обезжиренного молока, сыворотки или кефира. Добавляют 3 см^3 азотной кислоты (реактив 4) и $1,8 \text{ см}^3$ раствора сульфата калия (реактив 6). Проводят анализ.

Сливки. Пробу нагревают до $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Тщательно перемешивают, не допуская при этом взбалтывания или вспенивания. Очень густые сливки или сливки, в которых жир распределен неравномерно, для облегчения размешивания медленно нагревают до $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Быстро охлаждают пробу до $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Тщательно размешивают до полной однородности массы. Емкость закрывают.

Отвешивают 10 г пробы с точностью до 10 мг и переносят в колбу для минерализации. Добавляют 8 см^3 азотной кислоты (реактив 4). Колбу нагревают на водяной бане при $80 - 90 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 1 ч . Каждые 3 мин энергично встряхивают колбу для смывания жира азотной кислотой. Охлаждают до $40 \text{ }^\circ\text{C}$ и с помощью пипетки снимают как можно больше жира. Добавляют 15 см^3 петролейного эфира (реактив 3), осторожно размешивают и удаляют растворитель пипеткой.

Проведение анализа. Сначала минерализуют пробу. В колбу для минерализации помещают анализируемую пробу и три стеклянные (кварцевые) бусины. Под мощной вытяжкой устанавливают колбу в наклонном положении и нагревают ее на горелке. Высоту пламени регулируют для ограничения пенообразования в колбе. Допускается образование пены в горловине колбы, но без ее выплескивания. Поддерживают слабое кипение смеси.

Одновременно проводят холостую пробу. Для этого в колбу для минерализации вместо анализируемой пробы берут 10 см^3 воды и те же реактивы, что и для анализируемой пробы. В холостой пробе не должно содержаться более $0,5 \text{ мг}$ железа, в противном случае все реактивы необходимо проверить.

Когда раствор приобретает коричневую окраску, осторожно добавляют $3-5$ капель азотной кислоты (реактив 4) и энергично нагревают. Продолжают нагревание, добавляя по $5-20$ капель азотной кислоты, пока смесь станет бесцветной. Охлаждают до комнатной температуры.

Осторожно добавляют 2 см^3 воды и 1 см^3 раствора пероксида водорода (реактив 7). Размешивают и снова нагревают до появления белых паров. При пожелтении раствора его охлаждают до комнатной температуры. Добавляют еще $0,5 \text{ см}^3$ раствора пероксида водорода, а затем нагревают до образования белых

паров. После того как начнут образовываться белые пары, смесь нагревают еще в течение 45 мин. Затем охлаждают до комнатной температуры и осторожно доливают воду до полного объема, равного примерно 20 см^3 .

Добавляют одну или две капли раствора перманганата калия (реактив 12) до слабо-алого окрашивания смеси, затем 3 см^3 раствора хлорида гидроксиламмония (реактив 9) и тщательно перемешивают. Вносят 20 см^3 раствора ацетата натрия (реактив 8) и примерно 15 см^3 воды, тщательно перемешивают и оставляют в покое. После того, как температура смеси будет доведена до комнатной, смесь доливают водой до отметки 50 см^3 .

К содержимому колбы для минерализации пипеткой добавляют 4 см^3 раствора батофенантролина (реактив 11) и закрывают колбу пробкой. Энергично встряхивают колбу в течение 3 мин, следя за тем, чтобы пробка оставалась на месте. Охлаждают проточной водой в течение 10 мин и несколько раз после охлаждения осторожно наклоняют колбу. Выдерживают колбу на водяной бане в течение 1 ч при $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Переносят пипеткой верхний слой изоамилового спирта в кювету длиной 10 мм. Измеряют оптическую плотность изоамилового спирта анализируемого раствора и контрольной пробы при длине волны 533 нм, используя в качестве эталона воду. Из полученных данных находят разность между значением, полученным для анализируемого раствора, и значением, полученным для контрольной пробы. Для всех определений, включая контрольную пробу, проводят по два испытания.

Построение калибровочного графика. Пипеткой переносят в шесть колб для минерализации по $0; 1; 2; 3; 5$ и 10 см^3 стандартного раствора железа (реактив 14). Доливают водой до 10 см^3 . В каждую колбу добавляют по 3 см^3 азотной кислоты (реактив 4) и по $1,8 \text{ см}^3$ раствора сульфата калия. Проводят минерализацию и окрашивание.

Пипеткой переносят в кювету длиной 10 мм из каждой колбы слой (верхний) изоамилового спирта. Измеряют оптическую плотность изоамилового спирта при длине волны 533 нм, используя в качестве эталона воду. Вычитают значение, полученное для воды, из значений, полученных для других растворов.

Строят график зависимости оптической плотности от количества железа, содержащегося в рабочих стандартных растворах.

Содержание железа m_{Fe} (мг/кг) в анализируемом продукте (кроме сливочного масла) рассчитывают по формуле:

$$m_{Fe} = \frac{m_1}{m_0}, \quad (14)$$

где m_1 — масса железа, определяемая по градуировочному графику, мкг;

m_0 — масса пробы продукта для анализа, г.

Содержание железа в сливочном масле:

$$m_{Fe} = \frac{m_3 m_1}{m_2 m_0}, \quad (15)$$

где m_3 — масса плазмы, полученной из пробы масла, г;
 m_2 — масса пробы масла, г;
 m_1 — масса железа в плазме, определяемая по градуировочному графику, мкг;
 m_0 — масса плазмы, взятая для анализа, г.

Содержание железа в продукте рассчитывают с точностью до 0,001 для молока, кефира, пахты, молочной сыворотки, сливок, сливочного масла, молочного жира и с точностью до 0,01 – для молока сгущенного с сахаром и без сахара, молока сухого, сухой пахты, мороженого, сыра натурального и плавленного, казеина, казеинатов и молочного белка.

Лабораторная работа №3

Определение массовой доли лактозы методом Лоренса

Принцип метода состоит в извлечении белков из исследуемого продукта (молоко, кисломолочные напитки) путем растворения гидроксидом натрия, последующем фильтровании, добавлении к фильтрату фенола и концентрированной серной кислоты и фотометрировании образованного комплекса лактозы с фенолом на спектрофотометре или фотоэлектроколориметре при длине волны 490 нм и черном светофильтре.

Приготовление реактивов.

1 М раствор гидроксида натрия: 70 см³ насыщенного раствора гидроксида натрия вносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят объем до метки свежeproкипяченной и охлажденной водой.

Насыщенный раствор гидроксида натрия: растворяют в равном по объему количестве воды, например, 500 г NaOH растворяют в 500 см³ воды, предварительно прокипяченной для удаления CO₂. Так как раствор при этом сильно разогревается, растворение выполняют в фарфоровой чашке, добавляя NaOH к воде постепенно с непрерывным перемешиванием. Раствор отвечает примерно 16 Н раствору NaOH. Переливают раствор в емкость с резиновой пробкой, дают отстояться осадку Na₂CO₃ (одну-две недели).

Проведение анализа. 1 г продукта смешивают с 25 см³ дистиллированной воды. Добавляют 2 см³ 1 М раствора гидроксида натрия (реактив 1) и помещают в мерную колбу на 100 см³, перемешивают до растворения белков и доводят объем дистиллированной водой до метки. Раствор фильтруют, 1 см³ фильтрата смешивают с 1 см³ 5% раствора фенола и 5 см³ концентрированной серной кислоты.

Массовую долю лактозы в продукте рассчитывают по градуировочному графику в пробе продукта, затем пересчитывают на 100 г продукта по формуле:

$$L=C/100, \quad (16)$$

где L – массовая доля лактозы в исследуемом продукте, %;

C – концентрация лактозы в растворе для анализа по градуировочному графику, мкг/см³.

Чтобы получить данные для построения графика, из 2 % раствора лактозы (реактив А) готовят 0,2 % раствор (реактив Б). Для этого в мерную колбу вместимостью 200 см³ вносят 20 см³ реактива А и доводят объем

дистиллированной водой до метки, а из полученного раствора (реактив Б) готовят разведения (табл. 4).

Для фотометрирования берут 1 см³ каждого разведения, смешивают с 1 см³ 5 % раствора фенола и с 5 % концентрированной серной кислоты. Определяют оптическую плотность и строят градуировочный график.

Таблица 4

Концентрация лактозы и объем разведения

| Реактив Б | Объем, см ³ | | Концентрация лактозы в разведении, мкг/см ³ |
|-----------|------------------------|--|--|
| | Дистиллированная вода | | |
| 1 | 99 | | 20 |
| 2 | 98 | | 40 |
| 3 | 97 | | 60 |
| 4 | 96 | | 80 |
| 5 | 95 | | 100 |
| 10 | 90 | | 200 |
| 15 | 85 | | 300 |
| 20 | 80 | | 400 |
| 25 | 75 | | 500 |
| 30 | 70 | | 600 |
| 35 | 65 | | 700 |
| 40 | 60 | | 800 |

Лабораторная работа №4

Определение массовой доли карбонильных соединений

Основная масса вторичных продуктов окисления, обуславливающих прогоркание жира, представлена низкомолекулярными соединениями, в том числе карбонильными. Поэтому определение карбонильных соединений позволит дать косвенную характеристику окислительных процессов, происходящих в жирах, связанных с образованием вторичных продуктов окисления.

Метод основан на взаимодействии карбонильных соединений, главным образом альдегидов, с бензидин-ацетатом с образованием продуктов, интенсивно поглощающих свет в ультрафиолетовой области с максимумом при $\lambda=350$ нм.

Сущность метода заключается в том, что жир растворяют в смеси абсолютного этанола с изооктаном, обрабатывают бензидином и после экспозиции измеряют светопропускание раствора при $\lambda=350$ нм.

Для вычисления количества альдегидов из полученного значения вычитают пропускание, измеренное до обработки жира бензидином. Содержание альдегидов выражают в мг % коричневого альдегида.

Приготовление реактивов.

Смесь (1:1) изооктана и абсолютного этанола.

0,5 % раствор бензидина: растворяют отвешенное количество бензидина в смеси (1:1 по объему) абсолютного этанола и ледяной уксусной кислоты.

Проведение анализа. На весах отвешивают около 1 г жира в мерную колбу вместимостью 25 см³ и доводят до метки смесью (1:1) изооктана и абсолютного этанола, свободного от альдегидов. Если раствор окажется мутным, его отфильтровывают через бумажный фильтр.

В двухсантиметровой кювете фотоэлектроколориметра определяют пропускание раствора в процентах по отношению к смеси растворителей со светофильтром № 2. Затем в две пробирки отбирают пипеткой по 5 см³: в одну – раствор масла, в другую – смесь растворителей. В каждую пробирку добавляют по 0,5 см³ 0,5 % свежеприготовленного раствора бензидина, содержимое встряхивают, выдерживают 15 мин и определяют пропускание раствора масла в процентах по отношению к смеси растворителей, обработанных бензидином. Полученное значение включает суммарное пропускание самого жира и содержащихся в нем альдегидов.

Показания отсчитывают несколько раз и берут среднее значение пропускания в процентах.

Массовую долю карбонильных соединений X в мг % коричневого альдегида рассчитывают по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{(D_1 \cdot 1,1 - D) \cdot 0,039 \cdot 5 \cdot 100}{2m}, \quad (17)$$

где D_1 – оптическая плотность раствора масла после обработки бензидином;

D – оптическая плотность раствора масла до обработки бензидином;

1,1 – коэффициент, выражающий отношение общего объема взятых растворов (5 см³ раствора масла + 0,5 см³ раствора бензидина) к 1 см³ раствора масла;

0,039 – фактор для коричневого альдегида – бензидина при $\lambda=350$ нм;

5 – количество раствора масла, взятое для обработки бензидином, см³;

m – масса исследуемого масла, г;

2- толщина слоя масла, см.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность фотометрического метода анализа?
2. В чем состоит отличие фотоэлектроколориметрии от спектрофотометрии?
3. Дайте определение основного закона светопоглощения.
4. Объясните сущность методов определения концентрации анализируемого вещества: 1) градуировочного графика; 2) метода добавок.
5. Чему равна оптическая плотность раствора?
6. В каком случае в фотометрическом анализе используется свойство аддитивности оптической плотности?
7. Назовите основные узлы приборов для анализов по светопоглощению. Каково назначение каждого из этих узлов?
8. Назовите фотометрические приборы, предназначенные для работы в: а) видимом; б) ультрафиолетовом; в) инфракрасном участке спектра.

2. РЕФРАКТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

При прохождении через поверхность раздела двух сред световой луч отклоняется от первоначального направления, т.е. преломляется. Величина угла отклонения зависит от концентрации вещества и температуры среды.

Если монохроматический луч A проходит через поверхность раздела двух сред, то одна часть света A' отражается от поверхности раздела, а другая часть B проходит через вторую среду, изменяя при этом направление (рис. 7). Эту часть монохроматического света называют преломленным светом.

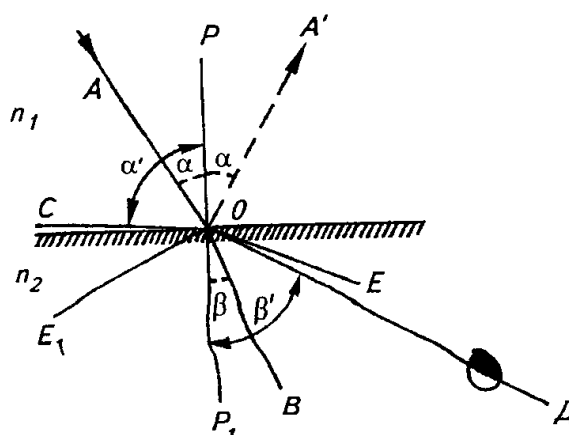


Рис. 7. Схема прохождения лучей света

Метод рефрактометрии основан на определении показателя преломления (рефракции). Показатель преломления зависит от температуры и концентрации раствора, а также от длины волны проходящего света.

Каждое вещество в смеси сохраняет преломляющую способность, и показатель преломления смеси соответствует сумме показателей преломления всех входящих в смесь компонентов.

При прохождении луча света из одной среды в другую, например из воздуха в стекло, он направлен по прямой, когда падает перпендикулярно на поверхность раздела двух сред. Если луч света падает под некоторым углом, он преломляется и отношение синуса угла падения (угол между направлением падающего луча и перпендикуляром к поверхности раздела сред) к синусу угла преломления (угол между направлением преломленного луча к перпендикуляру поверхности раздела) является постоянной величиной и выражается как показатель преломления, в данном случае стекла по отношению к воздуху.

Если луч света A направлен под углом α из среды с меньшим показателем преломления в среду с большим показателем преломления, то, изменив направление, он приближается к перпендикуляру PP_1 и угол преломления β будет меньше угла падения α . Если луч B переходит из одной среды более плотной в среду менее плотную, то, преломляясь, он удаляется от перпендикуляра и занимает положение луча A . Если при переходе из менее плотной среды в более плотную падающий луч C образует с перпендикуляром угол α' , приближающийся к 90° , то соответствующий ему луч преломления D будет давать с перпендикуляром угол β' , лежащий в меньшей угловой области.

Так как угол падения не может быть больше 90^0 , то соответствующий ему преломленный луч D является пограничным лучом распространения света в этой среде.

Луч света E, падающий под углом, больше предельного, не преломляется, а полностью отражается; он претерпевает «полное внутреннее отражение» от границы раздела, приобретая направление OE₁. С правой стороны от луча D будет темнота, а с левой свет.

При переходе к полному отражению резко возрастает яркость света и это дает возможность установить направление предельного угла.

Устройство рефрактометров (рис.8) основано на явлении полного внутреннего отражения на границе раздела двух сред, из которых одна является более плотной. Рефрактометры имеют две призмы – измерительную и осветительную. Измерительная призма изготовлена из оптического стекла с высоким известным показателем преломления. Одна из ее граней служит границей раздела, где происходит преломление и полное внутреннее отражение. Рефрактометр снабжен двумя шкалами – шкалой показателя преломления и шкалой содержания сухих веществ (по сахарозе) в весовых процентах.



Рис. 8. Рефрактометр ИРФ-454 Б2М

Принцип работы рефрактометра. Для нанесения исследуемой жидкости на измерительную призму, оправа осветительной призмы с помощью рукоятки откидывается. Несколько капель исследуемой жидкости помещают между гранями осветительной призмы с матовой гранью и измерительной призмы с полированной гранью. Поскольку на рефрактометре исследуются вещества, показатель преломления которых меньше показателя преломления измерительной призмы, то лучи всех направлений, преломившись на границе жидкости и стекла, войдут в измерительную призму. При рассмотрении пучка лучей, выходящих из измерительной призмы в зрительную трубу, нижняя часть ее поля зрения будет освещена, а верхняя останется темной. В этом положении граница раздела светотени определится лучом, выходящим из призмы под предельным углом. Граница светотени, наблюдаемая в окуляр, соответствует предельному углу преломления измеряемой жидкости. Установив границу раздела света и тени и устранив ее окрашенность, выполняют отсчет.

Определению показателя преломления предшествует проверка правильности показаний рефрактометра по дистиллированной воде. Рефрактометр считается установленным, если граница светлого и темного полей находится напротив показателя преломления, равного 1,333, который соответствует содержанию сухих веществ 0,0 %.

Расчет концентраций вещества по показателям преломления раствора ведут следующими методами: по калибровочному графику, по таблицам, по рефрактометрическому фактору, методом добавок.

По калибровочному графику: калибровочный график строят по растворам вещества известной концентрации (концентрация – показатель преломления), измеряют показатель преломления анализируемого раствора, и на графике по показателю преломления определяют концентрацию.

По таблицам: для многих веществ составлены таблицы, в которых приведены показатели преломления растворов с известной концентрацией.

По рефрактометрическому фактору: если известен рефрактометрический фактор, для расчета концентраций используют формулу:

$$\tilde{N} = \frac{n_1 - n_0}{F}, \quad (18)$$

где n_1 – показатель преломления раствора;

n_0 – показатель преломления растворителя;

F – рефрактометрический фактор, показывающий увеличение показателя преломления при росте концентрации вещества на 1 %.

Рефрактометрический фактор определяют экспериментально или по таблицам показателей преломления.

Например: для NaCl фактор F равен разности между показателями преломления 4% раствора $n_1 = 1,3397$ и 2 % раствора $n_2 = 1,3364$, деленной на разность концентраций (равную 2 %):

$$F = \frac{1,3397 - 1,3364}{4 - 2} = 0,00165, \quad (19)$$

Метод добавок: сначала определяют показатель преломления исследуемого раствора в трехкратном повторе, затем к исследуемому раствору добавляют определенные объемы стандартного раствора с известной концентрацией, каждый раз снимая показатель преломления в трехкратной повторности и ведут расчет по формуле:

$$C_x = \frac{n_x \cdot c_{\text{доб}}}{n_{\text{доб}} - n_x}, \quad (20)$$

где n_x – показатель преломления анализируемого раствора;

$n_{\text{доб}}$ – показатель преломления анализируемого раствора с добавкой стандартного раствора;

$c_{\text{доб}}$ – концентрация добавок с учетом общего объема, %.

Лабораторная работа №1

Определение состава смеси глицерин – вода

В пробирках с притертыми пробками готовят стандартные растворы смеси глицерина и воды в соотношениях, указанных в таблице 5.

Таблица 5

Соотношения воды и глицерина для получения стандартных смесей

| Глицерин, мл | Вода, мл | Глицерин, мл | Вода, мл |
|--------------|----------|--------------|----------|
| 1,0 | 9,0 | 6,0 | |
| 2,0 | 8,0 | 7,0 | 3,0 |
| 3,0 | 7,0 | 8,0 | 2,0 |
| 4,0 | 6,0 | 9,0 | 1,0 |
| 5,0 | 5,0 | | |

Таблица 6

Показатели преломления водных смесей глицерина

| № смеси глицерин - вода | Содержание глицерина, % | Показатель преломления | | | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------------------|
| | | n_1 | n_2 | n_3 | $n_{\text{сред}}$ |
| 1 | 10 | | | | |
| 2 | 20 | | | | |
| 3 | 30 | | | | |
| 4 | 40 | | | | |
| 5 | 50 | | | | |
| 6 | 60 | | | | |
| 7 | 70 | | | | |
| 8 | 80 | | | | |
| 9 | 90 | | | | |

Растворы тщательно перемешивают. Измеряют показатели преломления чистых глицерина и воды, а также каждой смеси. Для этого на центральную часть сухой чистой поверхности нижней призмы наносят оплавленной стеклянной палочкой 1-2 капли раствора, закрывают плавно верхней призмой и определяют показатель преломления по левой шкале. Определение проводят три раза. Полученные данные заносят в таблицу 6.

Строят калибровочный график в координатах глицерин (%) – показатель преломления. Измеряют показатель преломления анализируемого раствора и по графику находят состав смеси глицерин – вода.

Лабораторная работа №2

Определение массовой доли жира рефрактометрическим методом

Рефрактометрический метод определения массовой доли жира основан на объемной аддитивности показателя преломления, т.е. показатель преломления

раствора жира является средневзвешенной величиной (по объему) показателей преломления жира и чистого растворителя.

Из навески исследуемого объекта жир извлекают нелетучим растворителем с высоким показателем преломления. Объем растворителя отмеряют точно. Измеряют показатель преломления смеси (раствора жира в растворителе), по которому с учетом заранее известных показателей преломления используемого растворителя и определяемого жира, объема и плотности растворителя рассчитывают массу извлеченного жира. Результат получают в процентах, отнеся полученную массу жира к массе навески объекта исследования.

Для анализа используют рефрактометры с пределом измерения по показателю преломления до 1,7.

Объект исследования тщательно измельчают. Массу навески устанавливают, исходя из предполагаемой (ориентировочной) массовой доли жира в объекте исследования согласно приведенным ниже данным.

Таблица 7

Данные для исследования

| Предполагаемая массовая доля жира в объекте, % | Масса навески, г |
|---|-------------------------|
| Более 30 | 0,5 |
| 20-30 | 0,75 |
| 10-20 | 1,0 |
| Менее 10 | 1,5 |

Проведение анализа. Измельченную навеску объекта исследования помещают в ступку или маленькую фарфоровую чашку и растирают пестиком в течение 2 – 3 мин. Затем приливают прокалиброванной пипеткой 2,0 см³ растворителя и растирают содержимое ступки 3 мин. Для улучшения растворения и извлечения жира можно внести в ступку немного чистого сухого песка.

Если исследуемый объект содержит более 5 % воды, то ступку или чашку с навеской подсушивают в сушильном шкафу при температуре 103—105 °С и только после охлаждения вводят растворитель.

Содержимое ступки или чашки после экстракции жира растворителем фильтруют, используя небольшую воронку, в которую помещают складчатый фильтр. Фильтрат собирают в маленький стаканчик со стеклянной палочкой с оплавленными концами. Этой палочкой фильтрат перемешивают и наносят 2 – 3 капли на призму рефрактометра. Измерения проводят при температуре 20 ± 1 °С. При этой же температуре параллельно, так же как и для раствора жира, устанавливают показатель преломления чистого растворителя. Для этого 1 – 2 капли его наносят на призму рефрактометра.

Растворитель отмеривают прокалиброванной по массе пипеткой. Плотность растворителя, применяемого для калибрования пипетки, определяют пикнометром.

Для калибрования пипетки в заранее взвешенный на аналитических весах стаканчик отмеривают растворитель и взвешивают. Операцию с отмериванием

и взвешиванием проводят не менее 3 раз. При этом отмеривают тот объем растворителя, который в дальнейшем предполагается использовать в анализе. Из полученных результатов взвешивания вычисляют среднее значение массы растворителя. Разделив это значение на значение ранее определенной плотности, получают точный объем растворителя, отмериваемого данной пипеткой.

При применении монобром- или моноклорнафталина используют прокаленную пипетку объемом 2 см³, при использовании трикрезилфосфата — объемом 5 см³.

Массовая доля жира в объекте исследования (%):

$$X = \frac{V_D d_{\alpha} (n_{\delta} - n_{\delta.\alpha.}) \cdot 100}{m(n_{\delta.\alpha.} - n_{\alpha})}, \quad (21)$$

где V_P — объем растворителя, отмеренный прокаленной пипеткой, см³; $d_{жс}$ — плотность жира при 20 °C, г/см³; n_p , $n_{p.жс}$, $n_{жс}$ — соответственно показатели преломления растворителя, раствора жира и жира (см. табл. 8); m — масса навески исследуемого объекта, г.

Таблица 8

Показатели преломления и плотности масел и жиров

| Масло | Показатель преломления (n_D^{20}) | Плотность ($d_{ж}^{20}$), г/см ³ |
|--------------|---------------------------------------|---|
| Какао | 1,4647 | 0,913 |
| Кунжутное | 1,4730 | 0,919 |
| Подсолнечное | 1,4736 | 0,924 |
| Сливочное | 1,4605 | 0,920 |
| Маргарин | 1,4690 | 0,923 |
| Арахисовое | 1,4696 | 0,914 |

Некоторые объекты исследования содержат неизвестный жир или смесь жиров (какао-масло и сливочное масло в шоколаде с молоком, ореховое масло и какао-масло в пралине и т. п.). В этом случае показатель преломления устанавливают экспериментально, выделив предварительно неизвестный жир или смесь жиров из объекта исследования экстракцией растворителем.

Практически 5–10 г тонко измельченного объекта исследования смешивают с 15–20 см³ петролейного эфира, хлороформа или тетрахлорметана (четырёххлористого углерода) и взбалтывают. Вытяжку отфильтровывают в колбу, а растворитель полностью отгоняют. Полученный жир подсушивают и 1–2 капли его наносят на призму рефрактометра. Полученное значение принимают за показатель преломления смеси жиров $n_{жс}$ и используют для расчета результатов анализа. Для смеси жиров и неизвестного жира плотность условно можно принять равной 0,925 г/см³.

Жир из объектов, включающих молоко, извлечь трудно, поэтому навеску их предварительно обрабатывают уксусной кислотой. Так, например, обрабатывают халву и все мучные кондитерские изделия, что облегчает переход жира в раствор.

Для обработки навески объекта исследования используется 80 % раствор уксусной кислоты. Обработку навески и извлечение жира растворителем проводят следующим образом.

Навеску предварительно измельченного объекта исследования массой 1 г берут с точностью до $\pm 0,0002$ г и помещают в фарфоровую ступку. Затем прибавляют $0,5 \text{ см}^3$ дистиллированной воды и содержимое растворяют при нагревании на водяной бане. Вместо ступки может быть использована маленькая фарфоровая чашка. Введя около 1 части чистого сухого песка, все хорошо растирают, добавляют 1 см^3 уксусной кислоты 80 % концентрации и нагревают на песчаной бане в течение 2 мин. Охладив ступку (чашку), к содержимому прибавляют 2 см^3 монобромнафталина, отмеренного прокалиброванной по массе пипеткой. Все тщательно растирают в течение 3 мин, добавляют 1 г безводного гидроксида натрия, перемешивают и фильтруют в маленький стаканчик с маленькой стеклянной палочкой с оплавленными концами. Показатель преломления определяют, как указано выше. Параллельно определяют показатель преломления чистого растворителя, взятого при тех же условиях.

Определение показателя преломления раствора жира и чистого растворителя проводят не менее 3 раз и за результат берут среднее арифметическое значение.

При рефрактометрировании жира или растворителя жира необходимо поддерживать температуру 20°C или близкую к ней. Для компенсации отклонений от 20°C вносят поправку, которая на каждый 1°C составляет: для жира $\pm 0,00035$; для монобромнафталина $\pm 0,00046$; для раствора жира $\pm 0,0004$. При температуре ниже 20°C поправку берут со знаком «-», а при температуре выше 20°C — со знаком «+», т.е. от значения показателя преломления либо отнимают, либо прибавляют поправку. Например, раствор жира рефрактометрировали при температуре 22°C . Значения рефрактометра составили 1,6381, с учетом поправки показатель преломления раствора жира:

$$n_D = 1,6381 + 2 \times 0,0004 = 1,6389.$$

В последнее время в качестве заменителя монобромнафталина и моноклорнафталина применяют трикрезилфосфат, который почти не имеет запаха и менее летуч.

Трикрезилфосфат — трикрезиловый эфир фосфорной кислоты $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}$ с молекулярной массой 368,4. Существуют 3 изомера (орто-, мета- и пара-), различающиеся положением заместителей в бензольном кольце. Для анализа используют орто-трикрезилфосфат высокой степени очистки, который обладает стабильными свойствами. В частности, он не меняет своих свойств, например показателя преломления при нагревании на водяной бане в течение 10 – 15 мин.

Выполнение анализа по определению жира с применением трикрезилфосфата в основном не отличается от методики с использованием монобромнафталина. Изменение заключается в том, что для анализа берут 5 см^3 трикрезилфосфата, а не 2 см^3 , как предусмотрено для

монобромнафталина. После смешивания с навеской экстракцию проводят в течение 10 мин, нагревая смесь на водяной бане.

Полученный раствор жира фильтруют в подогретом состоянии, а затем после охлаждения рефрактометрируют. Результат анализа рассчитывают по формуле, приведенной выше, подставляя соответствующие данные трикрезилфосфата вместо монобромнафталина и результаты измерений.

Лабораторная работа №3

Определение лактозы в молоке

Определение основано на измерении показателя преломления прозрачных растворов лактозы $C_{12}O_{11}H_{22}$, полученных при осаждении содержащихся в молоке белков и жиров раствором хлорида кальция.

Цель работы: овладеть приемами рефрактометрического определения лактозы в молоке и молочных продуктах (кефире, йогурте, ацидофилине, молочной сыворотке).

Реактивы: Хлорид кальция, 8 % водный раствор.

Ход работы

Подготовка проб. В стеклянный бюкс пипеткой отбирают $5,00 \text{ см}^3$ свежего молока. Для осаждения белков к анализируемой пробе добавляют $0,50 \text{ см}^3$ 8 % раствора хлорида кальция. Бюкс закрывают крышкой и нагревают 10 мин на водяной бане при температуре кипения, затем охлаждают под струей водопроводной воды примерно до $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Проведение анализа. Перед началом работы проверяют показания прибора по дистиллированной воде. На нижнюю призму рефрактометра оплавленной стеклянной палочкой наносят 1–2 капли дистиллированной воды, опускают верхнюю призму и через 2–3 мин проводят замер. Граница светотени должна быть четкой и проходить через точку пересечения нитей (перекрестие) или пунктирную линию. Рефрактометр установлен на показатель преломления дистиллированной воды при $20 \text{ }^\circ\text{C}$ – 1,333, что соответствует 0 % сухих веществ.

Для анализа исследуемых образцов капельной пипеткой осторожно отбирают несколько капель прозрачной жидкости пробы (сыворотки) и быстро (во избежание испарения влаги) помещают на нижнюю (измерительную) призму рефрактометра. Опускают верхнюю (осветительную) призму и измеряют показатель преломления при $(18 \pm 0,2) \text{ }^\circ\text{C}$, поддерживая температуру с помощью термостата. Выполняют 2–3 измерения показателя преломления молочной сыворотки, рассчитывают среднее значение.

Расчет. По таблице 9 находят массовую долю лактозы в анализируемом молоке (w, %) при соответствующих показателях преломления (N_D^{18}).

Истинное содержание лактозы в молоке получают при анализе свежего молока с кислотностью 16–20 °Т. При анализе молока с повышенной кислотностью результаты завышены.

Таблица 9

Массовая доля лактозы в молоке при 18° С

| N_D^{18} | w, % | N_D^{18} | w, % | N_D^{18} | w, % |
|------------|------|------------|------|------------|------|
| 1,3406 | 3,77 | 1,3415 | 4,23 | 1,3424 | 4,69 |
| 1,3407 | 3,82 | 1,3416 | 4,28 | 1,3425 | 4,74 |
| 1,3408 | 3,87 | 1,3417 | 4,33 | 1,3426 | 4,79 |
| 1,3409 | 3,93 | 1,3418 | 4,38 | 1,3427 | 4,84 |
| 1,3410 | 3,98 | 1,3419 | 4,44 | 1,3428 | 4,89 |
| 1,3411 | 4,03 | 1,3420 | 4,49 | 1,3429 | 4,95 |
| 1,3412 | 4,08 | 1,3421 | 4,54 | 1,3430 | 5,00 |
| 1,3413 | 4,13 | 1,3422 | 4,59 | 1,3431 | 5,05 |
| 1,3414 | 4,18 | 1,3423 | 4,64 | 1,3432 | 5,10 |

*Лабораторная работа №4***Определение содержания сухих веществ в плодово-ягодных напитках**

Проведение анализа. Перед началом работы проверяют показания прибора по дистиллированной воде (см. лаб. № 3). Затем призмы рефрактометра вытирают сухой марлей и оплавленной стеклянной палочкой наносят 1–2 капли исследуемой жидкости, профильтрованной через крупнопористую фильтровальную бумагу. Опускают верхнюю призму и через 2–3 мин производят замер. Замер производят 2–3 раза и рассчитывают среднее арифметическое. По шкале рефрактометра определяют коэффициент преломления или массовую долю сухих веществ. Если шкала рефрактометра градуирована на коэффициент преломления, то по таблице 10 находят массовую долю сухих веществ.

Таблица 10

Определение содержания сухих веществ по показателю преломления

| Показатель преломления при 20°С | Массовая доля сухих веществ, % | Показатель преломления при 20°С | Массовая доля сухих веществ, % | Показатель преломления при 20°С | Массовая доля сухих веществ, % | Показатель преломления при 20°С | Массовая доля сухих веществ, % |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1,333 | 0 | 1,3456 | 8,5 | 1,3598 | 17,5 | 1,3865 | 33,0 |
| 1,3337 | 0,5 | 1,3464 | 9,0 | 1,3606 | 18,0 | 1,3883 | 34,0 |
| 1,3344 | 1,0 | 1,3471 | 9,5 | 1,3614 | 18,5 | 1,3902 | 35,0 |
| 1,3351 | 1,5 | 1,3479 | 10,0 | 1,3622 | 19,0 | 1,3920 | 36,0 |
| 1,3359 | 2,0 | 1,3487 | 10,5 | 1,3631 | 19,5 | 1,3939 | 37,0 |
| 1,3367 | 2,5 | 1,3494 | 11,0 | 1,3639 | 20,0 | 1,3958 | 38,0 |
| 1,3374 | 3,0 | 1,3502 | 11,5 | 1,3655 | 21,0 | 1,3978 | 39,0 |
| 1,3381 | 3,5 | 1,3510 | 12,0 | 1,3672 | 22,0 | 1,3997 | 40,0 |
| 1,3388 | 4,0 | 1,3518 | 12,5 | 1,3689 | 23,0 | 1,4016 | 41,0 |
| 1,3395 | 4,5 | 1,3526 | 13,0 | 1,3706 | 24,0 | 1,4036 | 42,0 |
| 1,3403 | 5,0 | 1,3533 | 13,5 | 1,3723 | 25,0 | 1,4056 | 43,0 |
| 1,3411 | 5,5 | 1,3541 | 14,0 | 1,3740 | 26,0 | 1,4076 | 44,0 |
| 1,3418 | 6,0 | 1,3549 | 14,5 | 1,3758 | 27,0 | 1,4096 | 45,0 |
| 1,3425 | 6,5 | 1,3557 | 15,0 | 1,3775 | 28,0 | 1,4117 | 46,0 |
| 1,3433 | 7,0 | 1,3565 | 15,5 | 1,3793 | 29,0 | 1,4137 | 47,0 |
| 1,3435 | 7,1 | 1,3573 | 16,0 | 1,3811 | 30,0 | 1,4158 | 48,0 |
| 1,3441 | 7,5 | 1,3582 | 16,5 | 1,3829 | 31,0 | 1,4179 | 49,0 |
| 1,3448 | 8,0 | 1,3590 | 17,0 | 1,3847 | 32,0 | 1,4200 | 50,0 |

Массу сухих веществ для плодово-ягодных напитков (X , г) рассчитывают по формуле:

$$\tilde{O} = \frac{a \cdot P}{100}, \quad (22)$$

где a – массовая доля сухих веществ, определенная рефрактометрическим методом, %;

P – объем напитка, см^3 .

Лабораторная работа № 5

Определение массовой доли сахарозы в молочных смесях

Подготовка к испытанию. Нулевую точку рефрактометра проверяют по дистиллированной воде. Показатель преломления воды при температуре $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ равен 1,3330; температурные отклонения вызывают изменения показателя преломления воды, указанные в таблице 11.

Таблица 11

Показатель преломления воды в зависимости от температуры

| Температура | Показатель преломления воды | Температура | Показатель преломления воды |
|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|
| 15 | 1,3335 | 23 | 1,3327 |
| 16 | 1,3334 | 24 | 1,3326 |
| 17 | 1,3333 | 25 | 1,3325 |
| 18 | 1,3332 | 26 | 1,3324 |
| 19 | 1,3331 | 27 | 1,3323 |
| 20 | 1,3330 | 28 | 1,3322 |
| 21 | 1,3329 | 29 | 1,3321 |
| 22 | 1,3328 | 30 | 1,3320 |

Подготовка проб. Для определения массовой доли сахарозы в молочных смесях из аналитической пробы отвешивают 10 г продукта с погрешностью не более 0,01 г, переносят через сухую воронку в мерную колбу вместимостью 100 см^3 , приливают 50 см^3 дистиллированной воды и оставляют на 15–20 мин периодически взбалтывая. Прибавляют $0,6\text{ см}^3$ 80 % раствора уксусной кислоты, доливают колбу до метки дистиллированной водой, перемешивают содержимое и фильтруют через складчатый фильтр в сухую колбу. В фильтрате определяют показатель преломления.

Проведение анализа. Из полученного фильтрата хорошо оплавленной стеклянной палочкой наносят 2–3 капли на призму рефрактометра и определяют показатель преломления по левой шкале прибора. Во время определения показателя преломления линия раздела светлого и темного полей должна быть резко выражена. При расчете показателя рефракции необходимо отмечать температуру прибора.

Массовую долю сахарозы, X_2 , %, вычисляют по формуле:

$$X_2 = (N_1 - N) \cdot 10000 \cdot K, \quad (23)$$

где n – показатель преломления дистиллированной воды при температуре определения;

n_1 – показатель преломления испытуемого раствора при температуре определения;

K – коэффициент пересчета показателя преломления на процентное содержание сахарозы в исследуемом пищевом концентрате (для молочных смесей $K = 0,2500$ – при рецептурной закладке сахара 18 %, $K = 0,2770$ – при рецептурной закладке сахара 25 %).

За окончательный результат испытания принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений, допускаемое расхождение между которыми не должны превышать 0,3 %.

Контрольные вопросы

1. На чем основан метод рефрактометрии?
2. От каких факторов зависит показатель преломления вещества?
3. Какие физические явления происходят со светом на разделе двух сред?
4. Каковы способы расчета концентрации вещества в рефрактометрии?
5. При каких условиях рефрактометр считается установленным?
6. Объясните схему прохождения лучей света через поверхность раздела двух сред.
7. На чем основано устройство рефрактометров?

3. ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Вольтамперометрия – совокупность электрохимических методов количественного и качественного анализа, основана на использовании явления поляризации микроэлектрода, получении вольтамперных кривых, отражающих зависимость силы тока от приложенного напряжения, которые получают в процессе электролиза раствора анализируемого вещества.

Вольтамперометрическим методом можно определять практически все катионы металлов, многие анионы, неорганические и органические вещества, способные к электрохимическому окислению или восстановлению.

Если аналитическая окислительно-восстановительная реакция протекает на электродах ячейки самопроизвольно, то есть без приложения напряжения от внешнего источника, а только за счет разности потенциалов (ЭДС) ее электродов, то такую ячейку называют гальваническим элементом. При необходимости ячейку можно подсоединить к внешнему источнику напряжения. В этом случае, приложив достаточное напряжение, можно изменить направление окислительно-восстановительной реакции и тока на противоположное тому, что имеет место в гальваническом элементе. Окислительно-восстановительную реакцию, протекающую на электродах под действием внешнего источника напряжения называют электролизом, а электрохимическую ячейку, являющуюся потребителем энергии, необходимой для протекания в ней химической реакции, называют электролитической ячейкой.

В вольтамперометрии используют два электрода: рабочий поляризуемый электрод с малой поверхностью (микроэлектрод) и неполяризуемый электрод сравнения. Если в качестве рабочего выбран электрод с постоянно обновляющейся поверхностью (например, ртутный капающий электрод), то метод анализа называют *полярографическим*. Для проведения полярографического анализа составляют цепь из двух электродов, поверхность одного из которых во много раз больше (анод) поверхности другого (катод) и прилагают к этой системе разность потенциалов от внешнего источника тока. Ртутный капающий электрод (РКЭ) представляет собой капилляр, из которого равномерно с определенной скоростью вытекают капли металлической ртути. Скорость прокапывания определяется высотой подвески емкости с ртутью, соединенной шлангом с капилляром. Второй электрод, поверхность которого во много раз больше поверхности микроэлектрода, служит электродом сравнения. В качестве него используют ртуть, налитую на дно электролитической ячейки. На эти электроды от внешнего источника напряжения подают плавно изменяющееся напряжение. Плотность тока на электроде сравнения, имеющего большую поверхность, ничтожно мала, поэтому потенциал его практически не изменяется, т.е. этот электрод не поляризуется. Плотность тока на РКЭ вследствие его малой поверхности высока. РКЭ изменяет свой равновесный потенциал, т.е. поляризуется. Реализацию метода осуществляют на приборах, называемых полярографами. Принципиальная схема полярографа приведена на рисунке 9. Ток от аккумулятора поступает на реостат, при помощи которого через очень чувствительный гальванометр подается плавно повышающееся напряжение на

электролитическую ячейку, содержащую ртутный (или каломельный) электрод, РКЭ и анализируемый раствор.

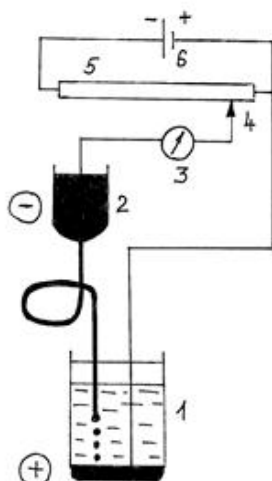


Рис. 9. Схема полярографической установки:

1 – электролизёр, 2 - сосуд с ртутью, 3 – гальванометр,
4 - подвижной контакт, 5 – реохорд, 6 - аккумулятор

Фиксируя силу тока, проходящего через ячейку, в зависимости от поданного напряжения, получают вольтамперные кривые, называемые в полярографии полярограммами (рис. 10).

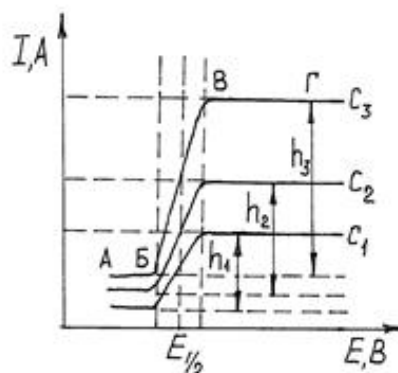
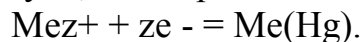


Рис. 10. Типичный вид полярограмм определяемого элемента при различных концентрациях

Форма полярограмм напоминает волну. Первый участок волны (АБ) соответствует начальному моменту процесса, когда протекает только остаточный (конденсаторный или емкостной) ток, связанный с расходом некоторого количества электричества на зарядку двойного электрического слоя на поверхности капли ртути и восстановлением следовых количеств электроактивных примесей.

Если в растворе присутствуют ионы, способные восстанавливаться на ртутном капающем электроде (катоде), то при достижении определенного значения внешнего напряжения, обеспечивающего потенциал, равный потенциалу восстановления данных ионов, на полярограмме наблюдается резкое увеличение тока. Потенциал, соответствующий точке Б на

полярограмме, называют потенциалом выделения. Восстановление иона металла на ртутном капающем электроде сопровождается растворением восстановившегося металла в ртути, т.е. образованием амальгаммы:



С этого момента рост потенциала электрода как бы отстает от роста налагаемого внешнего напряжения - электрод деполяризуется. Вещество, участвующее в электрохимической реакции и вызывающее деполяризацию электрода, называется деполяризатором. Ток, обусловленный электрохимической реакцией на электроде, называют фарадеевским, подчеркивая его связь с процессом электролиза. Подвод ионов деполяризатора к электроду осуществляется путем диффузии в приэлектродный слой раствора, концентрация в котором C_3 меньше концентрации в глубине C . Скорость диффузии, и тем самым сила тока, определяется разностью (градиентом) концентраций $C - C_3$, поэтому ток называют диффузионным током:

$$I_D = K(C - C_3), \quad (24)$$

Дальнейшее увеличение напряжения вызывает уменьшение C_3 и усиление диффузии, следовательно, также и увеличение тока (участок БВ). Так продолжается до тех пор, пока C_3 не становится практически равной нулю. Это означает, что все ионы деполяризатора, которые подходят к электроду, сразу разряжаются. Дальнейшее увеличение напряжения не вызывает роста тока - достигается предельный диффузионный ток (предельный). Он зависит от концентрации деполяризатора в растворе: $I_D = KC$, т.к. $C_3=0$.

На коэффициент пропорциональности K оказывают влияние многие факторы. Д. Ильковичем было получено уравнение, в котором отражено влияние некоторых из них:

$$I_D = 607zD^{1/2}m^{1/2}t^{1/2}C, \quad (25)$$

где z - число электронов, участвующих в электродной реакции;

D - коэффициент диффузии ионов деполяризатора;

m - масса ртути (мг), вытекающей из капилляра за одну секунду;

t - промежуток времени между двумя каплями, с.

Для обратимого восстановления деполяризатора Гейровским-Ильковичем было выведено уравнение полярографической волны:

$$E = E_{1/2} + \frac{0,058}{z} \lg \frac{I}{I_D - I}, \quad (26)$$

Когда сила тока равна половине предельного диффузионного тока ($I = 1/2 I_D$), получают $E = E_{1/2}$. Следовательно, потенциал полуволны $E_{1/2}$ не зависит от силы тока и концентрации восстанавливающего иона. Потенциал полуволны является, таким образом, качественной характеристикой иона в растворе.

Качественный анализ проводят по потенциалам полуволн деполяризаторов. При этом необходимо иметь в виду, что на значение этой величины оказывают влияние фоновый электролит, рН раствора, присутствие комплексообразующих агентов. Определив в процессе полярографирования потенциалы полуволн ионов, находящихся в растворе, и сравнив их величины с

табличными данными, можно установить, какие именно ионы находятся в растворе.

Для количественных определений уравнение Ильковича, как правило, не используют, поскольку определение численных значений всех его параметров - слишком трудоемкая работа. На практике чаще всего для целей количественного анализа пользуются высотой полярографической волны h , выраженной в мм. В количественном полярографическом анализе могут быть использованы все приемы определения концентрации: сравнение с эталоном, метод стандартных серий, метод добавок, метод градуировочного графика.

Метод градуировочного графика состоит в том, что получают полярограммы для нескольких стандартных растворов с известной концентрацией определяемых ионов, находят высоту волны и строят график в координатах h - c .

Основное условие правильного проведения полярографического анализа – подавление миграционного и конвективного токов. Эти токи возникают вследствие того, что кроме диффузии доставка деполяризатора к РКЭ может осуществляться миграцией, обусловленной действием электрического поля, и конвекцией при механическом перемешивании раствора или вследствие различий в плотности внутри раствора, вызванных перепадами концентрации или температуры. Поэтому в общем случае предельный ток складывается из диффузионного, миграционного и конвекционного токов. Но миграционный и конвекционный токи, в отличие от диффузионного, не связаны с концентрацией деполяризатора. Миграция и конвекция мешают диффузии ионов к РКЭ, следовательно, мешают полярографированию. Поэтому чтобы получить простую функциональную зависимость тока от концентрации, миграционную и конвекционную составляющую тока устраняют. Для этого в раствор добавляют приблизительно стократный избыток посторонних индифферентных (т.е. электрохимически неактивных) ионов сильного электролита, называемого фоном. В присутствии избытка ионов фона электрод будет экранирован этими ионами, и доля миграционного тока будет ничтожно мала.

Если в процессе регистрации полярограммы раствор не перемешивать и поддерживать постоянной его температуру, то практически исчезнет механическая и тепловая конвекция. В качестве фона применяют различные соли, кислоты, основания или буферные смеси, ионы которых имеют более отрицательные потенциалы выделения, чем определяемые ионы. Особенно часто применяют растворы солей щелочных и щелочно-земельных металлов (KCl, KCNS, NH_4Cl , Na_2SO_4 и т.д.). Иногда в качестве фона применяют комплексообразующие реагенты (NH_4OH , цитраты, тартраты и т.д.), которые не только подавляют миграционный ток, но и изменяют потенциалы полуволны анализируемых ионов, позволяя определять ионы с близкими значениями $E_{1/2}$.

Лабораторная работа №1

Полярнографический метод определения меди в пищевых продуктах

Метод основан на сухой минерализации (озолении) пробы с использованием в качестве вспомогательного средства азотной кислоты и количественном определении меди полярографированием в режиме переменного тока.

При анализе поваренной соли используют метод, основанный на растворении поваренной соли в воде, разрушении органических соединений и определении меди полярографированием в режиме переменного тока.

Ход работы

Подготовка к испытанию.

1. *Очистка инертного газа от кислорода.* При наличии примеси кислорода более 0,001 % газ пропускают через поглотительную смесь, состоящую из раствора пирогаллола и гидроксил калия в соотношении 1:5.

2. *Приготовление фоновых электролитов*

Фоновый электролит А – смешанный раствор ортофосфорной кислоты концентрации $c(1/3 \text{ H}_2\text{PO}_4) = 1,3 \text{ моль/дм}^3$ и хлорной кислоты концентрации $c(\text{HClO}_4) = 0,7 \text{ моль/дм}^3$; смешивают разбавленные ортофосфорную, хлорную кислоты и воду в соотношении 3:2:5. Используют при анализе мяса, мясопродуктов и плодоовощных консервов; кондитерских изделий.

Фоновый электролит В – раствор соляной кислоты концентрации $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$. Отмеривают пипеткой $8,2 \text{ см}^3$ соляной кислоты плотностью $1,19 \text{ г/см}^3$ в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят водой до метки. Используют при анализе виноматериалов, хлеба и хлебобулочных продуктов

Фоновый электролит В – раствор соляной кислоты концентрации $c(\text{HCl}) = 0,4 \text{ моль/дм}^3$. Отмеривают цилиндром 33 см^3 кислоты плотностью $1,19 \text{ г/см}^3$ в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 и доводят до метки водой. Используют при анализе зерна и продуктов его переработки; хлеба, хлебобулочных и кондитерских изделий.

Фоновый электролит Г – раствор хлористого аммония концентрации $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 1 \text{ моль/дм}^3$ и аммиака концентрации $c(\text{NH}_3) = 1 \text{ моль/дм}^3$ готовится следующим образом: $53,49 \text{ г}$ хлористого аммония растворяют в небольшом количестве воды, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см^3 , в колбу добавляют водяной раствор аммиака в таком объеме, который содержит 17 г аммиака. Необходимый объем раствора аммиака рассчитывают на основе измеренных ареометром показателей плотности (около 75 см^3). Объем в колбе доводят до метки. Используют при анализе мяса, мясопродуктов; мяса птицы, яиц и продуктов их переработки; молока и молочных продуктов; желатина; мясных, мясорастительных и плодоовощных консервов; пива, винодельческих продуктов.

Фоновый электролит Д – раствор хлористого натрия концентрации 50 г/дм^3 , содержащий серную кислоту и надсерноокислый аммоний. Раствор готовят следующим образом: $50,00 \text{ г}$ хлористого натрия количественно

переносят в коническую колбу вместимостью 2 дм³, растворяют в 1 дм³ дистиллированной воды, приливают 10 см³ раствора серной кислоты и вносят около 10 г надсерноокислого аммония. Кипятят раствор в течении 30 мин, охлаждают до комнатной температуры, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм³ и разбавляют дистиллированной водой до метки.

Фоновый электролит E – раствор хлористого натрия концентрации 50 г/дм³. Раствор готовят следующим образом: 50,00г хлористого натрия количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1 дм³, растворяют в бидистиллированной воде и доводят до метки. Используют при анализе вакуум-выварочной соли.

3. Приготовление основного раствора меди. Серноокислую медь дважды перекристаллизовывают и высушивают в эксикаторе до постоянной массы. 3,929 г серноокислой меди растворяют в воде, переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³, добавляют 1 см³ серной кислоты плотностью 1,84 г/см³ и доводят объем до метки. Основной раствор хранят не более 1 года. Концентрация меди в основном растворе равна 1 мг/см³.

Стандартные растворы необходимой концентрации готовят последовательным разбавлением в 10, 100, 1000 раз основного раствора меди. При измерении концентрации меди в испытуемом растворе с использованием фонового электролита А разбавление проводят водой, в остальных случаях – соответствующим фоновым электролитом.

4. Минерализация. Минерализацию проб проводят сухим способом по ГОСТ 26929. При анализе поваренной соли минерализацию пробы не проводят.

5. Приготовление контрольного раствора. Проверяют каждую новую партию реактивов. Контрольный раствор готовят, используя все реактивы и растворы, аналогично приготовлению испытуемого раствора. Если контрольный раствор содержит измеримое количество меди, его готовят ежедневно при каждой серии измерений.

6. Приготовление испытуемого раствора

При использовании фонового электролита А золу, приготовленную в результате минерализации пробы, растворяют в тигле при нагревании на водяной бане в 5 см³ разбавленной (1:2) азотной кислоты. Раствор выпаривают до влажных солей. К осадку в тигле добавляют 2 см³ разбавленной хлорной кислоты и нагревают на водяной бане в течении 5 мин. Раствор охлаждают, добавляют 3 см³ ортофосфорной кислоты, 3 см³ воды, тщательно перемешивают и дают отстояться осадку. Раствор фильтруют в мерную пробирку через обеззоленный фильтр, предварительно промытый фоновым электролитом. Тигель и фильтр смывают водой, доводя объем до 10 см³. Концентрация меди в испытуемом растворе должна быть от 0,2 до 3 мкг/см³. В случае более высокой концентрации проводят его дополнительное разведение фоновым электролитом.

При использовании фонового электролита Б приготовленную золу растворяют в тигле при нагревании на электроплитке в 5 см³ разбавленной (1Э:1) соляной кислоты. Раствор выпаривают на электроплитке до объема около 1 см³ и затем досуха на водяной бане. Осадок растворяют при нагревании

на водяной бане в 5 см³ фонового электролита, охлаждают и фильтруют в мерную пробирку через обеззоленный фильтр, предварительно промытый фоновым электролитом. Смазывают тигель и фильтр фоновым электролитом и доводят объем раствора до 10 см³. Концентрация меди в испытуемом растворе должна быть от 2 до 8 мкг/см³. В случае более высокой концентрации проводят его дополнительное разведение фоновым электролитом.

При использовании фонового электролита В приготовленную золу растворяют в 8 см³ фонового электролита, внося его порциями по 2 см³ и перемешивая стеклянной палочкой. После полного растворения золы раствор фильтруют через обеззоленный фильтр, предварительно промытый фоновым электролитом, в мерную пробирку, смывают тигель и фильтр тем же раствором и доводят объем до 10 см³. Концентрация меди в испытуемом растворе должна быть, от 2 до 8 мкг/см³.

При использовании фонового электролита Г при анализе всех продуктов, кроме молока и молочных продуктов, золу растворяют в тигле при нагревании на водяной бане в 5 см³ разбавленной соляной кислоты. Раствор нейтрализуют водным раствором аммиака по универсальной индикаторной бумаге и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³, смывая тигель несколько раз водой. К раствору в колбе добавляют водный раствор аммиака в таком объеме, который содержит 0,43 г аммиака. Необходимый объем этого раствора рассчитывают по его плотности, измеренной ареометром. Объем раствора в колбе доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют через обеззоленный, предварительно промытый фоновым электролитом. Концентрация меди в испытуемом растворе должна быть от 0,1 до 0,4 мкг/см³. В случае более высокой концентрации поступают так же, как описано выше.

При использовании фонового электролита Г при анализе молока и молочных продуктов золу растворяют в тигле при нагревании на электроплитке в 5 см³ разбавленной (1:1) соляной кислоты. Раствор выпаривают на электроплитке затем досуха на водяной бане. Осадок растворяют в 4 см³ раствора лимоннокислого аммония и нейтрализуют водным раствором аммиака по универсальной индикаторной бумаге. Содержимое тигля переносят в мерную колбу вместимостью 25 см³ смывая его несколько раз фоновым электролитом. Если появляется помутнение раствора, объем добавляемого лимоннокислого аммония следует увеличить до 5 см³. Объем раствора в колбе доводят до метки фоновым электролитом, перемешивают и фильтруют через обеззоленный фильтр, предварительно промытый фоновым электролитом. Концентрация меди в испытуемом растворе должна быть от 0,1 до 4 мкг/см³.

При анализе поваренной соли 5,00 г соли растворяют в 20 см³ дистиллированной воды в конической колбе вместимостью 250 см³, приливают 1 см³ раствора серной кислоты и вносят около 1 г надсернистого аммония. Присоединяют обратный холодильник и кипятят раствор в течении 30 мин. Охлажденный раствор фильтруют через промытый соляной кислотой (1:1) и дистиллированной водой фильтр в мерную колбу вместимостью 100 см³, смывают колбу и фильтр дистиллированной водой и объем доводят до метки. Концентрация меди в растворе должна быть 0,1 – 4,0 мкг/см³. В случае более

высокой концентрации проводят его дополнительное разведение фоновым электролитом Д.

При анализе вакуум-выпарочной соли обработку раствора соли кипячением в серной кислоте с надсернистым аммонием не проводят, а разбавление проводят фоновым электролитом Е.

Проведение испытания. Измерение проводят на полярографе в режиме переменного тока с ртутно-капельным электродом в электролизере вместимостью 5 см³. Полярограмму записывают при напряжении от минус 0,1 до 0,5 В относительно данной ртути, выбирая режим работы в соответствии с инструкцией к полярографу.

При анализе поваренной соли используют электролизер вместимостью 25 см³, полярограмму записывают при напряжении от минус 0,1 до минус 0,4 В.

Полярографирование при использовании фоновых электролитов А, Б и В. В две конические колбы вместимостью 10 или 25 см³ помещают по 4 см³ контрольного и испытуемого раствора. В первую колбу добавляем 1 см³ соответствующего фонового электролита или воду (при работе с фоновым электролитом А) и пропускают через раствор или любой инертный газ в течении 10 мин.

Раствор немедленно переносят в электролизер, предварительно промытый водой, фоновым электролитом и полярографируемым раствором, полярографируют и измеряют высоту пика меди.

Во вторую колбу вносят добавку – стандартный раствор меди в таком количестве, чтобы высота пика на полярограмме удвоилась по сравнению с первоначальной. Добавку следует вносить в малом объеме (не более 1 см³), чтобы предотвратить изменение концентрации фонового электролита и зольных элементов. Затем в колбу добавляют фоновый электролит или воду (при работе с фоновым электролитом А) в объеме, необходимом для доведения его до 5 см³. Пропускают инертный газ, полярографируют в тех же условиях и измеряют высоту пика меди.

Полярографирование при использовании фонового электролита Г.

В две конические колбы вместимостью 10 или 25 см³ помещают по 8 см³ контрольного и испытуемого раствора и 1 см³ раствора сульфата натрия. В первую колбу добавляют 1 см³ воды. Раствор переносят в электролизер, предварительно промытый как в предыдущем пункте, полярографируют и измеряют высоту пика меди.

Во вторую колбу вносят добавку так же, как описано выше. Далее поступают как с раствором без добавки. Необходимые объемы жидкости отбирают только пипетками.

Полярографирование при использовании фонового электролитов Д и Е. 25 см³ испытуемого раствора с помощью пипетки вносят в электролизер, предварительно промытый водой и полярографируемым раствором. Пропускают инертный газ в течении 10 мин, полярографируют и измеряют высоту пика меди.

Далее в электролизер вносят добавку – стандартный раствор меди в таком объеме, чтобы высота пика меди на полярограмме примерно удвоилась по сравнению с первоначальной. Добавку следует вносить в малом объеме (не более $0,5 \text{ см}^3$), чтобы предотвратить изменение концентрации фонового электролита. Пропускают инертный газ, полярографируют в тех же условиях и измеряют высоту пика меди.

Аналогично проводят полярографирование контрольного раствора.

Обработка результатов. Массовую долю меди (X) в млн^{-1} (мг/кг) или массовую концентрацию (X) в мг/дм^3 вычисляют по высоте пиков, измеренных на полярограммах с помощью линейки с точностью до 1 мм, соответственно по формулам:

$$\tilde{O} = \left[\frac{m_1 \cdot H_1 \cdot V_0 \cdot B}{(I_2 - I_1) \cdot V_L} - m_k \right] : m, \quad (27)$$

$$\tilde{O} = \left[\frac{m_1 \cdot H_1 \cdot V_0 \cdot B}{(I_2 - I_1) \cdot V_L} - m_k \right] : V, \quad (28)$$

где m_1 – масса меди, добавляемая перед вторым полярографированием, мкг ;

m – масса навески продукта, взятая для озоления, г ;

m_k – масса меди в контрольном растворе, мкг ;

H_1 – высота пика меди, полученная при первом полярографировании, мм ;

H_2 – высота пика меди, полученная при втором полярографировании, мм ;

V_0 – общий объем раствора, приготовленного из озоленной навески, см^3 ;

V_L – объем испытуемого раствора, взятый для полярографирования, см^3 ;

V – объем продукта, взятый для озоления, см^3 ;

B – кратность дополнительного разведения при большой массовой доле меди в испытуемом растворе.

Примечание: при анализе соли m – масса навески в пересчете на сухое вещество, г .

Лабораторная работа №2

Вольтамперометрический метод определения массовой концентрации витамина С

Вольтамперометрический метод определения массовой концентрации витамина С (аскорбиновой кислоты) применяется для таких продуктов, как свежие фрукты и овощи, компоты, соковая продукция (соки, нектары, морсы и сокосодержащие напитки), овощные, фруктовые, фруктово-молочные пюре, крупяные и молочные смеси.

В настоящей методике применены следующие сокращения:

- ВА – вольтамперометрический метод;
- ГСО – государственный стандартный образец;
- КХА – количественный химический анализ;
- АС – аттестованная смесь;
- ХСЭ – хлорсеребряный электрод;
- СУЭ – стеклоуглеродный индикаторный электрод.

Сущность метода состоит в проведении вольтамперометрических измерений раствора пробы после ее предварительной подготовки.

Предварительная подготовка анализируемых проб к измерениям состоит в переводе проб пищевых продуктов, в том числе продуктов детского питания в раствор путем растворения навесок соответствующих проб в воде, растворе соляной кислоты или растворе хлористого кальция с дальнейшим удалением белка (для молочных продуктов) и отделением осадка согласно таблице 12.

Таблица 12

Рекомендуемые навески и основные реактивы для подготовки проб на содержание витамина С

| Наименование продукта | Рекомендуемая навеска (объем) для анализа, г (или см ³) | Электролит для растворения пробы | Реактив для удаления белка | Отделение осадка |
|---|---|----------------------------------|----------------------------|--|
| Соки, нектары, морсы, сокосодержащие напитки, компоты | 0,1-2,0 | 0,1 моль/дм ³ КСІ | | Фильтрование через двойной бумажный фильтр |
| Свежие фрукты, овощи | 5,0-10,0 | 0,05 моль/дм ³ НСІ | - | |
| Овощные, фруктовые, фруктово-молочные пюре | 5,0-10,0 | 0,1 моль/дм ³ НСІ | КСІ (кристаллы) | |
| Молочные сухие смеси | 0,2-2,0 | 0,05 моль/дм ³ НСІ | КСІ (кристаллы) | |
| Молочные жидкие смеси | 5,0-50,0 | 0,1 моль/дм ³ НСІ | КСІ (кристаллы) | |
| Крупяные сухие смеси | 0,1-1,0 | 0,1 моль/дм ³ НСІ | - | |

ВА метод измерения основан на способности витамина С окисляться на индикаторном СУЭ электроде при определенном потенциале, характерном для данного органического вещества. Регистрируемый на вольтамперограмме аналитический сигнал витамина С пропорционален его концентрации в анализируемой пробе.

Процесс электрохимического окисления витамина С проводят в растворе хлористого калия молярной концентрации 0,1 моль/дм³, подкисленном соляной кислотой до рН 3-4, на индикаторном СУЭ при потенциале, находящемся в диапазоне от 0,45 до 0,60 В относительно насыщенного ХСЭ. Регистрацию аналитического сигнала витамина С проводят при линейно-меняющемся потенциале в дифференциальном режиме записи вольтамперограммы.

Массовую концентрацию витамина С в пробе определяют методом добавок АС витамина С.

Средства измерений и вспомогательное оборудование

1. Компьютеризированный вольтамперометрический анализатор СТА, вольтамперометрический анализатор Экотест-ВА или полярограф в комплекте с двухкоординатным самописцем.

2. Электрохимическая ячейка, в состав которой входят:

- сменные стаканчики из кварцевого стекла вместимостью 20-25 см³;
- индикаторный электрод – стеклоуглеродный с рабочей поверхностью 25-30 мм²;
- вспомогательный электрод и электрод сравнения - хлорсеребряные в насыщенном растворе хлорида калия с сопротивлением не более 3,0 кОм;
- стеклянная или тефлоновая трубка с оттянутым кольцом для подвода инертного газа.

Допускается использование других электрохимических ячеек и других индикаторных электродов из стеклоуглерода, позволяющих воспроизводить метрологические характеристики, указанные в данной методике.

3. Редуктор по ГОСТ 13861 с манометром (250±1) атм по ГОСТ 2405.
4. Дозаторы любого типа с дискретностью установки доз 1,0 или 2,0 мкл.
5. Шланги резиновые или силиконовые для подвода газа к ячейке (при использовании инертного газа).

Ход работы

Подготовка к выполнению измерений.

1. *Отбор проб.* Пробы продуктов хранят под темным колпаком и анализируют сразу после пробоподготовки в течение дня, так как витамин С со временем в растворе разлагается.

2. *Подготовка приборов и электродов к работе.* Подготовку и проверку работы средств измерений проводят в соответствии с инструкцией по эксплуатации и техническому описанию соответствующего прибора.

Устанавливают режим работы приборов в соответствии с таблицей 13.

Таблица 13

Параметры измерений аналитических сигналов витамина С вольтамперометрическим методом

| Параметр измерения | Значение |
|---|--|
| Трехэлектродная система измерений | Обеспечивается средством измерения |
| Накопительный режим развертки | Обеспечивается средством измерения |
| Поляризующее напряжение для электронакопления, В | -0,30 |
| Потенциал начала регистрации вольтамперной кривой, В | +0,10 |
| Конечное напряжение развертки, В | +1,10 |
| Скорость линейного изменения потенциала, мВ/с | 15 |
| Чувствительность прибора при регистрации вольта мперограммы, А/мм | 5·10 ⁻⁹ — 1·10 ⁻¹⁰ |
| Время электронакопления, с | 30 |

3. *Приготовление и проверка работы индикаторного электрода и электрода сравнения.* Индикаторный электрод представляет собой стеклоуглеродный стержень диаметром 2 мм и длиной 10–15 мм, запрессованный во фторпластовый держатель. Перед проведением измерений рабочую часть электрода выдерживают 2–5 с в этиловом спирте, шлифуют на бумажном фильтре и ополаскивают дистиллированной водой.

В качестве электрода сравнения и вспомогательного электрода используют насыщенные ХСЭ. Электроды заполняют раствором хлорида калия молярной концентрации 1,0 моль/дм³. При первом заполнении электроды выдерживают не менее 12 ч.

4. *Приготовление растворов*

Основной раствор, содержащий 1000 мг/дм³ витамина С (аскорбиновой кислоты).

1. Приготовление из ампул, выпускаемых медицинской промышленностью (5 % раствор аскорбиновой кислоты): в мерную колбу вместимостью 25,0 см³ вводят 0,5 см³ 5 % раствора аскорбиновой кислоты из ампулы и доводят объем до метки бидистиллированной водой;

2. Приготовление из сухого порошка витамина С (аскорбиновой кислоты): на аналитических весах берут навеску (0,025 ± 0,001) г порошка витамина С (аскорбиновой кислоты), переносят в мерную колбу вместимостью 25,0 см³, растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

Основные растворы, приготовленные из ампул и сухого порошка витамина С (аскорбиновой кислоты) идентичны.

Основной раствор готовят не ранее, чем за 2 ч до проведения анализа. Аскорбиновая кислота неустойчива и с течением времени разлагается. Поэтому основной раствор готовят в небольших объемах для работы с ним в течение одного рабочего дня.

Аттестованные смеси (АС)

АС определяемого вещества АС-1, АС-2, АС-3 с содержанием по 500,0; 300,0 и 100,0 мг/дм³ витамина С готовят соответствующими разбавлениями растворов в мерных пробирках или цилиндрах вместимостью 10,0 см³ бидистиллированной водой согласно таблице 14.

Таблица 14

Приготовление АС витамина С

| Массовая концентрация исходного раствора для приготовления АС, мг/дм ³ | Отбираемый объем, см ³ | Объем мерной посуды, см ³ | Массовая концентрация приготовленной АС, мг/дм ³ | Код полученной АС |
|---|-----------------------------------|--------------------------------------|---|-------------------|
| 1000,0 | 5,0 | 10,0 | 500,0 | АС-1 |
| 1000,0 | 3,0 | 10,0 | 300,0 | АС-2 |
| 1000,0 | 1,0 | 10,0 | 100,0 | АС-3 |

Фоновый электролит – раствор хлорида калия молярной концентрации с (KCl) = 0,1 моль/дм³, подкисленный соляной кислотой: навеску (0,75 ± 0,01) г

хлористого калия переносят в мерную колбу вместимостью $100,0 \text{ см}^3$, растворяют в небольшом количестве бидистиллированной воды, приливают $2,0 \text{ см}^3$ соляной кислоты молярной концентрации $0,1 \text{ моль/дм}^3$ и доводят бидистиллированной водой до метки. Кислотность полученного раствора ($\text{pH} = 3 - 4$) проверяют с помощью индикаторной бумаги.

Раствор соляной кислоты молярной концентрации $c(\text{HCl}) = 0,1 \text{ моль/дм}^3$: в мерную колбу вместимостью $100,0 \text{ см}^3$, наполовину заполненную бидистиллированной водой, вносят $1,0 \text{ см}^3$ концентрированной соляной кислоты, перемешивают и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

Раствор соляной кислоты молярной концентрации $c(\text{HCl}) = 0,05 \text{ моль/дм}^3$: в мерную колбу вместимостью $100,0 \text{ см}^3$, наполовину заполненную бидистиллированной водой, вносят $0,5 \text{ см}^3$ концентрированной соляной кислоты, растворяют и доводят объем до метки бидистиллированной водой.

5. *Подготовка проб.* В таблице 12 приведены рекомендуемые навески (объемы) для каждой из параллельных проб пищевых продуктов для определения в них массовых концентраций витамина С вольтамперометрическим методом. Предварительно пробу тщательно гомогенизируют. Навеску пробы берут с точностью до $0,001 \text{ г}$.

Подготовка проб компотов, соковой продукции (соков, нектаров, морсов и сокосодержащих напитков): в мерную колбу вместимостью $100,0 \text{ см}^3$ вносят навеску анализируемой пробы в соответствии со значениями, приведенными в таблице 11. Доводят объем до метки раствором фонового электролита, выдерживают $20 - 30$ мин и отфильтровывают полученный раствор через двойной бумажный фильтр. Фильтрат является подготовленной пробой, из которого берется аликвота (см. таблицу 15) для вольтамперометрического измерения.

Подготовка проб свежих фруктов и овощей: в фарфоровую ступку помещают навеску пробы массой $5 - 10 \text{ г}$, взятую с точностью до $0,001 \text{ г}$, измельчают фарфоровым пестиком, после чего количественно переносят в мерную колбу вместимостью $100,0 \text{ см}^3$, смывая со стенок ступки и пестика остатки измельченной пробы раствором соляной кислоты молярной концентрации $0,05 \text{ моль/дм}^3$, выдерживают $20 - 30$ мин и отфильтровывают полученный раствор через двойной бумажный фильтр. Фильтрат является подготовленной пробой, из которого берется аликвота (см. таблицу 15) для вольтамперометрического измерения.

Подготовка проб овощных, фруктовых и фруктово-молочных пюре: в мерную колбу вместимостью $100,0 \text{ см}^3$ вносят навеску анализируемой пробы массой $5 - 10 \text{ г}$, взятую с точностью до $0,001 \text{ г}$, добавляют 30 см^3 раствора соляной кислоты молярной концентрации $0,1 \text{ моль/дм}^3$ и $1 - 2 \text{ г}$ кристаллов хлорида калия, перемешивают, доводят объем до метки бидистиллированной водой, выдерживают $20 - 30$ мин и отфильтровывают полученный раствор через двойной бумажный фильтр. Фильтрат является подготовленной пробой, из которого берется аликвота (см. таблицу 15) для вольтамперометрического измерения.

Подготовка проб сухих молочных смесей: в мерную колбу вместимостью 100,0 см³ вносят навеску анализируемой пробы массой 0,2–2,0 г, взятую с точностью до 0,001 г, добавляют 30–50 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,05 моль/дм³, перемешивают до полного растворения смеси. Затем добавляют в колбу 1–2 г кристаллов хлорида калия и доводят объем колбы до метки раствором соляной кислоты молярной концентрации 0,05 моль/дм³. Содержимое колбы тщательно перемешивают и оставляют на 20 – 30 мин, затем отфильтровывают полученный раствор через бумажный фильтр. Фильтрат является подготовленной пробой, из которого берется аликвота (см. таблицу 15) для вольтамперометрического измерения.

Подготовка проб жидких молочных смесей: в мерную колбу вместимостью 100,0 см³ вносят навеску пробы массой 5 – 50 г жидкой молочной смеси, взятой с точностью до 0,001 г, добавляют 1 – 2 г кристаллов хлористого калия и доводят объем колбы до метки раствором соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм³. Содержимое колбы тщательно перемешивают и оставляют на 20 – 30 мин, затем отфильтровывают полученный раствор через бумажный фильтр. Фильтрат является подготовленной формой, из которого берется аликвота (см. таблицу 15) для вольтамперометрического измерения.

Подготовка проб сухих крупяных смесей для детского питания: в мерную колбу вместимостью 100,0 см³ вносят навеску сухой крупяной смеси массой 0,1 – 1,0 г, взятой с точностью до 0,001 г, предварительно измельченной в фарфоровой ступке, добавляют 10 см³ раствора соляной кислоты молярной концентрации 0,1 моль/дм³, выдерживают 20 – 30 мин, периодически перемешивая. Содержимое колбы доводят до метки бидистиллированной водой, тщательно перемешивают и отфильтровывают полученный раствор через двойной бумажный фильтр. Фильтрат является подготовленной формой, из которого берется аликвота (см. таблицу 15) для вольтамперометрического измерения.

При анализе проб пищевых продуктов «холостую» пробу делать не обязательно, так как присутствие витамина С ни в реактивах, ни в воде не обнаружено.

Выполнение измерений. При определении массовых концентраций витамина С в пробах пищевых продуктов вольтамперометрическим методом проводят следующие операции:

1. *Проверка электрохимической ячейки:* проверку стаканчиков, фонового электролита и электродов на чистоту проводят путем регистрации вольтамперограмм в данной электрохимической ячейке с фоновым электролитом после многократного ополаскивания стаканчиков бидистиллированной водой и фоновым электролитом.

Программу для работы вольтамперометрических анализаторов или режим работы полярографов задают согласно таблице 13. Стаканчики в электрохимических ячейках заполняют фоновым электролитом (10,0 см³ раствора хлорида калия молярной концентрации 0,1 моль/дм³, подкисленного соляной кислотой концентрации 0,1 моль/дм³ до рН 3 – 4). Регистрируют

вольтамперограммы раствора фонового электролита, проводя электролиз в течение 30 с.

Оптимальными считаются такие качества реактивов и чистота посуды, когда получаются аналитические сигналы вещества в фоновом электролите, равные или близкие к нулю.

2. Проверка работы индикаторного СУЭ по контрольным пробам витамина С: в стаканчик с раствором фонового электролита объемом 10,0 см³ (V_к) вносят точно отмеренный дозатором или пипеткой объем (V_{АС}) АС витамина С (С_{АС}). Получают контрольную пробу, содержащую аттестованную концентрацию витамина С. Проводят электронакопление и регистрацию вольтамперограмм I_{1К} контрольной пробы, при условиях, рекомендованных в таблице 12.

В этот же раствор повторно делают такую же добавку АС витамина С, регистрируют вольтамперограммы контрольной пробы с добавкой АС витамина С при тех же условиях измерений (I_{2К}) и оценивают содержание витамина С в контрольной пробе X_к.

Расчет массовой концентрации витамина С в контрольной пробе X_к, мг/дм³, при использовании анализаторов проводится автоматически, а при использовании полярографов по формуле:

$$X_k = \frac{I_{1K} C_{AC} V_{AC}}{(I_{2K} - I_{1K}) V_k}, \quad (29)$$

где I_{1К} – максимальный анодный ток витамина С на вольтамперограмме для контрольной пробы, единицы тока, мм;

C_{АС} - массовая концентрация АС витамина С, из которой при измерении делают добавку к пробе, мг/дм³;

V_{АС} - объем добавки АС витамина С, см³;

I_{2К} – максимальный анодный ток витамина С на вольтамперограмме для контрольной пробы с добавкой АС витамина С, единицы тока, мм;

V_к – объем подготовленной контрольной пробы, см³.

Если полученное значение концентрации витамина С отличается от контрольного значения менее чем на 10 %, то условия работы соответствуют нормальным и следует приступить к измерению подготовленной анализируемой пробы.

Если полученное значение концентрации витамина С отличается от контрольной пробы более чем на 10 %, то эксперимент повторяют с другим стаканчиком, с чистым фоновым электролитом. Если и в этом случае расхождение результатов будет значимым, то индикаторный электрод готовят заново.

3. ВА измерения при определении массовой концентрации витамина С в пробе: в кварцевый стаканчик, содержащий 8 – 10 см³ фонового электролита вносят аликвоту (V₂) подготовленной пробы анализируемого продукта. Объем аликвоты рекомендован в таблице 15. Стаканчик с пробой помещают в электрохимическую ячейку.

Проводят электронакопление и регистрацию вольтамперограмм анализируемой пробы, установив параметры измерений аналитических сигналов в соответствии с таблицей 13. Измеряют аналитические сигналы витамина С в пробе (I_2).

В стаканчик с анализируемым раствором пробы с помощью пипетки или дозатора вносят добавку АС (C_{AC}) витамина С в таком объеме (V_{AC}), чтобы высота пика витамина С на вольтамперной кривой увеличилась примерно в два раза по сравнению с первоначальной.

Добавку АС вносят в малом объеме (не более 0,10 см³), чтобы предотвратить изменение объема анализируемой пробы. Рекомендуемые добавки АС известной концентрации витамина С приведены в таблице 15.

Таблица 15

Рекомендуемые объемы аликвоты пробы, концентрации и объемы добавок АС витамина С при регистрации вольтамперограмм при анализе проб

| Диапазон измерения массовых концентраций витамина С в пробе, мг/кг (или мг/дм ³) | Объем аликвоты, см ³ | Концентрация АС витамина С для добавок, мг/дм ³ | Объем добавки АС витамина С, см ³ |
|--|---------------------------------|--|--|
| От 2,0 до 30,0 включительно | 1,0-1,5 | 100 | 0,02-0,10 |
| От 30,0 до 300 включительно | 2,0-4,0 | 300 | 0,02-0,10 |
| От 300 до 3000 включительно | 2,5 | 500 | 0,02-0,10 |

Проводят электронакопление и регистрацию вольтамперограмм пробы с введенной добавкой АС витамина С в тех же условиях. Измеряют аналитические сигналы (высоты пиков) витамина С в пробе с добавкой АС витамина С (I_2).

Обработка результатов измерений. При использовании вольтамперометрического анализатора в комплекте с компьютером регистрацию и обработку результатов анализов пищевых продуктов, а также расчет массовой концентрации витамина С в пробе выполняет система сбора и обработки данных анализатора.

При использовании полярографов в комплекте с самописцем обработку результатов измерений аналитических сигналов определяемого вещества, а также расчет его концентрации в анализируемой пробе проводят следующим образом:

Для определяемого вещества рассчитывают среднеарифметическое (I_1) не менее, чем из двух значений воспроизводимых аналитических сигналов, полученных при регистрации вольтамперограмм пробы.

Такой же расчет проводят и для вольтамперограмм при регистрации анализируемой пробы с добавкой АС витамина С. Получают значение I_2 .

Массовую концентрацию X , мг/кг или мг/дм³, витамина С в анализируемой пробе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{I_1 C_{AC} V_{AC} V_1}{(I_2 - I_1) m V_2}, \quad (30)$$

где I_1 – максимальный анодный ток витамина С на вольтамперограмме для анализируемой пробы, единицы тока, мМ;
 C_{AC} – массовая концентрация АС витамина С, из которой делается добавка к пробе, мг/дм³;
 V_{AC} – объем добавки АС витамина С, см³;
 V_1 – объем подготовленной пробы, равный 100 см³;
 I_2 – максимальны анодный ток витамина С на вольтамперограмме для пробы с добавкой АС витамина С, единицы тока, мМ;
 m – навеска (объем) пробы, взятой для анализа, г (или см³);
 V_2 – объем взятой для измерения аликвоты, см³.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность вольтамперометрического метода?
2. Что называется потенциалом полуволны и от каких факторов зависит его величина?
3. Как рассчитывают потенциал полуволны по вольтамперной кривой?
4. В чем сущность качественного полярографического анализа?
8. На чем основан количественный вольтамперометрический анализ?
9. Какой метод вольтамперометрии называется полярографией?
10. Какой ток называется предельным (диффузионным)?
11. От каких факторов зависит величина предельного тока?
12. Какие электроды используются в полярографии?
13. Для чего необходим в полярографии фоновый электролит?
14. Какова сущность и теоретические основы амперометрического титрования?
15. Что общего и какие различия между амперометрическим титрованием и полярографией?
16. Назовите типы кривых амперометрического титрования.
17. Какие методы определения концентрации вещества в вольтамперометрии вы знаете?

4. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Вначале следует напомнить, что такое рН. Водные растворы любых кислот имеет общую черту. Они содержат катионы водорода, которые и определяют кислотные свойства раствора. За щелочные свойства растворов отвечают гидроксид анионы. В нейтральных растворах, например в дистиллированной воде концентрации двух этих видов частиц равны между собой.

Для характеристики кислотности или щелочности растворов можно использовать величину молярной концентрации катионов водорода. В нейтральных растворах эта величина равна 10^{-7} моль/л, в кислотных растворах больше 10^{-7} моль/л, а в щелочных растворах меньше 10^{-7} моль/л (табл. 16).

Таблица 16

Значения молярных концентраций катионов водорода для определения кислотности или щелочности растворов

| Тип раствора | Концентрация H^+ , моль/л | рН |
|--------------|-----------------------------|----------|
| Кислый | больше 10^{-7} | меньше 7 |
| Нейтральный | 10^{-7} | 7 |
| Щелочной | меньше 10^{-7} | больше 7 |

Чтобы избежать неудобств, связанных с отрицательными показателями степеней, ввели понятие водородного показателя рН, который представляет собой взятый с обратным знаком десятичный логарифм концентрации катионов водорода $pH = - \lg[H^+]$.

Теперь очень просто запомнить: в нейтральных растворах $pH=7$, в кислых растворах $pH<7$, в щелочных растворах $pH>7$.

Для определения рН раствора можно использовать кислотно-основные индикаторы, называемые универсальными. Это вещества, изменяющие свою окраску в зависимости от рН среды.

В наше время известно несколько сот кислотно-основных индикаторов, синтезированных с середины XIX века.

Таблица 17

Изменение окраски индикаторов в зависимости от значения рН среды

| Индикатор | рН | Окраска индикатора |
|---------------------|------------|--------------------|
| Метиловый оранжевый | менее 3,1 | красный |
| | 3,1-4,4 | оранжевый |
| | более 4,4 | желтый |
| Лакмус | менее 6,0 | красный |
| | 6,0-8,0 | фиолетовый |
| | более 8,0 | синий |
| фенолфталеин | менее 8,2 | бесцветный |
| | 8,2-10,0 | розовый |
| | более 10,0 | малиновый |

По данным таблицы 17 можно судить, как изменяется окраска того или иного индикатора в зависимости от pH среды. Однако индикаторный метод определения pH ориентировочный. Его нельзя использовать, если растворы мутные или окрашенные.

Более точно измерить pH раствора можно при помощи pH-метра (рис. 12). Он представляет собой разновидность потенциометра. Определение pH раствора основано на измерении ЭДС гальванического элемента, составленного из индикаторного (измерительного) (2), потенциал которого зависит от pH среды и электрода сравнения (3), помещенных в исследуемый раствор (1). ЭДС системы регистрируется милливольтметром.

Индикаторный электрод – это электрод, на котором протекает собственно электрохимическая реакция окисления или восстановления. Это легкополяризуемый электрод, он должен реагировать на изменение концентрации определяемого вещества.

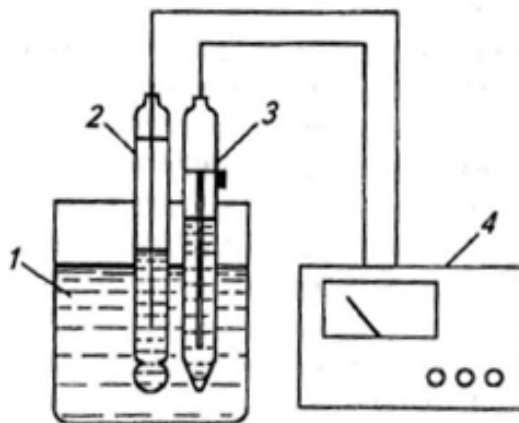


Рис. 11. Принципиальная схема pH-метра

Конструктивно индикаторный pH-электрод выполняют в виде стеклянной трубки, один конец которой заканчивается тонкостенным стеклянным шариком. С другого конца в трубку погружают серебряную проволоку, покрытую плотным слоем хлорида серебра. Трубку заливают 0,1 М раствором соляной кислоты, так что кислота полностью, без пузырей заполняет шарик и проволока глубоко погружена в раствор соляной кислоты.

Электрод сравнения – неполяризуемый электрод, потенциал его относительно раствора не зависит от присутствия других ионов в растворе и вообще от состава раствора. Электрод сравнения служит для создания измерительной цепи и поддержания постоянного значения потенциала индикаторного электрода. В качестве электродов сравнения чаще используют хлоридсеребряный и насыщенный каломельный электроды. Хлоридсеребряный электрод состоит из серебряной проволоочки, электролитически покрытой слоем хлорида серебра и погруженный в раствор хлорида калия.

Перед измерением проверяют и настраивают потенциометр по стандартным буферным растворам, которые готовят из фиксаналов квалификации для pH-метрии и дистиллированной воды, освобожденной от CO_2 кипячением в течение

30 – 40 мин. Для проверки показаний прибора используют несколько буферных растворов с различными значениями рН. Один из растворов должен иметь рН, близкий к рН испытуемого раствора.

При потенциометрическом титровании используются реакции кислотно-основного взаимодействия, окисления-восстановления, осаждения и комплексообразования, в ходе которых изменяется концентрация потенциалообразующих ионов.

Потенциометрическое титрование используют при титровании окрашенных растворов, когда цветные индикаторы неприменимы.

Зависимость потенциала от объема израсходованного рабочего раствора выражается кривой титрования. Ордината точки перегиба соответствует потенциалу электрода в конце титрования, а абсцисса – объему рабочего раствора, израсходованного на его определение, т.е. конечной точке титрования (рис.12, а).

Этим методом можно определить несколько веществ без предварительного разделения. В этом случае на кривой титрования появятся несколько скачков потенциала (рис. 12, б), по которым находят объем рабочего раствора, израсходованного на взаимодействие с каждым компонентом сложного раствора.

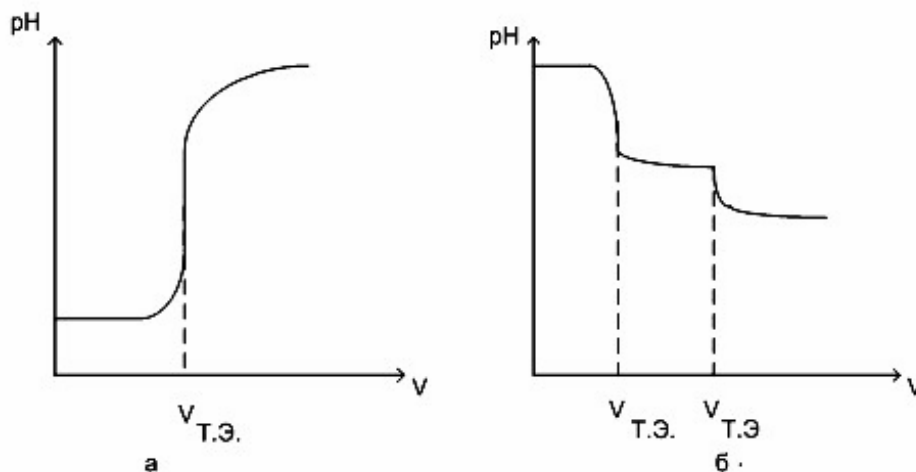


Рис. 12. Кривые потенциометрического титрования:
а – одного вещества; б – смеси двух веществ

Лабораторная работа №1

Определение кислотности и щелочности потенциометрическим методом

Потенциометрическим методом определяют кислотность и щелочность объектов, дающих при растворении темные растворы и взвеси, окраска которых мешает наблюдению за изменением цвета индикатора.

Приборы и реактивы: рН-метр; 0,1 Н гидроксид натрия или калия; 0,1 Н серная или соляная кислота.

Проведение анализа: 10 г измельченного исследуемого продукта или полуфабриката помещают в стакан и приливают 100 см³ дистиллированной воды. Если требуется ускорить растворение, содержимое подогревают до температуры 60 – 70 °С с последующим охлаждением до температуры (20 ± 5) °С. Полученный раствор, не обращая внимания на осадок,

количественно переносят в мерную колбу вместимостью 200 см³, доводят дистиллированной водой до метки и хорошо взбалтывают.

Отмеривают пипеткой 50 см³ полученного раствора в стакан, устанавливают стакан в подготовленный потенциометр, опускают в жидкость электроды и измеряют величину рН.

Отметив величину рН, начинают приливать из бюретки раствор гидроксида натрия или калия концентрацией 0,1 моль/дм³, если рН испытуемого раствора меньше 7,0. Если испытуемый раствор имеет рН больше 7,0, то из бюретки приливают раствор серной или соляной кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³.

При титровании по мере приближения рН к 7,0 гидроксид натрия (гидроксид калия) или кислоту приливают по каплям при тщательном перемешивании титруемого раствора стеклянной палочкой или магнитной мешалкой.

Титрование заканчивают, когда рН жидкости достигает 7,0 – 7,2. После этого отмечают количество гидроксида натрия (гидроксида калия) или кислоты, израсходованное на титрование.

Кислотность или щелочность (град) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{KVV_1 100}{V_2 m 10}, \quad (31)$$

где К - поправочный коэффициент раствора гидроксида натрия (гидроксида калия) или кислоты, используемых для титрования;

V - объем раствора гидроксида натрия (гидроксида калия) или кислоты, израсходованный на титрование, см³;

V₁ - вместимость мерной колбы, в которой была растворена навеска, см³;

100 - коэффициент пересчета на 100 г продукта;

V₂ - объем фильтрата, взятый для титрования, см³;

m - масса навески продукта, г;

10 - коэффициент пересчета раствора гидроксида натрия (калия) или кислоты концентрацией 0,1 моль/дм³ в 1 моль/дм³.

Лабораторная работа №2

Определение массовой доли хлоридов в мясе и мясных продуктах

Сущность метода заключается в диспергировании навески в воде с дальнейшим подкислением аликвоты полученной суспензии и потенциометрическим титрованием ее раствором азотнокислого серебра с использованием серебряного электрода.

Ход работы

Подготовка пробы. Лабораторный образец пробы измельчают в куттере или мясорубке с диаметром отверстий решетки не более 4,5 мм. При этом температура образца пробы не должна подниматься выше 25 °С. При использовании мясорубки пробу продукта пропускают через нее дважды.

Подготовленную пробу помещают в воздухонепроницаемую емкость, закрывают и хранят, не допуская порчи. Анализ образца проводят по возможности быстрее, не позднее 24 ч после измельчения.

Приготовление растворов.

Анализ пробы на отсутствие галогенов в воде. К 100 см³ воды добавляют 1 см³ раствора азотнокислого серебра молярной концентрации c (AgNO_3) = 0,1 моль/дм³ и 5 см³ азотной кислоты молярной концентрации $c(\text{HNO}_3)=4$ моль/дм³. Допускается только легкое помутнение.

Приготовление раствора азотной кислоты: 20 см³ концентрированной азотной кислоты приливают к 200 – 300 см³ воды и доводят объем до 1000 см³.

Приготовление раствора азотнокислого серебра. Азотнокислое серебро высушивают в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре $(150 \pm 2)^\circ\text{C}$ и охлаждают в эксикаторе, затем берут навеску 5,000 г и растворяют в воде. Полученный раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 1000 см³ и доводят водой до метки.

Подготовка электродов. Перед первым использованием электродов и ежедневно перед исследованиями рабочую поверхность серебряного комбинированного электрода чистят чистящим порошком или другим подходящим средством, затем тщательно ополаскивают водой; некоторые виды образцов ополаскивают горячей водой. Очистку других электродов проводят в соответствии с рекомендациями изготовителя. При работе с несколькими образцами электроды периодически промывают водой и для предотвращения образования на них пленки вытирают тканью. Комбинированные серебряные электроды не требуют заполнения хлоридом серебра.

Проведение испытания. Для проверки сходимости следует выполнить два параллельных определения в одинаковых условиях.

Получение суспензии образца.

В емкости гомогенизатора вместимостью 1000 см³ взвешивают $(50 \pm 0,1)$ г пробы, добавляют 450 см³ воды. Емкость закрывают и включают гомогенизатор на низкую частоту вращения для начального размешивания. Затем устанавливают высокую частоту вращения и перемешивают в течение 1–2 мин так, чтобы твердый материал был однородно суспензирован.

Сразу после окончания гомогенизации в предварительно взвешенный стакан вместимостью 250 см³ пипеткой вносят 50 см³ суспензии образца.

Построение кривой титрования

В стакан вместимостью 250 см³ вносят пипеткой 25 см³ раствора хлорида натрия, разбавляют водой до общего объема, равного примерно 50 см³, и добавляют 50 см³ раствора азотной кислоты.

Электроды опускают в полученный раствор и начинают перемешивание. Устанавливают постоянную скорость вращения магнитной мешалки, обеспечивающую во время титрования энергичное перемешивание без разбрызгивания жидкости.

Титруют раствором азотнокислого серебра, регулируя скорость капания по скорости изменения потенциала, регистрируемого рН-метром так, чтобы можно было построить график изменения потенциала с хорошо фиксированной точкой

перегиба в милливольтгах (по оси ординат) в зависимости от объема добавленного раствора азотнокислого серебра (см³), пошедшего на титрование (по оси абсцисс). Всего добавляют 50 см³ раствора азотнокислого серебра для получения полной кривой титрования.

Точку перегиба определяют, проведя две прямые линии под углом наклона 45 °С к осям и касательно к кривой титрования в двух точках ее наибольшей кривизны. Точку перегиба используют как конечную точку при титровании раствора образца. Периодически перепроверяют потенциал конечной точки относительно связывающего потенциала электрода сравнения. При замене электродов или рН-метра строят новую кривую титрования и определяют конечную точку. Исходя из израсходованного на титровании объема, рассчитывают молярную концентрацию раствора азотнокислого серебра и доводят ее до 0,0856 моль/дм³.

Титрование пробы. В стакан с навеской суспензии образца добавляют 50 см³ разбавленной азотной кислоты и титруют так же, как и раствор хлорида натрия. При концентрации хлорида натрия, равной или менее 1 %, используют бюретку вместимостью 10 см³.

При проведении серии испытаний одного и того же продукта для большей точности используют конечную точку, измеренную по кривой титрования этого мясного продукта, а не конечную точку, полученную со стандартными растворами хлорида натрия.

Контрольное испытание: контрольное испытание проводят также, заменив суспензию образца водой.

Обработка результатов испытаний

Массовую долю хлоридов W_{Cl} , %, в пересчете на хлорид натрия, вычисляют по формуле:

$$W_{Cl} = \frac{(V_1 - V_2)c \cdot 50 \cdot 58,44}{m_1 m}, \quad (32)$$

где V_1 - объем раствора азотнокислого серебра, израсходованный на титрование суспензии образца, см³;

V_2 – объем раствора азотнокислого серебра, израсходованный на контрольное титрование, см³;

c – концентрация раствора азотнокислого серебра, моль/дм³;

m_1 – масса испытуемой суспензии, г;

m – масса навески испытуемой пробы, г.

Вычисление проводят до второго десятичного знака, а результат округляют до первого десятичного знака.

Лабораторная работа №3

Определение активной кислотности молочных продуктов для детского питания

Сущность метода заключается в измерении активности ионов водорода (рН) с помощью потенциометрического анализатора. Данная методика распространяется на молочные продукты для детского питания, кроме каш.

Ход работы

Подготовка к проведению измерений

Приготовление буферных растворов для рН-метра : готовят из стандарт-титров по ГОСТ 8.135 и хранят при температуре $(20 \pm 3) ^\circ\text{C}$ не более 2 месяцев.

Приготовление раствора хлористого калия. 128,0 г хлористого калия помещают в колбу вместимостью 500 см^3 , приливают до метки дистиллированную воду. Раствор тщательно перемешивают до полного растворения реактива, фильтруют. Раствор хранят в бутылки, закрытой пробкой, при температуре $(20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ в течении 6 месяцев.

Проверка анализатора по буферному раствору. Прибор включают за 30 мин до начала проверки. Анализатор настраивают по буферным растворам с активной кислотностью 6,88 и 4,00 рН.

Перед проверкой электроды анализатора тщательно промывают дистиллированной водой. Остатки воды с электродов удаляют фильтровальной бумагой.

В стеклянный стакан вместимостью 50 или 100 см^3 наливают $(40 \pm 5) \text{ см}^3$ буферного раствора температурой $(20 \pm 1) ^\circ\text{C}$, после чего погружают в него электроды и в течение 10-15 с снимают показания прибора. Если показания прибора отличаются от стандартного значения активной кислотности образцового буферного раствора более чем на 0,05 рН, то прибор настраивают снова.

Проверка прибора по стандартному буферному раствору должна выполняться ежедневно перед началом работы.

Подготовка пробы сухих молочных продуктов. В стакан помещают навеску сухого продукта, затем небольшими порциями приливают дистиллированную воду. Отношение массы продукта к массе воды определенной температуры должно соответствовать требованиям по восстановлению данного продукта, указанным в соответствующем нормативном документе.

Стакан с полученной однородной смесью ставят на магнитную мешалку и включают ее так, чтобы появилась вихревая воронка. Перемешивают в течение 5 мин.

Подготовка пробы пастообразных молочных продуктов: навеску пастообразного продукта тщательно растирают в фарфоровой ступке до однородной консистенции и переносят в стакан для проведения измерений.

Проведение измерений. В стакан вместимостью 50 или 100 см^3 помещают $(40 \pm 5) \text{ см}^3$ жидкого или восстановленного сухого продукта или $(40 \pm 5) \text{ г}$ пастообразного продукта температурой $(20 \pm 2) ^\circ\text{C}$ и погружают в него электроды прибора. При этом электроды не должны касаться стенок и дна стакана. Для быстрого установления показаний прибора измерение проводят при непрерывном перемешивании продукта (кроме пастообразного) в стакане.

Показания по прибору считывают через 5 с после установления стрелки. При массовых измерениях активной кислотности остатки предыдущей пробы удаляют с электродов следующей пробой. Через 5 измерений электроды промывают дистиллированной водой.

В промежутках между измерениями электроды анализатора погружают в стакан с дистиллированной водой.

Обработка результатов. За результат измерения принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных измерений, округленное до второго десятичного знака.

Сходимость результатов измерений (допустимое расхождение между результатами двух параллельных измерений) не должна превышать 0,05 рН.

Воспроизводимость результатов измерений (допустимое расхождение между результатами измерений, выполненных в разных лабораториях) не должна превышать 0,10 рН.

Лабораторная работа №4

Определение массовой концентрации фторидов в питьевой воде

Метод позволяет определять суммарную концентрацию фторидов (всех его форм: иона фтора, его комплексных соединений). Для определения используют электродную систему состоящую из фторидного ионоселективного электрода и вспомогательного хлорсеребряного электрода. Измерение потенциала фторидного электрода проводят высокоомным рН-метром-милливольтметром, заменив стеклянный электрод на фторидный.

Ход работы

Подготовка к анализу

Приготовление основного градуировочного раствора фтористого натрия концентрацией 0,1 моль/дм³. В мерную колбу вместимостью 1000 см³ помещают 4,1990 г фтористого натрия, высушенного предварительно до постоянной массы при 105 °С, растворяют в дистиллированной воде и доводят объем раствора до метки. Этот раствор имеет значение рF = 1 (массовую концентрацию фторида 1,9 г/дм³). Раствор хранят в полиэтиленовом сосуде с плотно закрытой пробкой. Срок хранения 6 месяцев.

Приготовление рабочих градуировочных растворов фтористого натрия концентрацией 0,01; 0,001; 0,0001 и 0,00001 моль/дм³.

Для приготовления 0,01 моль/дм³ раствора фтористого натрия 10 см³ основного градуировочного раствора разбавляют дистиллированной водой до 100 см³ в мерной колбе. Этот раствор имеет значение рF = 2 (массовую концентрацию фторида 190 мг/дм³).

Для приготовления 0,001 моль/дм³ раствора фтористого натрия готовят разбавлением 10 см³ 0,01 моль/дм³ раствора до 100 см³ дистиллированной водой в мерной колбе. Данный раствор имеет значение рF = 3 (массовую концентрацию фторида 19 мг/дм³).

Для приготовления 0,0001 моль/дм³ раствора фтористого натрия 10 см³ 0,001 моль/дм³ раствора разбавляют дистиллированной водой до 100 см³ в мерной колбе. Этот раствор имеет значение рF = 4 (массовую концентрацию фторида 1,9 мг/дм³).

Для приготовления 0,00001 моль/дм³ раствора фтористого натрия готовят разбавлением 10 см³ 0,0001 моль/дм³ раствора до 100 см³ дистиллированной

водой в мерной колбе. Этот раствор имеет значение $pF = 5$ (массовую концентрацию фторида $0,19 \text{ мг/дм}^3$).

Все рабочие градуировочные растворы готовят в день построения и проверки градуировочного графика и хранят их в полиэтиленовой посуде.

Приготовление цитратно-этанольного буферного раствора лимоннокислого натрия концентрацией $0,2 \text{ моль/дм}^3$ и массовой долей этанола 10% ($pH = 5,6 \pm 0,2$). В мерную колбу вместимостью 1000 см^3 помещают $142,88 \text{ г}$ натрия лимоннокислого трехзамещенного, приливают 500 см^3 дистиллированной воды, растворяют соль, добавляют $13,0 \text{ см}^3$ концентрированной соляной кислоты и 100 см^3 этанола. Доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. pH раствора проверяют потенциометрически и, если необходимо, доводят до требуемого значения раствором соляной кислоты или едкого натра. Срок хранения раствора 6 месяцев. Хранят раствор в холодильнике.

Приготовление ацетатно-цитратного буферного раствора ($pH = 5 \pm 0,2$). В мерную колбу вместимостью 500 см^3 помещают $52,00 \text{ г}$ уксуснокислого натрия, $29,20 \text{ г}$ хлористого натрия, $3,00 \text{ г}$ лимоннокислого натрия, $0,30 \text{ г}$ трилона Б и 8 см^3 уксусной кислоты. Приливают $200 - 300 \text{ см}^3$ дистиллированной воды, растворяют соли и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. pH раствора проверяют потенциометрически и, при необходимости, доводят до требуемого значения pH раствором едкого натра или уксусной кислотой. Раствор хранят в холодильнике. Срок хранения 3 месяцев.

Подготовка к работе фторидного электрода. Новый фторидный электрод следует предварительно выдержать погруженным в раствор фтористого натрия концентрацией $0,001 \text{ моль/дм}^3$ в течение суток, а затем тщательно промыть дистиллированной водой. Когда работа с электродом проводится ежедневно, его хранят, погрузив в раствор фтористого натрия концентрацией $0,0001 \text{ моль/дм}^3$. При длительных перерывах в работе электрод хранят в сухом состоянии.

Построение градуировочного графика. В стакан вместимостью 50 см^3 вливают $20,0 \text{ см}^3$ $0,00001 \text{ моль/дм}^3$ рабочего градуировочного раствора ($pF = 5$), помещают в раствор магнит от магнитной мешалки, приливают 10 см^3 цитратно-этанольного или ацетатно-цитратного буферного раствора для устранения мешающего влияния алюминия и железа. Установившееся значение равновесного потенциала измеряют в милливольтгах при перемешивании раствора магнитной мешалкой. После этого электроды тщательно несколько раз отмывают в дистиллированной воде. Во второй стакан вместимостью 50 см^3 наливают 20 см^3 $0,0001 \text{ моль/дм}^3$ ($pF = 4$) рабочего градуировочного раствора, погружают в раствор магнит, приливают 10 см^3 буферного раствора, включают магнитную мешалку и измеряют установившееся значение потенциала в милливольтгах. Далее аналогичным способом измеряют потенциалы электрода в $0,001 \text{ моль/дм}^3$ рабочем градуировочном растворе ($pF = 3$) и в $0,01 \text{ моль/дм}^3$ растворе ($pF = 2$).

При выполнении измерений необходимо следить за тем, чтобы на поверхности мембраны фторидного электрода не налипали пузырьки воздуха.

Время установления равновесного потенциала в диапазоне $pF = 5$ и выше составляет 10 мин, при более высоких концентрациях фторида, т.е. при pF менее 5, время установления равновесия 3 мин. По результатам измерений строят градуировочный график, откладывая по оси абсцисс значения pF градуировочных растворов, а по оси ординат значение потенциала в милливольтгах.

Градуировочный график следует проверять каждый раз перед работой по двум-трем рабочим градуировочным растворам. При построении градуировочного графика проверяют одновременно правильность работы фторидного электрода (крутизна характеристики электрода). При измерении потенциалов рабочих градуировочных растворов он должен изменяться от раствора к раствору на значение (56 ± 3) мВ. Если такая зависимость значения потенциала от pF не соблюдается, то фторидный электрод следует регенерировать вымачиванием в $0,001$ моль/дм³ растворе фтористого натрия в течение суток, а затем тщательно отмыть дистиллированной водой.

Проведение анализа. В стакан вместимостью 50 см³ помещают 20 см³ анализируемой воды (температура воды не должна отличаться от температуры градуировочных растворов, по которым калибруют электрод, более чем на ± 2 °С, в противном случае воду следует подогреть или охладить до требуемой температуры). Затем помещают в раствор магнит от магнитной мешалки, приливают 10 см³ цитратно-этанольного или ацетатно-цитратного буферного раствора и погружают в раствор тщательно-промытые дистиллированной и анализируемой водой фторидный и вспомогательный электроды, следя за тем, чтобы к поверхности мембраны фторидного электрода не прилипали пузырьки воздуха. Перемешивают раствор магнитной мешалкой и через 3 – 10 мин отсчитывают установившееся значение равновесного потенциала в милливольтгах.

По градуировочному графику находят значение pF анализируемой воды. Зная значение pF анализируемой воды, по таблице пересчета (табл. 18) находят массовую концентрацию фторидов в мг/дм³.

Таблица 18

Таблица пересчета pF в мг/дм³ фторидов

| pF | мг/дм ³ | pF | мг/дм ³ | pF | мг/дм ³ | pF | мг/дм ³ | pF | мг/дм ³ | pF | мг/дм ³ | pF | мг/дм ³ |
|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|------|--------------------|
| 5,28 | 0,10 | 4,86 | 0,26 | 4,54 | 0,55 | 4,22 | 1,15 | 3,90 | 2,39 | 3,58 | 4,99 | 3,26 | 10,45 |
| 5,24 | 0,11 | 4,84 | 0,27 | 4,52 | 0,57 | 4,20 | 1,20 | 3,88 | 2,50 | 3,56 | 5,23 | 3,24 | 10,93 |
| 5,20 | 0,12 | 4,82 | 0,28 | 4,50 | 0,60 | 4,18 | 1,26 | 3,86 | 2,62 | 3,54 | 5,47 | 3,22 | 11,46 |
| 5,16 | 0,13 | 4,80 | 0,29 | 4,48 | 0,63 | 4,16 | 1,31 | 3,84 | 2,76 | 3,52 | 5,74 | 3,20 | 11,99 |
| 5,13 | 0,14 | 4,78 | 0,32 | 4,46 | 0,66 | 4,14 | 1,38 | 3,82 | 2,87 | 3,50 | 6,00 | 3,18 | 12,56 |
| 5,10 | 0,15 | 4,76 | 0,33 | 4,44 | 0,69 | 4,12 | 1,44 | 3,80 | 2,90 | 3,48 | 6,29 | 3,16 | 13,15 |
| 5,07 | 0,16 | 4,74 | 0,35 | 4,42 | 0,72 | 4,10 | 1,51 | 3,78 | 3,15 | 3,46 | 6,59 | 3,14 | 13,78 |
| 5,04 | 0,17 | 4,72 | 0,36 | 4,40 | 0,76 | 4,08 | 1,58 | 3,76 | 3,31 | 3,44 | 6,89 | 3,12 | 14,42 |
| 5,02 | 0,18 | 4,70 | 0,38 | 4,38 | 0,79 | 4,06 | 1,65 | 3,74 | 3,46 | 3,42 | 7,22 | 3,10 | 15,09 |
| 5,00 | 0,19 | 4,68 | 0,40 | 4,36 | 0,83 | 4,04 | 1,73 | 3,72 | 3,63 | 3,40 | 7,56 | 3,08 | 15,81 |
| 4,98 | 0,20 | 4,66 | 0,42 | 4,34 | 0,87 | 4,02 | 1,81 | 3,70 | 3,80 | 3,38 | 7,92 | 3,06 | 16,55 |
| 4,96 | 0,21 | 4,64 | 0,44 | 4,32 | 0,92 | 4,00 | 1,90 | 3,68 | 3,97 | 3,36 | 8,30 | 3,04 | 17,33 |
| 4,94 | 0,22 | 4,62 | 0,46 | 4,30 | 0,95 | 3,98 | 2,00 | 3,66 | 4,16 | 3,34 | 8,68 | 3,02 | 18,15 |
| 4,92 | 0,23 | 4,60 | 0,48 | 4,28 | 1,00 | 3,96 | 2,09 | 3,64 | 4,35 | 3,32 | 9,10 | 3,00 | 19,00 |
| 4,90 | 0,24 | 4,58 | 0,50 | 4,26 | 1,05 | 3,94 | 2,19 | 3,62 | 4,56 | 3,30 | 9,52 | | |
| 4,88 | 0,25 | 4,56 | 0,52 | 4,24 | 1,09 | 3,92 | 2,28 | 3,60 | 4,77 | 3,28 | 9,975 | | |

В стакан вместимостью 50 см^3 помещают 20 см^3 анализируемой воды, вводят градуировочную пробу с заранее известной концентрацией фторидов (добавку). Значение концентрации добавки в полученном растворе должно находиться в том же диапазоне, что и концентрация фторидов, определенная ранее.

Обработка результатов. За окончательный результат анализа принимают среднеарифметическое результатов двух параллельных определений.

Контрольные вопросы

1. На чем основан потенциометрический метод анализа?
2. Какая зависимость выражается уравнением Нернста? Поясните смысл входящих в него величин.
3. Какие функции выполняют индикаторные электроды и электроды сравнения? Укажите требования, которые к ним предъявляются.
4. Объясните сущность процессов, происходящих при измерении рН исследуемого раствора.
5. Чему равен водородный показатель рН?
6. На чем основан принцип действия рН-метра?
7. В каких координатах строят кривые потенциометрического титрования?
8. В каких случаях используется потенциометрическое титрование?

5. ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА

Хроматография – это физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной фазой обычно служит твердое вещество (сорбент) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу.

Компоненты анализируемой смеси вместе с подвижной фазой перемещаются вдоль стационарной фазы, которую обычно помещают в колонку (стеклянную или металлическую трубку). Если молекулы разных компонентов разделяемой смеси обладают различной адсорбируемостью или растворимостью, то время их пребывания в неподвижной фазе, а следовательно, и средняя скорость передвижения по колонке различны. Одни компоненты остаются в верхнем слое сорбента, другие, с меньшей адсорбируемостью, оказываются в нижней части колонки, некоторые покидают колонку вместе с подвижной фазой. Так достигается разделение компонентов. Хроматография – динамический метод, связанный с многократным повторением сорбционных и десорбционных процессов, так как разделение происходит в потоке подвижной фазы. Это обеспечивает эффективность хроматографического метода по сравнению с методами сорбции в статических условиях.

С помощью хроматографии возможны: разделение сложных смесей органических и неорганических веществ на отдельные компоненты, очистка веществ от примесей, концентрирование веществ из сильно разбавленных растворов, качественный и количественный анализ исследуемых веществ.

5.1. Классификация хроматографических методов

В основу классификации многочисленных хроматографических методов положены следующие признаки:

- 1) агрегатное состояние фаз;
- 2) механизм взаимодействия сорбент – сорбат;
- 3) способы проведения хроматографического анализа;
- 4) аппаратное оформление (техника выполнения) процесса хроматографирования;

По агрегатному состоянию фаз хроматографию разделяют на **газовую** и **жидкостную**. Газовая хроматография включает газожидкостную и газотвердофазную, жидкостная – жидкостно-жидкостную и жидкостно-твердофазную. Первое слово в названии метода характеризует агрегатное состояние подвижной фазы, второе – неподвижной.

По механизму взаимодействия сорбента и сорбата можно выделить несколько видов хроматографии: **адсорбционная** – основана на различии в адсорбируемости веществ твердым сорбентом; **распределительная** – основана на различной растворимости разделяемых веществ в неподвижной фазе (газожидкостная хроматография) или на различной растворимости веществ в подвижной и неподвижной фазах (жидкостная хроматография); **ионообменная**

– основана на разной способности веществ к ионному обмену; **эсклюзивная** – основана на различии в размерах и формах молекул разделяемых веществ; **аффинная** – основана на специфических взаимодействиях, характерных для некоторых биологических и биохимических процессов (например, антитело и антиген, гормон и рецептор и др.), **осадочная** – основана на образовании отличающихся по растворимости осадков разделяемых веществ с сорбентом и др. Следует помнить, что классификация по механизму взаимодействия весьма условна: ее используют в том случае, если известен доминирующий механизм; часто процесс разделения протекает сразу по нескольким механизмам.

По технике выполнения выделяют **колоночную** хроматографию, когда разделение проводится в специальных колонках, и **плоскостную** хроматографию, когда разделение проводится на специальной бумаге (**бумажная** хроматография) или в тонком слое сорбента (**тонкослойная** хроматография). В колоночной хроматографии используют насадочные или капиллярные колонки. Насадочную колонку заполняют сорбентом (насадкой), а внутреннюю стенку капиллярной колонки покрывают пленкой жидкости или пылью адсорбента.

Рассмотрим некоторые виды хроматографии, наиболее встречающиеся в пищевой промышленности.

5.1.1. Плоскостная хроматография

К плоскостным видам хроматографии относят бумажную (БХ) и тонкослойную (ТСХ). Эти два вида жидкостной хроматографии просты по технике выполнения, не требуют дорогостоящего оборудования. Разделение этими методами может быть выполнено с использованием хроматографических систем жидкость–твердый сорбент и жидкость–жидкость–твердый сорбент.

Тонкослойная хроматография

Метод тонкослойной хроматографии был разработан Н. А. Измайловым и М. С. Шрайбер еще в 1938 г. В методе ТСХ неподвижная твердая фаза (силикагель, оксид алюминия, порошок целлюлозы) тонким слоем наносится на стеклянную, пластмассовую или металлическую пластинку. В качестве подвижной фазы используют различные растворители или их смеси, органические и неорганические кислоты. Выбор растворителя зависит от природы сорбента и свойств анализируемых соединений. Например, при хроматографировании аминокислот используют смесь *n*-бутанола с уксусной кислотой и водой, при анализе неорганических ионов – водные буферные растворы, создающие постоянное значение рН. В ТСХ чаще используют *восходящий* способ получения хроматограммы. Раствор образца наносят микропипеткой на небольшом расстоянии от края пластинки на стартовую линию, и край пластинки погружают в растворитель, который действует как подвижная фаза жидкостной адсорбционной хроматографии. Под действием капиллярных сил растворитель поднимается вверх по пластинке и с разной скоростью переносит за собой компоненты смеси, что приводит к их пространственному разделению. Чтобы растворитель не испарялся с поверхности сорбента, пластинка на время разделения должна быть помещена в

герметически закрытую прозрачную камеру. Разделяемые компоненты на пластинке образуют отдельные зоны (пятна). Хроматографирование продолжают до тех пор, пока растворитель не пройдет от линии старта около 10 см до так называемой линии фронта. После этого пластинку вынимают из хроматографической камеры, подсушивают на воздухе и определяют положение пятен.

В *нисходящей* хроматографии растворитель передвигается по слою вниз под действием и капиллярных, и гравитационных сил.

Горизонтальная хроматография выполняется в виде круговой и со свободным испарением растворителя. В *круговой* хроматографии в центр горизонтально установленной пластинки вносят каплю анализируемой смеси и непрерывно подают растворитель, который под действием капиллярных сил движется в радиальном направлении от центра. Компоненты смеси располагаются в слое в виде концентрических колец.

Схема разделения смеси веществ методом тонкослойной хроматографии приведена на рисунке 13. Пятна характеризуют положение компонентов А, В, С на пластинке в конце опыта.

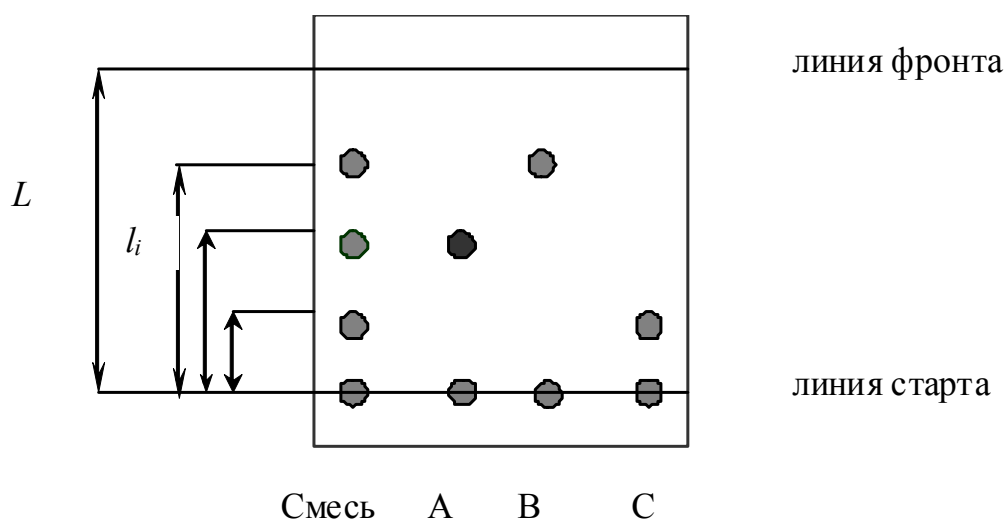


Рис. 13. Схема разделения методом восходящей тонкослойной хроматографии

Сорбционные свойства системы в ТСХ характеризуются подвижностью R_f – относительной скоростью перемещения компонентов в тонком слое. Величины R_f рассчитываются из экспериментальных данных (рис.13):

$$R_f = \frac{l_i}{L}, \quad (33)$$

где l_i – расстояние от стартовой линии до центра пятна, L – расстояние, пройденное растворителем от стартовой линии до границы фронта растворителя.

R_f характеризует положение пятна на хроматограмме. Это константа для данного вещества на данном сорбенте в данной системе растворителей. На величину R_f влияют качество и активность сорбента, его влажность, толщина слоя, качество и природа растворителя, техника эксперимента (способ нанесения пробы, способ детектирования) и другие факторы. На практике часто пользуются относительной величиной:

$$R_{f,отн} = \frac{R_{f,i}}{R_{f,см}}, \quad (34)$$

где $R_{f,см}$ также рассчитывают по уравнению (1).

Разделение двух веществ с $R_{f,1}$ и $R_{f,2}$ практически возможно, если $R_{f,1} > R_{f,2}$ и $\Delta R_f \geq 0,1$.

Качественный анализ. Проще всего идентификация вещества может быть сделана, если пятно определяемого вещества имеет характерную окраску. Невидимые хроматограммы проявляют соответствующими реагентами, как правило, групповыми. По характерной окраске образующихся цветных зон судят о составе анализируемой пробы. При обработке пластинки, например, парами иода четко проявляются неперелетные соединения; при опрыскивании пластинки тиоцианатом кобальта амины образуют голубые пятна на розово-белом фоне. В физических методах проявления используется способность некоторых веществ флуоресцировать под действием УФ-излучения.

Наиболее общий подход к качественному анализу основан на значениях R_f . При соблюдении стандартных условий получают воспроизводимые значения R_f , которые можно использовать в аналитических целях при сравнении с табличными, если они получены в тех же условиях опыта; более надежно использовать значения $R_{f,отн}$.

Самым надежным способом является метод свидетелей (стандартных веществ). Стандартное вещество в том же растворителе наносится на стартовую линию рядом с анализируемой пробой и, таким образом, хроматографируется в тех же условиях

По окончании хроматографирования и проявления хроматограммы приступают к идентификации веществ. Совпадение R_f компонента пробы и одного из свидетелей дает основание для отождествления веществ.

Количественные определения в ТСХ могут быть сделаны непосредственно на пластинке, в этом случае каким-либо способом измеряют площадь пятна и по заранее построенному градуировочному графику находят количество вещества.

Бумажная хроматография

Вместо пластинок с нанесенным тонким слоем сорбента можно использовать специальную хроматографическую бумагу в виде листов или полосок. Хроматографическая бумага должна быть химически чистой, нейтральной, инертной по отношению к компонентам раствора и подвижной фазе и быть однородной по плотности; имеют значение структура молекул целлюлозы в бумаге, ориентация волокон и другие свойства, влияющие на скорость движения подвижной фазы. Основные операции в бумажной хроматографии проводятся примерно так же, как и в тонкослойной.

Для разделения водорастворимых веществ, например, неорганических ионов, в качестве подвижной фазы обычно берут органический растворитель, а в качестве неподвижной – воду (бумагу заранее смачивают водой). Для разделения компонентов, хорошо растворимых в органических растворителях, гидрофильную бумагу превращают в гидрофобную, пропитывая ее растворами

органических веществ (парафина, растительного масла и др.), а в качестве подвижной фазы используют воду, водный раствор какой-либо кислоты или щелочи, буферный раствор.

Растворители подвижной и неподвижной фаз не должны смешиваться, состав растворителя в процессе хроматографирования не должен изменяться, растворители должны легко удаляться с бумаги. Индивидуальные растворители используются достаточно редко. Чаще для этой цели применяют смеси веществ, например, бутилового или амилового спирта с метиловым или этиловым, смеси бутилового спирта с уксусной кислотой, аммиаком и др.

Качественный состав пробы в методе бумажной распределительной хроматографии так же, как и в ТСХ, может быть установлен или по специфической окраске отдельных пятен на хроматограмме, или по численному значению R_f каждого компонента. Количественные определения в БХ выполняются по хроматографическим характеристикам (по площади пятна на хроматограмме и интенсивности его окраски) или после вымывания подходящим физико-химическим методом.

5.1.2. Газовая хроматография

Газовая хроматография – это вариант хроматографии, в котором подвижной фазой является инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, обладающую большой поверхностью. Обычно в качестве подвижной фазы используют гелий, азот, аргон, водород, диоксид углерода или воздух. Газ-носитель должен быть инертным по отношению к разделяемым веществам и сорбенту, взрывобезопасным и достаточно чистым. Выбор газ-носителя в каждом конкретном случае должен обеспечивать соответствие его физических свойств получению высокой эффективности колонки и достаточной чувствительности детектора.

В зависимости от агрегатного состояния неподвижной фазы газовая хроматография подразделяется на *газоадсорбционную*, когда неподвижной фазой является твердый адсорбент, и *газожидкостную*, когда неподвижной фазой является жидкость, нанесенная на поверхность твердого носителя. В газовой хроматографии используется преимущественно элюентный (проявительный) способ проведения процесса хроматографирования.

Газовая хроматография – метод разделения летучих соединений. Этим методом можно проанализировать газообразные, жидкие и твердые вещества с молекулярной массой меньше 400, удовлетворяющие определенным требованиям, главные из которых – летучесть, термостабильность, инертность и легкость получения. Количественный анализ можно провести только в том случае, если вещество термостойко, т.е. испаряется в дозаторе воспроизводимо и элюируется из колонки без разложения. При разложении вещества на хроматограмме появляются ложные пики, относящиеся к продуктам разложения. Вещество не должно образовывать устойчивых сольватов при растворении в неподвижной жидкой фазе и реагировать с материалами, из которых изготовлены детали хроматографа. Этим требованиям удовлетворяют, как правило, органические вещества, поэтому ГХ чаще используют как метод

анализа органических соединений, хотя этим методом можно определять почти все элементы периодической системы в виде летучих соединений.

Газотвердофазная хроматография

В газоадсорбционной хроматографии в качестве неподвижной фазы применяют различные адсорбенты – высокодисперсные искусственные или природные тела с высокой удельной поверхностью ($10-1000 \text{ м}^2/\text{г}$), поглощающие газы или пары. Адсорбция молекул из газовой фазы происходит за счет межмолекулярных взаимодействий, имеющих электростатическую природу; возможно образование водородной связи, но вклад этого взаимодействия уменьшается с ростом температуры.

Адсорбент должен обладать следующими основными свойствами: необходимой селективностью, отсутствием каталитической активности и химической инертностью к компонентам разделяемой смеси, достаточной механической прочностью.

Основными адсорбентами, применяемыми в газо-адсорбционной хроматографии, являются активированные угли, силикагели, оксид алюминия. Неоднородность поверхности активных адсорбентов не дает возможности определять сильно адсорбирующиеся полярные молекулы, однако, в последнее время промышленностью выпускаются адсорбенты с достаточно однородной поверхностью, такие, как пористые стекла, пористые полимеры, синтетические цеолиты (молекулярные сита), макропористые силикагели (силохром, порасил, сферосил), позволяющие проводить анализ смесей сильнополярных веществ.

Наиболее широко метод газоадсорбционной хроматографии применяют для анализа смесей газов и низкокипящих углеводородов, не содержащих активных функциональных групп. Например, для разделения O_2 , N_2 , CO , CH_4 , CO_2 с успехом применяют глинистые материалы, сорбенты, называемые порпаками, используют для разделения гидридов металлов (Ge, As, Sn, Sb). Метод ГАХ на колонках с пористыми полимерными сорбентами – удобный и быстрый способ определения воды в неорганических и органических материалах.

Газожидкостная хроматография

В аналитической практике чаще используют метод газожидкостной хроматографии. Это связано с чрезвычайным разнообразием жидких неподвижных фаз. В газожидкостной хроматографии неподвижной фазой служит практически нелетучая при температуре колонки жидкость, нанесенная на твердый носитель. Количество жидкой фазы составляет 5 – 30 % от массы твердого носителя.

К жидкой фазе предъявляется ряд жестких требований: 1) способность хорошо растворять компоненты смеси (если растворимость мала, компоненты выходят из колонки очень быстро); 2) инертность по отношению к компонентам смеси и твердому носителю; 3) малая летучесть (чтобы не испарялась при рабочей температуре колонки); 4) термическая устойчивость; 5) достаточно высокая селективность, т.е. способность разделять смесь компонентов; 6) небольшая вязкость (иначе замедляется процесс диффузии);

7) способность образовывать при нанесении на носитель равномерную пленку, прочно с ним связанную.

Природа жидкой фазы является тем основным фактором, который определяет последовательность выхода компонентов из колонки. В качестве жидких фаз применяются неполярные парафины (например, сквалан, вазелиновое масло, апиезоны), умеренно полярные (сложные эфиры, нитрилы и др.) и полярные (полиэтиленгликоли или карбоваксы, гидроксиламины и др.)

Каждая жидкая фаза имеет температурные пределы применения. Нижний температурный предел – минимальная рабочая температура, соответствующая застыванию жидкой фазы. Обычно выбирают минимальную рабочую температуру колонки выше точки застывания жидкой фазы на 10-15° С. Верхний температурный предел – максимальная допустимая рабочая температура (МДРТ) жидкой фазы, выше которой она начинает разрушаться, при этом образуются летучие соединения, уносимые из колонки. Практика использования жидких фаз для анализа показывает, что необходимо работать с ними при температурах на 20-30° С ниже МДРТ жидкой фазы.

Наибольшим температурным диапазоном использования в газо-жидкостной хроматографии обладают кремнийорганические полимеры, например, метилсиликоны – жидкости при комнатной температуре, а МДРТ их достигает 300 – 350 оС. Наиболее термостабильными жидкими фазами являются карборан-силоксановые полимеры, в которые входят атомы бора, кремния и углерода. МДРТ этих соединений достигает 400° С.

Твердым носителем обычно служит практически инертное твердое вещество, на которое наносят неподвижную жидкость. Основное назначение твердого носителя в хроматографической колонке – удерживать жидкую фазу на своей поверхности в виде однородной пленки. В связи с этим твердый носитель должен иметь значительную удельную поверхность (0,5-10 м²/г), причем она должна быть макропористой во избежание адсорбции компонентов пробы. Кроме того, твердый носитель должен обладать следующими качествами: отсутствием каталитической активности, достаточной механической прочностью, стабильностью при повышенных температурах, однородностью пор по размерам, максимальной однородностью размера зерен. Однако до настоящего времени не создано универсального носителя, удовлетворяющего всем перечисленным требованиям.

В качестве твердых носителей в газо-жидкостной хроматографии используются диатомиты (кизельгур, инфузорная земля), синтетические кремнеземы (макропористые силикагели, широкопористые стекла, аэросилогели), полимерные носители на основе политетрафторэтилена и т.д. Часто используют модифицированные носители, ковалентно связанные с «жидкой» фазой. При этом стационарная жидкая фаза более прочно удерживается на поверхности даже при самых высоких температурах колонки. Химически связанная неподвижная фаза более эффективна.

Аппаратурное оформление газовой хроматографии

Для проведения газо-хроматографических анализов применяются специальные приборы – газовые хроматографы (рис.14).

Одним из основных узлов газового хроматографа является дозатор, который предназначен для точного количественного отбора пробы и введения ее в хроматографическую колонку. В каждом хроматографе дозатор-испаритель устанавливается непосредственно у входа в хроматографическую колонку. Он представляет собой небольшую емкость, соединенную с началом хроматографической колонки и снабженную самоуплотняющейся термостойкой резиновой мембраной.

В дозаторе следует поддерживать такую температуру, при которой происходило бы полное и быстрое испарение жидкого образца. Жидкую пробу дозируют микрошприцем, выпуск газообразных проб часто осуществляют медицинским шприцем. В зависимости от концентрации и числа разделяемых компонентов объем вводимого газообразного образца колеблется от 1 до 10 мл, а объем жидкого образца – от 0,1 до 10 мкл. Вместе с газом-носителем введенный парообразный образец поступает в колонку, где происходит его сорбция.

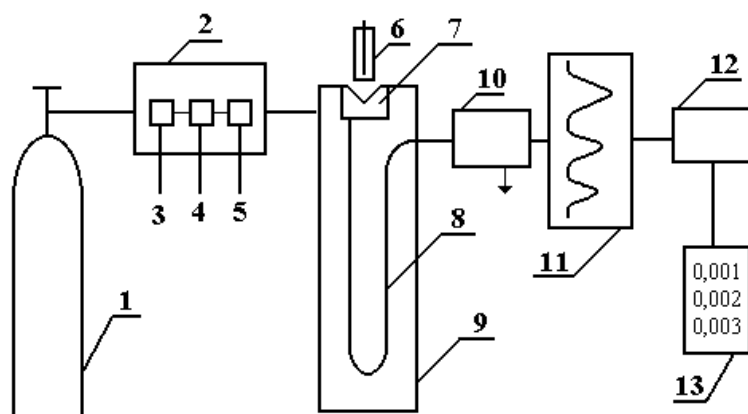


Рис. 14. Блок-схема газового хроматографа:

- 1 – баллон со сжатым газом; 2 – блок подготовки газа-носителя;
- 3 – регулятор расхода газа; 4 – измеритель расхода газа; 5 – фильтр;
- 6 – микрошприц для введения пробы; 7 – испаритель;
- 8 – хроматографическая колонка; 9 – термостат; 10 – детектор;
- 11 – самописец; 12 – интегратор; 13 – цифровая печатающая машина

Хроматографические колонки различны по форме, размерам и материалам. Наиболее распространены спиральные, U- и W - образные колонки длиной от 2 м и менее до нескольких десятков метров. Внутренний диаметр колонок обычно от 3 до 6 мм. Колонки изготавливают из нержавеющей стали, меди, латуни, стекла. Материал колонок должен обладать химической инертностью по отношению к компонентам пробы.

Большое влияние на сорбируемость газа оказывает температура, поэтому хроматографические колонки, как правило, термостатируются. Обычно

термостатирование производится при температурах, значительно превышающих комнатные, однако в некоторых случаях создаются температуры ниже 0°C при разделении низкокипящих газов.

Для обнаружения изменений в составе газа, прошедшего через колонку, предназначен детектор. Последний непрерывно измеряет концентрацию компонентов на выходе их из хроматографической колонки и преобразует концентрацию в электрический сигнал, который регистрируется самопишущим прибором.

Характеристики хроматограммы

Хроматограмма представляет собой кривую в виде ряда пиков, число которых соответствует числу разделяемых компонентов. Чем больше площадь пика, тем больше данного вещества в пробе.

В хроматограмме на оси абсцисс регистрируется время удерживания каждого компонента пробы, а на оси ординат – сигналы детектора в милливольтгах, пропорциональные содержанию компонента в пробе.

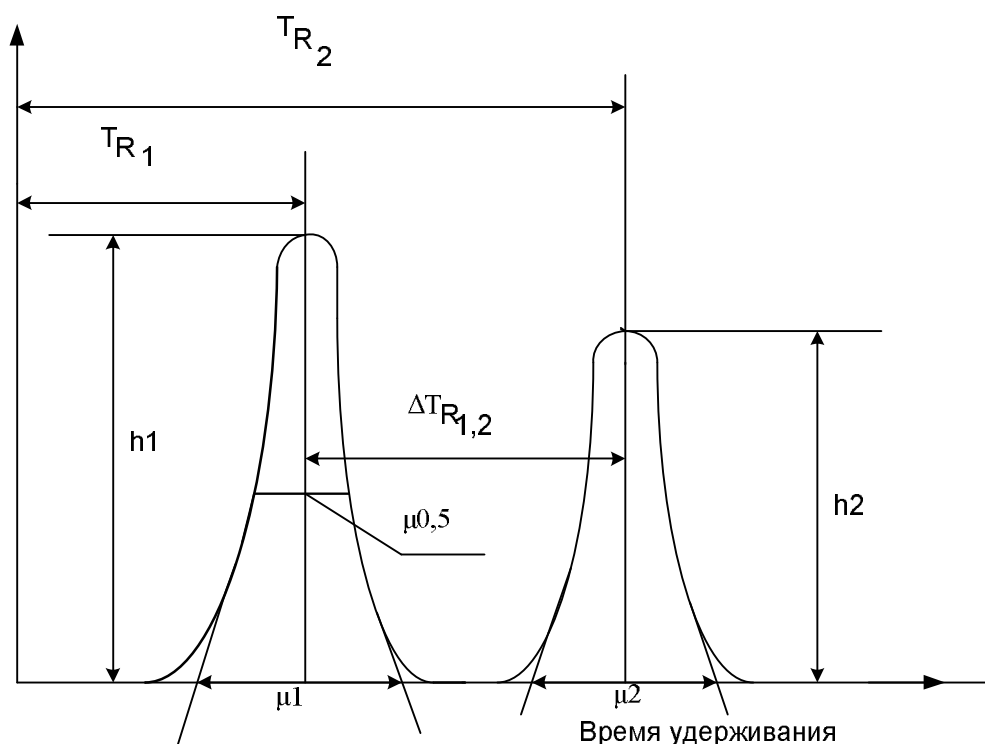


Рис. 15. Параметры дифференциальной хроматограммы

T_{R1} и T_{R2} – время удерживания компонентов 1 и 2; h_1 и h_2 – высоты пиков ; $\mu_{0,5}$ - ширина пика на середине высоты; μ – ширина пика у основания; $\Delta T_{R1,2}$ – интервал между максимумами двух соседних пиков.

Время от момента ввода анализируемой пробы до регистрации максимума пика называют **временем удерживания** (T_{R1} и T_{R2}). Время удерживания складывается из двух составляющих – времени пребывания вещества в подвижной и неподвижной фазах. Время удерживания не зависит от количества пробы, но зависит от природы вещества и сорбента, скорости

потока газа-носителя, а также упаковки сорбента и может меняться от колонки к колонке.

Величиной, не зависящей от скорости потока газа-носителя, является **удерживаемый объем** V_R – это объем газа-носителя, который должен быть пропущен от момента ввода пробы до появления максимума пика на хроматограмме:

$$V_R = F \cdot T_R, \quad (35)$$

где F – объемная скорость потока, мл/с.

Объем для вымывания несорбируемого компонента V_0 включает в себя объем колонки, не занятый сорбентом.

Приведенный удерживаемый объем V_R' равен:

$$V_R' = V_R - V_0, \quad (36)$$

При постоянных условиях хроматографирования (скорость потока, давление, температура, состав фаз) значения характеристик удерживания строго воспроизводимы и могут быть использованы для идентификации компонентов в качественном анализе и для физико-химических исследований.

Рассмотренные характеристики удерживания называются абсолютными. Кроме того, в хроматографии часто используют относительные характеристики удерживания.

При расчете относительного времени удерживания приведенное время удерживания какого-либо вещества относят к приведенному времени удерживания стандартного вещества:

$$\dot{O}_{i0i} = \frac{T_R'}{\dot{O}_{cm}'} , \quad (37)$$

В процессе хроматографического разделения часто происходит размывание пиков. Это явление обусловлено процессами, протекающими в колонке, например, медленностью сорбции и десорбции и др. Это приводит к тому, что разделение компонентов может вообще не произойти при значительной разнице в коэффициентах распределения.

Для объяснения специфического для хроматографии процесса размывания обычно используют теорию эквивалентных теоретических тарелок.

По аналогии с теорией дистилляционных колонн хроматографическая колонка мысленно разбивается на ряд последовательных теоретических ступеней-тарелок, через которые периодически проходят порции газа. Каждая тарелка содержит подвижную (газовую) и неподвижную (жидкую или твердую) фазы. Предполагается, что за время нахождения порции газа на тарелке успевает установиться равновесие между подвижной и неподвижной фазами для всех компонентов. Таким образом, хроматографический процесс – многоступенчатый и состоит из большого числа актов сорбции и десорбции (в газо-адсорбционной хроматографии) или растворения и испарения (в газо-жидкостной хроматографии), а сама колонка рассматривается как система, состоящая из совокупности многих ступеней-тарелок.

Длина участка колонки, на которой достигается состояние равновесия между концентрацией вещества в подвижной и неподвижной фазах, называется условно **высотой, эквивалентной теоретической тарелке** (ВЭТТ).

Существует простая зависимость:

$$H = \frac{L}{N}, \quad (38)$$

где L – длина хроматографической колонки, см;

N – число теоретических тарелок;

H – высота, эквивалентная теоретической тарелке, см.

Для вычисления числа теоретических тарелок (ч.т.т.) измеряют ширину хроматографического пика на половине высоты, $\mu_{0,5}$. Тогда:

$$N = 5/54 \left(\frac{\dot{O}_R}{\mu_{0,5}} \right)^2, \quad (39)$$

где $\mu_{0,5}$ – ширина полупика, выраженная в единицах времени (мин) или объема, мл.

Количественной мерой размывания хроматографических полос, т.е. **эффективности колонки** является ВЭТТ. С увеличением числа т.т. эффективность хроматографической колонки возрастает.

В теории теоретических тарелок реальный хроматографический процесс заменен идеальным, по которому хроматографическая полоса размывается вследствие равновесных процессов между подвижной и неподвижной фазами. Такое рассмотрение размывания хроматографической полосы не вскрывает сущности процесса и не дает информации о том, как подобрать такие условия, которые позволили бы уменьшить величину H и тем самым повысить эффективность хроматографической колонки.

Качественный анализ

Качественными характеристиками хроматографируемых веществ в определенных условиях проведения опыта служат удерживаемый объем и время удерживания. Качественный анализ основан на измерении и сопоставлении этих величин. Существует несколько методов идентификации на основе характеристик удерживания.

1.Применение индивидуальных эталонных веществ. Один из вариантов этого метода состоит в последовательном разделении анализируемой и эталонной смесей в одинаковых условиях. Равенство времен удерживания пиков соответствующих компонентов обеих смесей может служить основанием для идентификации.

Другой вариант заключается в том, что в исследуемую смесь вводят эталонный компонент, наличие которого в этой смеси предполагается. Увеличение высоты соответствующего пика (без его расширения) по сравнению с высотой этого пика на хроматограмме, полученной до введения эталона, может свидетельствовать о присутствии искомого соединения в анализируемой смеси.

Указанный метод прост, но обладает существенными недостатками. Во-первых, необходимо иметь эталонные вещества; во-вторых, все пики, полученные при разделении на данной колонке, должны соответствовать индивидуальным веществам. Но даже при выполнении этих условий нет никаких гарантий однозначности проведенной идентификации. Практически всегда имеются по крайней мере два вещества, удерживаемые объемы которых на колонке с данным сорбентом достаточно близки. Такими веществами вполне могут быть любой компонент смеси и эталон, нетождественные между собой.

2. Использование табличных данных о характеристиках удерживания. В настоящее время опубликовано много таблиц со значениями относительных удерживаемых объемов для самых различных веществ. Эти таблицы можно использовать при отсутствии необходимых эталонных соединений. Анализируемую смесь разделяют на колонке при условиях, указанных в соответствующей таблице, причем предварительно в смесь вводят небольшое количество веществ, служащих стандартами. На основе полученной хроматограммы рассчитывают относительные удерживаемые объемы, индексы удерживания или другие характеристики. Полученные значения сравнивают с табличными данными.

Количественный анализ

Для количественной оценки качества хроматографического разделения используют **критерий разделения R**, который учитывает воздействие на полноту разделения компонентов таких факторов, как эффективность колонки. Параметр R рассчитывают по формуле:

$$R = \frac{2\Delta T_{R1,2}}{\mu_1 + \mu_2}, \quad (40)$$

где $\Delta T_{R1,2}$ – интервал между максимумами двух соседних пиков;

μ_1, μ_2 – ширина пиков у основания.

Количественный газохроматографический анализ основан на допущении, что площади пиков (или высоты), соответствующие индивидуальным соединениям на хроматограмме, пропорциональны их количеству или концентрации. Площади пиков S на хроматограмме обычно измеряют методом триангуляции (приближения к площади треугольника) по формуле: $S = h \cdot \mu_{0,5}$, где h – высота пика, мм; $\mu_{0,5}$ – ширина пика на середине его высоты, мм.

Основными методами количественного анализа являются следующие: метод абсолютной градуировки, метод внутреннего стандарта.

В методе абсолютной градуировки (внешнего стандарта) экспериментально определяют зависимость высоты или площади пика от концентрации вещества и строят градуировочные графики. Далее определяют те же параметры пиков в анализируемой смеси и по градуировочному графику находят концентрацию анализируемого вещества.

Этот простой и точный метод является основным методом определения микропримесей. Кроме того, метод не требует разделения всех компонентов смеси, а ограничивается лишь теми, определение которых необходимо в данном конкретном случае.

Метод внутреннего стандарта основан на введении в анализируемую смесь точно известного количества стандартного вещества. В качестве стандартного выбирают вещество, близкое по физико-химическим свойствам к компонентам смеси. Это вещество должно отсутствовать в исследуемой смеси и давать на хроматограмме пик, отдельный от других компонентов. После хроматографирования измеряют площади пиков анализируемого компонента (S_i) и стандартного вещества (S_{cm}). Массовую долю компонента (W_i , %) рассчитывают по формуле:

$$\omega_i = \frac{S_i}{S_{cm}} \cdot r \cdot 100\% , \quad (41)$$

где r – отношение массы внутреннего стандарта к массе пробы.

Достоинством метода внутреннего стандарта является хорошая воспроизводимость, высокая точность, отсутствие влияния на измеряемые величины небольших колебаний условий опыта.

К недостаткам относятся требование точной дозировки стандарта и хорошего отделения пика стандарта от пиков анализируемых веществ.

5.1.3. Жидкостная колоночная хроматография

Жидкостная хроматография (ЖХ) – это метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой служит жидкость. Метод ЖХ применим для разделения более широкого круга веществ, чем метод ГХ, поскольку большинство веществ не обладает летучестью, многие из них неустойчивы при высоких температурах. В ЖХ разделение чаще всего происходит при комнатной температуре. Жидкая подвижная фаза, в отличие от газа в ГХ, выполняющего только транспортную функцию, является активным элюентом. Молекулы жидкой фазы могут сорбироваться на поверхности неподвижной фазы. При прохождении через колонку находящиеся в элюенте молекулы интересующего нас компонента должны вытеснить молекулы элюента с поверхности сорбента. Применяя различные элюенты, можно изменять параметры удерживания и селективность хроматографической системы.

В классическом варианте ЖХ в стеклянную колонку длиной 1–2 м, заполненную сорбентом (размер частиц ≥ 100 мкм), вводят анализируемую пробу и пропускают элюент. Скорость прохождения элюента под действием силы тяжести мала, а продолжительность анализа значительна. Однако такой вариант ЖХ не требует дорогостоящего оборудования и до сих пор находит применение.

Вследствие использования сорбентов со значительно меньшим размером частиц (до 5–10 мкм), нагнетательных насосов, чувствительных детекторов произошел переход от классической к высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), позволяющей проводить разделение и определение молекул, ионов, разделение макромолекул и биологически активных молекул. К достоинствам метода ВЭЖХ можно отнести универсальность, возможность автоматизации разделения и анализа сложных смесей органических и неорганических веществ, экспрессность, эффективность и высокую чувствительность.

Лабораторная работа №1

Распределительная хроматография аминокислот на бумаге

Метод основан на различной степени распределения компонентов смеси между двумя несмешивающимися жидкими фазами (неподвижной водной фазой и подвижной фазой органического растворителя).

Органический растворитель (например, фенол, насыщенный водой, или смесь *n*-бутилового спирта, ледяной уксусной кислоты и воды), проходя через полоску фильтровальной бумаги, увлекает за собой аминокислоты, раствор которых был нанесен на бумагу. Различные аминокислоты передвигаются по бумаге с неодинаковой скоростью. Скорость перемещения аминокислот зависит от многих факторов: строения молекулы аминокислот, их способности легче растворяться в органическом растворителе или воде, избирательной адсорбции на бумаге, типа бумаги условий проведения анализа и т.д. Чем лучше растворяется аминокислота в органическом растворителе, тем больший путь она пройдет с ним по бумаге.

Приняты два способа хроматографического разделения аминокислот на бумаге – восходящий и нисходящий. При восходящем способе растворитель поднимается по бумаге снизу вверх, при нисходящем – сверху вниз. Положение отдельных аминокислот обнаруживают путем проявления – обработки высушенной бумаги раствором нингидрина и последующего нагревания ее при 100°C. На полоске бумаги (хроматограмме) отчетливо видны пятна фиолетового, синего, голубого, желтого, оранжевого, коричневого цвета.

Положение аминокислоты на бумаге можно установить и без проявления, рассматривая хроматограмму в ультрафиолетовых лучах. Пятна отчетливо флуоресцируют в ультрафиолете.

Для каждой аминокислоты характерна скорость перемещения, которую выражают с помощью коэффициента R_f . Коэффициентом R_f называют отношение пути, пройденного аминокислотой (от места ее нанесения на бумагу до середины пятна на хроматограмме), к расстоянию от места нанесения смеси аминокислот до фронта растворителя:

$$R_f = \frac{a}{b}, \quad (42)$$

где a – расстояние от места нанесения раствора смеси аминокислот до середины пятна данной аминокислоты, мм;

b – путь, пройденный растворителем, мм.

Каждая аминокислота имеет определенное значение коэффициента R_f , которое может меняться в зависимости от вида применяемой бумаги, растворителя, температуры, рН среды и некоторых других факторов (таблица 19). Для разделения аминокислот применяют специальную хроматографическую фильтровальную бумагу высокого качества (она должна быть строго равномерной по толщине и одинаковой по плотности, характеризоваться незначительным содержанием примесей).

Реактивы: а) *раствор смеси аминокислот:* в 10 мл воды растворяют 60 мг аспарагиновой (или глутаминовой) кислоты, 40 мг глицина (или аланина) и 50

мг лейцина; б) фенол, насыщенный водой: к 100 г перегнанного фенола добавляют 35 мл воды и перемешивают, для ускорения растворения фенола смесь можно слегка подогреть; в) смесь *n*-бутанола, ледяной уксусной кислоты и воды (4:1:1 по объему): реактивы смешивают в указанном соотношении. Для того чтобы смесь не расслаивалась, рекомендуется дополнительно прибавить несколько капель уксусной кислоты; г) нигирин, 0,2% раствор в этиловом или бутиловом спирте.

Таблица 19

Значения R_f отдельных аминокислот (бумага ватман №1)

| Аминокислоты | Растворители | |
|-----------------------|-------------------------|---|
| | фенол, насыщенный водой | <i>n</i> -бутиловый спирт - ледяная уксусная кислота - вода (4:1:1) |
| Фенилаланин | 0,87 | 0,66 |
| Лизин | 0,82 | 0,16 |
| Аргинин | 0,90 | 0,18 |
| Гистидин | 0,69 | 0,17 |
| Серин | 0,36 | 0,32 |
| Треонин | 0,47 | 0,36 |
| Глицин | 0,41 | 0,34 |
| Аспарагиновая кислота | 0,15 | 0,33 |
| Глутаминовая кислота | 0,25 | 0,37 |
| Тирозин | 0,63 | 0,53 |
| α -аланин | 0,56 | 0,39 |
| Метионин | 0,83 | 0,58 |
| Триптофан | 0,75 | 0,62 |
| Пролин | 0,89 | 0,50 |
| Лейцин | 0,87 | 0,72 |
| Валин | 0,76 | 0,56 |
| Цистин | 0,03 | 0,13 |

Оборудование: а) термостат, отрегулированный на температуру 37-38 °С; б) сушильный шкаф, отрегулированный на 100-105 °С; в) пробирки стеклянные большого размера (длина 18-20 см, диаметр 2-2,5 см) с подобранными пробками; г) линейка с делениями на миллиметры; д) микропипетки; е) пульверизатор; ж) ножницы; з) игла с ниткой; и) штатив для пробирок.

Материалы: Бумага фильтровальная хорошего качества (лучше пользоваться специальной хроматографической бумагой).

Ход работы

Вырезают полоску фильтровальной бумаги шириной 1,2 см, длиной 12-15 см (рис.16). Один из концов полоски прокалывают иглой, протягивая нитку, которую завязывают петлей. На противоположном конце полоски, отступив на 1-1,5 см от ее края, графитовым карандашом очерчивают небольшой кружок (диаметром 3-5 мм) в который с помощью микропипетки вносят каплю раствора смеси аминокислот. Место нанесения раствора подсушивают на воздухе.

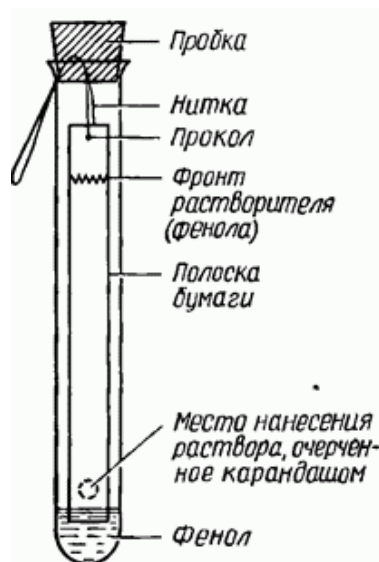


Рис. 16. Упрощенный прибор для распределительной хроматографии аминокислот

В сухую пробирку наливают около 1 мл. насыщенного водой фенола или смеси *n*-бутанола, уксусной кислоты и воды, следя, чтобы при этом не смочить стенки. В пробирку осторожно (за нитку) опускают полоску бумаги, погружая её нижний конец в растворитель на 2-3 мм (не более!), и закрепляют в висячем положении с помощью нитки и пробки. Пробирку ставят в термостат (при температуре 37-38⁰) на 1,5 ч, затем вынимают полоску и переносят её на 10-12 мин. В сушильный шкаф, нагретый до 100-105⁰. В сушильном шкафу полоску подвешивают за нитяную петлю на стеклянную палочку. После испарения растворителя полоску вынимают из шкафа, опрыскивают раствором нингидрина (с помощью пульверизатора) и снова вносят в тот же сушильный шкаф на несколько минут. На хроматограмме появляются окрашенные пятна аминокислот (рис 17).

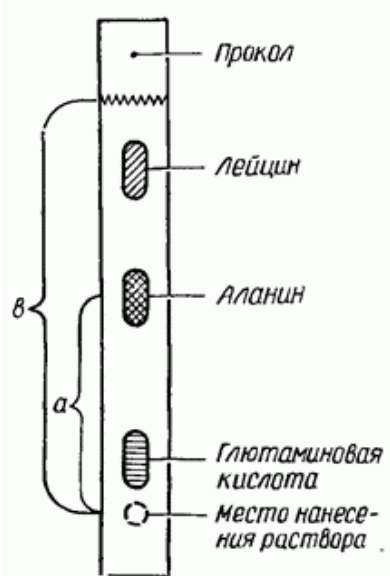


Рис. 17. Хроматограмма аминокислот

Линейкой измеряют расстояния:

- а) от места нанесения капли раствора смеси аминокислот до середины данной кислоты;
 - б) от места нанесения капли раствора аминокислот до фронта растворителя.
- Рассчитывают R_F каждой аминокислоты.

Лабораторная работа №2

Хроматографический анализ спиртов

1. Качественный анализ смеси спиртов

1.1. Выполнить обработку хроматограммы, данную преподавателем для каждого компонента.

1.2. Рассчитать время удерживания T_R по формуле:

$$\frac{\Delta l}{V} \cdot 60, \quad (43)$$

где Δl – расстояние с момента ввода пробы до максимума соответствующего пика, мм;

V – скорость движения ленты самописца; в расчетах принять значение $V=15$ мм/мин.

1.3. Выполнить качественную идентификацию спиртов полученной смеси, используя справочные данные таблицы 20.

Таблица 20

Время удерживания T_R различных спиртов

| Спирт | T_R , с | Спирт | T_R , с |
|-----------------|-----------|-----------------|-----------|
| CH_3OH | 80 | C_4H_9OH | 255 |
| C_2H_5OH | 120 | Изо- C_4H_9OH | 300 |
| C_3H_7OH | 140 | C_5H_9OH | 365 |
| изо- C_3H_7OH | 185 | $C_6H_{13}OH$ | 455 |

2. Количественный анализ смеси спиртов

2.1. Определить высоту h и ширину пика μ в мм для каждого компонента.

2.2. Измерить и записать значение $\mu_{0,5}$ на половине высоты хроматографического пика в мм.

2.3. Определить эффективность работы хроматографической системы для двух, заданных преподавателем, компонентов, рассчитав для них значение ВЭТТ в мм и число N теоретических тарелок по формулам:

$$\text{для ВЭТТ: } \dot{I} = \frac{L}{N}, \quad (44) \quad \text{и} \quad N = 5,54 \left(\frac{T_R}{\mu_{0,5}} \right)^2, \quad (45)$$

В расчете использовать значение длины хроматографической колонки $L=300$ см и время удерживания T_R в мм.

На основании расчетов N и ВЭТТ сделать вывод об эффективности работы колонки в целом и по каждому компоненту.

2.4. Для этих же компонентов определить критерий разделения R по формуле:

$$R = \frac{2\Delta T_{R1,2}}{\mu_1 + \mu_2}, \quad (46)$$

Исходя из значения R, сделать вывод о качестве разделения компонентов.

2.5. Методом триангуляции (площади треугольника) по значениям **h** и $\mu_{0,5}$ рассчитать площади пиков для всех компонентов смеси:

$$S = h \cdot \mu_{0,5}, \quad (47)$$

2.6. Определить объемное процентное содержание по каждому компоненту X_i (об.%):

$$X_i (\%) = \frac{S_i}{S_1 + S_2 + S_3 + S_4 + S_5} \cdot 100\%, \quad (48)$$

2.7. Результаты измерений и вычислений занести в таблицу 21.

Таблица 21

Таблица результатов измерений и вычислений

| № пика | Определяемый компонент | T _R | | h мм | μ _{0,5} мм | S мм ² | X % | μ мм |
|--------|------------------------|----------------|---|---------|------------------------|----------------------|--------|---------|
| | | мм | с | | | | | |
| | | | | | | | | |

Лабораторная работа №3

Газохроматографический метод определения содержания бензойной кислоты

Метод основан на экстракции бензойной кислоты или ее соли хлороформом при предварительном подкислении пробы сока или напитка и определении массовой доли бензойной кислоты методом газожидкостной хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием. При анализе густых продуктов перед экстракцией проводят осаждение мешающих веществ растворами Карреза. Линейная зависимость хроматографического сигнала от массы введенной в хроматограф бензойной кислоты – от $5 \cdot 10^{-6}$ до $60 \cdot 10^{-6}$ г (5-60 мкг). Диапазон измерения массовой доли бензойной кислоты – от 100 до 1000 млн⁻¹(мг/кг).

Приготовление реактива Карреза

Реактив Карреза 1: отвешивают 15 г KFe(CN)₆·3H₂O (гексацианоферрата(II) калия с погрешностью ±0,01 г, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ дистиллированной водой и доводят водой до метки.

Реактив Карреза 2: 30 г ZnSO₄·7H₂O (сульфат цинка), взятых с погрешностью ±0,01 г, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 см³ дистиллированной водой и доводят водой до метки.

Реактив Карреза 1 и Реактив Карреза 2 смешивают в соотношении 1:1.

Средства измерения: лабораторный газовый хроматограф по ГОСТ 26703, состоящий из:

- 1) термостата с верхним пределом измерения рабочей температуры не ниже 250⁰С;

- 2) испарителя с верхним пределом измерения рабочей температуры не ниже 300°C ;
- 3) пламенно-ионизационного детектора пределом детектирования от $1,0 \cdot 10^{-12}$ до $2,0 \cdot 10^{-12}$ г/с, допускаемым относительным средним квадратическим отклонением выходного сигнала хроматографа от 1,0 до 2,0 % от высоты или площади хроматографического пика, допускаемым отклонением выходного сигнала хроматографа за 48 ч измерений от $\pm 4,0$ до $\pm 5,0\%$;
- 4) регистрирующего устройства (самописца или интегратора), позволяющего проводить измерения при чувствительности 1 мВ с погрешностью записи в рабочих условиях не более 0,5 %;
- 5) стеклянной насадочной колонки длиной 200 см и внутренним диаметром 3 мм, заполненной хромосорбом W-AW или хроматоном N-AW размером частиц от 0,20 до 0,25 мм, на который нанесен 1 % ортофосфорной кислоты и 10 % диэтиленгликольсукцината от массы хромосорба.

Ход работы

1. Приготовление рабочего раствора бензойной кислоты. Рабочий раствор бензойной кислоты массовой концентрации 5 мг/см^3 готовят весовым способом. В стаканчике номинальной вместимостью 50 см^3 взвешивают на аналитических весах $0,250 \text{ г}$ бензойной кислоты количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 см^3 , смывая небольшими порциями этилового спирта. Объем содержимого в колбе доводят до метки этиловым спиртом.

Полученный раствор хранят при температуре не выше 5°C в закрытом сосуде в течение 6 мес.

2. Приготовление рабочего раствора каприловой кислоты (внутреннего стандарта). Готовят по п.1.

3. Подготовка хроматографа к работе

Приготовление насадки для хроматографической колонки. Неподвижную фазу, содержащую по массе носителя 1 % фосфорной кислоты и 10 % диэтиленгликольсукцината (ДЭГС) на твердом носителе хромосорб, готовят в два этапа. Для этого берут навеску фосфорной кислоты массой $0,313 \text{ г}$ и растворяют ее в 120 см^3 этилового спирта. В круглодонную колбу вместимостью 250 см^3 высыпают навеску хромосорба или хроматона ($30,0 \text{ г}$) и заливают полученным спиртовым раствором фосфорной кислоты, перемешивают. Затем растворитель отгоняют на ротационном испарителе до сыпучего состояния твердого носителя.

Далее в колбу вносят приготовленный раствор $3,0 \text{ г}$ ДЭГС в 120 см^3 хлороформа, перемешивают и также отгоняют растворитель на ротационном испарителе. Полученную насадку пересыпают в выпарительную чашку и выдерживают в вытяжном шкафу до полного удаления запаха хлороформа, далее пересыпают в стеклянный сосуд и хранят в укупоренном состоянии.

Приготовление хроматографической колонки. Хроматографическую стеклянную колонку длиной 200 см и внутренним диаметром 3 мм промывают последовательно этиловым спиртом, ацетоном и хлороформом и высушивают. Один конец спиральной стеклянной колонки закрывают тампоном из

стекловаты. Через другой конец колонку заполняют приготовленной насадкой с помощью водоструйного насоса. Для равномерного уплотнения насадки стеклянную колонку постукивают деревянной палочкой. После заполнения колонки входное отверстие также закрывают тампоном из стекловаты.

Подготовка хроматографа. Подготовку и установку колонки, подключение хроматографа к сети и вывод хроматографа на режим выполняют согласно инструкции по эксплуатации хроматографа.

4. Определение градуировочного коэффициента. В пробирках вместимостью 10 см^3 готовят градуировочные растворы, состоящие из растворов бензойной кислоты и каприловой кислоты (внутреннего стандарта), приготовленного по п. 1 и 2. Для этого пипетками отмеривают определенные объемы рабочих растворов этих кислот (таблица 22) и перемешивают их.

Далее проводят газохроматографический анализ каждого полученного градуировочного раствора в соответствии со следующими условиями:

- объем вводимой в инжектор хроматографа пробы от $2 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^3$ (от 2 до 5 мкл);
- температура термостата – $200 \text{ }^\circ\text{C}$;
- температура детектора – $250 \text{ }^\circ\text{C}$;
- температура испарителя – $250 \text{ }^\circ\text{C}$;
- скорость потока газа-носителя (азота) – $30 \text{ см}^3/\text{мин}$;
- скорость потока водорода – $30 \text{ см}^3/\text{мин}$;
- скорость потока воздуха – $300 \text{ см}^3/\text{мин}$;
- рабочая шкала электрометра – $4 \cdot 10^{-10} \text{ А}$;
- диапазон чувствительности самописца на полную шкалу – 1 мВ ;
- скорость подачи диаграммной ленты – $10 \text{ мм}/\text{мин}$;
- время удерживания бензойной кислоты – около 6 мин;
- время удерживания каприловой кислоты – около 2 мин.

Таблица 22

**Шкала градуировочных растворов
при измерении градуировочных коэффициентов**

| Наименование показателя | Градуировочный раствор | | | |
|---|------------------------|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Объем рабочего раствора бензойной кислоты массовой концентрации $5 \text{ мг}/\text{см}^3$ | 2 | 2 | 4 | 1 |
| Объем рабочего раствора каприловой кислоты массовой концентрации $5 \text{ мг}/\text{см}^3$ | 2 | 3 | 1 | 4 |
| Концентрация бензойной кислоты в полученном градуировочном растворе, $\text{мг}/\text{см}^3$ | 2,5 | 2 | 4 | 1 |
| Концентрация каприловой кислоты в полученном градуировочном растворе, $\text{мг}/\text{см}^3$ | 2,5 | 3 | 1 | 4 |
| Масса бензойной кислоты в $5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^3$ (5 мкл) хроматографической пробы, мкг | 12,5 | 10 | 20 | 5 |
| Масса каприловой кислоты в $5 \cdot 10^{-3} \text{ см}^3$ (5 мкл) хроматографической пробы, мкг | 12,5 | 15 | 5 | 20 |

Градуировочный коэффициент f рассчитывают по формуле:

$$f = \frac{m_1 \cdot S_2}{m_2 \cdot S_1}, \quad (49)$$

где m_1 – масса бензойной кислоты, мкг;

S_2 – площадь пика каприловой кислоты, мм²;

m_2 – масса каприловой кислоты, мкг;

S_1 – площадь пика бензойной кислоты, мм².

5. Порядок выполнения измерений

Экстракция бензойной кислоты из густых продуктов (пюре, джемов, повидла и др.) Навеску пробы массой 50,0 помещают в плоскодонную колбу. Продукт разбавляют дистиллированной водой объемом 10-20 см³. Полученную смесь подщелачивают раствором гидроокиси натрия до значения рН 9-10 по универсальной индикаторной бумаге. В колбу вносят 1-2 см³ рабочего раствора каприловой кислоты, приготовленного по п. 2, в зависимости от предполагаемого содержания консерванта. Смесь помещают на кипящую водяную баню на 30 мин, после чего ее охлаждают до комнатной температуры и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 250 см³. В колбу последовательно добавляют по 10 см³ раствора Карреза 1 и Карреза 2. Содержимое в колбе доводят до метки дистиллированной водой, тщательно перемешивают и выдерживают 30 мин, после чего фильтруют через бумажный складчатый фильтр. Для анализа отбирают 50 см³ фильтрата.

Фильтрат переносят в делительную воронку, подкисляют раствором серной кислоты до значения рН=2 по универсальной индикаторной бумаге. Раствор выдерживают в течение 5-10 мин, после чего вновь проверяют значение рН и при необходимости проводят дополнительное подкисление раствора. Экстракцию проводят хлороформом трижды порциями по 50 см³, перемешивая содержимое в делительной воронке 5 мин, каждый раз отбирая нижний хлороформный слой. Объединенный экстракт обезвоживают, фильтруя его через воронку, заполненную на треть ее высоты безводным сульфатом натрия. Экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре 45 °С до сухого остатка. Остаток в отгонной колбе растворяют в 1 см³ этилового спирта. Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

Экстракция бензойной кислоты из соков и напитков. Навеску пробы массой 50,0 г, количественно переносят в делительную воронку. В воронку приливают от 0,5 до 1 см³ раствора каприловой кислоты в зависимости от предполагаемого содержания консерванта, от 10 до 20 см³ насыщенного раствора хлорида натрия и от 1 до 2 см³ этилового спирта. Подкисляют раствор до рН=2. Экстракцию проводят хлороформом трижды порциями по 50 см³, перемешивая содержимое в делительной воронке 5 мин, каждый раз отбирая нижний хлороформный слой. Объединенный экстракт обезвоживают, фильтруя его через воронку, заполненную на треть ее высоты безводным сульфатом натрия. Экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре 45 °С практически досуха. Остаток в отгонной колбе растворяют в 1 см³ этилового спирта. Полученный раствор используют для хроматографического анализа.

Хроматографический анализ. В инжектор хроматографа с помощью микрошприца вводят от $2 \cdot 10^{-3}$ до $5 \cdot 10^{-3}$ см³ (2-5 мкл) полученного экстракта и проводят хроматографический анализ при условиях, указанных в п. 3 и 4. Если пики бензойной и каприловой кислот выходят за пределы шкалы регистрирующего устройства, хроматографический анализ повторяют, вводя в инжектор меньший объем экстракта.

6. Правила обработки результатов измерений

Массовую долю бензойной кислоты или соли X , млн⁻¹(мг/кг), вычисляют по формуле:

$$X = K \frac{cVS_1 f 1000}{mS_2}, \quad (50)$$

где K – коэффициент, рассчитанный делением молярной массы соли на молярную массу кислоты: для бензоата калия $K=1,33$

для бензоата натрия $K=1,19$

для бензойной кислоты $K=1,0$;

c – концентрация каприловой кислоты, приготовленной по п.2;

V – объем каприловой кислоты, добавленный в пробу, см³;

S_1 – площадь пика бензойной кислоты, мм²;

f – градуировочный коэффициент, определенный по п.3.4;

m – масса навески пробы, г;

S_2 – площадь пика каприловой кислоты, мм².

Вычисления результатов определений проводят до первого десятичного знака. За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов двух параллельных определений, округленное до целого значения.

Лабораторная работа №4

Метод определения содержания винной кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Метод основан на определении массовой концентрации или массовой доли винной кислоты в виноградном соке с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с применением ионоэксклюзивной колонки и спектрофотометрического детектора в ультрафиолетовой области спектра.

Диапазон определения массовой концентрации (массовой доли) винной кислоты - от 1,0 до 10,0 г/дм³ (г/кг).

Средства измерения: жидкостный хроматограф, состоящий из:

- 1) насоса высокого давления с верхним пределом давления не менее 25 МПа и диапазоном регулирования подачи растворителя от 0,1 до 5 см³/мин;
- 2) петлевого устройства ввода пробы с рабочим объемом петли от 0,010 до 0,020 см³;
- 3) спектрофотометрического детектора с переменной длиной волны, позволяющего проводить измерение оптической плотности при длине волны 210 нм, снабженного проточной кварцевой кюветой

- вместимостью не более $0,01 \text{ см}^3$, с относительной погрешностью измерения оптической плотности не более 2 %;
- 4) регистрирующего устройства (самописца или интегратора), позволяющего проводить измерения при чувствительности $0,2 \text{ мВ/см}$ с погрешностью записи в рабочих условиях не более 0,5 %;
 - 5) термостата колонок, пригодного для поддержания рабочей температуры $40 \text{ }^\circ\text{C}$;
 - 6) колонки длиной 300 мм, внутренним диаметром 7,8 мм, заполненной ионоэкслюзивным сорбентом на основе сополимера стирола с дивинилбензолом с привитыми сульфогруппами в водородной форме размером частиц 10 мкм;
 - 7) предколонки, заполненной катионитом в водородной форме.

Ход работы

1. Приготовление градуировочных растворов. Готовят серию градуировочных растворов винной кислоты в диапазоне массовых концентраций от 100 до 500 мг/дм^3 . Для этого навеску винной кислоты массой 50 мг переносят в мерную колбу вместимостью 100 см^3 , растворяют в небольшом количестве воды, объем содержимого в колбе доводят до метки. Получают градуировочный раствор винной кислоты массовой концентрации 500 мг/дм^3 . Остальные градуировочные растворы готовят точным разведением первого раствора в соответствующее количество раз.

2. Проведение испытаний

Приготовление раствора пробы для хроматографического анализа. Проводят два параллельных определения. Пробу объемом $25\text{-}50 \text{ см}^3$ ($25\text{-}50 \text{ г}$) помещают в мерную колбу вместимостью 500 см^3 , добавляют около 300 см^3 горячей воды температурой $80\text{-}85 \text{ }^\circ\text{C}$, тщательно перемешивают и оставляют для охлаждения до комнатной температуры, после чего объем содержимого в колбе доводят до отметки водой, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр. Фильтрат используют для хроматографического анализа.

Хроматографический анализ. Хроматографический анализ градуировочных растворов и растворов пробы, приготовленных по п. 1 и 2, проводят при следующих условиях:

- состав подвижной фазы – раствор серной кислоты с $(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,005 \text{ моль/дм}^3$;
- скорость потока подвижной фазы – $0,6 \text{ см}^3/\text{мин}$ (для предотвращения чрезмерного давления скорость потока при кондиционировании колонки повышают постепенно, начиная с $0,2 \text{ см}^3/\text{мин}$);
- длина волны детектора – 210 нм;
- температура колонки – $40 \text{ }^\circ\text{C}$;
- объем анализируемого раствора – полное заполнение петли инжектора;
- длительность анализа – 20 мин;
- ориентировочное время удерживания винной кислоты- 10 мин.

Анализ градуировочных растворов проводят непосредственно перед анализом каждой серии растворов проб.

Регистрируют высоту пика винной кислоты.

3. Обработка и оформление результатов испытаний. По результатам анализа градуировочных растворов строят градуировочный график зависимости высоты пика винной кислоты от ее массовой концентрации.

По градуировочному графику определяют массовую концентрацию винной кислоты в растворе пробы, соответствующую высоте пика винной кислоты на хроматограмме раствора пробы.

Массовую концентрацию винной кислоты в пробе X_1 , г/дм³, вычисляют по формуле:

$$\tilde{O}_1 = \frac{\tilde{n}V_2}{V_1} \cdot 10^{-3}, \quad (51)$$

где c – массовая концентрация винной кислоты в растворе пробы, определенная по градуировочному графику, мг/дм³;

V_1 – объем приготовленного раствора по п. 2, см³;

V_2 – объем пробы, взятый для приготовления раствора пробы по п. 2, см³.

Массовую долю винной кислоты X_2 , г/кг, вычисляют по формуле:

$$X_2 = \frac{cV_1}{m} \cdot 10^{-3}, \quad (52)$$

где m – масса навески пробы, взятой для приготовления раствора пробы по п. 2, г.

Вычисления проводят до второго десятичного знака.

Контрольные вопросы

1. В чем сущность хроматографического процесса? Каким образом достигается разделение компонентов хроматографируемой смеси?
2. Каково назначение подвижной и неподвижной фаз?
3. Какие требования предъявляются к адсорбентам и растворителям?
4. Какова роль основных узлов в газовом хроматографе?
5. Как идентифицировать пятна органических соединений в методе ТСХ?
6. Как можно определить концентрации компонентов смеси после разделения методом БХ или ТСХ?
7. Как классифицируют методы хроматографии по агрегатному состоянию фаз и по способу хроматографирования?
8. Что является качественными характеристиками хроматографируемых веществ?
9. Что такое относительный удерживаемый объем и относительное время удерживания?
10. В чем сущность основных методов количественной хроматографии: а) абсолютной калибровки; б) внутреннего стандарта?
11. Как измеряется площадь пика на хроматограмме?
12. В чем состоит сущность теории эквивалентных теоретических тарелок?
13. Какие величины характеризуют эффективность хроматографической колонки?

6. ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД АНАЛИЗА

Люминесценцией называют свечение атомов, ионов, молекул и других более сложных частиц вещества, которое возникает в результате перехода в них электронов из возбужденного состояния в нормальное.

Частицы вещества, поглощая энергию, переходят в возбужденное состояние, пребывая в нем некоторое время. Затем они возвращаются в состояние покоя, отдавая при этом часть энергии возбуждения в виде квантов люминесценции. Такой переход может совершаться с излучением фотонов люминесценции или безызлучательно, путем передачи энергии окружающим частицам в виде тепла. Для возникновения люминесценции необходимо, чтобы вероятность излучательных переходов превышала вероятность безызлучательных переходов. Таким образом, явление люминесценции связано с преобразованием поглощенной частицами вещества энергии внешнего источника в энергию их собственного излучения.

Свечение, возникающее под действием световых лучей оптического диапазона ультрафиолетовых и видимых частот, носит название фотолюминесценции, которая в зависимости от вида возбужденного уровня и времени пребывания в нем подразделяется на флуоресценции и фосфоресценцию.

Флуоресценция – это вид собственного свечения вещества, которое продолжается только при облучении. Если источник возбуждения устранить, то свечение прекращается мгновенно или спустя не более 0,001 с. Флуориметрия – метод люминесцентного анализа, основанный на измерении спектров флуоресценции. Пределы обнаружения веществ флуориметрическим методом составляют 10^{-9} - 10^{-4} %.

Поглощение ультрафиолетового света определенными молекулами с легковозбуждаемыми электронами приводит к флуоресценции в видимой спектральной области. Этот процесс начинается с перехода электронов с основного энергетического уровня S_0 на более высокие энергетические уровни (S_1 и S_2). Схема процессов, происходящих при флуоресценции, приведена на диаграмме энергетических уровней (рис.18).

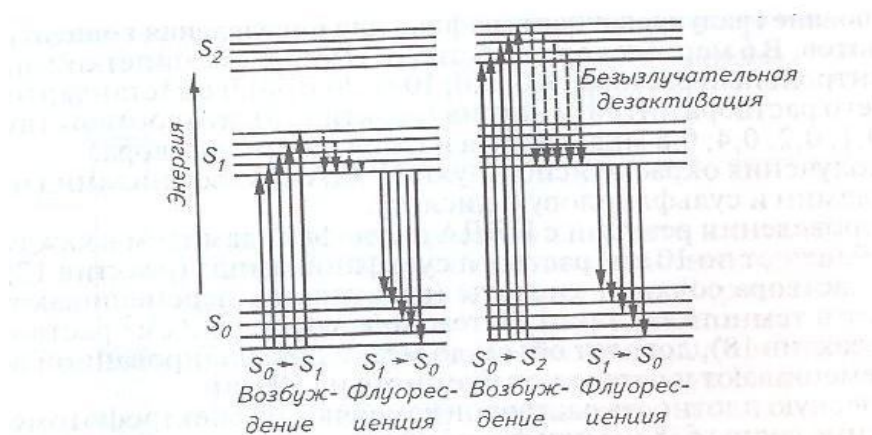


Рис. 18. Диаграмма энергетических уровней молекулы при флуоресценции

При нормальных температурах осуществляются абсорбционные переходы с низших колебательных уровней основного состояния S_0 на различные уровни возбужденных состояний S_1 и S_2 . Эмиссионные переходы – это излучательные переходы с нулевого уровня состояния S_1 на любой колебательный уровень основного состояния S_0 . Переходы с уровня S_2 (или более высоких уровней) на нулевой уровень S_1 происходит без излучения.

Деактивация без излучения, т.е. потеря энергии возбужденными молекулами без излучения света, происходит в результате межмолекулярных и внутримолекулярных взаимодействий.

Метод флуориметрии применяют для чувствительного определения очень малых количеств элементов при анализе органических веществ, при определении малых количеств витаминов, гормонов, антибиотиков, канцерогенных соединений и др. Основным преимуществом флуориметрии по сравнению с другими абсорбционными методами является высокая селективность, так как флуоресценцией обладает значительно меньшее число веществ (прежде всего ароматические соединения и порфирины). Ряд соединений можно перевести во флуоресцирующие, введя в молекулу флуоресцирующую группу, т.е. флуорофор (люминифор).

Фосфоресценцией называют собственное свечение вещества, которое продолжается после отключения возбуждающего света. Фосфориметрия – метод люминесцентного анализа, основанный на измерении спектров фосфоресценции. Пределы обнаружения веществ фосфориметрическим методом составляет 10^{-7} - 10^{-4} %.

Важным преимуществом люминесцентного анализа является простота и скорость, во много раз превосходящие скорость химического анализа. В то время как при химическом анализе анализируемые вещества разлагаются, при люминесцентном анализе они, как правило, не подвергаются изменениям и их можно использовать в дальнейшей работе.

Общее название веществ, обладающих способностью люминесцировать – **люминофоры**. Так же называются неорганические люминофоры. Сложные неорганические кристаллические люминофоры с дефектной структурой, вызванной внедрением в их кристаллическую решетку ионов тяжелых металлов (активаторов), называют кристаллофосфорами. Органические люминофоры принято называть органолюминофорами.

При возбуждении люминесценции в каждом конкретном случае следует разумно подходить к выбору источника возбуждения. Для возбуждения люминесценции жидких веществ (растворов) целесообразнее всего использовать ультрафиолетовый и видимый свет. Люминесценцию твердых веществ, например кристаллофосфоров, можно возбуждать ультрафиолетовым, видимым светом, рентгеновскими и катодными лучами.

Эффективность преобразования энергии возбуждения в энергию люминесценции характеризуют энергетическим выходом люминесценции.

Энергетический выход V_E представляет собой отношение излучаемой веществом энергии люминесценции E_L к поглощенной энергии возбуждения E_B :

$$\hat{A}' = \frac{\hat{A}_{\dot{E}}}{\hat{A}_{\hat{A}}}, \quad (53)$$

Энергетический выход пропорционален концентрации флуоресцирующего вещества (С):

$$B_{\text{Э}} = K \times C, \quad (54)$$

Однако, в области относительно высоких концентраций наблюдается явление концентрационного тушения (т.е. яркость свечения ослабляется), происходящее при увеличении доли безизлучательных переходов.

Линейная зависимость между $B_{\text{Э}}$ и С в этом случае нарушается. Таким образом, имеется концентрационный барьер, выше которого свечение не наблюдается. Если концентрация слишком высока, то раствор разбавляют, чтобы не происходило тушения.

Тушение возникает также, если в растворе много примесей, поэтому до проведения анализа продукт очищают экстракцией, хроматографией, перегонкой.

Согласно закону Стокса-Ломмеля, спектр флуоресценции и его максимум всегда сдвинуты относительно спектра поглощения и его максимума в сторону длинных волн. Это означает, что средняя энергия квантов люминесценции меньше средней энергии поглощенных квантов. Причина этого явления заключается в превращении части энергии поглощенных квантов в тепловую энергию. Поэтому вещества, поглощающие ультрафиолетовый свет, могут флуоресцировать любым светом, но вещества, флуоресценция которых возбуждается, например, синим светом, не могут светиться лиловым, а только зеленым, желтым, красным, т.е. расположенным в более длинноволновой части спектра.

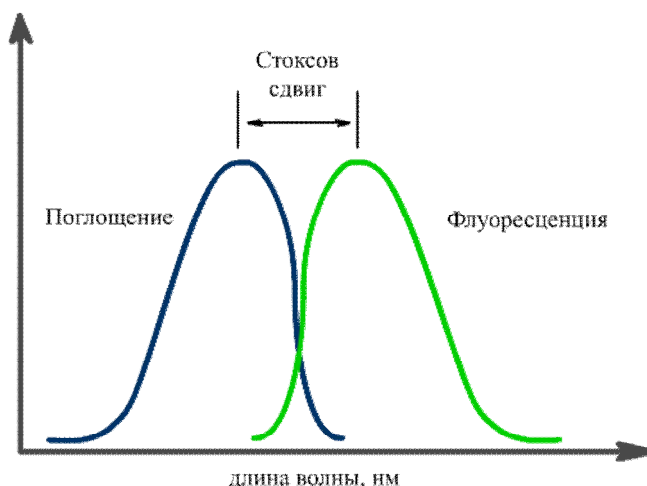


Рис. 19. Стоксовое смещение

Расстояние между максимумом спектра поглощения и максимумом спектра люминесценции называется стоксовым смещением (рис. 19). Чем больше стоксовое смещение, тем более надежно определение вещества люминесцентным методом.

Для возбуждения люминесценции веществ, поглощающих в ультрафиолетовой части спектра, применяют ртутно-кварцевые, водородные и

дейтериевые лампы, испускающие значительную часть световой мощности в этом участке спектра. Для возбуждения веществ, поглощающих видимые волны, применяют оптические лампы накаливания с малогабаритными, «точечными» спиралями. Выделение из полного светового потока излучения заданного спектрального участка, хорошо поглощаемого исследуемым соединением (и мало поглощаемого прочими люминесцирующими веществами, если они имеются), достигается применением различных оптических фильтров. Наиболее селективны интерференционные фильтры, которые могут пропускать полосу шириной всего в 10 мкм.

Приборы для измерения молекулярной флуоресценции можно разделить на флуориметры (флуорометры) и спектрофлуориметры. У флуориметров селекция монохроматических лучистых потоков осуществляется с помощью простейших анализаторов излучения — светофильтров. Использование светофильтров обеспечивает высокий уровень возбуждающего излучения и эффективную регистрацию флуоресценции. При флуориметрических измерениях существенное значение имеет выбор светофильтров. Первичный светофильтр должен пропускать поглощаемое образцом излучение и не пропускать излучение флуоресценции. Вторичный светофильтр должен пропускать излучение флуоресценции, но возбуждающее излучение должно им полностью поглощаться. Подбирая такую пару светофильтров, следует добиваться их хорошей скрещенности: сложенные вместе, они вообще не должны пропускать электромагнитное излучение. Источниками возбуждения у флуориметров являются ртутные лампы низкого давления. Принципиальная схема типового флуориметра показана на рис.20.

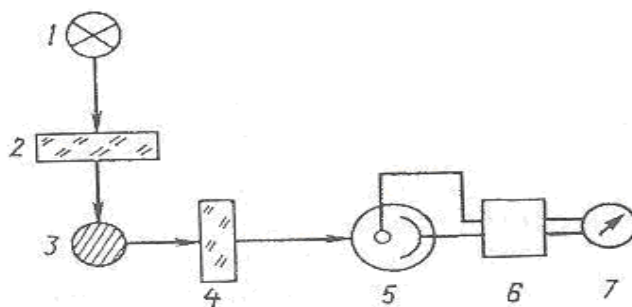


Рис. 20. Принципиальная схема флуориметра

Излучение I_0 источника I (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 .

В спектрофлуориметрах селекция монохроматических лучистых потоков осуществляется монохроматорами, а источником возбуждающего излучения служит ксеноновая дуговая лампа высокого давления, испускающая сплошной спектр в УФ-, видимой и ближней ИК-области. Спектрофлуориметры позволяют регистрировать как спектры флуоресценции, так и спектры ее возбуждения. Для получения спектра возбуждения вторичный монохроматор

излучения настраивают на частоту (длину волны), соответствующую максимуму флуоресценции, а первичным меняют частоту (длину волны) возбуждающего излучения. Для получения спектров флуоресценции первичный монохроматор излучения настраивают на частоту (длину волны), соответствующую максимуму возбуждения, а вторичным меняют частоту (длину волны) флуоресценции.

Кюветы, применяемые при измерении спектров флуоресценции жидких образцов (растворов) представляют собой прямоугольные или треугольные в сечении стаканы или обычные пробирки, изготовленные из оптического кварца. При измерении спектров флуоресценции жидких образцов используют кюветы в виде капилляров или тонких трубок с внутренним диаметром 1–2 мм. Твердые порошкообразные образцы помещают в специальные насыпные кюветы.

В люминесцентных спектральных приборах детекторами излучения, испускаемого оптически возбужденными атомами и молекулами, чаще всего служат фотоумножители, реже – фотоэлементы и фотодиоды.

Качественный люминесцентный анализ основан на различии цвета люминесценции, производимой веществами разной химической природы и используется для визуального наблюдения за цветом люминесценции. В качестве источника ультрафиолетового света может быть использован лабораторный флуориметр или осветитель ВЮ-1, а в качестве объекта наблюдения – люминесцирующие индикаторы, которые добавляют к испытываемому продукту.

Количественный люминесцентный анализ заключается в построении с помощью эталонных растворов градуировочного графика в координатах: концентрация раствора в мкг/см^3 – абсцисса, относительная интенсивность флуоресценции – ордината; и нахождении по графику искомой концентрации.

Люминесцентный анализ применяется для установления порчи и фальсификации пищевых продуктов, для определения примеси к продуктам ядохимикатов и канцерогенных веществ, для определения витаминов.

Люминесцентные методы исследования позволяют определять начальные степени порчи пищевых продуктов, когда еще нет органолептических изменений. Это имеет большое гигиеническое и экономическое значение, давая возможность быстро сделать заключение о качестве продукта, позволяет своевременно реализовать продукт, не допуская дальнейшей порчи, и тем самым предупредить возникновение пищевых отравлений.

Лабораторная работа №1

Определение доброкачественности пищевых продуктов по показателям люминесценции

Методика исследования

Методика люминесцентного исследования заключается в том, что испытываемый продукт помещают в поток ультрафиолетовых лучей и наблюдают явление люминесценции. Отмечают ее цвет, интенсивность, однородность.

Плотные объекты рассматривают на черном листе бумаги, фаянсовой тарелке или стеклянной пластинке из нефлюоресцирующего стекла. Жидкие вещества исследуют в пробирках из нефлюоресцирующего стекла. Для этого заранее отбирают такие пробирки путем проверки под осветителем. Необходимо проверить также все реактивы на наличие флюоресценции.

Начинать освоение люминесцентных методов исследования лучше всего с наиболее показательных проб, дающих яркое и отчетливое свечение. Хорошие результаты в этом отношении дает сравнение натурального растительного масла с таким же, имеющим примесь минерального масла, а также сравнение маргарина со сливочным маслом. Для исключения ошибок рекомендуется проводить исследования с контролем (с заведомо натуральным продуктом или образцом, содержащим известное количество добавки). Исследуемый продукт помещают на расстоянии 5 – 10 – 15 см от осветителя.

Исследование растительных масел

10 мл масла наливают в пробирку из нефлюоресцирующего стекла и помещают в поток ультрафиолетовых лучей. Смотреть можно в проходящем и отраженном свете. Натуральные растительные масла обладают специфической люминесценцией: подсолнечное масло дает слабую люминесценцию желто-зеленого цвета, льняное — бледно-голубого цвета, оливковое -светло-синего цвета. Минеральные масла (вазелиновое, трансформаторное, машинные и др.), флюоресцируют ярко-голубым цветом. Поэтому примесь 1–2 % минеральных масел к растительным меняет цвет флюоресценции с желто-зеленого на голубой.

Исследование маргарина и сливочного масла

Пробы исследуемого масла или маргарина в виде кусочка размером 3 X 4 см помещают на фарфоровую тарелку и освещают ультрафиолетовыми лучами. На темно-фиолетовом фоне (свечение тарелки) сливочное масло светится желтым цветом, а маргарин дает бело-голубое свечение.

Можно исследовать и расплавленные жиры. Для этого их наливают в пробирки из нефлюоресцирующего стекла и наблюдают в потоке ультрафиолетовых лучей как сверху, так и сбоку. Сливочное масло светится желтым цветом, а маргарин – голубым с розоватым оттенком.

Определение вида жира в гарнирах, кондитерских изделиях

Необходимость разработки люминесцентного метода определения вида жира в гарнирах объясняется тем, что существующие физико-химические методы весьма трудоемки и длительны, требуют высокой квалификации лаборанта и сравнительно большого количества жира.

Люминесцентный метод определения вида жира в гарнирах позволяет одномоментно исследовать большое количество проб в короткие сроки. На одно определение затрачивается не больше 10 мин, причем исследование можно производить непосредственно на пищевом объекте. В большую пробирку помещают 10–20 г гарнира либо столько же печенья, либо 5–6 капель расплавленного крема, заливают 20 мл эфира (для крема – 5 мл), закрывают пробкой и встряхивают в течение 2–3 мин. Эфир сливают в другую пробирку,

добавляют 5–10 мл дистиллированной воды, встряхивают и после полного разделения водного и эфирного слоев рассматривают под ультрафиолетовыми лучами в затемненном месте.

При наличии в гарнире только сливочного масла эфирный слой в пробирке дает зеленовато-желтую люминесценцию. Маргарин в гарнире люминесцирует голубоватым цветом без оттенков. В случае примеси маргарина к сливочному маслу цвет вытяжки — зеленовато-голубой.

Для исключения возможной ошибки и приобретения определенного навыка пробу рекомендуется исследовать с контролем. В качестве контроля берут в одну пробирку 2 капли расплавленного сливочного масла, в другую — столько же маргарина. Обработка эфиром и водой производится так же, как и у исследуемых проб.

Исследование фритюрных растительных масел

Известно, что в зависимости от температуры и продолжительности нагревания жира образуются продукты окисления и сополимеризации, оказывающие токсическое и канцерогенное действие. В связи с этим необходимо проводить санитарно-гигиенический контроль за качеством фритюра. Для этой цели предложены различные методы. Однако все они являются довольно трудоемкими. Нами разработан ориентировочный люминесцентный метод, который можно использовать в качестве подсобного.

В пробирку из нефлюоресцирующего стекла наливают 3 – 4 мл исследуемого жира, добавляют столько же воды и 3 – 4 капли 10 % раствора аммиака. Смесь в пробирке хорошо встряхивают и оставляют в штативе до ясного разделения водного и жирового слоев, а затем помещают в поток ультрафиолетовых лучей. При наличии в перегретых жирах окисленных веществ от 0,64 % и выше появляется голубое свечение водного слоя, усиливающееся по мере увеличения количества продуктов окисления.

Определение вида и свежести мяса

Мясо относится к категории скоропортящихся продуктов, поэтому оно подлежит постоянному санитарному контролю. Рекомендуемые ГОСТ объективные методы исследования свежести мяса весьма трудоемки и недостаточно точны (ГОСТ 7269-54). Расхождение результатов при исследовании этими методами достигает 25 % и больше.

Наиболее простым методом определения вида мяса и степени порчи является люминесцентный. Люминесцентным методом можно исследовать как непосредственно пробы мяса, так и водные вытяжки из него.

Для исследования кусочки мяса размером примерно 10 X 8 см помещают на фарфоровую тарелку или темную бумагу и освещают ультрафиолетовыми лучами сверху. При исследовании мясных экстрактов измельчают 10 г мяса, помещают в колбу и заливают 50 мл дистиллированной воды. Настаивают 10 мин, периодически взбалтывая, фильтруют и фильтрат рассматривают в ультрафиолетовых лучах.

При начальной стадии порчи мяса флюоресценция мышечных волокон утрачивает характерную бархатистость и приобретает более темный фон

свечения. На общем темном фоне свечения появляются специфически светящиеся колонии гнилостных бактерий. Явно несвежее мясо имеет тусклую флюоресценцию бордового цвета со сплошным налетом зеленовато-желтого или зеленовато-голубого цвета (табл. 23).

При определении вида мяса необходимо использовать заведомо свежие образцы его. Исследование проводят по описанной выше методике. Данные для оценки приведены в таблице 24.

Люминесцентным методом можно определить также зараженность мяса некоторыми гельминтами. Финны бычьего и свиного цепней флюоресцируют розовым цветом.

Люминесцентный метод может быть использован для проведения ветеринарно-санитарной экспертизы мяса свиней, болевших чумой или паратифом. Мясо таких животных флюоресцирует молочно-голубым цветом, а мясо животных, болевших рожей, — серым цветом.

Таблица 23

Показатели свежести говяжьего мяса

| Степень свежести мяса | Цвет люминесценции | |
|------------------------------------|--|----------------------|
| | Мышечных тканей | Мясного экстракта |
| Свежее | Бархатистый темно-красный | Темный желто-зеленый |
| Мясо с начальными признаками порчи | Более темный фон свечения с единичными светящимися точками | Зеленовато-голубой |
| Мясо несвежее | Тусклый бордовый неравномерный с множественными светящимися зеленоватыми пятнами | Голубой |

Таблица 24

Флюоресценция отдельных видов мяса и разных тканей

| Вид мяса | Цвет флюоресценции |
|--|--|
| Говядина | Темно-красный или красновато-фиолетовый с бархатистым и бурым оттенком |
| Баранина | Темно-коричневый |
| Свинина | Розовый с коричневым оттенком |
| Телятина | Светло-коричневый |
| Конина | Темно-коричневый с ржавым оттенком |
| Кости и соединительнотканые образования (сухожилия, фасции, хрящи) | Светло-голубой |
| Жировая ткань | Светло-желтый |

Определение качества рыбы

Определение качества рыбы представляет определенные трудности. С помощью химических методов исследования не всегда можно обнаружить начальные признаки порчи, а органолептические методы являются

субъективными. После кулинарной и термической обработки, когда исчезает дряблость мышц, ослизнение и ослабляется гнилостный запах, определить качество исходного продукта еще труднее. В этих случаях может быть использован люминесцентный метод. Он дает возможность определить и качество исходного продукта в кулинарных изделиях, поскольку кулинарная обработка рыбы практически не изменяет характера ее первоначальной флюоресценции. Рыбу рассматривают в ультрафиолетовых лучах как с поверхности, так и на разрезе. Можно исследовать также водные вытяжки из мышц, которые готовят так же, как и мясные экстракты.

Оценка результатов исследования может быть произведена по следующим данным.

Свежая парная рыба. Поверхность тела флюоресцирует слабым серым цветом с хорошо заметным фиолетовым оттенком, причем непигментированные участки тела имеют светло-фиолетовый цвет, а пигментированные – более темный фиолетовый оттенок свечения. Жаберные дуги и глаза почти не флюоресцируют. Мышцы на разрезе флюоресцируют голубовато-сиреневым цветом, иногда с желтым оттенком, кровь в сосудах имеет темно-коричневое свечение. Водные экстракты флюоресцируют бледно-голубым или синеватым цветом, иногда с желтым оттенком.

Лежальная, но допустимая в пищу рыба. Флюоресцирует интенсивно-белым цветом с голубоватым оттенком. Картина свечения несколько напоминает цвет снега в солнечных лучах.

Рыба сомнительной свежести. На поверхности тела в области жабер, плавников и брюшка имеются пятна, флюоресцирующие желтым, зеленым и голубым цветом. Мышцы на разрезе флюоресцируют сиреневым цветом со слабо-желтым оттенком. Кровь в сосудах приобретает коричнево-оранжевое свечение.

Рыба с признаками порчи. Поверхность тела покрыта многочисленными пятнами и полосами ярко-желтого цвета. Мышцы на разрезе имеют разные оттенки. Поверхностные мышцы флюоресцируют фиолетовым цветом, а глубоко лежащие — синим цветом с желто-зеленым оттенком. Кровь в сосудах флюоресцирует оранжевым цветом. При дальнейшей порче в цвете флюоресценции начинают преобладать оранжевые и красные тона.

Испорченная рыба. Жабры флюоресцируют ярко красным цветом, а на мышцах появляются ярко-оранжевые или красновато-желтые пятна. Местами на разрезах бывают пятна ярко-желтого цвета.

По мере порчи рыбы свечение экстрактов из мышц приобретает зеленовато-желтые тона; интенсивность свечения возрастает с ухудшением качества продукта.

Дефростированная рыба. При люминесценции имеет некоторые отличия в оттенках флюоресценции по сравнению с парной рыбой:

а) в глубине мышц доброкачественной размороженной рыбы иногда встречаются единичные пятна, дающие оранжевое свечение, что в парной рыбе служит показателем порчи;

б) лежащая дефростированная рыба светится более насыщенным синеголубым цветом, хотя иногда свечение остается таким же, как у незамороженной рыбы;

в) в некоторых случаях начальной стадии порчи дефростированной рыбы типичные пятна ярко-желтого цвета заменяются менее яркими серовато-желтыми участками или сплошным свечением того же цвета.

Сельди. Поверхностные покровы доброкачественных сельдей светятся фиолетовым цветом; у сельдей сомнительной свежести на поверхности тела появляются пятна, флюоресцирующие белым или желтым цветом. Водные экстракты из доброкачественных сельдей светятся светло-голубым цветом. По мере порчи сельдей свечение экстрактов становится более интенсивным.

Исследование рыбы на пораженность плероцеркоидами широкого лентеца. Плероцеркоид представляет собой личиночную форму широкого лентеца и паразитирует в тканях некоторых видов рыбы, которые являются промежуточными хозяевами этого гельминта. В некоторых водоемах пораженность рыбы плероцеркоидами достигает 100 %. Чаще всего поражаются щуки и налимы (97 – 100 %), несколько реже – ерши (87 %) и окуни (40 %).

Для исследования рекомендуется брать из каждого водоема по 15 экземпляров щук и налимов и по 30 – окуней и ершей. При вскрытии рыбы плероцеркоиды, имеющие беловато-молочный цвет, длину около 1 – 2 см и ширину до 2 – 3 мм, хорошо видны невооруженным глазом на внутренних органах и при послойном разрезе в мышцах. Выделенные плероцеркоиды, помещенные в теплый физиологический раствор (30°), начинают двигаться.

Применение люминесцентного метода значительно облегчает и ускоряет исследование, позволяет сделать результаты анализа более точными. Например, с помощью лупы удастся обнаружить в одном налиме до 30 – 50 плероцеркоидов, а люминесцентным методом в том же экземпляре – до 150.

Для исследования разрезанную рыбу помещают в поток ультрафиолетовых лучей в затемненной комнате. Плероцеркоиды при этом имеют вид белоснежных светящихся пятен с легким зеленовато-голубым оттенком по краям.

Исследование творога

Творог, приготовленный в нормальных условиях из натурального молока, дает беловато-желтоватую флюоресценцию, творог, приготовленный из снятого молока, а также хранившийся в жестяной таре, — флюоресценцию белого цвета с синевато-фиолетовым оттенком. Если же творог имеет бактериальное загрязнение, то на его поверхности видны светящиеся точки разного цвета, величиной с булавочную головку. Использование такого творога в сыром виде не допускается.

Исследование сыра

Люминесцентный метод пригоден для контроля за созреванием сыров. Несозревший сыр флюоресцирует матово-желтым цветом. По мере его созревания свечение приобретает синеватый оттенок, который у созревших

сыров становится почти фиолетовым. Плесневые грибки в сыре легко определить по яркой флюоресценции зеленого, черного и желтого цвета.

Исследование яиц

Люминесцентный метод исследования может быть использован дополнительно к овоскопированию для определения качества яиц. Совершенно свежие яйца при исследований в течение 24 ч после получения от кур светятся в потоке ультрафиолетовых лучей нежным бархатисто-розовым цветом. Со 2-го дня хранения (в холодильнике, складе и комнате) две трети яиц дают более красное свечение с легким фиолетовым оттенком. Такой цвет сохраняется без изменений до 4-го дня хранения. С 5-го дня отмечается усиление фиолетового цвета, которое продолжается до 9-го дня. Начиная с 10-го дня цвет люминесценции яиц становится темно-фиолетовым. При дальнейшем хранении особых изменений в свечении не наблюдается. Яйца, зараженные брюшнотифозными бактериями, флюоресцируют бледно-фиолетовым цветом.

Исследование муки

Люминесцентный метод исследования может быть использован для распознавания различных видов и сортов муки, ее загрязненности спорыньей, зараженности различными клещами и т. п. Благодаря различному свечению можно определить также примесь одного вида муки к другому (табл. 25).

Таблица 25

Флюоресценция муки

| № п/п | Вид муки | Цвет флюоресценции |
|--------------|-----------------|-----------------------------|
| 1 | Пшеничная | Синий |
| 2 | Ржаная | Светло-синий |
| 3 | Ячменная | Белый |
| 4 | Гороховая | Розовый |
| 5 | Гречневая | Синий |
| 6 | Соевая | Желто-зеленый |
| 7 | Бобовая | Сине-зеленый |
| 8 | Картофельная | Коричневый с серым оттенком |

Оболочка зерна дает более интенсивную синюю флюоресценцию, чем внутренний слой, поэтому как пшеничная, так и ржаная мука с большим содержанием отрубей светится более ярким синим цветом. Примесь спорыньи обнаруживается по ее фиолетовому мерцающему свечению. Отдельные частицы спорыньи светятся темным желто-оранжевым цветом.

Исследование фруктовых соков и вин

Натуральный фруктовый сок при облучении ультрафиолетовыми лучами не флюоресцирует. При добавлении к нему искусственных эссенций появляется свечение.

Натуральные виноградные вина также не флюоресцируют, а плодово-ягодные дают фиолетовую флюоресценцию. Примесь плодово-ягодных вин к виноградным обнаруживается по флюоресценции фиолетовой окраски.

Оценка качества фруктов

Люминесцентный метод чаще всего применяется для исследования цитрусовых плодов. Прежде всего этим методом удается выявить ранние стадии поражения у подмороженных плодов.

Так, здоровые апельсины и лимоны флюоресцируют желтым цветом с голубым оттенком. У подмороженных апельсинов цвет флюоресценции становится оранжевым с фиолетовым оттенком, а у лимонов приобретает матовый оттенок.

Свежие мандарины флюоресцируют темно-оранжевым цветом с фиолетовым оттенком, у подмороженных оттенок свечения меняется на голубой. Омертвевшие участки плода светятся матово-желтым цветом.

Люминесцентным методом хорошо выявляются также грибковые поражения цитрусовых. Пораженные голубой плесенью участки плодов флюоресцируют сине-голубым цветом, причем интенсивность свечения зависит от степени поражения. Очаги поражения у апельсинов флюоресцируют темно-синим цветом с голубым ободком и широким желтым окаймлением. Начальные стадии поражения лимонов обнаруживаются в виде отдельных флюоресцирующих точек синего или голубого цвета. Более поздние стадии характеризуются такими же изменениями цвета флюоресценции, как у апельсинов. У пораженных плесенью мандаринов вокруг очага поражения флюоресцирует широкая полоса ярко-желтого цвета.

Исследование картофеля

Люминесцентный метод может быть использован для определения ранних стадий поражения клубней картофеля морозом задолго до того, как поражение становится заметным при обычном осмотре. Здоровые клубни на срезе обычно флюоресцируют желтым или серым цветом с разными оттенками в зависимости от сорта картофеля. При повреждении картофеля флюоресценция приобретает отчетливо выделяющийся белесоватый оттенок.

Люминесцентный метод позволяет также определять поражение клубней фитофторой задолго до появления видимых признаков поражения. Поврежденные фитофторой клубни в местах поражения флюоресцируют голубым цветом. Флюоресцирующие пятна могут быть одиночными или разбросанными по клубню.

Люминесцентный метод применяется и для диагностики поражения клубней картофеля вирусными заболеваниями. Установлено, что клубни картофеля, пораженные мозаичным вирусом, в ультрафиолетовых лучах приобретают характерное свечение. Так, если здоровые клубни картофеля сорта Лорх обладают флюоресценцией серовато-зеленого цвета, то клубни того же сорта, пораженные вирусом, светятся желтым цветом.

Лабораторная работа №2

Исследование продуктов на содержание ядохимикатов

В целях организации систематического контроля за остаточными количествами ядохимикатов в пищевых продуктах, кроме химических реакций, могут быть использованы и приведенные ниже люминесцентные методы.

Обнаружение хлорофоса

Для исследования берут водные смывы с пищевых продуктов. В пробирку помещают 5 мл водного смыва, приливают 0,2 мл 1 % раствора резорцина в 1 % растворе едкого натра и нагревают на спиртовке до кипения. После охлаждения под краном пробирку помещают в поток ультрафиолетовых лучей. При наличии хлорофоса в смывах содержимое пробирки флюоресцирует желтым цветом. При отсутствии хлорофоса флюоресценции не наблюдается.

Обнаружение севина (на поверхностях, во фруктах, в хлопковом масле)

В связи с высокой токсичностью севина реализация пищевых продуктов с остаточными количествами его запрещена (письмо ГСИ Министерства здравоохранения РСФСР от 12/V 1970 г. № 08 (6-851)). Поэтому для практических целей достаточно лишь качественной реакции на севин.

С поверхности инвентаря, оборудования, листьев растений, плодов и с кожи рук делают смыв ватным тампоном, укрепленным на спичке или палочке и смоченным 0,1 н раствором едкого натра в 50 % этиловом спирте. Для этого поверхность исследуемого объекта протирают, совершая 10 – 15 встречных движений. При наличии севина тампон, помещенный затем в поток ультрафиолетовых лучей, светится зеленовато-голубым цветом, при отсутствии севина – темно-фиолетовым. Реакция специфична. Исследование занимает 3–5 мин. Чувствительность метода – 0,05 мкг севина в пробе .

Сухие или свежие фрукты (100 г) измельчают, помещают в склянку с притертой пробкой, заливают бензолом с таким расчетом, чтобы навеска продукта была полностью покрыта, и взбалтывают в течение 5 – 10 мин. В пробирку наливают 10 мл полученной бензольной вытяжки, приливают 5 мл 0,1 н водного раствора едкого натра и энергично встряхивают в течение 30 с. После расслоения бензольного и водного слоев пробирку помещают в поток ультрафиолетовых лучей. При наличии севина нижний водно-щелочной слой люминесцирует ярким зеленовато-голубым цветом. Чувствительность метода – 0,5 мкг севина в пробе.

Хлопковое масло (100 г) помещают в делительную воронку, приливают 100 мл бутилового спирта и энергично встряхивают в течение 30 с. После этого в воронку приливают 25 мл 1 н водного раствора едкого натра, содержимое воронки осторожно перемешивают в течение 30 с. После расслоения жидкостей нижний водно-щелочной слой сливают в пробирку и помещают в поток ультрафиолетовых лучей. При наличии севина содержимое пробирки люминесцирует отчетливым зеленовато-голубым цветом. Чувствительность метода – 0,5 мкг севина в пробе.

Обнаружение медьсодержащих ядохимикатов

Наличие в продуктах медьсодержащих ядохимикатов может быть установлено с помощью хемилюминесцентной реакции, т. е. химической реакции, идущей с выделением света.

В небольшую фарфоровую чашку помещают 65 мл водного смыва с исследуемого объекта и добавляют 3 капли аммиака. Через 3 мин в жидкость погружают люминольную бумажку и добавляют 2 капли пергидроля. При наличии медьсодержащих ядохимикатов (сульфат меди, трихлорфенолят меди, парижская зелень и др.) возникает устойчивое (в течение 1 – 2 мин) голубое свечение люминольной бумажки, видимое в темноте. Чувствительность метода – 2 мкг в 5 мл смыва.

Вместо индикаторных бумажек может быть использован раствор люминола. В этом случае при наличии медьсодержащих ядохимикатов светится весь раствор.

Реакцию можно проводить также и без приготовления водного смыва. Ватным тампоном, смоченным 10 % раствором аммиака, протирают поверхность объекта исследования (яблока, листьев растений и др.). На этот тампон наносят 2 – 3 капли раствора люминола и 1 – 2 капли пергидроля. Появление голубого свечения (в темноте) укажет на наличие медьсодержащих ядохимикатов.

Контрольные вопросы

1. Что называют люминесцентным излучением и какова его природа?
2. Какие виды люминесценции различают в зависимости от способа возбуждения?
3. Что такое квантовый выход в люминесценции и как он влияет на чувствительность анализа?
4. Как определяют концентрацию исследуемого вещества в люминесцентном анализе?
5. Что характеризуют энергетическим выходом люминесценции?
6. Какова зависимость между энергетическим выходом и концентрацией флуоресцирующего вещества?
7. В каких случаях наблюдается явление концентрационного тушения?
8. В чем сущность закона Стокса-Ломмеля?
9. Что такое стоксовое смещение?
10. Приведите примеры качественных определений пищевых продуктов методом люминесценции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Крусь, Г.Н. Методы исследования молока и молочных продуктов / Г.Н. Крусь, А.М. Шалыгина, З.В. Волокитина; под общ. ред. А.М. Шалыгиной. – М.: Колосс, 2002. – 368 с.
2. Арутюнян, Н.С. Лабораторный практикум по химии жиров / Н.С. Арутюнян, Е.П. Корнена, Е.В. Мартовщук; под ред. проф. Н.С. Арутюняна и проф. Е.П. Корненой. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 264 с.
3. 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.
4. Скуратовская, О.Д. Контроль качества продукции физико-химическими методами. Мучные кондитерские изделия / О.Д. Скуратовская. – М.: ДеЛи принт, 2001. – 141 с.
5. Барсукова, З.А. Аналитическая химия: Учебник для техникумов / З.А. Барсукова. – М.: Высшая школа, 1990. – 320 с.
6. Антипова, Л.В., Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. – М.: Колос, 2001. – 376 с.
7. Булатов, М.И. Практическое руководство по физико-химическим методам анализа / М.И. Булатов, И.П. Калинин. – Л.: Химия, 1986, 378 с.
8. Васильев, В.П. Аналитическая химия: в 2 т./ В.П. Васильев. – М.: Высшая школа, 1989. Т. 1, 2
10. Дорохова, Е.Н. Аналитическая химия. Физико-химические методы анализе / Е.Н. Дорохова, Г.В.Прохорова. – М.: Высшая школа, 1991. – 256 с.
13. Лебедева, М.И. Лабораторный практикум по физико-химическим методам анализа / М.И. Лебедева, Б.И. Исаева. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-т, 1996. – 105 с.
14. Лебедева, М.И. Практикум по аналитической химии / М.И. Лебедева, Б.И. Исаева и др. – Тамбов: Изд-во Тамб. гос. техн. ун-та, 2002. – 79 с.
17. Попечителей, Е.П. Аналитические исследования в медицине, биологии и экологии / Е.П. Попечителей. М.: Высшая школа, 2003. – 279 с.
18. Практикум по физико-химическим методам анализа / Под ред. О.М. Петрухина. – М.: Химия, 1987. – 245 с.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|----|
| Введение | 3 |
| 1. Спектроскопические методы анализа | 4 |
| <i>Лабораторная работа №1. Определение массовой доли общего сахара ускоренным отозлектроколориметрическим методом с раствором бихромата калия</i> | 12 |
| <i>Лабораторная работа №2. Определение содержания железа в молоке и молочных продуктах</i> | 15 |
| <i>Лабораторная работа №3. Определение массовой доли лактозы методом Лоренса</i> | 19 |
| <i>Лабораторная работа №4. Определение массовой доли карбонильных соединений</i> | 20 |
| 2. Рефрактометрический метод анализа | 22 |
| <i>Лабораторная работа №1. Определение состава смеси глицерин-вода</i> | 25 |
| <i>Лабораторная работа №2. Определение массовой доли жира рефрактометрическим методом</i> | 25 |
| <i>Лабораторная №3. Определение актозы в молоке</i> | 29 |
| <i>Лабораторная работа №4. Определение содержания сухих веществ в плодово-ягодных напитках</i> | 30 |
| <i>Лабораторная работа №5. Определение массовой доли сахарозы в молочных смесях</i> | 31 |
| 3. Вольтамперометрический метод анализа | 33 |
| <i>Лабораторная работа №1. Полярографический метод определения меди в пищевых продуктах</i> | 37 |
| <i>Лабораторная работа №2. Вольтамперометрический метод определения массовой концентрации витамина С</i> | 41 |
| 4. Потенциометрический метод анализа | 50 |
| <i>Лабораторная работа №1. Определение кислотности и щелочности потенциометрическим методом</i> | 52 |
| <i>Лабораторная №2. Определение массовой доли хлоридов в мясе и мясных продуктах</i> | 53 |
| <i>Лабораторная работа №3. Определение активной кислотности молочных продуктов для детского питания</i> | 55 |
| <i>Лабораторная работа №4. Определение массовой концентрации фторидов в питьевой воде</i> | 57 |
| 5. Хроматографический метод анализа | 61 |
| <i>Лабораторная работа №1. Разделение смеси аминокислот</i> | 74 |
| <i>Лабораторная работа №2. Хроматографический анализ спиртов</i> | 77 |
| <i>Лабораторная работа №3. Газохроматографический метод определения содержания бензойной кислоты</i> | 78 |
| <i>Лабораторная работа №4. Метод определения содержания винной кислоты с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии</i> | 82 |
| 6. Люминесцентный метод анализа | 85 |
| <i>Лабораторная работа №1. Определение доброкачественности пищевых</i> | |

| | |
|---|----|
| продуктов по показателям люминесценции..... | 89 |
| <i>Лабораторная работа №2. Исследование продуктов на содержание</i> <i>ядохимикатов.....</i> | 97 |
| Список литературы | 99 |

Учебное издание

Башкеева Галина Евгеньевна

Мухаметчина Наиля Усмановна
кандидат биологических наук, доцент

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
АНАЛИЗА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ**
УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

Корректор Белова И.М.
Худ. редактор Фёдорова Л.Г.

Сдано в набор 03.03.15.
Подписано в печать 12.03.15.
Бумага писчая. Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 6,4. Тираж 100.
Заказ № 47.

НХТИ ФГБОУ ВПО «КНИТУ»,
г. Нижнекамск, 423570, ул. 30 лет Победы, д. 5а.